INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
Dr. rer. nat.
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin Katja Parsche
aus Lörrach

Tag der mündlichen Prüfung:

Interaktionen von Papillomviren mit Zellen

Gutachter: PD Dr. Martin Müller
Prof. Dr. Lutz Gissmann

Wally, Theresia und Rudolf Parsche gewidmet

Danksagung

Herrn PD Dr. Martin Müller danke ich für die engagierte Betreuung, die Übernahme des Gutachtens sowie den unerschöpflichen Vorrat an hervorragenden Baculo-Virusstöcken, Expessionsplasmiden und Mikroorganismen, den ich für die Bearbeitung des Themas nutzen konnte. Mein Dank gilt Herrn Professor Lutz Gissmann für die Übernahme des Gutachtens. Nicht zu vergessen, die fortwährende freundliche Unterstützung die mein Projekt durch Reagenzien, Geräte und Diskussionen aus der Abteilung Gissmann erhalten hat.

Herrn PD Dr. Martin Müller und Herrn Professor Lutz Gissmann möchte ich noch einmal für die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes in den Pfizer R&D Laboratories danken. Dort gebührt mein Dank Frau Dr. Tanya Parkinson, Herrn Dr. Manos Perros und allen Kollegen die mich ganz wesentlich bei der Arbeit unterstützt haben.
Für die Unterstützung bei den Syndecan-Experimenten möchte ich mich bei Herrn Professor Rainer Zawatzky, Anita und Heribert bedanken. Darüber hinaus für die ständige Gesprächsbereitschaft und Hilfe die ich aus diesem Labor erhalten habe.

Meinen Kollegen aus dem Labor 1219, Dr. Janina Görnemann, Dr. Stephanie Mattil, Dr. Nico Michel, Dr. Henrik Michaely, Dr. Marcel Jung und Georg Pougialis möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für ihre freundliche, stetige und überaus kompetente Unterstützung danken.
Dr. Christoph Gänzler und Dr. Peter Sehr danke ich für die wertvollen Tipps bei FPLC und PC sowie die unermüdliche Auseinandersetzung mit der kanadischen French Press. Dem gesamten Pawlita-Labor gilt ein herzlicher Dank.
Ebenso herzlich möchte ich mich bei den Kollegen aus dem Gissmann-Labor, Dr. E-J Freyschmidt, Dr. H. Guthöhrlein, Dr. E. Glasstetter, Dr. T. Peiler, Dr. K. Schäfer, Dr. T Steinberg, B. Aengeneydt und A. Henn, bedanken.

Professor Dr. Michael Pawlita und Dr. Janina Görnemann möchte ich für die Etaterweiterung im Frühjahr 2002 danken, Birgit Hub für die unermüdliche Begutachtung der EM Präparate und Professor Dr. Zentgraf für die Optimierung der Viruspräparate.

Dem „Ott-Lab“ gilt ein genauso herzlicher Dank! Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Wowra, Uli und Katja, bedanken, die die Weihnachtsschicht 2003 übernahmen, um mir die zeitraubende Auswertung der FPLC Daten zu ermöglichen. Besonderer Dank gilt Luise Kühne und Dr. Christian Oehler.

Frau Professor C. Sautés und Herrn Dr. J. Solal danke ich für die Expressionsplasmide der Fc-Rezeptoren und die engagierte Diskussion der Daten. Herrn Professor A. Sonnenberg danke ich besonders für die Übersendung der K562 Zellen, Antikörper und der Integrin-Expressionsplasmide. Frau Professor S. Campo möchte ich für die Bereitstellung der BPV-2 Referenz-DNA danken.

Sehr herzlich möchte ich auch Holger danken, für seinen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Schließlich und vor allem danke ich meiner Familie und Ursula & Helmut Schiefer auf deren tatkräftige Unterstützung ich jederzeit zählen konnte.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 11. Januar 1999 bis zum 11. April 2002 am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Heidelberg, den 12. Oktober 2006

Katja Parsche

I. Inhaltsverzeichnis

Titelblätter ..... I - IV
Danksagung III
I. Inhaltsverzeichnis V
III. Abbildungsverzeichnis IX
II. Tabellenverzeichnis X
IV. Abkürzungsverzeichnis XI
V. Zusammenfassung XIII
V. Summary in English XIV

1 Einleitung 1
1.5 Zielsetzung der Arbeit 16
2 Material und Methoden 17
3 Ergebnisse 49
4 Diskussion 111
4.12 Ausblick 126
5 Literaturverzeichnis 127
6 Appendix 137
6.1 Tagungsbeiträge 137

Kapitel 1 Einleitung 1

1.1 Humane Papillomviren 1
1.1.1 Einführung 1
1.1.2 Wirtstropismus 3
1.1.3 Die virale Replikation 3
1.2 Struktur und Aufbau der Papillomviren 4
1.2.1 Aufbau und Eigenschaften des Virusgenoms und der viralen Kontrollregion (LCR) 4
1.2.2 Die Produkte der frühen PV-Gene (E1-E7)– Early Region 5
1.2.2.1 Die Proteine E1, E2 und E4 5
1.2.2.2 Die Proteine E5, E6 und E7 6
1.2.3 Strukturproteine, die Produkte der späten PV-Gene L1 und L2 7
1.2.3.1 Das Papillomvirus-Nebenkapsidprotein L2 7
1.2.3.2 Das Papillomvirus-Hauptkapsidprotein L1 8
1.3 In vitro Systeme zur Herstellung von Papillomviren 8
1.3.1 Virus-like Particles (VLPs) und VLP-basierende Vakzine 8
1.3.2 Pseudovirionensysteme 10
1.4 Zellvermittelte Bindung von Papillomviren und potentielle Rezeptoren 11
1.4.1 Zellvermittelte Bindung und Aufnahme von Papillomviren 11
1.4.2 Integrin-α6 als potentieller Rezeptor für Papillomviren 12
1.4.3 Heparansulfat als potentieller Rezeptor für Papillomviren 14
1.5 Zielsetzung 16

Kapitel 2 Material und Methoden 17

2.1 Material 17
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika 17
2.1.1.1 Chemikalien 17
2.1.1.2 Säuren und Basen 18
2.1.1.3 Säulenmaterial 18
2.1.1.4 Enzyme 18

2.1.1.5 Zytokine 18
2.1.1.6 Antibiotika 18
2.1.1.7 Zellkulturlösungen 18
2.1.2 Antikörper 19
2.1.3 Oligonukleotide 20
2.1.3.1 RT-PCR Primer 20
2.1.3.2 HPV 16 L1 Mutationsprimer 20
2.1.3.3 Sequenzierprimer HPV 11 20
2.1.4 Expressionsplasmide 20
2.1.5 DNA- und Proteinmarker 21
2.1.5.1 DNA-Längenmarker 21
2.1.5.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine 21
2.1.6 Mikroorganismen 21
2.1.6.1 Bakterienstämme. 21
2.1.6.2 Hefestämme 21
2.1.6.3 Zellinien 21
2.1.7 Verbrauchsmaterial 22
2.1.8 Geräte und Anlagen 22
2.1.8.1 Zentrifugen, Rotoren und Zentrifugenbecher 22
2.1.8.2 Sonstige Geräte und Anlagen 22
2.1.9 Computerprogramme 23
2.2 Standardpuffer, Lösungen und Nährmedien 23
2.2.1 Standardpuffer und Lösungen 23
2.2.2 Materialien molekularbiologischer und proteinchemischer Standardtechniken 24
2.2.2.1 Lösungen zur DNA-Präparation 24
2.2.2.2 Lösungen für Polyacrylamidgele 25
2.2.2.3 Lösungen zum Färben von Proteingelen mit Silbernitrat 25
2.2.2.4 Lösungen zum Elektrotransfer von RNA (Northern-Bot) 25
2.2.2.5 Lösungen für die radioaktive Markierung von DNA 26
2.2.2.6 Lösungen zum Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot) 26
2.2.2.7 Lösung zur Proteinbestimmung nach Bradford 27
2.2.2.8 Lösungen für Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) 27
2.2.3 Material für Immunfluoreszenz 27
2.2.4 Lösungen zur Extraktion und Reinigung von PV-VLPs und Pseudovirionen 27
2.2.4.1 Extraktion und Reinigung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) aus TN high five Zellen 27
2.2.4.2 Extraktion und Reinigung von HPV 16 Pseudovirionen aus Saccharomyces Cerevisiae 28
2.2.5 Material zum Kultivieren von Bakterien-, Hefen-, Säuger- und Insektenzellen 28
2.2.5.1 Material zum Kultivieren von Bakterien 28
2.2.5.2 Material zum Kultivieren von Hefen 28
2.2.5.3 Material zum Kultivieren von Säugetierzellen 28
2.2.5.4 Material zum Kultivieren von Insektenzellen 29
2.2.6 Lösungen für die FPLC 29

Kapitel 2 Methoden **29**

2.3 Molekularbiologische Methoden 29
2.3.1 Agarose Gelelektrophorese 29
2.3.2 Analytische Plasmidisolierung aus E. coli nach Birnboim-Doly 30
2.3.3 Plasmid-präparation aus E. coli im Maximalmaßstab mittels $CsCl_2$-Gradientenzentrifugation 30
2.3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen 31
2.3.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA 31
2.3.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen 32
2.3.7 Dephosporylierung von Vektor DNA 32

2.3.8 DNA Ligation ... 32
2.3.9 Klenow Reaktion ... 33
2.3.10 Transformation von Bakterien mit DNA Plasmiden ... 33
2.3.11 PCR zum Nachweis viraler Genprodukte ... 34
2.3.12 Fusions-PCR ... 34
2.3.13 Extraktion von Gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen ... 35
2.3.14 Reverse Transkription von mRNA ... 35
2.4 Proteinchemische Methoden ... 36
2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ... 36
2.4.2 Denaturierende Fällung von Proteinen ... 37
2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford ... 37
2.4.4 Coomassieblaufärbung zum Nachweis von Proteinen ... 37
2.4.5 Silberfärbung ... 37
2.4.6 Western Blot ... 38
2.4.7 Aufreinigung monoklonaler Antikörper über Protein A Sepharose ... 39
2.4.8 Kopplung gereinigter Antikörper mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ... 39
2.4.9 Gelfiltration ... 40
2.4.10 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ... 40
2.4.11 Hämagglutinationstest ... 41
2.4.12 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie ... 41
2.5 Zellbiologische Methoden ... 41
2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen ... 41
2.5.2 Zellzahlbestimmung ... 42
2.5.3 Kryokonservierung von Zellen ... 42
2.5.4 Transfektion von DNA Plasmiden in Säugetierzellen ... 42
2.5.5 Subklonierung von Hybridomzellinien ... 43
2.6 Immunologische Methoden ... 43
2.6.1 *Antigen-Capture ELISA* ... 43
2.6.2 *Immunfluoreszenz* ... 44
2.6.3 *Probenvorbereitung für Durchflusscytometrische Analysen (FACS)* ... 44
2.7 Methoden zur Virusherstellung ... 45
2.7.1 Herstellung und Reinigung von Virus-like Particles (VLPs) ... 45
2.7.2 Virusisolation aus Rinderwarzen ... 46
2.7.3 Herstellung der HPV16-gfp-Pseudovirionen ... 47
2.7.4 Reinigung der Pseudovirionen aus Hefe Extrakten „Crude Extracts“ ... 47
2.7.5 Infektion von Zellen durch HPV16-gfp-Pseudovirionen ... 48
2.8 Mathematische Auswertung und Statistische Methoden ... 48
2.8.1 Mittelwert und Standardabweichung ... 48
2.8.2 Ermittlung der halbmaximalen Hemmstoffkonzentration (IC 50) ... 48
2.8.3 Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) ... 48

Kapitel 3 Ergebnisse ... **49**

3.1 Untersuchung der Bindung verschiedener Papillomviren an das Polysaccharid Heparin und dessen Derivate ... 49
3.1.1 Gewinnung boviner Viren aus infiziertem Gewebe ... 50
3.1.2 Herstellung von Papillomvirus-VLPs ... 53
3.1.3 Quantifizierung des Proteingehalts ... 55
3.2 Bindung von PV Partikeln und Virionen an immobilisiertes Heparin als Modell für die Heparasulfatbindung ... 57
3.2.1 Bindung HPV 16 L- und HPV 11 L1 VLPs ... 57
3.2.2 Bindung boviner, DNA-haltiger Papillomviren ... 59
3.2.3 Beitrag basischer Aminosäuren am L1 Carboxylterminus zur Bindung von Papillomviren an Heparin ... 61

3.3 Beitrag basischer Aminosäuren auf der Virusoberfläche zur Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Heparin 69
3.3.1 Herstellung der HPV 16 L1 $_{mut\ B->A}$ VLPs 69
3.3.2 Charakterisierung neutralisierender Epitope auf dem HPV 16 L1 Protein und Überprüfung der lokalen Konformation der L1 $_{mut\ B->A}$ VLPs 74
3.3.3 Einfluss der Mutationen auf die Bindung von HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs an Heparin….. 82
3.3.4 Einfluss der Mutationen auf die Bindung von HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs an HaCaT-Zellen 86
3.4 Bindung unterschiedlicher PV VLPs an Keratino-, Lympho-, und Erythrocyten 88
3.4.1 Bindung von PV VLPs und Virionen an Erythrocyten 88
3.4.2 Einfluss verschiedener Polysaccharide auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Erythrocyten 90
3.4.3 Inhibition der HPV 16 VLP Bindung an humane Keratinocyten und Lymphocyten durch Polysaccharide 93
3.4.4 Heparin–Lyase 1 Behandlung von K562-Zellen führt zu einer Reduktion der HPV 16 Bindung 96
3.5 Einfluss des HS Core Proteins auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Zellen 98
3.6 Untersuchung der Integrin Komplexe α6β4/α6β1und ihre Rolle bei der Bindung und Infektion von Zellen durch Papillomviren 104
3.6.1 Herstellung Integrin-α6-positiver Zellen 104
3.6.2 Integrin-α6β1 und -α6β4 unabhängige Bindung von PV-VLPs an K562-Zellen 107
3.6.3 Einfluss neutralisierender Antikörper auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Integrin-α6-positive Zellen 108
3.6.4 Integrin-α6β1 und -α6β4 unabhängige Infektion von K562-Zellen durch HPV 16-gfp Pseudovirionen 109

Kapitel 4 Diskussion **111**

4.1 Einführung…… 111
4.2 Beurteilung des Integrin α6 Komplexes als potentieller PV Rezeptor 111
4.3 Rolle von Polysacchariden bei der Bindung von PV an Zellen 112
4.3.1 Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Bindung von PV an Zellen 112
4.3.2 Heparinase-Behandlung von Zellen 115
4.3.3 PV zeigen bei der Bindung an Zellen keine Spezifität für ein HS-Core Protein. 116
4.3.4 Einfluss des L1 Carboxylterminus auf die PV Bindung an immobilisiertes Heparin ….. 117
4.4 Betrachtung potentieller Rezeptor-Bindungstaschen 119
4.4.1 Potentielle Rezeptor-Bindungstaschen und Bindungsstellen monoklonaler Antikörper 119
4.4.2 Der Einfluss von L2 auf die Bindung von Papillomviren 122
4.4.3 Bindung an antigenpräsentierende Zellen 122
4.5 Rezeptor-vermittelte Bindung und Aufnahme von Papillomviren in Zellen 124
4.6 Ausblick…… 126

Kapitel 5 Literaturverzeichnis **127**

Kapitel 6 Appendix **137**

6.1 Tagungsbeiträge 137

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen in Kapitel 1 Einleitung

Abb. 1.0 BPV Virionen ... 1
Abb. 1.1 Die Replikation der Papillomviren ist an die Differenzierung der Keratinocyten gekoppelt ... 4
Abb. 1.2 Linearisiertes HPV 16 Genom ... 5
Abb. 1.3 Tertiär- und Quartärstruktur eines aus HPV 16 L1 Pentameren gebildeten VLPs. 9
Abb. 1.4 Bindung von BPV 1 Virionen an CV-1 Zellen ... 11
Abb. 1.5 Struktur eines Integrin-Dimers ... 13
Abb. 1.6 Struktur zellulärer Hepransulfate ... 15

Abbildungen in Kapitel 2 Material und Methoden

Abb. 2.7 Prinzip des Western Blot ... 38
Abb. 2.8 Prinzip des Antigen-Capture ELISA ... 43

Abbildungen in Kapitel 3 Ergebnisse

Abb. 3. 9 Extraktion nativer BPV-1 Virionen ... 52
Abb. 3.10 Elektronenmikroskopische Präparate der in Insektenzellen erzeugten VLPs ... 54
Abb. 3.11 A: Konzentrationsbestimmung der VLP- und Viruspräparation ... 56
B: Eichgeraden der Proteinbestimmung ... 56
Abb. 3.12 Bindung von HPV 11 L1 – und HPV 16 L1 VLPs an Heparin ... 57
Abb. 3.13 Analyse der FPLC Fraktionen ... 58
Abb. 3.14 Bindung von BPV 1 Viren an immobilisiertes Heparin ... 60
Abb. 3.15 Bindung carboxy-terminal deletierter HPV 11 L1ΔC VLPs ... 63
Abb. 3.16 Bindung von HPV 11 L1 VLPs und L1ΔC VLPs an K562-Zellen ... 64
Abb. 3.17 Bindung und Elution von HPV 16 L1ΔC VLPs an immobilisiertes Heparin ... 65
Abb. 3.18 Bindung und Elution carboxy-terminal deletierter BPV 1 L1ΔC VLPs ... 66
Abb. 3.19 Bindung und Elution carboxy-terminal substituierter BPV 1 L1/E7 VLPs von einer Heparin-Sepharose Säule ... 67
Abb. 3.20 HPV 16 L1 Monomer und Pentamer ... 69
Abb. 3.21 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs ... 73
Abb. 3.22 Punktmutationen im L1 Protein bei Arginin 41 oder Lysin 443 beeinflussen die Bindung monoklonaler Antikörper an HPV 16 L1 VLPs ... 76
Abb. 3.23 Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins ... 78
Abb. 3.24 Darstellung der Aminosäure 41 in der Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins ... 79
Abb. 3.25 Position der Aminosäure Lysin 443 innerhalb der Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins ... 80
Abb. 3.26 Konzentrationsunterschiede in den VLP Präparaten ... 82
Abb. 3.27 Bindung der HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs an immobilisiertes Heparin ... 84
Abb. 3.28 Bindung der HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs an HaCaT Zellen ... 87
Abb. 3.29 Schema des Hämagglutinationstests ... 88
Abb. 3.30 Erythrocyten aus Ratte werden durch HPV 16 VLPs agglutiniert ... 88
Abb. 3.31 Heparin und Low Molecular Weight Heparin sind in der Lage die durch HPV 16 VLPs vermittelte Hämagglutination zu verhindern ... 90
Abb. 3.32 Heparin und Low Molecular Weight Heparin lösen bestehende HPV 16 VLP – Erythrocyten Agglutinate ... 92
Abb. 3.33 Heparin und Low Molecular Weight Heparin inhibieren die VLP Bindung an HaCaT-Zellen ... 93
Abb. 3.34 Dextransulfat inhibiert die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT-Zellen ... 94
Abb. 3.35 Heparin kompetiert die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an K562 und THP-1 Zellen ... 96
Abb. 3.36 Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Heparinase-1 behandelte Zellen ... 97

Abb. 3.37 Organisation der Syndecan Familie 99
Abb. 3.38 Heparansulfatgehalt und HPV 16 L1 VLP Bindung an murine WEHI256-Zellen nach Zytokinstimulation 100
Abb. 3.39 RT-PCR zum Nachweis der Syndecan-2 und Syndecan-3 mRNA 101
Abb. 3.40 Heparansulfat dreier Zellinien nach Zytokinstimulation 102
Abb. 3.41 Bindung von HPV 16 L1 VLPs an U937- und THP-1-Zellen 103
Abb. 3.42 DG75-Zellen und BPV-1 L1 VLPs 104
Abb. 3.43 Autofluoreszenz, Integrin-α6 Expression und VLP Bindung Integrin-α6 transfizierter K562- und DG75-Zellen 106
Abb. 3.44 Bindung von BPV 1 L1 VLPs, BPV 1 L1ΔC VLPs und BPV 1 Virionen an K562- und K562-Integrin-α6β4-positive-Zellen 107
Abb. 3.45 Einfluss des Integrin-α6 blockierenden Antikörpers GoH3 auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an K562- und HeLa-Zellen 108
Abb. 3.46 Prinzip der Pseudovirioneninfektion 109
Abb. 3.47 In-vitro Transduktion von egfp in Zellen durch Infektion der K562-Zellen mit HPV 16 Pseudovirionen 110

Abbildungen in Kapitel 4 Diskussion

Abb. 4.48 Rezeptorbindungstaschen 120
Abb. 4.49 Schema der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von PV in Zellen 124

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Vergleich des ermittelten Gesamtproteingehalts mit dem L1-Proteingehalt der Präparationen 56
Tab. 2 Quantifizierung des Proteingehalts 56
Tab. 3 Elution der L1ΔC VLPs 68
Tab. 4 Zusammenfassung bekannter und vermuteter Antikörperbindungsstellen 81
Tab. 5 Elutions der HPV 16 $L1_{mutB->A}$ VLPs 83
Tab. 6 Hämagglutinationseigenschaften von PV VLPs 89
Tab. 7 Ermittelte Inhibitorkonzentrationen 95
Tab. 8 Integrin Expression und BPV L1 VLP Bindung 105

IV. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström; Längeneinheit, entspricht 10^{-10} m
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
bFXa	Boviner, aktivierter Gerinnungsfaktor X (Protease)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BPV	Bovines Papillomvirus
c-Cbl	Zelluläre Ubiquitin Ligase
$CsCl_2$	Cäsiumchlorid
cDNA	komplemantäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
CRPV	Cottontail Rabbit Papillomavirus
COPV	Canine Oral Papillomavirus
Da	Dalton
DAPI	4`,6-Diaminidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
dGTP	Deoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
E1-E7	Proteine der Papillomavirus Early Genes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbant assay
Fab	Fab Fragment eines IgG Moleküls
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Gampo	Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper
GamFITC	Fluoresceinisothiocyanat gekoppelter Ziege-anti–Maus-IgG Antikörper
Garpo	Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper
GFP	Green Fluorescence Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol (Verankerung v. Proteinen)
GSK	Glaxo Smith Kline Pharma
HPV	Humanes Papillomvirus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HHT	Hämagglutinationshemmtest
HRP	Meerrettichperoxidase
hsDNA	Heringsspermien-DNA
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
IL-8	Interleukin 8 (zelluläres Zytokin)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
ISGF	Interferon-stimulierter Gen Faktor
Hve A-D	Herpesvirus “entry mediator“ A-D zelluläre Rezeptoren der Herpesviren
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

L1	Proteinprodukt des Papillomavirus Late Gene 1 (Hauptstrukturprotein)
L1mut	Verändertes L1 Strukturprotein, welches eine Aminosäurensubstitution erfahren hat
L2	Proteinprodukt des Papillomavirus Late Gene 2 (Strukturprotein)
mAB	Monoklonaler Antikörper
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
O/N	Über Nacht
ORF	offenes Leseraster
ori	Replikationsstart
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PDGF	Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
Poly-A^+	Polyadenyl-
PV	Papillomvirus
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil
U/N	Über Nacht
URR	Upstream regulatory region im PV genom
UV	Ultraviolett
VLP	Virus-like Particle (Kapsid-ähnliches Partikel)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-ß-D-galactosid

Einbuchstaben Code der DNA/RNA Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil *(RNA)*

Einbuchstaben Code der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

V. Zusammenfassung

Papillomviren werden als ätiologisches Agens in der Entstehung bestimmter Krebsarten wie z.B. dem Zervixkarzinom angesehen und können derzeit noch nicht quantitativ In−vitro hergestellt werden. Dies hat die Identifizierung eines Papillomvirusrezeptors erschwert. Die Entwicklung von Virus-like Particles (VLPs), geordneten Aggregaten des Hauptrukturproteins L1, welche Virionen in Größe und Symmetrie gleichen, führte dazu, dass erste Bindungsstudien unternommen wurden und Heparansulfatproteoglycane, Integrin-α6 (CD49f) und CD16 (Fc-γRIII) als mögliche Rezeptoren für Papillomviren in der Literatur beschrieben wurden.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Papillomvirus-Typen HPV 11, -16 und BPV 1, die Vertreter unterschiedlicher PV-Gruppen darstellen, konnte eine Interaktion mit immobilisiertem Heparin gezeigt werden. Die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Zellen der Linie K562 erwies sich als Heparinase 1 sensitiv. Die Menge gebundener Papillomvirus VLPs auf Zellen ließ sich erhöhen, wenn die Expression von Heparansulfaten auf der Zelloberfläche durch Zytokinstimulation gesteigert wurde. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die für mehrere Papillomvirustypen beobachtete Bindung an eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, darunter auch solche, die für die natürliche Infektion nicht in Frage kommen, mit der Bindung an zelluläres Heparansulfat erklärt werden.

Bei der Untersuchung einer potentiellen Heparin Bindungsstelle zeigte sich, dass diese nicht am Carboxylterminus der L1 Proteine von HPV 11, 16 und BPV 1 lokalisiert sein kann, da auch VLPs mit c-terminaler Deletion in der Lage waren, an Heparin und an verschiedene Heparansulfat-positive Zellen zu binden. Ebenso konnte man bei BPV 1 VLPs, deren L1 Proteine eine c-terminale Substitution erfahren haben beobachten, dass diese weder die Bindung an immobilisiertes Heparin, noch an Zellen beeinträchtigen kann.

Freies Heparin kompetiert mit Zellen um die Bindung von Papillomviren. Hochmolekulares und niedermolekulares Heparin, nicht aber ein sulfatreiches Disaccharid, waren in der Lage, gebundene Papillomvirus VLPs von HaCaT-, K562- , THP-1-Zellen und Erythrocyten zu lösen. Mit den gesammelten Daten lassen sich Heparin bzw. Heparansulfate als Interaktionspartner nicht nur für HPV 11, sondern auch für HPV 16 und BPV 1 nachweisen.

Als ein zellulärer Rezeptor für HPV 6b wurde Integrin-alpha-6 beschrieben. Jedoch ließ sich im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass es für die Bindung von HPV 16 VLPs an Zellen nicht notwendig ist, da auch Integrin-alpha-6-negative Zellen HPV 16 VLPs binden

können. Um die Rolle von Integrin-alpha-6 bei der Aufnahme von Papillomviren zu untersuchen wurden Integrin-negative K562-Zellen und deren Integrin-alpha-6-positive Transfektanten einer Infektion durch HPV 16 Pseudovirionen unterzogen. Das verwendete Pseudovirionensystem zeigt eine erfolgreiche Aufnahme der HPV 16 Pseudovirionen durch Expression von GFP in den Zellen an. Die Integrin-alpha−6 positiven Transfektanten der Zellinie K562 wurden ebenso infiziert wie ihre Integrin-negativen Parentalzellen. Die Bindung an und die Aufnahme von HPV 16 in Zellen kann, im Gegensatz zu HPV 6b Integrin-alpha-6 unabhängig ablaufen.

V. Summary in English

Papilloma viruses are regarded as etiological agents in the formation of certain types of cancer, in particular the cervical cancer. So far they cannot be produced quantitatively *in vitro*. This made the identification of a papilloma virus receptor quite difficult. The development of virus-like particles (VLP), stable aggregates of the main structure proteine L1, which resemble virions in size and symmetry lead to first binding studies and reports of heparan sulfate proteoglycans, Integrin-α6 (CD49f) and CD16 (Fc-γRIII) being possible receptors for papilloma viruses.

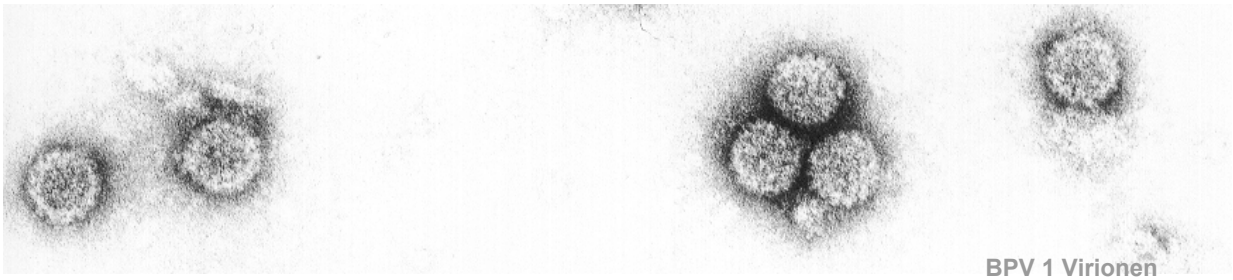
For the papilloma virus types HPV 11, HPV 16 and BPV 11 which are the subject of this thesis and which represent different papilloma virus groups, an interaction with immobilised heparin could be shown. The binding of HPV16 L1 VLPs to K562 cells proved to be heparinase-1-sensitive. The amount of bound papilloma virus VLP on cells could be increased by stimulating the expression of heparan sulfate on the cell surface by means of cytokine treatment. With the results of this thesis, the observed binding of several types of papilloma viruses to a variety of cell types, amongst them some who are out of question to be infected naturally, can be explained by the binding to cellular heparan sulfate.

By examining a potential heparin binding site it showed that this binding cannot be located at the carboxyle terminus of the L1 proteins of HPV 11, HPV 16 and BPV 1 as even VLPs with a C-terminal deletion were able to bind to heparin and to several heparan-sulfate-positive cells. It could be also observed that BPV 1 VLPs whose L1 proteins underwent a C-terminal substitution neither showed impaired binding to immobilized heparin nor to cells.

Free heparin competes with cells for the binding of papilloma viruses. High-molecular and low-molecular heparin, but not sulfate-rich disaccharide were able to remove bound papilloma virus VLPs from HaCaT, K562 and THP-1 cells and from erythrocytes. With the

collected data, heparin resp. heparan sulfates can be identified as interaction partners not only for HPV11, but also for HPV16 and BPV 1.

Integrin-alpha-6 was described as a cellular receptor for HPV 6b. Yet it was shown in the course of these examinations that it is not a necessity for the binding of HPV16 VLPs to cells because Integrin-alpha-6-negative cells can bind HPV 16 VLP equally well. In order to examine the role of integrin-alpha-6 during the reception of papilloma viruses, integrin-negative K562 cells and their integrin-alpha-6-positive K562 transfectants were infected by HPV16 pseudo-virions. The pseudo-virion system used showed a successful uptake of the HPV 16 pseudo-virions by expression of GFP inside the cells. The integrin-alpha-6-positive transfectants of the K562 cells were as well infected as their integrin-negative parental cells. In opposite to HPV 6b, the binding of HPV 16 and the uptake of HPV 16 into cells can take place independently of integrin-alpha-6.



BPV 1 Virionen

1. Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

1.1.1 Einführung

Papillomviren (PV) sind DNA-Viren, die die äußeren Haut- und Schleimhautschichten bei einer Reihe von Vertebraten infizieren und dort eine lokale Zellproliferation hervorrufen, die sich als gutartige Warzenerkrankung äußern kann (Pfister, Nurnberger et al. 1981). Einige humanpathogene Papillomviren stehen darüber hinaus in einem engen Zusammenhang mit maligner Entartung, so dass Papillomviren auch als Tumorviren bezeichnet werden (Laimins 1993; zur Hausen 1996; Bosch and de Sanjose 2002). Derzeit sind 118 verschiedene humanpathogene Papillomviren molekulargenetisch charakterisiert (de Villiers, Fauquet et al. 2004). Sie werden seit dem Jahr 2001 einer eigenen Virusfamilie zugeordnet, der Familie der Papillomaviridae (Regenmortel 2001). Papillomviren werden auf Grund ihres Wirtstropismus und ihres malignen Potentials eingeteilt. Papillomviren, die die Schleimhäute befallen werden als mukosotrop bezeichnet, Papillomviren die in Hautläsionen gefunden werden, als kutanotrop. In beiden Gruppen finden sich Viren, deren DNA in Tumorbiopsien gefunden wird (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Sie zählen daher zur Gruppe der *high risk* Papillomviren (zur Hausen 1996). Papillomviren werden durch direkten Kontakt mit infizierten Hautstellen übertragen und die Infektionen zeigen in immunkompetenten Individuen häufig einen inapparenten Verlauf. In vielen Fällen kommt es zu einer spontanen Regression ohne Behandlung. Bei einigen Individuen jedoch werden Rezidive an behandelten Läsionen beobachtet oder eine Veränderung unbehandelter Läsionen hin zu präkanzerösen und kanzerösen Formen (Scheinfeld and Lehman 2006; Scheinfeld 2006). Bereits vor 1933 wurde die Übertragung PV-assoziierter Erkrankungen beobachtet und einem viralen Agens zugeschrieben. Als ein Virus, welches auch Tumore verursachen kann, wurden PV erstmals 1933 von Shope und Hurst beschrieben (Shope 1933). Sie wiesen nach, dass Papillomviren wie das Cottontail Rabbit Papilloma Virus (CRPV) nicht nur gutartige Warzen induzieren, sondern in Hauskaninchen auch bösartige Tumore hervorrufen können (Shope 1933). Seit Mitte der Siebziger Jahre weiss man, dass auch humane Papillomviren in einen ursächlichen Zusammenhang mit Krebs, besonders mit dem Cervixkarzinom, gebracht

werden können. In mehr als 90% der Cervixkarzinome lässt sich HPV DNA nachweisen, vor allem DNA sogenannter *high risk* Papillomviren, HPV 16, -18, -31, -45 und -56 (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Weltweit erkranken jährlich eine halbe Million Frauen an diesem Tumor, das Cervixkarzinom ist bei Frauen die zweithäufigste Tumorart. Die Einführung der Pap-Tests hat die frühe Diagnose und Behandlung HPV-assoziierter Erkrankungen ermöglicht. Daher ist die Cervixkarzinom-bedingte Mortalitätsrate in den industrialisierten Ländern in den vergangenen 40 Jahren um über 70% gefallen (Boring, Squires et al. 1994). Dagegen sind Unterleibskarzinome in weniger entwickelten Ländern immer noch eine der häufigsten Todesursachen. Einen weiteren Rückgang der Papillomvirus-assoziierten Erkrankungen verspricht man sich von dem Einsatz der prophylaktischen HPV-Vakzine (Gissmann, Osen et al. 2001; Goldie, Grima et al. 2003; Roden and Wu 2003). Ergebnisse der klinischen Studien zeigen nach einer Beobachtungszeit von fast 4 Jahren, dass die mit *VLPs* immunisierten Individuen neutralisierende Antikörper entwickeln und keine mit den geimpften HPV Typen (HPV 6, -11, -16, -18) assoziierten Erkrankungen auftreten (Poland, Jacobson et al. 2005; Harper, Franco et al. 2006; Lowy and Schiller 2006; Villa, Ault et al. 2006).

Das Papillomvirus selbst besteht aus einem komplexen, ikosaedrischen Kapsid von 55 nm Durchmesser, das durch die beiden Kapsidproteine L1 und L2 gebildet wird (Crawford and Crawford 1963). Darin eingeschlossen ist das 7-8 kb grosse DNA-Genom, auf dem neben den beiden Hauptstrukturproteinen auch für die Replikation notwendige Faktoren codiert sind (Favre, Orth et al. 1975). Der Replikationszyklus und die Genexpression der Papillomviren ist sehr stark an den Differenzierungsgrad der Wirtszelle gekoppelt (Bedell, Hudson et al. 1991; Frattini, Lim et al. 1996). Aus diesem Grund ist die Vermehrung von Papillomviren in der Zellkultur aufwändig und mit geringer Ausbeute in organotypischen „Raft"-Kulturen, in denen die verwendeten Zellen differenzieren, möglich (Chow and Broker 1997). Da die darin erzeugten Virusmengen gering sind wurden In-vitro Systeme zur Erzeugung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) und Pseudovirionen (PsV) entwickelt (Review in Sapp and Selinka 2005; Lowy and Schiller 2006). Damit konnte die Clathrin-abhängige Aufnahme von PV in Zellen beobachtet und zelluläre Moleküle als potentielle Rezeptoren identifiziert werden (Muller, Gissmann et al. 1995; Zhou, Gissmann et al. 1995; Bousarghin, Touze et al. 2003; Day, Lowy et al. 2003).

Als mögliche Rezeptoren sind das Integrin-α6, die Fc-Rezeptoren (CD16) und die Heparansulfate beschrieben worden (Evander, Frazer et al. 1997; Joyce, Tung et al. 1999; Da Silva, Pastrana et al. 2001). Die dazu veröffentlichten Daten sind aber widersprüchlich, und führen dazu, dass diese Moleküle bisher nicht als Rezeptoren für Papillomviren akzeptiert wurden (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Drobni, Mistry et al. 2003; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003).

Zunächst soll in dieser Einleitung auf die Biologie und die strukturellen Eigenschaften der Papillomviren eingegangen werden, anschließend die zelluläre Bindung und die möglichen Rezeptoren genauer besprochen werden.

1.1.2 Wirtstropismus

Humane Papillomviren haben einen sehr engen Wirtstropismus. Sie können sich darüberhinaus nur in differenzierenden Keratinocyten vermehren (Frattini, Lim et al. 1996). Sie binden aber an eine weitaus grössere Anzahl verschiedener Zellinien, in die auch die Aufnahme der Viruskapside beobachtet werden kann (Qi, Peng et al. 1996; Da Silva, Velders et al. 2001; Fausch, Da Silva et al. 2003). Der Wirtstropismus wird also vermutlich nicht durch den Rezeptor vermittelt, sondern durch zelluläre Prozesse, die nach der Aufnahme des Virus in die Zielzelle, ablaufen. Sämtliche beim Menschen isolierte PV Typen wurden den humanpathogenen Papillomviren zugerechnet und sind bisher bei keiner anderen Spezies als pathogen beschrieben worden. Derzeit sind nur bei tierpathogenen Papillomviren Ausnahmen bekannt, in denen die Artenbarriere überwunden wird. Jedoch sind diese Viren im neuen Wirt nicht in der Lage, ihre Replikation vollständig zu vollziehen was beispielsweise bei Pferden beobachtet werden kann, die mit BPV 1 infiziert sind (Lancaster, Olson et al. 1977). Viruspartikel werden in den durch BPV 1 verursachten Hautläsionen nach bisherigem Kenntnisstand nicht produziert, lediglich die Transkription der frühen PV Gene ist aktiviert, so dass das Hauptonkogen boviner PV, E5, transkribiert wird und die Entartung der Hautzellen in equine Sarkoide ermöglicht (Campo 1997).

1.1.3 Die virale Replikation

Die Replikation der Papillomviren ist ein sehr komplex regulierter Prozess, der stark an die Differenzierung der Keratinocyten gekoppelt ist (Klumpp, Stubenrauch et al. 1997; Klumpp and Laimins 1999) und in drei Phasen eingeteilt werden kann (Bedell, Hudson et al. 1991). Der Übergang zwischen den Phasen unterliegt einer Regulation, über deren Mechanismen noch wenig bekannt ist. In der frühen Phase infizieren wenige virale Partikel die undifferenzierten Basalzellen des Epitels. Die viralen, episomalen Genome liegen im Kern der infizierten Zelle mit einer Anzahl von 50-100 Kopien vor (Stubenrauch and Laimins 1999; Woytek, Rangasamy et al. 2001). In der zweiten Phase, der sog. *Maintenance Phase,* replizieren die viralen Episome synchron mit den zellulären Chromosomen sich teilender Basalzellen (Hoffmann, Hirt et al. 2006). Durch die Verteilung des viralen Genoms auf Zellen, die als Stammzellen in der Basalschicht verbleiben und nicht ausdifferenzieren, wird ein Reservoir für die kontinuierliche Virusproduktion im Gewebe etabliert (Doorbar 2006). Die Keratinocyten, die ihr Differenzierungsprogramm beginnen und die Basalschicht verlassen, werden durch die Proteinprodukte der frühen viralen Gene gezwungen, wieder in die S-Pase einzutreten, um das virale Genom zu replizieren (McCance, Kopan et al. 1988). Histologisch

sind die infizierten Bereiche als hyperproliferative Areale zu erkennen (Middleton, Peh et al. 2003). In den oberen Schichten der Epidermis, vor allem im Stratum granulosum ist die virale DNA Synthese am höchsten. Mehrere Tausend Kopien des viralen Genoms liegen in den infizierten Zellen vor. Mit Erreichen des Stratum corneums werden dann die viralen Strukturproteine L1 und L2 synthetisiert und große Mengen DNA-haltiger Viruskapside elektronenmikroskopisch sichtbar (zur Hausen 2002).

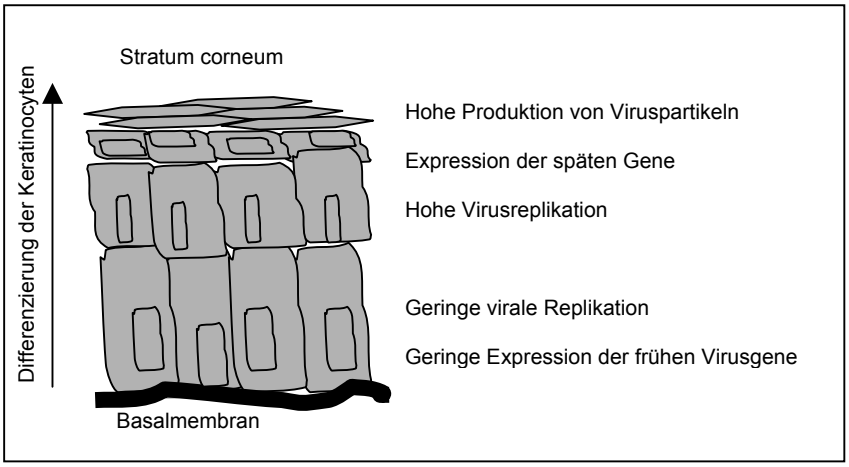


Abb. 1.1: Die Replikation der Papillomviren ist an die Differenzierung der Keratinocyten gekoppelt. *In der frühen Phase der Infektion, in den Basalzellen, sind nur die frühen Gene aktiv und das Genom wird nur wenig repliziert. Mit zunehmender Differenzierung setzt verstärkte DNA-Replikation ein. Erst nachdem die Keratinocyten das Stratum granulosum bilden werden dort die Strukturproteine synthetisiert und Viruspartikel gebildet (Schema verändert nach Modrow (Modrow and Falke 1997).*

1.2 Struktur und Aufbau der Papillomviren

1.2.1 Aufbau und Eigenschaften des Virusgenoms und der viralen Kontrollregion (LCR)

Das virale Genom ist ein zirkulär-geschlossenes doppelsträngiges DNA-Molekül, dessen Grösse je nach Papillomvirus-Typ von 7,2 bis 8 Kilobasen reichen kann und “supercoiled“ vorliegt. Alle bisher bekannnten humanen Papillomviren zeigen eine hochkonservierte Organisation ihres Genoms, welches 8-10 offene Leserahmen enthält und in drei Regionen unterteilt werden kann. Diese Regionen sind die *long control region* (LCR) (auch *upstream regulatory region* (URR) genannt, die *early* (E) und die *late region* (L). Nur einer der DNA-Stränge codiert die Proteine. Die Gene in der E-Region codieren für Faktoren, die für die Replikation und die Kontrolle der Transkription notwendig sind. Die Gene der L-Region codieren für die beiden Strukturproteine L1 und L2. In der späten Phase der Virusvermehrung werden das Hauptstrukturprotein L1, das Nebenkapsidprotein L2 und ein E4^E1 Fusionsprotein exprimiert (Longworth and Laimins 2004). Die Transkripte beginnen am Promotor der späten Gene und enden entweder mit dem frühen oder dem späten Polyadenylierungsignal. Die frühen Gene werden in eine polycistronische Messenger-RNA transkribiert, die am frühen Promotor beginnt und mit dem frühen Polyadenylierungssignal endet.

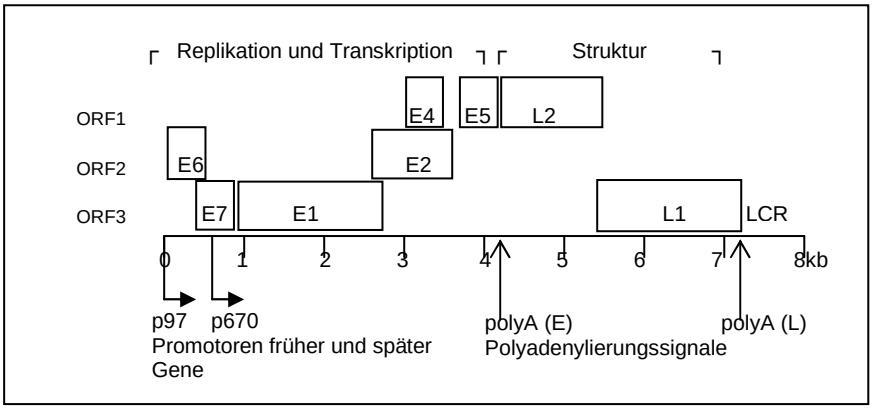


Abb. 1.2: Linearisiertes HPV 16 Genom. *Die frühen Genprodukte (E) sind für die Replikation und die Regulation der Transkription notwendig. In der späten Region des Genoms werden die Kapsidproteine (L1, L2) codiert. Der Replikationsursprung und die Bindungsstellen viraler und zellulärer Transkriptionsfaktoren liegen in der Long Control Region (LCR)(Verändert nach Modrow (Modrow and Falke 1997).*

Die Regulation der viralen Genexpression wird von zellulären wie auch viralen Transkriptionsfaktoren kontrolliert (Zheng and Baker 2006). Sie findet in der long control region (LCR) statt, einer 1 kB grossen Region, in der unter anderem die zellulären Transkriptionsfaktoren AP1, NF-1 und SP-1 und vier Kopien des viralen Transkriptionsfaktors E2 binden (Stunkel and Bernard 1999). In der LCR liegt auch der virale Replikationsursprung der durch das virale Protein E1 in Kooperation mit E2 gebunden und reguliert wird (Frattini and Laimins 1994).

1.2.2 Die Produkte der frühen PV-Gene (E1-E7) - Early Region

1.2.2.1 Die Proteine E1, E2 und E4

Für die virale Replikation notwendig sind die Proteine E1 und E2, die den Replikationsursprung binden und den zellulären Replikationskomplex rekrutieren (Benson, Lawande et al. 1997; Woytek, Rangasamy et al. 2001). **Das E1 Protein** (abhängig vom PV Typ etwa 640 Aminosäuren groß) besitzt eine ATP-abhängige Helicaseaktivität und rekrutiert zusammen mit E2 die DNA-Polymerase α an den viralen Replikationsursprung (Blitz and Laimins 1991). Die Konzentration von E1 und E2 reguliert den Zugang zum Replikationsursprung und kontrolliert darüber die Anzahl der viralen Genome, die in der Zelle vorliegen (Frattini and Laimins 1994; Rangasamy, Woytek et al. 2000; Deng, Lin et al. 2004). **Für den E2 ORF** sind bisher 3 Produkte nachgewiesen worden (Pepinsky, Androphy et al. 1994). Das größte der Proteine, etwa 360 Aminosäuren, kontrolliert die Transkription der Papillomvirus-Onkogene E6 und E7 (Prakash, Grossman et al. 1992). Verlust der E2 Expression führt durch die ungeregelte Transkription der viralen Onkogene zu einer verstärkten Proliferation der Zellen und Erhöhung der genetischen Instabilität. DNA Biopsien aus Tumorzellen, in denen das virale Genom in das Wirtsgenom integriert ist, weisen regelmäßig einen zerstörten E2 ORF auf (Durst, Kleinheinz et al. 1985; Schwarz, Freese et al. 1985). **Der E4 ORF**, der ein etwa 90 Aminosäuren grosses Protein codiert, wurde fälschlicherweise den frühen Genen zugerechnet. Im Infektionsverlauf wird es in der späten

Phase der produktiven Virusvermehrung exprimiert. (Pray and Laimins 1995). Das E4 Protein ist in kultivierten Epithelzellen eng mit dem zellulären Keratinskelett assoziiert wo es eine Rolle bei der Freisetzung reifer Viren aus den infizierten Zellen des Stratum corneums spielt (Doorbar, Ely et al. 1991; Roberts, Ashmole et al. 1993; Brown, Kitchin et al. 2006).

1.2.2.2 Die Proteine E5, E6 und E7

Die Proteine E5, E6, E7 verfügen über Eigenschaften, die Proliferation der Wirtszellen zu stimulieren (zur Hausen 2002). **Das E5 Protein** boviner Papillomviren ist mit 44 Aminosäuren das kleinste, in bovinen Papillomviren aber das Hauptonkogen (Sparkowski 1994; Campo 1997). Im Gegensatz dazu ist das E5 Protein humanpathogener Papillomviren ungefähr 80 Aminosäuren groß und spielt während der späten Ereignisse der HPV verursachten Karzinogese keine wesentliche Rolle, da der ORF nach der spontanen Integration des viralen Episoms in das Wirtsgenom regelmäßig mit E4, Teilen von E2 und L2 deletiert wird (Review in zur Hausen 2002). E5 assoziiert in infizierten Zellen jedoch mit Untereinheiten der in Phagolysosomen residenten H^+-ATPase und einer E3-Ubiquitin Ligase (c-Cbl), wodurch es den Abbau des EGF-Rezeptors verhindert und das Recycling der EGF-, CSF1- und PDGF-Rezeptoren erhöht. Damit verstärkt es die Transduktion mitogener Signale (Briggs, Adam et al. 2001; Zhang, Srirangam et al. 2005; Kim, Juhnn et al. 2006). Entsprechend erhöht E5 die Proliferationsrate humaner Keratinocyten (Conrad, Goldstein et al. 1994). E5 allein ist aber nicht ausreichend, um primäre, humane Keratinocyten oder Fibroblasten zu immortalisieren (Suprynowicz, Disbrow et al. 2005). Da es die Retention von HLA-I Molekülen im Golgi Apparat verursachen kann erschwert es die Beseitigung der Infektion durch das Immunsystem des Wirts (Ashrafi, Haghshenas et al. 2005). Eines der Onkoproteine humaner Papillomviren ist **das E6 Protein**. Es ist ein etwa 150 Aminosäuren großes Zinkfinger-Protein, das zusammen mit E7 humane, primäre Keratinocyten immortalisieren kann. E6 allein ist nicht in der Lage, diese Zellen zu transformieren; es benötigt dazu die Kooperation eines weiteren Onkoproteins wie E7 oder c-Ras (Chen and Defendi 1992; Song, Liem et al. 2000). Am besten dokumentiert ist die Wechselwirkung der E6-Proteine von *high risk* HPV Typen mit dem Tumorsupressor p53 (Scheffner, Werness et al. 1990). E6 bindet p53 als tertiärer Komplex mit E6AP, einer sogenannten E3-Ubiquitin-Ligase, und E6BP (Thomas, Pim et al. 1999). Dadurch wird der Ubiquitin-abhängige Abbau des Tumorsupressors eingeleitet (Scheffner, Huibregtse et al. 1994). Einen Reihe weiterer zellulärer Proteine darunter Bak, cMyc, hDlg, Paxillin, IRF-3, Mcm7 und MAGI-1 gehen mit E6 Proteinen der *high risk* PV Interaktionen ein und werden abgebaut (Review in Scheffner and Whitaker 2003). Durch den Abbau pro-apoptotischer Proteine und die Aktivierung der Telomerase ist E6 für die Vermeidung der Apoptose infizierter Zellen verantwortlich, die durch eine von E7 verursachte, gestörte Zellproliferation ausgelöst wird (Jackson and Storey 2000; Mantovani and Banks 2001; Oh, Kyo et al. 2001). Über die Deaktivierung zellulärer

Promotoren, wie beispielsweise den des Interferon Regulatory Factor, unterdrückt das E6-Protein auch die antivirale Antwort infizierter Zellen (Frazer, Thomas et al. 1999). **Das E7-Protein** ist das Hauptonkoprotein humanpathogener Papillomviren. Es bindet den Tumorsupressor Retinoblastoma und weitere Mitglieder der sogenannten Pocket Protein Familie. Bindung an Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise den p300/CBP-assoziierten Faktor (P/CAF) wurden berichtet (Huang and McCance 2002). E7 dereguliert Kontrollpunkte des Zellzyklus haupsächlich am G1/S Übergang (Howley, Scheffner et al. 1991; Scheffner, Munger et al. 1992). Die direkte Bindung an die Pocket Proteine wie Retinoblastoma setzt Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie frei (Xiao, Spencer et al. 2003). Die Struktur des Zinkfingers im E7-Protein ist für die Zelltransformation und die Immortalisierung essentiell. Indem es die Bildung des ISGF3-Transkriptionsfaktor-Komplexes verhindert (Frazer, Thomas et al. 1999; Vambutas, DeVoti et al. 2001) und die Expression von IL-8 verhindert (Huang and McCance 2002), stört E7 zudem die durch Interferonα ausgelöste Signaltransduktion und die antivirale Antwort infizierter Zellen. Kontinuierliche Expression des E7-Gens findet sich in E7-transformierten NIH 3T3 Zellen, aber auch in Zellen HPV induzierter Tumore, wo es offenbar für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps notwendig ist (Mazurek, Zwerschke et al. 2001; Nishimura, Nakahara et al. 2006).

Die Beobachtung, dass eine kontinuierliche Expression von E7 für das Zellwachstum nötig ist, macht E7 als Tumorantigen für die Immuntherapie interessant. So werden derzeit Fusionsproteine aus HPV 16 L1/E7, HPV 16 L2/E6/E7 oder HSP65-E7 in klinischen Studien der Phasen I/II auf ihre Wirksamkeit hin erprobt (Davidson, Faulkner et al. 2004; Hallez, Brulet et al. 2004; Vandepapeliere, Barrasso et al. 2005; Palefsky, Berry et al. 2006); (Review in Christensen 2005).

1.2.3 Strukturproteine, die Produkte der späten PV-Gene L1 und L2

1.2.3.1 Das Papillomvirus-Nebenkapsidprotein L2

Die zirka 500 Aminosäuren großen L2 Proteine der Papillomviren machen nur etwa 10 % des Kapsidproteins aus. Für die Bildung und die Struktur des Viruskapsids ist L1 allein ausreichend und das Nebenkapsidprotein L2 nicht notwendig (siehe Kapitel 1.3.1 VLPs). Sowohl der konservierte Amino- als auch der C-Terminus von L2 können mit DNA wechselwirken (Roden, Day et al. 2001). Papillomvirus Infektionen können auch durch L2-spezifische Antikörper neutralisiert werden (Roden, Yutzy et al. 2000). Interaktionen von L2 mit einer Reihe zellulärer Proteine sind beschrieben worden (Day, Roden et al. 1998; Gornemann, Hofmann et al. 2002; Florin, Becker et al. 2004; Bossis, Roden et al. 2005). So lokalisiert es im Zellkern in *PML- Oncogenic Domains (PODs),* wo es mit den viralen Proteinen L1 und E1 assoziiert und für die korrekte Verpackung des viralen Genoms wichtig ist (Zhou, Sun et al. 1994; Sun, Frazer et al. 1995; Heino, Zhou et al. 2000; Zhao, Hengst et

al. 2000; Okun, Day et al. 2001). Die Notwendigkeit der Proteindomänen am N- und am C-Terminus von L2 für eine erfolgreiche Infektion von Zellen wurde in mehreren Untersuchungen nachgewiesen (Yang, Day et al. 2003; Bossis, Roden et al. 2005; Buck, Pastrana et al. 2005; Florin, Becker et al. 2006; Kamper, Day et al. 2006). So ist L2 nicht nur an den späten Vorgängen in der infizierten Zelle wie dem Virusassembly, sondern auch an sehr frühen Ereignissen wie beispielsweise der Freisetzung der viralen DNA aus dem Endosom beteiligt (Day, Roden et al. 1998; Kamper, Day et al. 2006).

1.2.3.2 Das Papillomvirus-Hauptkapsidprotein L1

Während der späten Replikationsphase wird in den infizierten Zellen das Hauptkapsidprotein L1 exprimiert. Es ist 55 kDa groß und das konservierteste der viralen Proteine. Die konservierte L1-Sequenz wird zur Einteilung der Papillomviren in Haupt- und Subtypen herangezogen (de Villiers, Fauquet et al. 2004). L1 ist mit 360 Molekülen und einem Anteil von über 90% der Hauptbestandteil der Virushülle. Die bemerkenswerte Eigenschaft von L1 ist, dass es in verschiedenen Expressions-Systemen spontan zu Kapsiden aggregiert, den sogenannten *Virus-like Particles (VLPs)* (s. u.), deren Oberflächenstruktur sich in nur wenigen Merkmalen (L2, Disulfidbrücken, Durchmesser) von Virionen unterscheidet (Zhou, Sun et al. 1991; Hagensee, Yaegashi et al. 1993; Kirnbauer, Taub et al. 1993; Rose, Bonnez et al. 1993; Sasagawa, Pushko et al. 1995; Sapp, Fligge et al. 1998). Für die Stabilisierung der L1 Struktur sind 362 der 504 Aminosäuren des HPV16 L1 Proteins notwendig (Chen, Garcea et al. 2000). Der C-Terminus des L1 Proteins, der ins Innere des Viruskapsids hineinragt, trägt eine große Anzahl positiv geladener Aminosäuren und bindet DNA unspezifisch (Schafer, Florin et al. 2002).

Das L1 Protein wird über ein Kernlokalisationssignal am C-Terminus in den Nucleus transportiert (Zhou, Doorbar et al. 1991). Dort assoziiert es während der späten viralen Replikationsphase vermutlich mit dem Nebenkapsidprotein L2 und der viralen DNA (Day, Roden et al. 1998).

1.3 In-vitro Systeme zur Herstellung von Papillomviren

1.3.1 Virus-like Particles (VLPs) und VLP-basierende Vakzine

Isolate aus *Condylomata Acuminata* enthielten DNA von Papillomviren, deren L1 Gen ein funktionelles L1 Protein codieren konnte (Dartmann, Schwarz et al. 1986). Untersuchungen zeigten, dass L1 Proteine allein, in verschiedenen Expressionssystemen spontan zu Kapsiden aggregieren können, den sogenannten *Virus-like Particles (VLPs)* (Zhou, Sun et al. 1991; Hagensee, Yaegashi et al. 1993; Kirnbauer, Taub et al. 1993; Rose, Bonnez et al. 1993; Sasagawa, Pushko et al. 1995). Die L1 Proteinen bilden zunächst die L1-Pentamere, auch Kapsomere genannt, bevor diese sich zu einem VLP zusammenlagern.

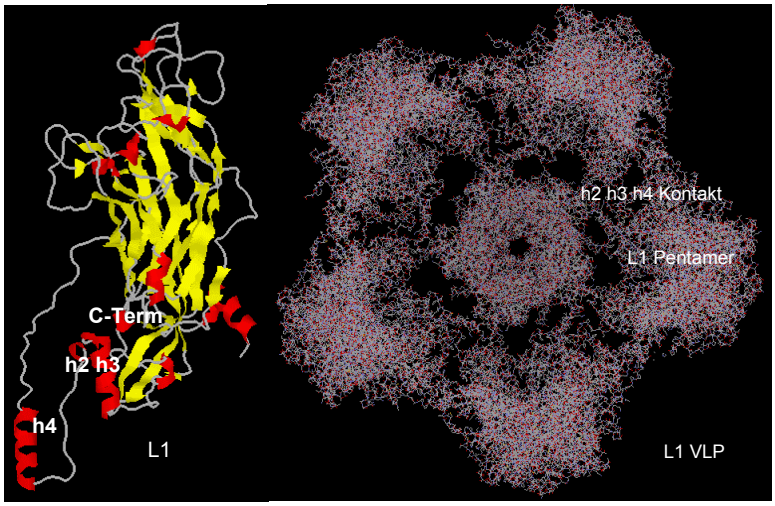


Abb. 1.3: Tertiär- und Quartärstruktur eines aus HPV 16 L1 Pentameren gebildeten VLPs. *Die L1 Monomere ordnen sich zu Pentameren zusammen, indem die Seitenketten der ß-Faltblätter benachbarter Monomere direkt miteinander wechselwirken. Die nach außen ragenden Schleifen (Loops) des L1 Proteins kontaktieren im Pentamer die Schleifen des nächsten und übernächsten Nachbarn. Im VLP werden die Interpentamerkontakte von der flexiblen Helix h4 mit den Helices h2 und h3 benachbarter Pentamere geschlossen.*

Mutationsanalysen zeigen, dass nur wenige Sequenzen im L1 für die VLP oder Kapsidbildung verzichtbar sind. Nur neun Aminosäuren am N-Terminus oder 23 Aminosäuren des positiv geladenen C-Terminus können ohne Auswirkung auf die VLP-Bildung deletiert oder substituiert werden (Paintsil, Muller et al. 1996; Muller, Zhou et al. 1997; Chen, Garcea et al. 2000). Beide Deletionen zusammen ergeben L1-Proteine, die nur noch „kleine“ VLPs mit 30 nm Durchmesser und einer T=1 Symmetrie bilden können (Chen, Garcea et al. 2000). Mutationen in den strukturgebenden Domänen verhindern die korrekte Faltung des L1-Proteins und wirken sich auf die Partikelbildung fatal aus (Paintsil, Muller et al. 1996). Für die Stabilität der VLPs und DNA-haltiger Viruskapside sind Disulfidbrücken zwischen C-175 und C-428 dreier benachbarter Pentamere wichtig (Sapp, Fligge et al. 1998).

VLPs gleichen nativen Virionen in Größe, Symmetrie und vor allem in den neutralisierenden Epitopen, die sie auf ihrer Partikeloberfläche tragen. Da VLPs starke virusneutralisierende, humorale Immunantworten auslösen können wurde diese Eigenschaft zur Impfstoffentwicklung genutzt (Christensen, Kirnbauer et al. 1994; Christensen, Reed et al. 1996; Kirnbauer, Chandrachud et al. 1996). Auf L1-VLPs von HPV 6, -11, -16, und -18 basieren die ersten zugelassenen prophylaktischen HPV Vakzine (Poland, Jacobson et al. 2005; Harper, Franco et al. 2006; Lowy and Schiller 2006; Villa, Ault et al. 2006). Mit VLPs wurden die ersten Zell-Bindungsexperimente für humanpathogene Papillomviren vorgenommen (Roden, Kirnbauer et al. 1994; Muller, Gissmann et al. 1995; Zhou, Gissmann et al. 1995; Qi, Peng et al. 1996). Dadurch konnte gezeigt werden, dass L1-VLPs mit BPV Virionen um denselben zellulären Rezeptor und um die Aufnahme in Zellen kompetieren. Die ersten Schritte im frühen Infektionsverlauf, die Clathrin-abhängigen Aufnahme und der Transport in Endosomen, sind für BPV Virionen und VLPs identisch (Zhou, Gissmann et al. 1995; Bousarghin, Touze et al. 2003; Day, Lowy et al. 2003).

1.3.2 Pseudovirionensysteme

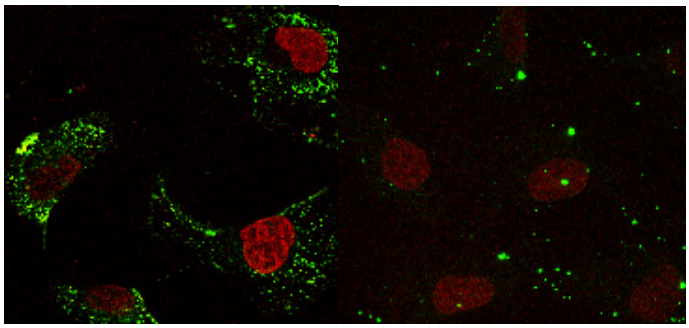
Mit der Pseudovirionentechnologie wurden neben Erkenntnissen über die frühe Infektionsphase auch Informationen über neutralisierende Antikörper und mögliche antivirale Wirkstoffe wie beispielsweise Carragen gesammelt (Baba, Snoeck et al. 1988; Buck, Thompson et al. 2006).

Es gibt verschiedene Systeme zur Erzeugung der Pseudovirionen. In den meisten Systemen wird der Transfer eines Reportergens in eine eukaryotische Zelle als erfolgreiche Infektion gewertet (Sapp and Selinka 2005). Bei den auf VLPs basierenden Pseudovirionen werden VLPs, die aus Insektenzellen aufgereinigt werden, mit einen DNA-Molekül oder einem Fluorochrom wie beispielsweise CFDA-SE chemisch gekoppelt und die Aufnahme in die Zellen verfolgt (Combita, Touze et al. 2001; Drobni, Mistry et al. 2003). Bei den DNA-haltigen Pseudovirionen wird von den L1- und L2-Strukturproteinen ein DNA-Plasmid mit eingeschlossen, das die Größe und einige Sequenzen des viralen Genoms trägt, die für die Verpackung der DNA wichtig sind. Auf dem Plasmid ist ein Reportergen wie beispielsweise *gfp* oder *β-gal* codiert. Im Hefesystem werden die Strukturproteine L1 und L2 durch einen induzierbaren Expressionsvektor in *Saccharomyces Cerevisiae* Zellen exprimiert (Rossi, Gissmann et al. 2000). Durch die Verwendung starker, Galaktose-induzierbarer Promotoren, können hohe L1- und L2-Proteingehalte erzielt werden. Die Proteine verpacken ein *gfp*-tragendes Reporterplasmid von 7,9 kb Größe aber auch zelluläre DNA-Fragmente adäquater Größe können verpackt werden (Rossi, Gissmann et al. 2000). Im Vaccinia-Virus System und im Semliki-Forest-Virus System exprimieren rekombinante Viren die beiden Strukturproteine L1 und L2. Verpackt werden ein in den Zellen episomal relizierendes BPV-Genom oder ein vorhandenes DNA Plasmid (Liu, Frazer et al. 2001; Sapp and Selinka 2005). Von den über hundert humanpathogenen Papillomviren sind bisher HPV 5, -6, -11, -16, -18, -31, -33, -40, -45, -58, -59 und -68 als Pseudovirionen erzeugt worden (Roden, Greenstone et al. 1996; Unckell, Streeck et al. 1997; Combita, Touze et al. 2001; Buck, Pastrana et al. 2005). Das erst kürzlich von Buck und Kollegen entwickelte System, in dem 293T Zellen transient transfiziert werden, ist in der Lage, Pseudovirionen in Konzentrationen von bis zu 1 Milliarde transduzierenden Einheiten pro Milliliter zu erzeugen. Die 293T Zellen tragen zusätzliche Expressionskassetten für das SV40 large-T-Antigen welches für die Replikation des SV40-*ORI* tragenden DNA Plasmids sorgt. Die aus diesem System gewonnenen und nach Buck et al. gereiften Pseudovirionen haben eine große Anzahl Disulfidbrücken zwischen ihren L1 Pentameren geschlossen und sind soweit stabilisiert, dass sie im Gegensatz zu bisher erzeugten Pseudovirionen bei -80°C gelagert werden können (Buck, Pastrana et al. 2005).

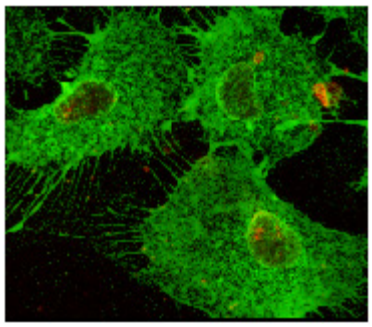
1.4 Zellvermittelte Bindung von Papillomviren und potentielle Rezeptoren

1.4.1 Zellvermittelte Bindung und Aufnahme von Papillomviren

Die Bindung des Virus an eine Wirtszelle ist der erste Schritt in einer viralen Infektion. Papillomviren und VLPs binden unterschiedlich stark an eine Vielzahl verschiedener Zellinien (Roden, Kirnbauer et al. 1994; Muller, Gissmann et al. 1995; Volpers, Unckell et al. 1995; Qi, Peng et al. 1996). Die stärkste Bindung kann auf Zellen epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden. Gewebe, das produktive Papillomvirus-Infektionen ermöglicht (Qi, Peng et al. 1996; Da Silva, Velders et al. 2001).



BPV 1 Virionen



BPV 1 L1 VLPs

Abb. 1.4: Bindung von BPV 1 Virionen und BPV 1 VLPs an CV-1 Zellen*. Um die Bindung von BPV 1 an CV-1 Zellen zu untersuchen wurden die Zellen mit den VLPs oder den Virionen inkubiert und mit einem gegen BPV 1 L1 gerichteten Erstantikörper und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Sowohl die aus infiziertem Gewebe extrahierten BPV 1 L1/L2 Virionen wie auch die in Insektenzellen hergestellten BPV 1 L1 VLPs sind in der Lage, an CV-1 Zellen zu binden (Abbildung K. Parsche).*

Versuche mit L1 VLPs zeigen, dass L1 für die Bindung und Aufnahme von VLPs durch unterschiedliche Zellen ausreichend ist. Die VLPs dieser Studien waren einige Zeit nach der Aufnahme im perinucleären Raum und in Kompartimenten des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert (Muller, Gissmann et al. 1995). Einer neueren Untersuchung zufolge akkumulieren L1 VLPs jedoch in den Endosomen und werden dort abgebaut, da ihnen das zur Freisetzung, zum weiteren Transport an das ER und zur Bindung des Syntaxins 18 im ER benötigte L2 Protein fehlt (Bossis, Roden et al. 2005; Florin, Becker et al. 2006; Kamper, Day et al. 2006). Dies steht im Einklang mit Berichten, die bei Pseudovirionen-Infektionen eine wesentliche Steigerung der Transduktionseffizienz erzielen, wenn L2 im Kapsid enthalten ist (Buck, Pastrana et al. 2005).

Die Bindung und Aufnahme von Papillomviren erfolgt sehr schnell; bereits nach 10 min ist die halbmaximale Zellbindung erreicht (Zhou, Gissmann et al. 1995). Die Aufnahme von Papillomviren in die Zelle ist bei 37°C nach 30 min fast abgeschlossen. In der indirekten Immunfluoreszenz sind nach 30 min die L1-Signale im Zellinneren lokalisiert (Muller, Gissmann et al. 1995). Bei einigen PV wie HPV 31 und Pseudovirionen des Typs 33 wurden

auch langsamere Aufnahmezeiten beobachtet (Selinka, Giroglou et al. 2003; Patterson, Smith et al. 2005). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen die Kapside in Endosomen und *Coated Pits* (Zhou, Gissmann et al. 1995; Day, Lowy et al. 2003). Für die meisten der bisher untersuchten PV wurde eine Clathrin-abhängige Aufnahme, in zwei Fällen, HPV 31 und HPV 58, ein Caveolin-abhängiger Prozeß beschrieben (Bousarghin, Touze et al. 2003; Day, Lowy et al. 2003; Patterson, Smith et al. 2005). Der Transport durch das Zytoplasma ist durch Mikrofilament- bzw. Mikrotubuli-zerstörende Substanzen wie Cytochalasin B und Taxol inhibierbar (Muller, Gissmann et al. 1995; Liu, Qi et al. 2001). Nach 60 min lokalisiert das Hauptkapsidprotein L1 an der Kernmembran und im Zellkern (Zhou, Gissmann et al. 1995). Der Prozess des *Uncoating* muss noch im Cytoplasma stattfinden, da am Kern keine vollständigen Kapside nachweisbar sind (Zhou, Gissmann et al. 1995).

Bei Bindungsstudien kann gezeigt werden, dass Zellen 1-2 x 10^4 Bindungsstellen für VLPs aufweisen und dass die Bindung dabei eine Sättigung erfährt. Die Bindung von VLPs ist Trypsin und Heparinase sensitiv (Qi, Peng et al. 1996). Derselbe Rezeptor wird von allen bislang untersuchten Papillomviren genutzt. Das zeigen Studien, in denen die Bindung von Papillomviren einer Spezies durch Bindung von VLPs einer anderen verhindert wird. (Roden, Kirnbauer et al. 1994; Muller, Gissmann et al. 1995).

Die Beobachtung, dass Zellen verschiedener Spezies große Mengen Papillomviren binden können und dass verschiedene Papillomviren um denselben Rezeptor kompetieren, deutet darauf hin, dass der Rezeptor ein zwischen Spezies stark konserviertes Molekül sein muss. Im Einklang mit diesen Überlegungen wurden in der Zwischenzeit einige Moleküle als Rezeptor vorgeschlagen, die diese Kriterien erfüllen.

1.4.2 Integrin-α6 als möglicher Rezeptor für Papillomviren

Evander et al. beschrieben 1997, dass HPV 6b VLPs an ein Protein der extrazellulären Matrix, das Integrin-α6 (CD49f), binden (Evander, Frazer et al. 1997). Integrin-α6 und gebundene HPV 6b VLPs co-lokalisierten in den angefertigten Gewebeschnitten an der Oberfläche basaler und suprabasaler epithelialer Zellen. Sämtliche Mitglieder der Integrin-Familie sind durch Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert und bilden Heterodimere aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit. Das Integrin-α6 dimerisiert ausschließlich mit der β1- oder der β4- Untereinheit (De Melker and Sonnenberg 1996). Während die α6β1- und α6β4-Komplexe auch auf Lymphocyten und Endothelien zu finden sind, gilt Integrin-α6β4 jedoch als das „epitheliale Integrin“, da es besonders stark in Epithelien exprimiert wird (Sonnenberg, Linders et al. 1990; Sonnenberg, Calafat et al. 1991). In den Epithelien findet auch die natürliche, produktive Papillomvirus-Infektion statt. Zellen epithelialen Ursprungs binden am meisten HPV VLPs (Qi, Peng et al. 1996).

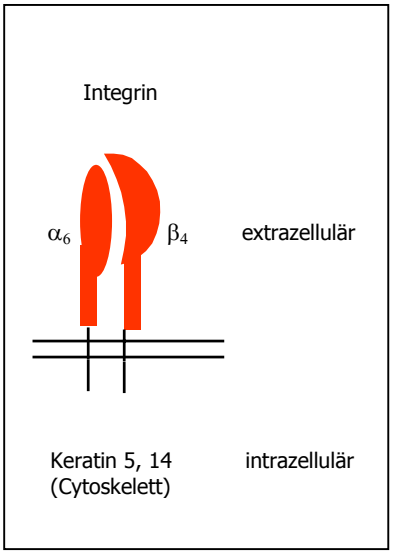


Abb. 1.5: Struktur eines Integrin-Dimers. *Integrine bestehen aus einer α- und einer β-Untereinheit. Verschiedene α-Untereinheiten können mit mehreren β-Untereinheiten dimerisieren. Die Dimere werden zell- und gewebespezifisch exprimiert. Als Papillomvirus-rezeptor wurde α6β4 vorgeschlagen, ein Integrin, das auf Epithelien vorkommt (Sonnenberg, Calafat et al. 1991; Evander, Frazer et al. 1997). Extrazellulär ist es mit Laminin verbunden. Die Affinität des Integrins für den Liganden wird durch Signale von Chemokin Rezeptoren gesteuert, die letztendlich zu einer Konformationsänderung in der α-Untereinheit führen. Durch intrazellulären Wechselwirkungen ist es mit Keratinen, dem Zytoskelett und Kinasen wie der Focal Adhesion Kinase (FAK) verbunden, über die Signale äußerer Veränderungen in das Zellinnere gelangen. (Wei, Shaw et al. 1997)*

Integrine sind Bestandteil der Hemidesmosomen und verankern die Zellen mit der Basalmembran (Sonnenberg, Calafat et al. 1991; Borradori and Sonnenberg 1996). Über Wechselwirkungen mit dem Actincytoskelett verbinden die Integrine den Extrazellulärraum der Zellen mit dem Zellinneren (Niessen, Hogervorst et al. 1994). Einige Kriterien als Papillomvirus-Rezeptor erfüllen die Integrin-α6 Komplexe, indem sie zwischen unterschiedlichen Spezies sehr weit verbreitet und stark konserviert sind. Evander et al. beobachteten, dass HPV 6b VLPs in der Lage sind, das Integrin-α6 Glycoprotein aus Zellextrakten zu präzipitieren (Evander, Frazer et al. 1997). Ein gegen Integrin-α6 gerichteter, monoklonaler Antikörper fällte mit dem Integrin auch das Papillomvirus-Kapsidprotein L1 aus Zellpräparationen, die zuvor mit HPV 6b VLPs inkubiert wurden. Berichtet wurden auch, dass der monoklonale anti-Integrin-α6 Antikörper GoH3 die Bindung von HPV 6b VLPs an HaCaT-Zellen um 60 % reduzieren kann (Aumailley, Timpl et al. 1990). Diese Beobachtung wurde aber in der Zwischenzeit durch Berichte derselben Arbeitsgruppe wieder relativiert (Drobni, Mistry et al. 2003). Ebenso setzt der natürliche Ligand des Integrin-α6β4-Komplexes, das Laminin, die Bindung von HPV 11 VLPs an HaCaT Zellen um 20 % herab (Joyce, Tung et al. 1999).

Jedoch finden sich in der neueren Literatur zunehmend Hinweise, dass Integrin-α6 nicht als obligatorischer Papillomvirus-Rezeptor gelten kann, da Sibbet et al. bei ihren Untersuchungen mit authentischen, bovinen Papillomviren feststellten, dass BPV 4 bei der Bindung und Infektion von Keratinocyten nicht auf Integrin-α6 angewiesen ist (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000). BPV 4 infiziert nicht nur Keratinocyten, sondern auch Fibroblasten. In den Versuchen von Sibbet konnte gezeigt werden, dass BPV 4 Virionen an Integrin-α6-negative Keratinocyten und Integrin-α6-negative Fibroblasten genauso stark binden können wie an Integrin-α6-positive Keratinocyten. Die Infektion mit BPV 4 Virionen zeigte, dass das virale Genom in humane, Integrin-α6-negative Keratinocyten ebenso wie in Integrin-α6-negative, bovine Fibroblasten transduziert wurde und Transkripte des viralen E7

Gens nachweisbar waren (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000). Vor kurzem wurde diese Beobachtung auch bei humanen Papillomviren bestätigt. Versuche mit HPV 11 Virionen und HPV 33 Pseudovirionen zeigten, dass die Aufnahme von HPV 33 Pseudovirionen in COS-7 Zellen und HPV 11 in Keratinocyten Integrin-α6-unabhängig erfolgen kann (Giroglou, Florin et al. 2001; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Ein monoklonaler Antikörper gegen Integrin-α6 konnte nach Präinkubation der Zellen eine Infektion durch die Pseudovirionen nicht verhindern (Giroglou, Florin et al. 2001). HPV 6b, HPV 11 und HPV 33 sind humanpathogene Papillomviren, für die Integrin-α6 als Rezeptor untersucht wurde. Während HPV 6b an Integrin-α6 bindet (McMillan, Payne et al. 1999), ist es bei HPV 11 und HPV 33 nicht für die Aufnahme in Zellen notwendig (Giroglou, Florin et al. 2001; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Aus diesen Gründen sind die Integrin-α6 Komplexe heute als Rezeptor sehr umstritten und bislang nicht als obligatorischer PV Rezeptor akzeptiert.

1.4.3 Heparansulfat als potentieller Rezeptor für Papillomviren

Heparansulfate (HS) als mögliche Rezeptoren wurden neben Sialinsäuren durch Roden et al. vorgeschlagen (Roden, Kirnbauer et al. 1994). Die Gruppe leitete ihre Überlegung durch die Beobachtung her, dass Papillomviren auf Zellen eine hohe Anzahl Bindungsstellen besetzen und Zellen verschiedener Spezies mit gleicher Affinität binden. Das Molekül wurde nicht weiter untersucht, da Qi et al. bei der Behandlung von CV-1-Zellen mit Glycosidasen keine Veränderungen in den Bindungseigenschaften der Zellen feststellte (Qi, Peng et al. 1996). Erst in Jahr 1999 wurde durch Joyce et al. die Bindung von HPV 11 an Heparansulfat gezeigt (Joyce, Tung et al. 1999). Seitdem ist die Anzahl der Papillomviren, für die eine Interaktion mit Heparin bzw. Heparansulfat dokumentiert wurde, stetig gestiegen. Zur Zeit sind HPV 6b, 11, 16, 18, 31, 33, 38, 39, 45, 58, 59 und BPV 4 als Heparansulfat-bindend beschrieben (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Combita, Touze et al. 2001; Giroglou, Florin et al. 2001; Drobni, Mistry et al. 2003; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Neuere Arbeiten widmen sich der Struktur der HS Polymere die von PV als Interaktionspartner akzeptiert werden. So zeigt sich, dass PV Polysaccharide binden können, die neben O- und N-Sulfatierungen eine ähnliche Ladungs- und Polymerstruktur aufweisen wie Heparansulfate (Christensen, Reed et al. 2001; Selinka, Giroglou et al. 2003; Buck, Thompson et al. 2006).

Heparansulfate sind unverzweigte Polysaccharidketten, die sich aus D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure und D-Galaktosamin zusammensetzen (Gallagher 2001). Sie werden an sogenannte Core Proteine synthetisiert, über die sie in der Plasmamembran verankert sein können (Iozzo 2001). Abhängig von der Identität des Core Proteins wird es über eine Transmembrandomäne oder über einen GPI-Anker in der Zellmembran befestigt.

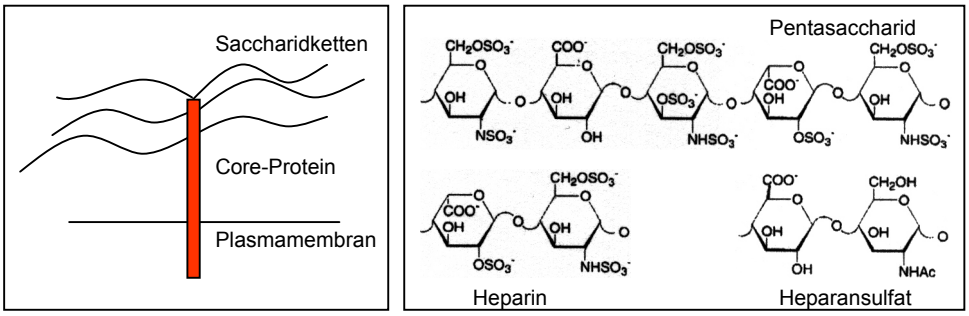


***Abb. 1.6**: **Struktur zellulärer Heparansulfate.** Die Heparansulfate der extrazellulären Matrix bestehen aus einem Core Protein aus der Familie der Syndecane oder der Glypikane, an dem die unverzweigten Polysaccharidketten befestigt sind. Die dominierende Disaccharideinheit im Heparin, das sezerniert wird, trägt vier negative Ladungen, während im Heparansulfat eine so hohe Ladungsdichte nur in wenigen Abschnitten vorkommt. An Heparansulfate binden eine Reihe von Viren wie beispielsweise HSV 1 (Laquerre, Argnani et al. 1998) und Wachstumsfaktoren wie bFGF (Faham, Hileman et al. 1996). Für die anticoagulierenden Eigenschaften des Heparins ist die oben gezeigte Pentasaccharidsequenz verantwortlich, die das Antithrombin bindet (Abbildung verändert nach Lindahl et al. 1999)*

Heparinase-Behandlung der Zellen oder Behandlung mit Na-Chlorat, das die Glukosaminoglykansynthese inhibiert, verringert die Bindung von HPV 11 an HaCaT-Zellen drastisch (Joyce, Tung et al. 1999). Ebenso kann eine Heparinase-Behandlung von Zellen die Infektion durch HPV 11, BPV 4 oder HPV 31b Virionen senken (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003; Patterson, Smith et al. 2005).

Aktuelle Berichte zeigen, dass die Mehrheit der bisher untersuchten Zelltypen Papillomviren über ihre Heparansulfate binden. Jedoch ist für die Bindung bestimmter Papillomviren wie beispielsweise HPV 31 an primäre humane Keratinocyten, HPV 5 an HeLa-Zellen und HPV 16 an Langerhanszellen, die antigenpräsentierenden Zellen der Epithelien, eine Heparansulfat-unabhängige Interaktionen beschrieben worden (Fausch, Da Silva et al. 2003; Yan, Peng et al. 2004; Bousarghin, Hubert et al. 2005; Hubert, Caberg et al. 2005; Patterson, Smith et al. 2005; Buck, Thompson et al. 2006).

Eine Heparin-Interaktionsdomäne im L1 Protein wurde bisher nur durch Joyce et al. für HPV 11 beschrieben (Joyce, Tung et al. 1999). Diese Region am C-Terminus des Hauptstrukturproteins L1 wird jedoch, basierend auf den für HPV 16 L1 VLPs und BPV 1 Virionen veröffentlichten Atomkoordinaten, im Inneren der VLPs vermutet, so dass die Daten zu dieser Heparinbindungsstelle noch sehr umstritten sind (Joyce, Tung et al. 1999; Chen, Garcea et al. 2000; Giroglou, Florin et al. 2001; Modis, Trus et al. 2002; Bousarghin, Touze et al. 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Rolle verschiedener Moleküle bei der Bindung und der Infektion von Zellen durch Papillomviren geklärt werden.

Besondere Aufmerksamkeit wird dabei den Molekülen Integrin alpha 6 und Heparansulfat geschenkt, da sie als potentielle Interaktionspartner für Papillomviren beschrieben wurden. Papillomviren können derzeit noch nicht in ausreichenden Mengen aus der Zellkultur gewonnen werden. Für die Bindungsstudien wurden daher HPV 16-, HPV 11- und BPV 1-Virus-ähnliche Partikel (VLPs) hergestellt und aufgereinigt. Um die Virusaufnahme in Zellen zu untersuchen, wurden HPV16 Pseudovirionen (PsV) erzeugt und bovine Papillomviren aus infiziertem Gewebe extrahiert. Die potentiellen Rezeptoren wurden auf verschiedenen Zelltypen stabil exprimiert und auf Bindung und Aufnahme von Papillomviren hin untersucht. Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

- *Spielt das zelluläre Protein Integrin alpha 6 bei der Bindung und Infektion von Zellen eine wesentliche Rolle?*
- *Vermitteln Heparansulfate die Bindung von Papillomviren an Zellen?*
- *Zeigen VLPs, deren Hauptstrukturprotein modifiziert wurde, ein geändertes Bindungsverhalten?*
- *Welche Rolle spielt der Carboxylterminus der L1 Proteine von HPV 11, HPV 16 und BPV 1 bei der Bindung an Polysaccharide und an Zellen?*
- *Welchen Einfluss haben definierte Veränderungen der VLP-Oberfläche auf die Bindung virus-neutralisierender monoklonaler Antikörper?*

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

2.1.1.1 Chemikalien

Acrylamid (30%)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
ABTS	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
APS	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Bovines γ-Globulin	Bio-Rad, München
Cäsiumchlorid, $CsCl_2$	Merck, Darmstadt
Coomassie brilliant blue	Gerbu, Gaiberg
DAPI	Sigma, Deisenhofen
Dextran	Sigma, Deisenhofen
Di-NatriumhydrogenPhosphat	Merck, Darmstadt
Disaccharide	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze, Niederlande
EDTA	Merck, Darmstadt
EDTA-free Proteinase Cocktail	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
FITC Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt zur Bakterienkultur	Difco, Hamburg
Heparin	Braun, Melsungen
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid, $CaCl_2$	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid LiCl	Merck, Darmstadt
LMW-Heparin	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NatriumdihydrogenPhosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
Natriumluminol	Sigma, Deisenhofen
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Pepton	Life Technologies, Paisley, Schottland
Heringsspermien DNA	Life Technologies, Paisley, Schottland
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Tris-Cl	USB, Cleveland, USA
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt

Tween-20	Gerbu, Gaiberg
X-Gal	RPI, Massachusettes, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	Difco, Hamburg
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Pepton	Difco, Hamburg
Trypton	Difco, Hamburg
Poly-L-Lysine	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Sigma, Deisenhofen

Radiochemikalien

☢ α-^{32}P dCTP	GE-Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.1.1.2 Säuren und Basen

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Para-hydroxy-coumarsäure (trans)	Sigma, Deisenhofen

2.1.1.3 Säulenmaterial

Protein-A Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Hi-Trap Heparin Säulen	Sigma, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B Säulen	Sigma, Deisenhofen
Sephadex G-25	Sigma, Deisenhofen
Sephadex G100	Sigma, Deisenhofen

2.1.1.4 Enzyme

DNA Polymerase (Klenow-Fragment)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*)	Promega, Madison, USA
Pwo DNA Polymerase (*Pyrococcus woesei)*	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwabach
Maus Moloney Leukaemia Virus-Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Calf Intestin Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-Ligase	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.1.5 Cytokine, humane und murine

IFNα, IFNγ, TNFα, IL1-β	Prof. Dr. R. Zawatzky, DKFZ Heidelberg

2.1.1.6 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Geneticin G418	Life Technologies, Paisley, Schottland
Hygromycin	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.1.7 Zellkulturlösungen

RPMI	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin 100 U/ml	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
TNM-FH	Sigma, Deisenhofen
Excell 405	JRH Bioscience, Lenexa USA
Trypsin (0,25%) /EDTA (1mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypanblau	Fluka, Neu-Ulm

2.1.2 Antikörper

F8521 anti Maus IgG FITC Konjugat $F(ab')_2$ Fragment aus Ziege	1:1000 FACS	Sigma, Deisenhofen
F9887 anti Maus IgG FITC Konjugat aus Ziege	1:1000 FACS	Sigma, Deisenhofen
12095062 anti Ratte IgG FITC Konjugat aus Ziege	1:1000 FACS	Dianova, Hamburg Jackson Lab., USA
MAB570 anti Heparin IgG2b aus Maus	1: 100 FACS	Chemikon, Temecula, USA
30621A-3G8 anti CD16 (humaner Fc-Rezeptor) IgG1 aus Maus	1: 500 FACS	Beckton Dickinson (PharMingen), San Diego, USA
MCA1193 anti CD16 (humaner Fc-Rezeptor) IgG1 aus Maus	1: 500 FACS	Biozol, Eching Serotec, UK
30931A anti CD32 (humaner Fc-Rezeptor) IgG2b aus Maus	1: 500 FACS	Beckton Dickinson (PharMingen), San Diego, USA
MCA1075-AT10 anti CD32 (humaner Fc-Rezeptor) IgG1 aus Maus	1: 500 FACS	Biozol, Eching Serotec, UK
30701A anti CD104 (humanes Integrin β4) IgG2b aus Maus	1: 500 FACS	Beckton Dickinson (PharMingen), San Diego, USA
30771A –GoH3 anti CD49f (humanes Integrin α6) IgG2b aus Maus	1: 500 FACS	Beckton Dickinson (PharMingen), San Diego, USA
anti Maus IgG Peroxidase Konjugat aus Ziege	1: 4000 ELISA 1: 2000 Western Blot	Sigma, Deisenhofen
anti Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat aus Ziege	1: 4000 ELISA 1: 2000 Western Blot	Sigma, Deisenhofen
1.3.1.55 anti HPV16 L1 FITC Konjugat aus Maus (Hybridom) konformationsspezifisch	1:800 FACS 3-7 Moleküle FITC/AK	Dr. Martin Müller, DKFZ Heidelberg
5B6 anti BPV L1 aus (Hybridomüberstand)	1:20 Immunfluoreszenz	Dr. Martin Müller, DKFZ Heidelberg
#14 anti BPV L1/E7 VLPs Serum aus Kaninchen	1:2000 Western Blot	Katja Parsche Stefanie Mattil
#10 anti BPV L1/E7 VLPs Serum aus Kaninchen	1:2000 Western Blot	Katja Parsche Stefanie Mattil
4543 anti HPV16 L1 VLPs Serum aus Kaninchen	1: 4000 ELISA	Dr. Juan Rossi, DKFZ Heidelberg
camvir anti HPV16 L1 (linearisiertes Epitop) aus Maus (Hybridomüberstand)	1:50 Western Blot	Dr. Chen Zhou, Centre for Immunology & Cancer Research; Brisbane, Australien
DAKO anti HPV16 L1 (linearisiertes Epitop) aus Kaninchen	1:2000 Western Blot	DAKO, Illinois, USA
H16.V5, H16.U4, H16 S1, H16.H5 anti HPV16 L1	1:100 ELISA	Dr. Neil D. Christensen; Jake Gittlen Cancer Research Institute, Pennsylvania, USA
Hybridome #4,#5,#7 anti HPV16 L1 VLPs		Dr. Martin Müller, DKFZ Heidelberg
1.4.7.22 (Hybridom) anti HPV16 L1 VLPs		Dr. Martin Müller, DKFZ Heidelberg

2.1.3 Oligonukleotide

2.1.3.1 RT-PCR Primer

GACAGACCCCGGTTTTCACAT	BPV 1 E6 E7 Gen
CGCAGTTTCCACAGCAGACAG	BPV 1 E6 E7 Gen
TGGAGATTGTTGCCATCAACGACC	GAPDH
GATGGCATGGACTGTGGTCATG	GAPDH
CTTCTGCCTCTCCCACTGAC	Humanes Syndecan 3
CCCAGGTGGAGATGATGC	Humanes Syndecan 3
CAACAGCTCCATTGAAGAAGC	Humanes Syndecan 2
GGTGCCTTCTGATAAGCAGC	Humanes Syndecan 2
GGTGCTTTAAGAAAGGCGC	BPV 1 E2 Gen
AAGAGCGGAGAATAGAGCCC	BPV 1 E2 Gen
TTTGATATCATGGAGACAGCATGCGAACGTTTAC	BPV 1 E2 Gen
TTTAAGCTTGAAGTCCAAGCTGGCTGTAAAGCCGG	BPV 1 E2 Gen

2.1.3.2 HPV 16 L1 Mutationsprimer

GCAGGAACAAGTGCACTACTTGC	Aminosäure 41 R-A
ACTGCAAGTAGTGCACTTGTTCC	
CTAACAATAACGCGATATTAGTT	Aminosäure 59 K-A
GGAACTAATATCGCGTTATTGTT	
TATTAGTTCCTGCAGTATCAGGA	Aminosäure 64 K-A
AATCCTGATACTGCAGGAACTAA	
AACACTGGGGCGCAGGATCCCCA	Aminosäure 171 K-A
CATGGGGATCCTGCGCCCCAGTG	
AAACTACATACGCGAATACTAAC	Aminosäure 356 K-A
AAGTTAGTATTCGCGTATGTAGT	
ATCCCCTTAAGGCCTACACTTTT	Aminosäure 443 K-A
CAAAAAGTGTAGGCCTTAAGGGG	
CTGCAGACGTTATGACATAC	Äußerer Vektorpimer EcoRV
GACCATGATTACGCCAAGCT	Äußerer Vektorpimer Hind III

2.1.3.3 HPV 11 L1 Sequenzierprimer

ATTATTCATACCGTCCCACCATCGG	Sequenzierprimer HPV 11 L1
CTCAAGATGTCCCTTTGAACCTGGG	

2.1.4 Expressionsplasmide

pRC CMV	Invitrogen
pBluescript KS	Stratagene
pcDNA 3	Invitrogen
NT	Dr. C. Sautés, Institut Curie, Paris

2.1.5 DNA- und Proteinmarker

2.1.5.1 DNA-Längenmarker

Lambda/HindIII	Lambda/HindIII [50ng/µl]	100bp DNA Leiter
Größe der Banden in [bp]	Anteil an Gesamt DNA [%]	Größe der Banden [Bp]
23 130	47,69	1500
9416	19,41	1200
6557	13,52	1000
4361	8,99	900
2322	4,79	800
2097	4,18	700
564	1,16	600
125	0,26	500
		400
		300
		200
		100

2.1.5.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Benchmark Proteinmarker (Invitrogen)	Ungefärbter low range für Silbergele (Bio Rad)	(Bio Rad)
Größe der Banden in [kDa]	Größe der Banden in [kDa]	Protein
172,6	97,4	Phosphorylase B
111,4	66,2	Rinderserumalbumin
79,6	45	Ovalbumin
61,3	31	Carboanhydrase
49	21,5	Sojabohnentrypsininhibitor
36,4	14,4	Lysozym
24,7	6,5	Aprotinin
19,2		
13,1		
9,3		

2.1.6 Mikroorganismen

2.1.6.1 Bakterienstämme

DH5α	F⁻supE44 ΔlacU169 (ϕ 80d*lacZ*ΔM15) *hsd*R17 ($r_k^- m_k^+$) *rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi*-1 *rel*A1 *deo*R

2.1.6.2 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae #1699	MATαleu2-04 ade1 pep4 ura3 cir°	Dr. K. Jansen Merck & Co Inc. Philadelphia, USA

2.1.6.3 Zellinien

DG75	humane B-Zelllinie; Burkitt Lymphom EBV negativ	(Brielmeier, Bechet et al. 1998)
HaCaT	Immortalisierte Keratinocyten	(Fusenig 1987)
HeLa	HPV-18 positive humane, cervikale Keratinocyten	(Boshart, Gissmann et al. 1984)
K562	humane Myelocyten	(Lozzio and Lozzio 1975)
EL-4	T-Lymphom einer 9,10-dimethyl-1,2-Benzanthracen induzierten C57BL Maus	(Goldstein 1981)
THP-1	humane Monocyten	(Tsuchiya, Yamabe et al. 1980)
U937	humane Monocyten	(Epstein 1978)
WEHI 265.1	murine Monocyten	(Walker, Lanier et al. 1982)

Sf9 *Spodoptera frugiperda*	Ovar Gewebe der *Spodoptera frugiperda* Larve	(Vaughn 1977)
High five *Trichoplusia ni*	Ovar Gewebe der *Trichoplusia ni* Larve	(Vaughn 1977)

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Nitrocellulose	Schleicher und Schuell, Dassel
Dialyse Plättchen	Millipore, Eschborn
Dialyse Kammern Slide-A-Lyzer	Pierce, Rckford, Illinois USA
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Blue Cap Reagenzröhrchen	Greiner, Frickenhausen
1,5 ml Reagenzgefässe	Eppendorf, Hamburg
Whatman Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Sterilfilter 22µm Pore	Renner, Darmstadt
Röntgenfilme Kodak, BioMax MR1	Sigma, Deisenhofen
Parafilm	AMC, Chicago, USA
Geltrockenfolie	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Spritzen und Kanülen	Terumo, Leuven, Belgien
2ml Kryokonservierungsröhrchen	Roth, Karlsruhe
Zellschaber	Nalgene Nunc Incorp., Wiesbaden
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Einmalskalpelle	Megro, Wesel
Elektroporationsküvetten 4 mm	Peqlab, Erlangen
Bottle Top Filter 0,2 µm Pore	Costar, Corning, USA
Reagent-Resevoir	Costar, Corning, USA

2.1.8 Geräte und Anlagen

2.1.8.1 Zentrifugen, Rotoren, Zentrifugenbecher

Zentrifugen

Sorvall RC5C, Kühlzentrifuge	DuPont, Bad Nauheim
Centrikon T2070 ,Ultrazentrifuge	Kontron, Neufahrn
Varifuge RF, Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Sepatech Biofuge Pico	Heraeus, Hanau

Rotoren

TFT 65.13	Kontron, Neufahrn
SS 34	DuPont, Bad Nauheim
SA 600	DuPont, Bad Nauheim
GS 3	DuPont, Bad Nauheim

Zentrifugenbecher

Quick seal PA 6 ml, Ultrazentrifuge	Sorvall, Newtown, USA
GS3 500ml Polypropylen 70x130 mm	Konrad Beramek, Weinheim
Beckmann 16x76 mm quick seal 13ml 342413	Beckmann, Palo Alto CA, USA
Beckmann 14x89mm 13ml 331377	Beckmann, Palo Alto CA, USA

2.1.8.2 Sonstige Geräte und Anlagen

Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer, Norwalk, USA
Elektroblotapparatur	Bio-Rad, München
Lichtmikroskop	Hund, Wetzlar
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Multiscan MS, ELISA-Reader	Labsystems, Frankfurt a.M.
FPLC	Bio-Rad, München
FACS Sort	Becton Dickinson, Heidelberg
Expositionskasetten	Kodak, Stuttgart
Micro Pulser Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
Agarosegel-Elektrophoresekammern Horizon 58	Gibco BRL, Eggenstein
Acryamidgel-Elektrophoresekammern	Hoefer, Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Bakterieninkubator Certomat H	Braun, Melsungen

Insektenzellinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Power Supply PS305	Gibco BRL, Eggenstein
Mikrowellengerät	Sharp Electronics, Hamburg
Zellkulturinkubator	Heraeus, Hanau; Labotect, Göttingen
Ultraschallgerät	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterile Werkbank	Concept GmbH, Heidelberg
Spektralphotometer, EKB Biochrom	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
UV-Transilluminator	Konrad Bede, Wiesloch
Folienschweissgerät Impulse Sealer	TEW, USA
Tischschwenkplatte Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Wasserbad, Grant	Grant Instruments, Cambridge, UK
Transillumatoren λ=254nm und 366nm	Konrad Bede, Wiesloch
Zellkulturinkubator, CO_2-Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Stickstofftank, Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Griesheim
Pipettierhilfe Pipettboy	Integra Bioscience, Fernwald
Achtkanalpipette	Dunn Labortechnik , Asbach
Pipetten 20-,200-,1000µl	Greiner, Frickenhausen
pH-Meter	Knick, Berlin
Laborwaage MC-1	Sartorius, Göttingen
Konfokales Laserscanningmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop	Leitz Wetzlar
Kamera für Agarose Gele EASY 429K	Herolab, Wiesloch
Neubauer Zählkammer	Neolab, Heidelberg
Kühl- und Gefrierschränke,	Bosch, Labotect, Göttingen
Bead Beater	Roth, Karlsruhe
Glaskügelchen 0,5 µm	Roth, Karlsruhe

2.1.9 Computerprogramme

Endnote 4.0	ISI Research Software, Berkeley, USA
Clone Manager 5.0	Sci+Edu Software, Pennsylvania, USA
MS Office 2000	Microsoft Corp.,Redmont, USA
MS Windows 2000	Microsoft Corp.,Redmont, USA
Acrobat Reader	Adobe, California, USA
Cellquest	Beckton Dickinson, Heidelberg
SwissModel	Glaxo Smith Kline, Genf, Schweiz
HUSAR Datenbankprogramme	Bioinformatik, DKFZ, Heidelberg
FPLC Director	GE-Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
RasMol 2.7	Molecular Graphics

2.2 Standardpuffer, Lösungen und Nährmedien

2.2.1 Standardpuffer und Lösungen

Coomassie Blau für Proteingele	0,15% (w/v) Coomassie Blau 45% (v/v) Methanol 45% (v/v) H_2O 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie Brilliant Blau (97,98 mg / Tablette)	4 Tabletten / 250 ml
Coomassie Blau Entfärbelösung	45% (v/v) Methanol 45% (v/v) H_2O 10% (v/v) Essigsäure
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg / ml H_2O
Ethidiumbromidfärbelösung Agarosegele	5µl in 100ml Agaroselösung
PBS Puffer pH 7,2	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4

Phenol (wassergesättigt)	Phenol pH 7,5-8,0 TE pH 8,0 gesättigt
Chloroform-Isoamylalkohol	Chloroform: Isoamylalkohol 24:1
Phenol / CIA	50% (v/v) Phenol 50% (v/v) CIA
TE Puffer pH 8,0	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0
EDTA	1M, pH 8,0

2.2.2 Materialien molekularbiologischer und Proteinchemischer Standardtechniken

2.2.2.1 Lösungen zur DNA Präparation

Präparation von Plasmid-DNA (Minimalmaßstab)

Glucose Puffer	50 mM Glucose 10 mM EDTA pH 8,0 25 mM Tris pH 8,0
Alkali Lyse Puffer	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Natrium Acetat Lösung pH 5,2	3 M NaAcetat 1:10 verdünnen bei Fällungen
RNase Stammlösung (sterilfiltriert)	1 mg/ ml 1:20 verdünnen (50 µg/ ml)

PCR-Zusätze

dNTPs 10x	8 µl (25mM)	(DMSO 0-8 µl optional)
$MgCl_2$ 10x	8 µl	
Puffer 10x	8 µl	
Primer	je 2 µl	
DNA Template	0,5 µl	
Polymerase	0,3 µl	H_2O ad. 80 µl

Agarosegele zur DNA-/RNA-Gelektrophorese

Agarosegel	1% (w/v) Agarose p.a. (RNase frei) 30 ml TAE (RNase frei) aufkochen 2µl Ethidiumbromidlösung
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg Ethidiumbromid / ml H_2O
Ethidiumbromidfärbelösung Agarosegele	5 µl / 100 ml Agaroselösung

DNA Probenpuffer

Saccharose 6X	*Glycerol 6x*
50 % (v/v) Saccharose	30% (v/v) Glycerol
0,15 % Bromphenolblau	0,25 % Bromphenolblau
0,12 SDS	-

DNA/RNA Laufpuffer TAE	0,04 M	Tris pH 8,0
	5,71 % (v/v)	Essigsäure
	10 % (v/v)	0,5 M EDTA pH 8,0

RNA Probenpuffer FA-Mix (-20°C)

25 mM MOPS
6 mM NaAcetat
0,7 mM EDTA pH 8
4,5 % (v/v) Glycerin
0,04% (w/v) Bromphenolblau

90 µg/ml Ethidiumbromid
62 % (v/v) Formamid
8 % (v/v) Formaldehyd

2.2.2.2 Lösungen für Polyacrylamidgele zur denaturierenden Gelektrophorese

Trenngel		*12,5 %*	*10 %*
	1M Tris-HCl, pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml
	30 % Acrylamid	12,5 ml	10 ml
	H_2O	5,65 ml	8,15 ml
	10% SDS	0,3 ml	0,3 ml
	10% APS	0,3 ml	0,3 ml
	TEMED	0,015 ml	0,015 ml

Sammelgel		
	1M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
	30 % Acrylamid	1,0 ml
	H_2O	7,5 ml
	10% SDS	0,1 ml
	10% APS	0,1 ml
	TEMED	0,015 ml

Laufpuffer TGS pH 8,3		
	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	1,45 %
	SDS	0,1 %

Probenpuffer	*DTT 2X*	*β-Mercaptoethanol 4X*
1 M Tris-HCl	0,125 M pH 6,8	pH 7,5 0,4 ml
SDS	4 %	12 %
DTT/β-Mercaptoethanol	0,2 M	1,2 ml
Bromphenolblau	0,02 %	0,02 %
Glycerol	20 %	6,96 ml
H_2O		ad 10 ml

2.2.2.3 Lösungen zum Färben von Proteingelen mit Silbernitrat

Fixierlösung	30 % (v/v) Ethanol p.a. 10 % (v/v) Essigsäure p.a.
Thiosulfatlösung	30 % (v/v) Ethanol 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd 0,1 % (v/v) Natriumthiosulfat 0,4 M Natriumacetat pH 6,0
Silberlösung	100 mg Silbernitrat 25 µl 37 % Formaldehyd ad 100 ml H_2O
Entwickler	2,5 % Natriumcarbonat 40 µl 37% Formaldehyd ad 100 ml H_2O
Stopplösung	50 mM EDTA pH 8

2.2.2.4 Lösungen zum Elektrotransfer von RNA (Northern Blot)

SSC Puffer Hochsalz	2xSSC 0,1 % SDS
SSC Puffer Niedrigsalz	0,2xSSC 0,1 % SDS
SSC 20x	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
SSPE 20x	3,6 M NaCl 200 mM NaH_2PO_4, pH 7,4 20 mM EDTA pH 7,4

Hybrimix	10 % (w/v) Dextransulfat 1x Denhardts 5x SSPE 1 % (w/v) SDS 62,5 µg/ml sonifizierte Heringssperma DNA 50 % (v/v) Formamid
Denhardts 50x	1 % (w/v) Rinderserumalbumin 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) Ficoll 400 in 6x SSPE
Membran	Hybond-N

2.2.2.5 Lösungen für die radioaktive Markierung von DNA

Stopplösung	0,5 M EDTA 50 mg/ml Dextranblau
Säulenmaterial	Sephadex G-100
Oligo-labelling-Puffer 5x 100µl Klenow-Reaktion	4 mM dATP 4 mM dGTP 4 mM dTTP β-Mercaptoethanol in Lösung O 1 M HEPES pH 6,6 33 OD Random Hexadeoxynukleotidprimer in TE
Lösung O	260 mM Tris-Base pH 8 26 mM $MgCl_2$
BSA Lösung	1mg/ml BSA
Klenow-Polymerase	2U/µl

2.2.2.6 Lösungen zum Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

EMBL Puffer (Semidry Transfer)	40 mM Tris-Cl pH 10,4 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % (v/v) Methanol
Membran	Nitrozellulose, 0,2 µm Poren PVDF
Block Puffer	5 % (w/v) Trockenmilchpulver oder BSA 0,05 % (v/v) Tween-20 PBS pH 7,2
Wasch Puffer	0,05 % (v/v) Tween-20 PBS pH 7,2
Ponceau-S-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau 5 % (v/v) Essigsäure
Lösungen zur ECL-Reaktion	Luminol/Enhancer 1000:1
Luminol	1,25 mM Natriumluminol 2,7 mM Wasserstoffperoxid (30%) 0,1M Tris-Cl pH 8,5
Enhancer	11 mg Para-hydroxy-coumarsäure (trans) 10 ml H_2O

2.2.2.7 Lösung zur Proteinbestimmung nach Bradford

Farbreagenz	8 mg Coomassie Blau 10 ml 85% Phosphorsäure 85 ml H_2O

2.2.2.8 Lösungen für Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Coat Puffer	PBS pH 7,2
Block Puffer	5 % (w/v) Trockenmilchpulver 0,05 % (v/v) Tween-20 PBS pH 7,2
Wasch Puffer	0,05 % (v/v) Tween-20 PBS pH 7,2
ABTS	10mg/ml H_2O
ELISA Puffer pH=4,2	100 mM Natriumacetat 50 mM Natriumdihydrogenphosphat
Substrat Puffer	9,5 ml ELISA Puffer 0,5 ml ABTS (10mg/ml) 4 µl H_2O_2 (30%)

2.2.3 Material für Immunfluoreszenz

Beschichtung der Objektträger	Poly-L-Lysin
Fixierlösungen	100 % Ethanol p.a. (-20°C) oder 2% Paraformaldehyd (-20°C)
Block Puffer / Wasch Puffer	2,5 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween-20 PBS pH 7,2
Inkubationspuffer	2,5 % (w/v) BSA PBS pH 7,2
DAPI Stammlösung	0,05 % (w/v) in H_2O
Kernfärbung	1:100–1:10000 verdünnen in Waschpuffer
Feuchte Kammer zur Inkubation	

2.2.4 Lösungen zur Extraktion und Reinigung von PV-VLPs und Pseudovirionen

2.2.4.1 Extraktion und Reinigung von Virus-ähnlichen Partikeln aus TN high five Zellen

Extraktionspuffer (sterilfiltriert) pH=7,4	10 mM $MgCl_2$ 50 mM CaCl 150 mM NaCl 20 mM HEPES, pH 7,4 0,01 % Triton-X-100 1 mM PMSF (-20) kurz zuvor zugeben
Cäsiumchloridlösung für Gradienten (Xmg/8ml)	57,5% (w/v) $CsCl_2$ p.a. in H_2O
Saccharoselösung für Gradienten (sterilfiltriert)	40% (w/v) Saccharose p.a. in H_2O

2.2.4.2 Extraktion und Reinigung von HPV16 Pseudovirionen aus Saccharomyces Cerevisiae

Extraktionspuffer (sterilfiltriert) pH 7,4	20 mM HEPES, pH 7,0 1 mM PMSF (-70) kurz zuvor zugeben
Proteaseinhibitorcocktail (Roche)	1 Tablette / 10 ml Puffer
PMSF Stammlösung –70°C	100mM PMSF in Isopropanol

2.2.5 Material zum Kultivieren von Bakterien-, Hefen-, Säuger- und Insektenzellen

2.2.5.1 Material zum Kultivieren von Bakterien

Luria Broth LB Medium pH 7,5	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml H_2O
Terrific Broth TB Medium pH	12 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 ml Glycerol ad 900 ml H_2O ad 1000 ml 170 mM KH_2PO_4/740 mM K_2HPO_4
LB-Agar Platten	1,5 % Bacto Agar LB Medium
Ampicillinstammlösung (sterilfiltriert)	50 mg/ ml H_2O 1:1000 zur Bakterienselektion in LB
Kanamycinstammlösung (sterilfiltriert)	30 mg/ ml H_2O

2.2.5.2 Material zum Kultivieren von Hefen

Selektionsmedium Leu^-, Ura^- 1x (sterilfiltriert)	20 mg/l L-Arginin 10 mg/l L-Histidin 60 mg/l L-Isoleucin 40 mg/l L-Lysin 10 mg/l L-Methionin 60 mg/l L-Phenylalanin 60 mg/l L-Threonin 40 mg/l L-Tryptophan 50 mg/l L-Tyrosin 150 mg/l L-Valin 40 mg/l Adenin 2% (w/v) Dextrose/Glukose 18,2 % (w/v) Sorbitol 0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base H_2O
Vollmedium YPD (autoklavierbar)	1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton/ Trypton
Induktionslösung (1:10 verdünnnen, 2% Endkonzentration)	20 % Galaktose (Glukose frei)

2.2.5.3 Material zum Kultivieren von Säugetierzellen

RPMI	RPMI 1640 10 % FCS (hitzeinaktiviert 56°C, 60 min) 2 mM L-Glutamin 100 U / ml Penicillin / Streptomycin

Dulbecco´s Modified Eagle Medium	DMEM 10 % FCS (hitzeinaktiviert 56°C, 60 min) 2 mM L-Glutamin 100 U / ml Penicillin / Streptomycin
Trypsin/EDTA	140 mM NaCl 5 mM KCl 0,56 mM Na_2HPO4 25 mM Tris 5 mM EDTA 0,125 % Trypsin

2.2.5.4 Material zum Kultivieren von Insektenzellen

TNM zur Kultur der *Sf9* Zellen	TNM-FH 10 % FCS (hitzeinaktiviert 56°C, 60 min) 100 U / ml Penicillin / Streptomycin
Excell zur Kultur der Tn high five Zellen	ExCell 405 100 U / ml Penicillin / Streptomycin

2.2.6 Lösungen für die FPLC

Äquilibrationspuffer pH 7,0	50 mM MOPS 360 mM NaCl
Elutionspuffer	2M NaCl
Konservierung der Säulen und Anlagen	20% (v/v) Ethanol p.a.

2. Methoden

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Agarose Gelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zum Auftrennen von DNA oder RNA Gemischen gemäß ihrer Größe verwendet. Für ein Gel werden 0,3 Gramm Agarose in 30 ml 1xTAE Puffer gegeben, so dass eine 1%-ige Suspension entsteht. Die Agarose wird zum Sieden aufgekocht und vollständig und schlierenfrei gelöst. Nach dem Abkühlen auf 40-50 °C werden 2 µl einer (10 mg/ml) Ethidiumbromidlösung zugefügt und ein Horizontalgel der Dicke von zirka 7 mm gegossen, in das ein Kamm eingesetzt wurde. Agarose besteht aus linearen Polymerketten sich wiederholender D-Galaktose-3,6-Anhydro-L-Galaktose Disaccharide. Nach dem Festwerden der Agarose haben sich die Zuckerpolymere über Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Netzwerk zusamengelagert. Die DNA Proben werden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (30% Glycerin, 0,25 % BPB) versetzt. Die Proben werden in die Geltaschen gegeben und eine Spannung von 80 V angelegt. Durch den pH Wert des Puffers liegt die DNA deprotoniert vor und wandert im elektrischen Feld durch ihre negative Ladung zum Pluspol. Dabei muss sie das Agarosenetzwerk durchqueren. Lange DNA Polymere werden von den engen Maschen zurückgehalten, erfahren also einen hohen Widerstand und laufen langsamer durch das Gel als kürzere DNA Fragmente. Das Gemisch trennt sich in ein sogenanntes Bandenmuster auf. Durch Einlagerung des Ethidiumbromids in die DNA Helix können die Banden im Gel auf einem UV Transilluminator sichtbar gemacht werden.

2.3.2 Analytische Plasmid Isolierung aus *E. coli* nach Birnboim-Doly (Birnboim and Doly 1979)

Für eine Plasmidpräparation im Minimalmaßstab werden 1,5 ml Bakteriensuspension einer Übernachtkultur in einem Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert. Zur Vorbereitung auf die Lyse werden 100 µl des EDTA-haltigen Glucose Puffers zum Pellet gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das EDTA entzieht den Membranproteinen und Nucleasen zweiwertige Ionen, die für ihre Stabilität und Funktion wichtig sind. Die Zellmembran wird im zweiten Schritt durch die Zugabe von 200µl Alkali-Lyse-Puffer (1% SDS, 0,2M Natronlauge, 5 min 0°C) denaturiert. Natronlauge hydrolisiert zudem die bakterielle RNA. Der stark alkalische pH Wert führt zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Durch 150µl Na-Acetat pH 5,2 für 5 min bei 0°C wird die Lösung neutralisiert und die DNA Stränge der Plasmid DNA hybridisieren rasch wieder miteinender, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Das Bakterienchromosom ist mit der Zellwand verknüpft und wird mit den Zelltrümmern abzentrifugiert. Zur weiteren Aufreinigung werden die Proteine, die sich in organischen, polaren Lösungsmitteln anreichern, durch Phenol/Chloroform extrahiert. In der wässrigen Phase befinden sich nun die Nukleinsäuren, die durch Ethanolfällung konzentriert werden (Shapiro 1981).

2.3.3 Plasmid Präparation aus *E. coli* im Maximalmaßstab mittels $CsCl_2$-Gradientenzentrifugation

Bei der Plasmid Extraktion werden zunächst die Bakterien aufgeschlossen und das bakterielle Genom mit den Zelltrümmern entfernt. Im zweiten Abschnitt wird die Plasmid DNA von der RNA und den Proteinen gereinigt.

Die Bakterien einer 250 ml Übernacht Kultur werden abzentrifugiert und das Pellet in 6 ml Glucose Mix (50mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA), einer stark hypotonen Lösung aufgenommen. Zur Hydrolyse der Mureinhaltigen Bakterienzellwand, werden 30 mg Lysozym zum Ansatz gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden im zweiten Schritt durch die Zugabe des SDS und der Natronlauge lysiert (12 ml Alkali-Lyse Puffer, 5-15 min 0°C). Zur Neutralisation wird der Ansatz 10 Minuten auf Eis mit 9 ml 3M NaAcetat pH 5,2 versetzt und zur Klärung 30 Minuten bei 0°C und 18000 U/min im SS34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein 50 ml Röhrchen gegeben und zum vollständigen Abbau der RNA mit 20 µl RNase (10mg/ml) versetzt. Nach 10 min bei 37°C wird der gesamte Ansatz mit einem Volumenteil Isopropanol versetzt und 30 min bei 0°C 5000 U/min abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 4 ml TE resuspendiert. Die Löslichkeit von RNA kann durch Hinzufügen von 4 ml 5 M LiCl verringert werden. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und zur Fällung mit dem 2,5 fachen Volumen 100% Ethanol versetzt. Die Fällung wird mit 5000 U/min für 20 min bei 0°C durchgeführt. Das DNA Pellet wird getrocknet, bis es opaque erscheint. Das Pellet wird dann in 3,5 ml TE Puffer aufgenommen und vollständig gelöst. Dann werden 4,4 Gramm Cäsiumchlorid dazugegeben und gelöst. Die Cäsiumchlorid-DNA Lösung wird in ein Quick seal Röhrchen überführt und 300 µl Ethidiumbromid hizugegeben. Das Röhrchen wird bis zum Hals vorsichtig mit TE aufgefüllt und mit TE tariert, bevor es durch “crimpen“ verschlossen wird. Der Dichtegradient bildet sich während der 16-stündigen Zentrifugation bei 55 000 U/min im TGV 865 Rotor bei 20°C in der Ultrazentrifuge. Damit der Gradient beim Abstoppen nicht zerstört wird, lässt

man den Rotor in der Zentrifuge ohne Bremse zum Stillstand kommen. Unter dem UV-Licht werden in der Mitte des Gradientenröhrchens zwei DNA Banden sichtbar. Die obere Bande ist genomische Bakterien DNA und relaxierte Plasmid DNA (Le Pecq 1971). Die darunter erscheinende Bande besteht aus der Plasmid DNA, die supercoiled vorliegt und deshalb weniger Ethidiumbromid eingelagern kann. Ihre Dichte ist deshalb höher als die relaxierter DNA. Für die Entnahme der DNA wird das Gradientenröhrchen durch das Einstechen einer Kanüle am oberen Rand belüftet. Die untere Bande mit der Plasmid DNA wird über eine Spritze entnommen. Dazu wird die Kanüle knapp unter der Bande eingestochen und im UV Licht solange Lösung abgezogen, bis der Ethidiumbromidschein auf Höhe der unteren Bande nicht mehr im Röhrchen zu sehen ist. Das Ethidiumbromid und Reste des Cäsiumchlorids müssen nun entfernt werden. Die Cäsiumchloridkonzentration wird durch Zugabe von 5 Volumenteilen TE Puffer verringert. Das Ethidiumbromid wird in 2-3 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Das Ethidiumbromid geht in die n-Butanol Phase über und färbt diese rosarot. Die wässrige Phase hingegen wird entfärbt. Das Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die wässrige Phase klar ist. Das Ethidiumbromid-Butanol Gemisch muss als Sonderabfall entsorgt werden. Die Plasmid DNA wird nun mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol aus der Lösung ausgefällt und 30 min bei 5000 U/min abzentrifugiert (Shapiro 1981). Das getrocknete DNA Pellet wird in 800 µl H_2O gelöst und die Konzentration spektroskopisch bestimmt. Die DNA wurde für Transfektionen verwendet.

2.3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch gegen Wasser bestimmt. Grundlage jeder Absorptionsmessung ist das Lambert-Beer´sche Gesetz, wonach vereinfacht die Absorption eines Stoffes proportional zur seiner Konzentration ist. Das Absorptionsmaximum der Basen im DNA oder RNA Polymer liegt bei einer Wellenlänge von etwa λ=260nm. Bei dieser Wellenlänge erreicht eine DNA Lösung der Konzentration 50 µg/ml oder eine RNA Lösung der Konzentration 40 µg/ml den Absorpionswert 1. Über dieses Verhältnis wird die Konzentration der unbekannten DNA ermittelt. Um eine Angabe über die Verunreinigungen zu machen, werden bei RNA Präparationen die Proben bei λ=280, 230 und 320 nm gemessen. Bei 280 nm absorbieren vor allem die aromatischen Seitenketten der Proteine, bei 230 nm wird die Peptidbindung angeregt. Organische Komponenten wie das bei der RNA Extraktion eingesetzte Guanidiniumisothiocyanat können durch die Messung bei 230 nm nachgewiesen werden. Der A320 Wert gibt Hinweise, ob in der Präparation Polysaccharide enthalten sind. Für die Messung werden 2 µl DNA oder RNA in 400 µl Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben.

Über folgende Gleichung wird die Konzentration berechnet:

$$\text{DNA [µg/µl]} = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \qquad \text{RNA [µg/µl]} = \frac{A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

2.3.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die an eine definierte DNA Sequenz, meist Palimdrome, binden und beide DNA Stränge zwischen zwei spezifischen Basen hydrolysieren. In Bakterien erkennen Restriktionsenzyme DNA mit fremden Methylierungsmusterund spalten diese als Schutz des Bakteriums vor eindringenden Phagen. Durch Spaltung der Plasmid DNA an genau

festgelegten Schnittstellen können DNA Stücke entfernt und Klonierungen anhand der enstandenen Fragmente überprüft werden.

	Analytischer DNA Verdau		Präparativer DNA Verdau	
DNA	1	µg	12	µg
Restriktionsenzym	1-4	U	5-20	U
10X Enzympuffer	2	µl	10	µl
10X BSA (Nucleasefrei)	2	µl	10	µl
H_2O	ad 20	µl	ad 100	µl
	37°C 2h		37°C Über Nacht	

2.3.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Das DNA Gemisch eines Restriktionsverdaus oder eines PCR Ansatzes wird durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid werden die DNA Banden unter UV Licht sichtbar. Unter langwelligem UV Licht wird das DNA Fragment ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, in das Glaswolle vorgelegt wurde. In den Boden des Eppendorfreaktionsgefäßes wurde mit einer heißen Kanüle ein Loch eingeschmolzen. Das Agarosestück wird 15 min bei –20 °C eingefroren und wird durch die Eisbildung amorph. Die DNA wird durch Zentrifugation von der Agarose getrennt. Des Ethidiumbromid wird durch Ethanolfällung und Waschen in 70% igem Ethanol aus der DNA entfernt.

2.3.7 Dephosphorylierung von Vektor DNA

Beim Klonieren verhindert die Selbstligation des geschnittenen Vektors das Einfügen eines neuen DNA Fragments. Deshalb wird nach dem Restriktionsverdau der Vektor dephosphryliert. Das Enzym Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm; calf intestine alkaline phosphatase (CIP); spaltet Phophatgruppen an den freien 5´ Enden der DNA ab. CIP ist sehr stabil, seine enzymatische Aktivität bleibt in fast allen gängigen Puffern erhalten, deshalb wird es zum Restriktionspuffer dazugegeben. Vor der Ligation muss das Enzym hitzeinaktiviert und durch Phenol/Chloroform entfernt werden.

	Dephosphorylierung	
Vektor-DNA	5-10	µg
CIAP	2	µl
Restriktionspuffer	liegt vor	
H_2O	ad 100	µl
	37°C	10 min
Hitzeinaktivierung	56°C	10 min

2.3.8 DNA Ligation

Das Enzym T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5´α-Phosphat und der 3´OH Gruppe zweier benachbarter Basen. Vektor und DNA Fragment werden dadurch kovalent miteinander verknüpft. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die überhängenden Enden eines DNA Fragments mit denen des Vektors hybridisieren wird das DNA

Fragment mit einem 10-fachen Überschuss in der Reaktion eingesetzt. Der Ligationsansatz wird bei 15 °C über Nacht inkubiert und anschließend in E. coli Bakterien transformiert

	Ligationsansatz	
Vektor DNA	5-10	µg
Fragment	25	µg
5XLigationspuffer	4	µl
Ligase	0,5	µl
H_2O	ad 20	µl

2.3.9 Klenow Reaktion

Mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase kann aus einzelsträngiger DNA ein Doppelstrang synthetisiert werden. Es benötigt zur Synthese ein freies 3´-OH Ende, das durch einen Primer geliefert werden kann. Das Klenow Enzym enthält die katalytischen Eigenschaften der DNA-abhängigen DNA Polymerase I aus E. coli, ist temperatursensitiv und hat keine Korrekturleseeigenschaften (5´-3´ Exonucleaseaktivität). Mit der Klenow Reaktion wurde ein PCR Produkt als Sonde für den Northern Blot radioaktiv markiert. Als Primer dienten Hexanukleotide zufälliger Sequenz (random hexamer priming). Nicht eingebaute Nucleotide werden durch Gelfitration über eine Sephadex G-100 Säule von der DNA abgetrennt. Das negativ geladene Dextranblaupolymer wird bei der Gelfiltration genauso zurückgehalten wie die Nucleinsäure, deshalb lässt sich die Wanderung der DNA durch die Säule am Dextranblau verfolgen.

Reaktionsansatz		
PCR Fragment (denaturiert bei 100°C)	50	ng
BSA (Nucleasefrei)	1	µg
5x OL Mix (Puffer, dNTPs)	5	µl
Klenow Polymerase	4 U	2µl
☢α-^{32}P dCTP	50 µCi	(5µl)
H_2O	ad 25	
	RT, 3-12 Stunden	
Stopplösung 0,5M EDTA	5	µl
Dextranblau	10	µl

2.3.10 Transformation von Bakterien mit DNA Plasmiden (Dower, Miller et al. 1988)

Durch einen kurzen elektrischen Impuls soll die Zellmembran permeabilisiert werden, dass DNA in die Zelle hineindiffundieren kann. Wichtig für die Elektroporation ist es, das Salz aus der Kulturlösung möglicht vollständig durch mehrere Waschschritte zu entfernen.

Für eine Transformation von in E. coli Zellen mit DNA Plasmiden benötigt man zunächst “kompetente Bakterien“. Dazu werden 500 ml LB Medium mit 50 ml aus einer über Nacht Kultur im Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von OD_{600}= 0,6-0,7 inkubiert. Die Kultur wird auf Eis abgekühlt und bei 5000 U/min bei 4°C abzentrifugiert. Gewaschen wird das Bakterienpellet mit kaltem,

destilliertem Wasser. Durch den Salzverlust wird das Pellet bei jedem Waschschritt weniger fest. Nach 4 Waschschritten werden die Bakterien einmal mit 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Die Bakterien werden dann in einem Milliliter Glycerinlösung aufgenommmen, in der sie bei –70°C als 50 µl Aliquots gelagert werden können. Für die Elektroporation werden 40 µl Bakterien mit etwa 1 ng DNA auf Eis zusammengegeben und in eine 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation wird eine Spannung von 2,5 kV angelegt. Die Überlebensrate frisch transformierter Bakterien ist am höchsten, wenn sie sofort in einem Milliliter Medium resuspendiert werden. Zur Expression der Antibiotika-Resistenz werden sie eine Stunde bei 37 °C in LB ohne Antibiotikum geschüttelt. Danach werden sie auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.3.11 PCR zum Nachweis viraler Genprodukte (Innis, Myambo et al. 1988)

Die Infektion von Zellen durch BPV1 Virionen soll über mRNAs des viralen E2 Gens, das in der frühen Infektionsphase gebildet wird, nachgewiesen werden. Die Gesamt RNA wurde aus den Zellen isoliert und in einer RT Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die in der RT Reaktion hergestellte cDNA wird als Matrize in der PCR eingesetzt. Bei der PCR werden einzelsträngige DNA Moleküle durch die Polymerase zu einen Doppelstrang synthetisiert. Der Doppelstrang wir im nächsten Reaktionszyklus wieder denaturiert und beide Einzelstränge erneut komplementiert. Über mehrere Reaktionszyklen wird das DNA Molekül stetig vermehrt. Für die DNA Synthese benötigt die Polymerase neben den Deoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch ein freies 3´-OH Ende. Das OH Ende wird durch ein Oligonucleotid, den sogenannten Primer geliefert. Durch die Primersequenz kann der Bereich auf dem DNA Molekül gewählt werden, der amplifiziert werden soll. Die Primer der E2 Sequenz amplifizieren ein Produkt von 400 kb. Die Primer wurden nach folgender Formel : T_m= 4(G+C) + 2(A+T) für T_m = 60°C ausgewählt. Die Taq Polymerase aus dem Organismus Thermophilus aquaticus hat ihre optimale enzymatische Aktivität bei 72 °C. Sie ist zudem hitzestabil, so dass mehrere Denaturierungsschritte durchgeführt werden können, ohne dass sie ihre enzymatische Aktivität einbüßt.

Beispiel eines PCR-Programms

94°C	5min		
94°C	1min	⎫	Denaturierung
60°C	1min	⎬ 35 Zyklen	Hybridisierung
72°C	1min	⎭	Elongation
72°C	7min		

2.3.12 Fusions-PCR

Mit Hilfe der Fusions-PCR (Ho, Hunt et al. 1989) (Horton, Hunt et al. 1989) wurden in die L1 Sequenz Punktmutationen eingefügt. Dazu wird ein inneres Primerpaar verwendet, das die Mutation trägt und ein äußeres Primerpaar, das Schnittstellen für die spätere Klonierung einfügt. Die inneren Primer werden nach folgendem Schema synthetisiert: 5´-AAAAAAAAAAAXXXAAAAAAAAA-3´. Benachbarte Tripletts werden so mutiert, dass die Aminosäure erhalten bleibt, über den Mutationsprimer aber eine neue Restriktionschnittstelle eingeführt wird, mit der die Mutation nachgewiesen werden kann.

Die PCR vollzieht sich in zwei Schritten. Es werden zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt. Ein innerer Primer wird jeweils mit einem äußeren Primer kombiniert. Bei einer Temperatur von 54°C kommt es trotz Fehlpaarung dreier Basen zu einer Hybridisierung zwischen Template und Mutationsprimer, die Mutation wird eingefügt und in jedem weiteren Zyklus vermehrt. Ein äußerer Primer und ein Mutationsprimer stellen ein Teilfragment mit der Mutation her. Um aus den beiden Teilfragmenten das vollständige PCR Fragment zu synthetisieren, werden die Produkte beider Ansätze in einer weiteren PCR Reaktion als Template eingesetzt. Die Teilfragmente überlappen am Ort der Punktmutation und hybridisieren dort. Die äußeren Primer sorgen dafür, dass die Teilfragmente aufgefüllt werden. Das vollständige Fragment wird bei 60°C Annealingtemperatur über 25 Zyklen amplifiziert. Die Fragmente werden durch ein präparatives Agarosegel gereinigt und daraus isoliert. Die PCR Produkte werden in den bakteriellen Expressionsvektor pBluescriptKS kloniert und damit der E. coli Stamm DH5α transformiert.

2.3.13 Extraktion von Gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Gewinnung der Gesamt RNA wurden $3x10^6$ Zellen abzentrifugiert und in 600 µl RNA Lyse Puffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat) aufgenommen (Chomczynski and Sacchi 1987). Die Zellsuspension wird mit Hilfe einer 20 gauge Kanüle homogenisiert. Zum Homogenat werden 600 µl 70% Ethanol (RNAse-frei) zugegeben und vorsichtig gemischt. 600 µl der Suspension werden auf die „Quick spin“ Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 10000 U/min und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der „Flow through“ wird noch einmal über die Säule gegeben. Die Säule wird zuerst mit 700 µl RW1 Puffer gewaschen. Danach werden zweimal 500 µl RPE Puffer darübergegeben, um das Guanidinium Isothiocyanat vollständig zu entfernen. Die Säule wird durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 2 Minuten getrocknet, dann werden 38 µl H_2O auf die Membran gegeben und die RNA bei 10000 U/min für eine Minute eluiert. Die Qualität der RNA wird auf einem 1% Agarosegel überprüft. Die Konzentration und die Reinheit werden am UV-Spektrophotometer untersucht. Die RNA wird bei der RT Reaktion eingesetzt.

2.3.14 Reverse Transkription von mRNA (Melton, Krieg et al. 1984)

Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) aus Mouse Moloney Leukaemia Virus (MMLV) synthetisiert komplementäre DNA von einer RNA Matrize (Krieg and Melton 1984). Es benötigt dazu ein freies 3´-OH Ende, das über den Primer zugefügt wird. Die RT Reaktion wird benutzt, um aus der Gesamt RNA nur die Messenger RNA in cDNA umzuschreiben. Die Messenger RNA wird durch den Poly-(dT) Primer selektiert. Er bindet RNA die den Poly-A-Tail trägt. Für die Reaktion werden 1 µg RNA oder 20 µl aus einem DNase Verdau eingesetzt.

Zum Denaturieren der RNA-Struktur wird Ansatz 5 min bei 70°C inkubiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird kurz abzentrifugiert. Dann werden 2µl poly-(dT) Primer zugegeben und zur Hybridisierung 2 Minuten bei 42°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und dann 1 µl Reverse Transkriptase zugesetzt. Die Reaktion wird 90 Minuten bei 42°C gehalten und gelegentlich gemischt. Zur Inaktivierung wird die Reaktion 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Die cDNA wird für eine PCR Reaktion verwendet, in der die mRNA des viralen E2 Gens in infizierten Zellen nachgewiesen werden soll.

RT Reaktion

DNAse Verdau (1µg)	20	µl	5 min 65°C		
Oligo-d(T)$_{18}$ (0,5µg/µl)	2	µl			
dNTPs (10mM)	2	µl		2 min 42°C	
RNase Inhibitor (20u/µl)	1	µl			90 min 42°C
5x RT Puffer	8	µl			
H_2O	5,5	µl			
MMLV Reverse Transkriptase	1,5	µl			
Hitzeinaktivierung					15 min 70°C

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Diskuntinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970)

Das durch Laemmli modifizierte System arbeitet mit verschiedenen pH Werten und sorgt für eine hohe Bandenschärfe. Durch den SDS-haltigen Puffer werden die Proteine in einer Gelmatrix nach ihrer Grösse aufgetrennt.

Während der Elektrophorese beeinflusst der pH Wert des Sammelgels die Beweglichkeiten der Ionen so, dass sich die Proteine zwischen dem Leit-Ion Chlorid und dem Folge-Ion Glycin anordnen. Zwischen dem Leit- und Folgeion bildet sich eine Grenzschicht aus, in der die Proteine zu einer schmalen Zone konzentriert werden. Die Zonen wandern in das hochprozentige Trenngel. Im Trenngel, bei pH 8,8 ändert sich die Beweglichkeit des Glycins so, dass es die Proteine überholt und keinen Einfluss mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hat. Die Proteine werden nun im Trenngel nur durch den Molekularsiebeffekt des Gels aufgetrennt.

In dem diskontinuierlichen System wird zunächst das sogenannte Trenngel zwischen zwei vertikale Platten gegossen, die 1-1,5 mm Abstand voneinander haben. Die Polymerisation wird durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat in wässriger Lösung in zwei freie Radikale gestartet. Die Polymerisation des Acrylamids wird durch das zugesetzte TEMED katalysiert. Das vorhandene Bisacrylamid sorgt für die Vernetzung der Polymere. Der Vernetzungsgrad ist von der Acrylamid-Bisacrylamidkonzentration abhängig. Die Lösung wird mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um die Radikalpolymerisation nicht durch den Kontakt mit Luftsauerstoff zu behindern. Zusätzlich wird das Austrocknen des Gels verhindert. Nach der Polymerisaton wird das Butanol vom Gel entfernt und das niedrigprozentige Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zwischen die Platten wird ein Kamm eingesetzt, in dessen Taschen später die Proben pipettiert werden.

Probenvorbereitung:

Das anionische Detergenz SDS bindet an das Polypeptidrückgrat der Proteine in einem Verhältnis von 1,4 g SDS / g Protein. Durch die Anlagerung von SDS wird das Protein denaturiert und erhält eine negative Ladung, die proportional zu seiner Größe ist. Die negative Ladung lässt alle Proteine, die SDS anlagern zum Pluspol wandern. Das zugesetzte DTT reduziert die Disulfidbindungen in den Proteinen. Zur Verdichtung wird Glycerol zugefügt. Die mit Laemmli-Probenpuffer versetzte Proteinprobe wird bei 100 °C 10 Minuten aufgekocht und geladen. Wenn L1 Proben aus einer VLP Präparation analysiert werden, muss das darin enthaltene $CsCl_2$ verdünnt werden, um Präzipitation mit dem SDS zu vermeiden.

2.4.2 Denaturierende Fällung von Proteinen

In polaren, organischen Lösemitteln wie Chloroform und Aceton sind Proteine unlöslich und können damit aus einer Lösung gefällt werden. Bei der Fällung werden die Proteine aber denaturiert.
Proteinproben aus der Säulenchromatographie werden für die Elektrophorese abgenommenen und durch Fällung eingeengt. Zur wässrigen Proteinlösung wird ein Volumenteil Aceton p.a. gegeben, mit der wässrigen Phase vermischt und 10-20 min zur Fällung bei –20°C abgekühlt. Der Fällungsansatz wird 10 min bei 10000 U/min abzentrifugiert und der acetonhaltige Überstand verworfen. Das Pellet wird in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen und für die Gelektrophorese mit 2 x Laemmli Probenpuffer versetzt.

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteine bilden mit dem Coomassiefarbstoff einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von etwa 595 nm ein Absorptionsmaximum hat. Die Konzentration einer Proteinlösung wird über die Menge gebundenen Coomassies bestimmt. Als Proteinstandard wird bovines Gammaglobulin der Konzentration 1,39 mg/ml eingesetzt. Aus zwei unabhängigen Verdünnungsreihen wird die Eichgerade erstellt und der Fehler ermittelt. Von der zu bestimmenden Proteinlösung werden 3 Verdünnungen in Wasser hergestellt und 20 µl in einer Einwegküvette mit dem Farbreagenz und dem Wasser zusammengegeben. Die Reaktion wird durch Pipettieren gemischt und 5 Minuten zur Bildung des Komplexes bei Raumtemperatur inkubiert. Als Referenzlösung werden am Photometer 200 µl Farbreagenz in 800µl Wasser vermessen.

Farbreaktion			Referenzlösung		
Coomassie Farbreagenz	200	µl	Farbreagenz	200	µl
Wasser	780	µl	Wasser	800	µl
Proteinprobe	20	µl			

2.4.4 Coomassieblaufärbung zum Nachweis von Proteinen

Der Coomassieblaufarbstoff bindet an Proteine und färbt die Proteinbanden eines Gels blau an. Banden ab 0,5 µg Protein können damit sichtbar gemacht werden. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixiert die Proteine im Gel und verhindert damit das Auseinanderdiffundieren der Banden während der Färbung. Für die Färbung eines 9x13 cm Gels werden 30 ml Färbelösung (0,15% Coomassie, 45% Methanol, 45% H_2O, 10% Essigsäure) für mindestens drei Stunden zu dem Gel gegeben. Die Färbelösung wird abgenommen und kann wiederverwendet werden, wenn noch genug Farbstoff und Essigsäure enthalten sind. Das Gel wird kurz in Wasser gewaschen und in die Entfärbelösung gegeben. Das Coomassie das in der Gelmatrix gebunden ist geht schneller in die Entfärbelösung über als das Protein gebundene. Wenn die Entfärbelösung ihre Farbe nicht weiter verdunkelt, hat sich ein Gleichgewicht eingestellt und die Entfärbelösung muss gewechselt werden.

2.4.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung wird eingesetzt, um geringe Proteinmengen in einem Polyacrylamidgel nachzuweisen. Mit ihr können Proteinbanden von 5 ng sichtbar gemacht werden.
Die Ag+ Ionen, die sich an negativ geladene Aminosäuren anlagern, werden durch Thiosulfat im Alkalischen gefällt und bilden den Niederschlag im Gel an den Proteinbanden. Formaldehyd reduziert die Silberionen in alkalischer Lösung zu elementarem Silber, das den Banden die braune Färbung

gibt und sie sichtbar macht. Für die Silberfärbung werden die Proteinbanden im Gel durch die Fixierung immobilisiert. Die Fixierung dauert eine Stunde. Danach wird das Gel mit der Thiosulfatlösung 15 Minuten getränkt und dann 3x5 Minuten mit Wasser gewaschen. Die Silberlösung wird 20 min zu dem Gel gegeben und danach 2 Mal kurz in Wasser geschwenkt. Die Entwicklerreaktion braucht einige Zeit, bis sie die Banden sichtbar macht. Die Reaktion muss mit 50 mM EDTA gestoppt werden.

2.4.6 Western Blot (Semi-dry-Verfahren)

Beim Western Blot werden Proteine aus einem SDS Gel durch die angelegte Spannung auf eine aufgelegte Nitrocellulose Membran übertragen "geblottet".

Auf die Kathode der Blotkammer werden vier in Transfer Puffer (40 mM Tris pH 10,4, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol) getränkten Lagen Whatman Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Die Nitrocellulosemembran wird in methanolhaltigem Puffer gewaschen, damit die Bindungsstellen auf der negativ geladenen Nitrocellulosemembran aktiviert werden. Nitrocellulose hat dann eine Bindungskapazität von 150 µg Protein / cm² . Das Gel wird ebenfalls im Transferpuffer gesättigt und auf die Membran aufgelegt. Weitere vier Lagen getränkten Filterpapiers folgen. Die oberen Filterpapierschichten sind so zugeschnitten, dass sie nicht über das Gel hinausragen. Damit soll der Stromdurchtritt nur an der Stelle des Gels erfolgt. Geblottet wird 1 h bei 160 mA. Der Transfer kann durch die Übertragung der gefärbten Markerbanden kontrolliert werden. Die Proteinbanden werden durch eine Ponceau-S-Färbung sichtbar gemacht. Ponceau färbt Proteinbanden ab 50 ng / Bande an. Die Trichloressigsäure der Ponceaulösung fixiert die Proteine auf der Membran. Die Ponceau gefärbten Banden werden auf der Nitrocellulosemembran mit Bleistift markiert.

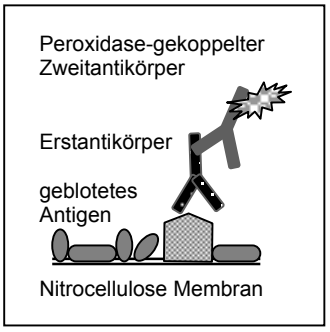


Abb. 2.7: Prinzip des Western Blots. *Die Antigen-haltige Nitrocellulose Membran wird nach dem Blotten in einem ersten Schritt mit geeignetem Blocking Reagenz zur Absättigung verbliebenener unspezifischer Bindungsstellen versetzt. In einem nächsten Schritt wird der Antigen-spezifische Erstantikörper auf den Blot gegeben und inkubiert. Nach einem Waschschritt wird der gegen Immunglobulin gerichtete Zweitantikörper aufgetragen und mit dem Blot inkubiert. Der Zweitantikörper ist mit einem Enzym (hier Peroxidase) gekoppelt, welches beim Umsetzen des Substrats eine Chemilumineszenz erzeugt, die den aufgelegten Röntgenfilm idealerweise an den Stellen belichtet, an denen der Erstantikörper sein Antigen gebunden und sich wie abgebildet ein Komplex aus Erst- und Zweitantikörper gebildet hat.*

Immunfärbung

Die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulose werden vor der Inkubation mit dem Antikörper mit BSA-PBS-T (2,5% BSA, 0,05% Tween-20, PBS pH 7,2) oder Magermilch-PBS-T (5% Magermilch, 0,05% Tween-20, PBS pH 7,2) abgesättigt. Nach kurzem Waschen mit PBS-T wird der Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:2000-1:4000 in BSA-PBS-T zugegeben und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Der erste Antikörper bindet idealerweise nur das linearisierte Antigen auf dem Blot. Ungebundener Antikörper wird durch PBS-T vom Blot gewaschen. Insgesamt werden drei Waschschritte von 5 min Dauer durchgeführt. Der zweite Antikörper ist ein Peroxidase gekoppelter Antikörper, der den Erstantikörper erkennt und daran bindet. Er wird für eine Stunde mit dem Blot inkubiert. Ungebundener Zweitantikörper wird durch drei Waschschritte in PBS-T entfernt.

Vor der “Enhanced Chemoluminescence Reaktion“ (ECL) wird der Blot noch einmal kurz in BSA Lösung geschwenkt. Bei der ECL Reaktion katalysiert die Antikörper-gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol. Die durch elektronische Vorgänge erzeugte Chemolumineszenz tritt nur dort auf, wo Zweitantikörper gebunden wurde.

Für die ECL Reaktion werden 1000 µl einer Natriumluminollösung mit 1 µl Enhancer gemischt und sofort gleichmässig auf die Membran gegeben. Nach einer Minute wird die Membran kurz abgetropft und überschüssiges Luminol vorsichtig auf einem fusselfreien Tuch abgetupft. Durch die Chemoluminessezenz kann ein Röntgenfilm belichtet werden.

2.4.7 Aufreinigung monoklonaler Antikörper über Protein A Sepharose

Protein A aus Staphylococcus aureus bindet Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne (1 Mol Protein A bindet 2 Mol IgG). Hohe Salzkonzentrationen und alkalischer pH Wert verstärken die Bindung zwischen Protein A und dem Antikörper. Ascites oder Hybridomüberstand wird mit 100 mM Tris auf pH 8 eingestellt und dann mit Protein A Sepharose inkubiert. Die Sepharose wird in eine Säule gegeben und der aufgefangene “Flow through“ noch einmal über die Säule gegeben. Eine Probe wird aus dem “Flow through“ entnommen um die Aufreinigung zu dokumentieren. Die Säule wird mit dem 10 fachen Volumen Waschpuffer (100 mM Tris, 3M NaCl pH 8) gewaschen. Der zweite Waschschritt wird mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris, 3 M NaCl pH 8) durchgeführt. Eluiert wird mit 100 mM Glycin Puffer pH 3,0. Das Eluat wird in Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen, in die 50 µl 1 M Tris pH 8 zur Neutralisation vorgelegt wurde. Der pH Wert wird um den Neutralpunkt eingstellt damit der Antikörper nicht degradiert. Protein A ist sehr stabil, deshalb kann die Säule mit 2 M Harnstoff gewaschen und 1 M LiCl regeneriert werden werden. Nachdem 100 mM Glycin pH 2,5 über die Säule gegeben wurde, kann das Säulenmateriel mit 100 mM Tris neutralisiert und aufbewahrt werden. Ascites enthält etwa 10mg Antikörper/ml, Hybridomüberstand 20-50 µg Antikörper/ml.

2.4.8 Kopplung gereinigter Antikörper mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Die nach der Affinitätsreinigung über Protein A Sepharose gewonnenen Antikörper werden auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Die Kopplungsreaktion mit FITC verläuft nur bei alkalischen pH Werten, deshalb werden 500 µl Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C gegen 250 ml Carbonatpuffer (50 mM $NaCO_3$, 150 mM NaCl pH 9,2) dialysiert.

Aus einer frisch angesetzten FITC Stammlösung (3 mg/ml DMSO) werden 0,1 ml pro 1ml Antikörperlösung hinzu pipettiert. Die Reaktion verläuft bei Raumtemperatur, unter Lichtausschluss 30 Minuten auf einem Rotationsschüttler. Um den markierten Antikörper von freien FITC Molekülen zu trennen wird eine Gelfiltration duchgeführt. Hierzu werden 3 Gramm Sephadex G-25 in 50 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 zur Quellung gebracht. Mit dem Gelbett von 19 ml wurde eine 1 x 20 cm Säule gepackt. Die Säule wurde mit dem Reaktionsansatz beschickt und mit 50 mM Tris-HCl , pH 7,5 eluiert und gequencht. Die FITC gekoppelten Antikörper passieren die Säule schneller als die freien FITC-Moleküle.

<u>Bestimmung der Konzentration und des FITC : Protein Verhältnisses der FITC Konjugate:</u>

Um die Anzahl der gebundenen FITC-Moleküle pro Antikörper und den Antikörpergehalt pro Mililiter zu bestimmen, wurde die Extinktion des Eluats bei den Wellenlängen 280 nm und 496 nm gemessen.

Der Gehalt an FITC gekoppeltem Protein lässt sich über folgende Formel berechnen (Goldmann, 1968)

$$\text{FITC-Protein [mg/ml]} = \frac{OD_{280} - (0{,}36 \times OD_{496})}{1{,}4}$$

Das F:P Verhältnis läßt sich über ein Nomogramm ermitteln (Nomogramm in Mishell und Shiigi; Selected Methods in Cellular Immunology; Freeman and Company, 1980)

2.4.9 Gelfitration

Bei der Gelfitration werden Moleküle gemäß ihrer Größe voneinander getrennt. Das Säulenmaterial besteht aus Sephadex Kügelchen, die aufeinander geschichtet werden. Sephadex besteht aus epichlorhydrin vernetztem Dextran, das je nach Polymerisierungsbedingungen große oder kleine Hohlräume ausbildet. Große Moleküle können in diese Hohlräume nicht eindringen und fließen an den Kugeln vorbei. Kleinere Moleküle geraten auf ihrem Weg durch die Säule in das Dextrannetzwerk und werden zurückgehalten. Das heißt, die effektive Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls ist umgekehrt proportional zu dem ihm zur Verfügung stehenden Diffusionsraum. Die Korngröße liegt meist zwischen 50 und 100 µm Durchmesser, der Vernetzungsgrad richtet sich nach den zu trennenden Gemischen. Die Säulen wurden bei der radioaktiven Markierung von DNA zur Abtrennung freier Nukleotide verwendet oder bei der Antikörpermarkierung zur Abtrennung des freien FITC genutzt.

Trennung	DNA von freien Nukleotiden	Antikörper von freiem FITC
Säulenmaterial	Sephadex G-100	Sephadex G-25
Migrationsmarker	Dextranblau	freies FITC
Säulenlänge	10 cm (Glaspipette)	15 cm

2.4.10 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die FPLC wird zur Aufreinigung rekombinanter Proteine oder zur Durchführung der Heparin-Bindungstests verwendet. Mit der FPLC können Säulenchromatographien durchgeführt werden, bei denen ein Elutionsverlauf programmiert und am Monitor und durch Leitfähigkeitsmessungen und UV-Absorption kontinuierlich verfolgt werden. Die FPLC besitzt zwei Pumpen und eine Mischzelle, mit denen die Pufferzusammensetzung gesteuert und lineare Elutionsgradienten gemischt werden können. Damit der Lauf am UV Monitor verfolgt werden kann, müssen die Schläuche und Apparaturen luftblasenfrei sein. Die ganze Apparatur wird deshalb mit beiden Puffern gespült, bis keine Luft mehr am UV Meter nachweisbar ist. Alle Puffer müssen filtriert sein, um zu verhindern, dass Salzkristalle die Dichtungen oder Schläuche verstopfen. Die mit Heparin-, Glutathion-, oder Protein-A-Säulen durchgeführten Chromatographien sind Affinitätschromatographien. Die Säulen werden zwischen Mixer und UV Monitor an die FPLC angeschlossen. Die Säulen werden mit Laufpuffer gewaschen und äquilibriert. Für die Leitfähigkeitsmessung muss die Messzelle geeicht werden. Der Leitfähigkeit des Niedrigsalzpuffers wird auf 0 gesetzt, der Hochsalzpuffer wird =100% Leitfähigkeit gesetzt.

Die Proteinprobe wird automatisch aus einem Reservoir dem sogenanten „Loop“ über die Säule gegeben. Gemäß der Programmierung wird der Waschpuffer über die Säule gegeben. Über die Zweite Pumpe kann der Elutionspuffer auf die Säule gegeben werden, die Leitfähigkeitsänderung

zeigt den Beginn der Elution an. Die Proteinelution kann durch die UV Absorption verfolgt werden. Nach dem Lauf wird die Anlage mit Wasser gereinigt und in 20 % Ethanol konserviert. Die meisten Säulen lassen sich in 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahren.

2.4.11 Hämagglutinationstest

VLPs binden an ein Oberflächenmolekül auf Maus Erythrocyten. Durch die Bindung an VLPs werden die Erythrocyten quervernetzt und agglutinieren. Die Agglutination ist aber reversibel. Wenn ein VLP bindender Antikörper zu den Erythrocyten-VLP Komplexen gegeben wird, werden die Erythrocyten wieder frei beweglich. Mit dem Agglutinationstest lassen sich Substanzen testen, die mit der Bindung von VLPs an Erythrocyten interferieren.

Mäuseblut wird zur Gewinnung der Erythrocyten bei 1000 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das labile Pellet wird mit PBS versetzt und bei 1000 U/min abzentrifugiert. Der Waschschritt wird viermal wiederholt. Das gewonnene Pellet wird mit PBS auf das Anfangsvolumen gebracht und 70 µl daraus für den Hämagglutinationstest verwendet. Die Erythrocyten sind im Kühlschrank etwa 3 Tage haltbar. 70 µl Erythrocytensuspension werden mit 5 ml PBS gemischt und jeweils 50 µl werden in ein Well einer 96-well Rundboden Mikrotiterplatte gegeben

Die Mikrotiterplatte wird vorher zum Absättigen der Bindungsstellen mit 5% Magermilch in PBS eine Stunde geblockt. Die Platte wird zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Erythrocyten daraufgegeben werden.

VLPs aus $CsCl_2$ Gradienten werden zur Entfernung des Cäsiumchlorids 10 Minuten einer Tropfendialyse gegen Wasser unterzogen. Die VLPs werden in PBS verdünnnt und dann zu den Erythrocyten gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 2-3 Stunden bei 4-8°C sind die Erythrocyten in den VLP-behandelten Wells agglutiniert. Die unbehandelten Erythrocyten sind in den Wells frei beweglich und rollen in der Mitte der Rundbodenplatte zusammen. Für den Hemmtest werden die Heparinderivate in PBS verdünnt und daraus 50 µl in die Vertiefungen pipettiert.

2.4.12 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Die VLP und BPV-1 Proben werden zur Abtrennung des Cäsiumchlorids 10 Minuten gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Proben werden dann 1:3 oder 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und für kurze Zeit auf ein Kohle bedampftes Kupfernetz (Mesh-300, Plano, Wetzlar) gegeben. Das Netz wird kurz zuvor unter Hochspannung beglimmt, um die Kohle hydrophil zu machen und die Probe gleichmäßig zu verteilen. Überstehende Probe wird vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Die Negativkontrastierung wird mit Uranylacetat durchgeführt. Dazu wird ein Tropfen einer 2%igen Lösung kurz auf das Netz gegeben und mit Filterpapier abgesaugt. Die Schwermetalle dringen in leere Kapside ein und lassen ihre Hohlräume dunkel erscheinen, weil wenige Elektronen durchtreten können. Nach dem Trocknen wird das Netz im Elektronenmikroskop (EM 10, Zeiss, Oberkochen) untersucht.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Säugetierzellen werden in einem Inkubator bei 37°C mit 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden in sterilen, für die Zellkultur beschichteten Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen)

gehalten und in einer sterilen Werkbank gehandhabt. Dem Medium wurden Wachstumsfaktoren durch fötales Kälberserum zugesetzt. Alle Medien erhielten zudem Penicillin und Streptomycin. Die Suspensionskulturen wurden bei einer Zelldichte von $8x10^5$ Zellen /ml subkultiviert und je nach Zellinie 1:5 bis 1:20 mit frischem Medium verdünnt. Adhärend wachsende Kulturen werden bei 80-90% Konfluenz mit Trypsin/EDTA behandelt und 1:3 bis 1:10 verdünnt.

Insektenzellen wachsen bei 27°C, 95% Luftfeuchte ohne geregelte CO_2-Atmosphäre bis zu einer Zelldichte von $2\text{-}3x10^6$ Zellen /ml heran. Die adhärend wachsenden Kulturen werden durch Pipettieren oder mit einem Zellschaber von der Unterlage gelöst und 1:5 subkultiviert. Die Suspensionskulturen werden 1:5-1:10 verdünnt.

2.5.2 Zellzahlbestimmung

Bei der Zellzahlbestimmung wurde die Anzahl lebender Zellen in der Kultur bestimmt. Der Trypanblaufarbstoff wird aus dem Cytoplasma lebender Zellen stetig herausgepumpt, tote Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau angefärbt. Eine steril entnommene Probe wird 1:1 mit Trypanblaulösung versetzt und auf eine verbesserte Neubauer Zählkammer aufgetragen. Mit korrekt aufgelegtem Deckglas gibt die Zellzahl aus 16 Zählquadraten mit dem Faktor 10^4 multipliziert die Anzahl lebender Zellen pro ml.

2.5.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren werden $1x10^7$ Zellen einer niedrigen Passage abzentrifugiert und mit 2 ml kaltem Konservierungsmedium versetzt. Damit die Temperatur beim Einfrieren pro Minute um etwa 1 °C abfällt werden die Kryokonservierungsröhrchen mit Papier umwickelt und in den –70 °C Schrank gegeben. Nach einigen Tagen werden die Röhrchen auf Trockeneis zwischengelagert und in den –196 °C Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen werden die Röhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut, in 10 ml Medium gegeben und abzentrifugiert. Damit soll das DMSO verdünnt und abgetrennt werden. Das Zellpellet wird in 3-5ml Medium aufgenommen und die Kultur im Zellkulturinkubator für eine Woche inkubiert, bevor die Zellen bei Experimenten eingesetzt werden.

2.5.4 Transfektion von DNA Plasmiden in Säugetierzellen (Potter, Weir et al. 1984; Brielmeier, Bechet et al. 1998)

Durch den kurzen elektrischen Impuls soll die Zellmembran für die DNA permeabilisiert werden

Für die Transfektion von DNA Plasmiden in Zellen wird das DNA Plasmid über eine Schnittstelle, die im Ampicillinresistenzgen liegt linearisiert. Die DNA wird in 400 ml RPMI Puffer (ohne FCS und Ampicillin) resuspendiert. Die Zellen werden bei einer Zelldichte von $5x10^5$-$8x10^5$ Zellen/ml kultiviert. Für die Elektroporation wurden $1x10^7$ Zellen pelletiert und mit dem RPMI / DNA Gemisch in die sterile, 4 mm Elektorporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 960 µF, 230 V. Nach dem Stromfluss wird denaturiertes Protein sichtbar. Der Ansatz wird noch 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach werden die Zellen vorsichtig in 5 ml RPMI, 10%FCS, Pen/Strep resuspendiert und 48 Stunden kultiviert, bevor mit der Selektion durch den Zusatz der Antibiotika begonnen wird. Durch die Transfektion sollten neue Membranproteine auf der Zelloberfläche

exprimiert werden. Das Vorhandensein wurde durch indirekte Immunfluoreszenz am Durchflusszytometer überprüft.

2.5.5 Subklonierung von Hybridomzellinien

Aus den Fusionszellen soll ein Zellklon isoliert werden, der einen für das Antigen spezifischen Antikörper stabil über längere Zeit sezerniert. Die Zellen werden in einem Kulturfläschchen zu einer hohen Zelldichte herangezogen und dann seriell auf einer 96-well Mikrotiterplatte verdünnt. Bei der Verdünnung wird ein Bereich miteingeschlossen in dem statistisch eine Zelle pro Well eingesäht wird. Da bei geringer Zellkonzentration auch die Konzentration autokriner Wachstumsfaktoren sehr gering ist wird dem Medium 10 % Condimed zugesetzt. Die Wells, in denen nur ein Klon gewachsen ist, werden mittels Imunfluoreszenz getestet. Positive Klone werden aufgezogen und wiederholt subkloniert um einen stabilen Klon zu isolieren.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Antigen-Capture ELISA

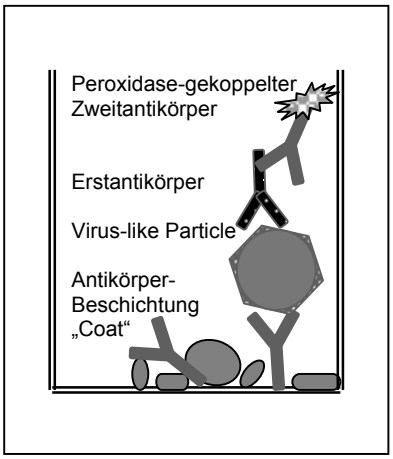


Abb. 2.8: Prinzip des Antigen-Capture ELISA. *Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden mit einem monoklonalen HPV 16 Antikörper beschichtet. Das Antigen, die HPV 16 VLPs, werden darüber gebunden. Die HPV 16 VLPs werden durch einen polyklonalen, anti-HPV 16 Kaninchenantikörper erkannt. Der gegen den Kaninchenantikörper gerichtete Zweitantikörper ist Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase setzt ein Substrat in ein farbiges Endprodukt um (Hier verwendet: ABTS). Je mehr HPV 16 VLPs in der Vertiefung vorliegen, desto mehr Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper wird binden.*

In die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte werden 50 µl Antikörperlösung gegeben und über Nacht bei 2-8°C abgedeckt inkubiert. Die Verdünnungen der Antikörper wurden in PBS Puffer mit 5%iger Magermilchlösung und 0,05% Tween-20 oder in PBS Puffer mit 2% BSA und 0,05% Tween-20 hergestellt. Gecoatet wurde bei HPV 16 mit 1.3.1.55, bei BPV 1 mit 5B6 oder Hybridom#3.6 und bei HPV 11 mit H11.B1. Die verwendeten Antikörper sind konformationsspezifisch und binden nicht an denaturierte L1 Proteine. Nachdem die Antikörperlösung von der Platte entfernt wurde, werden zum Sättigen weiterer Bindungsstellen 200 µl Magermilchlösung in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde auf dem Kippschüttler langsam gewiegt. Die Lösung wird durch Abschlagen der Platte entfernt und mindestens dreimal mit einer PBS-Tween Lösung gewaschen. Dialysierte VLPs werden aufgetragen und nach einer Stunde bei RT wird der ungebundene Anteil durch mindestens drei Waschschritte entfernt. Ein polyklonales Kaninchenserum wird aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Für HPV 16 wurde #4543, für BPV 1 Kaninchenserum #14 verwendet. Nach dem Waschen wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper aus Ziege (anti Kaninchen) in die Vertiefungen pipettiert und ungebundenes Protein nach einer Stunde Inkubation entfernt. Nach dem Waschen wurde ABTS als Enzymsubstrat in die Vertiefungen gegeben und nach 15 Minuten oder bei ausreichender

Anreicherung des grünen Farbstoffs in den Positivkontrollen die Absorption der Lösung bei 405 nm am ELISA-Reader gemessen. In einigen Assays wurden die VLPs direkt gecoatet, dies ist bei den entsprechenden Versuchen vermerkt.

2.6.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde für verschiedene Fragestellungen eingesetzt:

1.) die Aufnahme von VLPs in Zellen untersuchen.

2.) die Expression des HPV16 Strukturproteins L1 durch rekombinante Baculoviren überprüfen

3.) Hybridomzellen subklonieren

Für die Anheftung der Zellen werden die Objektträger mit positiv geladenem Poly-L-Lysin beschichtet. Das Poly-L-Lysin wird 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf dem Objektträger gelassen. Danach wird es mit destilliertem Wasser von den Feldern abgespült und die Felder getrocknet. Auf die Felder werden 30-50µl Zellsuspension aufgetragen und zur Anheftung 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Suspension wird danach vorsichtig entfernt und angeheftete Zellen werden in 100% kaltem Ethanol oder 2% Paraformaldehyd 5 Minuten fixiert. Rehydriert werden die Zellen 5 Minuten in einem PBS Bad. Der Objektträger wird getrocknet und kann nach dem Fixieren eingefroren oder in der Immunfluoreszenz weiterverwendet werden. Bei der Immunfluoreszenz werden 10-30 µl Hybridomüberstand oder ein in Milch verdünnter Erstantikörper aufgetragen und eine Stunde bei 37°C in der Kammer auf den Feldern gelassen. Die Lösung wird von den Feldern entfernt und der Objektträger 10 min in ein PBS Bad gestellt. Nach dem Trocknen wird der Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper aufgetragen. Der Zweitantikörper wird 1:1000 in 5% Magermilch-PBS verdünnt und für die Nucleinsäurefärbung wird der Lösung DAPI zugesetzt. Nach einer Stunde bei 37°C wird der Antikörper entfernt und der Objektträger zum Waschen in das PBS Bad gestellt. Nach dem Trocknen wird er mit 50% Glycerinlösung eingedeckt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht.

2.6.3 Probenvorbereitung für Durchflusscytometrische Analysen (FACS)

Zellen, die mit der cDNA eines Membranproteins transfiziert wurden, werden getestet, ob sie diese Proteine auf ihrer Zelloberfläche tragen und ob ihre PV-Bindungseigenschaften dadurch verändert sind.

Dazu wurde die Durchflusszytometrie (FACS) genutzt. Die Durchflusscytometrie ist eine Methode zur automatisierten Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen. Die Streuung eines Laserstrahls von λ=488nm an einer vereinzelten Zelle in Vorwärts-Richtung verhält sich z.B. proportional zur Größe der Zelle. Das um 90° gestreute Licht lässt eine Aussage über die Granula die in der Zelle eingelagert ist und über die Zellvitalität zu. Fluoreszierende Farbstoffe, die sich beispielsweise in toten Zellen anreichern, werden vom Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das gemessen und zur Quantifizierung herangezogen werden kann. Mit der Durchflusscytometrie sind quantitative und qualitative Aussagen über eine große Zellpopulation möglich, da während einer Messung mindestens 10.000 Zellen analysiert werden. Abhängig von der Anzahl der Waschschritte und von dem zu erwartenden Zellverlust werden für einen Ansatz zwischen $5x10^4$ und $1x10^6$Zellen verwendet. Die Zellen werden abzentrifugiert und das Kulturmedium entfernt.

Das Pellet wird in RPMI / 10% FCS oder RPMI / 5% BSA / 0,05% Tween-20 aufgenommen. Für Bindungsstudien werden zu den Zellen dialysierte PV VLPs oder BPV-1 Virionen gegeben. Bei Kompetitionen werden die entsprechenden Substanzen oder Antikörper vor VLP Bindung, bei einigen Assays auch nach der VLP Bindung zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden zweimal mit 1,5 ml PBS oder RPMI Medium gewaschen und mit 1500 U/min, bei 4°C zentrifugiert. Der Antikörper wird entsprechend den Vorschriften der Hersteller, meist 1:500, in RPMI 10% FCS verdünnt. 200µl dieser Lösung werden zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden eine Stunde auf Eis inkubiert, um Rezeptor vermittelte Endocytose zu verhindern. Danach werden die Zellen zweimal mit 1,5 ml PBS oder RPMI Medium gewaschen und mit 1500 U/min, bei 4°C zentrifugiert. Der Zweitantikörper, der zu den Zellen gegeben wird, ist mit einem Fluorochrom, meist Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Er wird 1:800-1:1000 in RPMI verdünnt und 200µl der Verdünnung werden zu den Zellen gegeben. Die Zellen werden auf Eis inkubiert und abgedunkelt, um einem UV-induzierten Zerfall des Fluorochroms entgegenzuwirken. Der Ansatz wird zweimal mit PBS gewaschen und mit 1500 U/min, bei 4°C zentrifugiert. Er wird in 200 µl filtriertem PBS aufgenommen und eventuelle Zellklumpen mit Hilfe einer Kanüle oder eines Zellsiebs vereinzelt. Bis zur Messung werden die Ansätze auf Eis gehalten. Für die Messung wurden folgende Kontrollen vorbereitet: 1. Autofluoreszenzkontrolle: Unbehandelte, lebende Zellen. 2. Zweitantikörperkontrolle: Zellen, die nur mit Zweitantikörper behandelt wurden, um die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers zu messen. 3. Vitalitätskontrolle: Propidiumjodidfärbung toter Zellen im Ansatz. 4. Behandlungskontrolle: Mit diesen Ansätzen wird die Veränderung der Zellen durch den Einsatz anderer Puffersubstanzen (z.B. Tris, MOPS) oder zusätzlicher Testsubstanzen wie Heparin gemessen.

Vor jeder Messung wird die Autofluoreszenz ermittelt und gemäß der Konvention in die erste Dekade gelegt. Einige Messungen wurden ausgewertet, indem das (MFIR) Mean Fluorescence Intensity Ratio gebildet wurde. Dazu wurde der am Cytometer gemessene Wert des Channel Means gefärbter Zellen durch den gemessenen Wert des Channel Means der Autofluoreszenzproben geteilt. Dieses Verfahren wurde in den Assays angewandt, bei denen sich keine diskrete Zellpopulation von der negativen Zellpopulation abspaltete, sondern die gesamte Zellpopulation ihre Fluoreszenz veränderte.

2.7 Methoden zur Virusherstellung

2.7.1 Herstellung und Reinigung von Virus-like Particles (VLPs)

Das Hauptstrukturprotein L1 wird durch einen rekombinanten Baculovirus in Insektenzellen exprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen werden die VLPs durch einen $CsCl_2$-Dichtegradienten gereinigt.

Der L1-Baculovirusstock wurde durch mehrfaches Passagieren über Sf9-Zellen so oft angereichert, bis in der Immunfluoreszenz infizierter Zellen ein starkes L1 Signal zu sehen ist. Für die Herstellung von VLPs werden H5 Zellen infiziert, weil sie eine größere Ausbeute an L1 Protein ermöglichen. Die H5-Zellen werden bis zu einer Zelldichte von 0,5-1 Mio Zellen / ml in einem Spinner-Schüttelkolben bei 27 °C kultiviert. Die Arbeitsgänge werden auf einer sterilen Werkbank durchgeführt. Von der Kultur werden 400 ml abgenommen und 15 min bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert. Die Zellen werden in 50 ml frischem ExCell Medium resuspendiert und mit 5-10 ml rekombinantem Baculovirus (MOI 3 – 5) versetzt. Um die Wahrscheinlichkeit der Infektion durch Baculoviren zu erhöhen, wird das Volumen

klein gehalten und der Infektionsansatz eine Stunde bei Raumtemperatur auf einen Kippschüttler gestellt. Nach einer Stunde Inkubation wird der Ansatz mit 250 ml frischem ExCell Medium aufgefüllt und 72 Stunden bei 27 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation, 15 min bei 1500 rpm und 4 °C, geerntet. Das vom Medium befreite Zellpellet kann bei – 70 °C gelagert werden.

Für die Extraktion wird das Pellet in 9 ml VLP-Extraktionspuffer vollständig resuspendiert. 1 mM PMSF oder ein Protease Inhibitor Cocktail wird zugegeben. Der Aufschlusss der Zellen kann durch Ultraschall oder mit der French Press erfolgen.

Für die Ultraschallbehandlung wird die Lösung auf Eis gestellt und 45 sec auf Stufe 3 (60W) mit konstanter Leistung beschallt. Dann folgt eine Pause von 2 min auf Eis. Eine weitere Beschallung von 45 Sekunden bei Stufe 3 und eine Pause auf Eis folgen. Nach der Ultraschallbehandlung wird das Zelllysat zur Klärung bei 10000 U/Min im SS34 Rotor bei 4°C abzentrifugiert, Der VLP-haltige Überstand wird gesammelt, das Pellet in 9 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Die resuspendierten Zellen werden noch zweimal beschallt; diesmal für 45 Sekunden bei Stufe 4. Das Lysat wird durch Zentrifugation geklärt und die beiden Überstände vereinigt. Die VLPs werden nun von verbliebenen Proteinen und Membrantrümmern gereinigt, indem das VLP-haltige Lysat auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Cäsiumchlorid Gradienten aufgetragen wird. Acht Milliliter Cäsiumchloridlösung werden in einem 30 ml SW28 Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 7 ml einer 40 %igen Sucroselösung überschichtet. Auf die Sucrose wird der Überstand geschichtet und mit Extraktionspuffer bis 2mm unter den Rand aufgefüllt um ein Kollabieren des Röhrchens zu vermeiden. Die Röhrchen werden mit Extraktionspuffer tariert und bei 10 °C 2 Stunden mit 100.000 im SW28 Swinging-bucket Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erscheint unterhalb der Sucrose/$CsCl_2$ Phasengrenze eine diffuse Bande, die vermutlich die VLPs enthält. Über der Sucrose liegt eine zusammengelagerte Interphase aus Membranbestandteilen, die vorsichtig abgenommen wird. Nur 12 ml Lösung verbleiben im Röhrchen, sie enthalten das $CsCl_2$ Kissen und darin eingewanderte VLPs. Die Lösung wird zur besseren Vermischung 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt und danach in ein 13 ml quick seal Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird bis zum Hals mit Extraktionspuffer aufgefüllt und tariert. Die $CsCl_2$-Lösung hat nun die mittlere Dichte von etwa 1,29 g/ml. Während der Zentrifugation bei 50.000 U/min im TFT 65.13 Rotor bei 20 °C stellt sich ein kontinuierlicher Dichtegradient von ca. 1,24 – 1,36 g/ml ein. Dort bandieren auch die VLPs. Nach 16 Stunden Zentrifugation wird der Rotor ohne Bremse gestoppt, um den gebildeten Gradienten nicht zu zerstören. Das Zentrifugenröhrchen wird durch das Einstechen einer Kanüle von oben blüftet. Im unteren Teil des Röhrchens wird eine zweite Kanüle eingestochen über die der Gradient in Eppendorfgefäße ausgetropft wird. Aus jeder Fraktion werden Proben entnommen, um die VLP-haltige Fraktion zu identifizieren. Die Proben werden 1:200 in Milch verdünnt und mittels Antigen Capture ELISA analysiert. Weitere Proben werden auf SDS Gele aufgeladen und geblottet, um die Grösse des isolierten L1 Proteins und die Fraktion zu identifizieren. Die VLPs wurden im Elektronenmikroskop auf Form, Symmetrie und Anzahl untersucht.

2.7.2 Virusisolation aus Rinderwarzen

Um BPV Virionen aus einer Rinderwarze zu gewinnen, muss das Gewebe zunächst homogenisiert und aufgeschlossen werden, bevor die Virionen von anderen Zellbestandteilen über $CsCl_2$ Gradienten abgetrennt und gereinigt werden.

Alle Schritte der Homogenisierung werden bei 4°C und auf Eis durchgeführt. Zunächst wird die 500 gramm schwere Rinderwarze mit Messer, Fleischwolf und Moulinette in Extraktionspuffer zerkleinert. Bei der Moulinette werden mehrere Pausen zum Abkühlen und Vermischen eingelegt. Für den weiteren Aufschluss wird das Gewebe in einen 500 ml GS3 Zentrifugenbecher überführt und auf Eis mit dem Polytron und dem größten Messereinsatz homogenisiert. Zum Abkühlen werden Pausen eingelegt. Das Homogenisat wird durch Zentrifugation geklärt, der virushaltige Überstand gesammelt, das Pellet erneut in Extraktionspuffer aufgenommmen und mit dem Polytron zerkleinert. Um den Überstand einzuengen, werden 30 ml Zentrifugenröhrchen für den SW28 Rotor mit dem Überstand befüllt und die Viren bei 100.000 g pelletiert. Zu dem soliden, virushaltigen Pellet werden 20 ml Extraktionspuffer gegeben, mit einem kleinen Polytronmesser kurz resuspendiert, um die Virionen wieder in Lösung zu bringen. Die Lösung wird 2 x 1min bei mittlerer Einstellung beschallt. Ungelöste Partikel werden bei der Zentrifugation im SS34 Rotor abgetrennt; der Überstand wird gesammelt. Das Pellet wird mit neuem Puffer versetzt und nochmal mit Stufe 4, der maximalen Einstellung, beschallt. Die gewonnenen Überstände werden vereinigt und auf einen diskontinuiertlichen Sucrose-$CsCl_2$ Gradienten geladen. Die Aufreinigung der Viren erfolgt nun wie bei der VLP Extraktion über $CsCl_2$ Gradienten. Die mittler Dichte des Gradienten wird aber auf 1,32 g/ml eingestellt, da DNA-haltige Viren eine höhere Dichte aufweisen als leere VLPs.

2.7.3 Herstellung der HPV16-gfp Pseudovirionen

In Hefen werden die beiden HPV16 Strukturproteine L1 und L2 exprimiert. Bei der Aggregation zu Viruskapsiden sollen sie ein DNA Plasmid mit einem *gfp*-Reportergen verpacken.

Für die Anreicherung der Hefen, die das L1/L2 Plasmid und das zu verpackende DNA Plasmid tragen, werden Selektionskulturen angelegt. Dazu werden 500 µl Hefen aus einem Glycerolvorrat in 25 ml Leu^-, Ura^- Selektionsmedium angeimpft. Hefen, die beide Plasmide tragen, können fehlende Enzyme im Leucin und Uracilstoffwechsel durch die Information aus den Plasmiden komplementieren. Die Selektion verläuft 48 Stunden. Danach werden 10-20 ml in 360 ml YPD Vollmedium umgesetzt und aus dem Rest der Selektionskultur neue Glycerolvorräte angelegt. Zur Induktion der L1/L2 Synthese wurden dem Medium täglich 40 ml einer 20%igen Galaktoselösung (Glukosefrei) zugefügt. Im Vollmedium bleiben die Hefen in einer 2 L Schüttelkultur bei 30 °C für 72 Stunden. Dem Medium muss zusätzlich jeden Tag Adenin zugefügt werden, um den Adeninmangel des Hefestamms auszugleichen. Nach 72 Stunden werden die Kulturen abzentrifugiert (GSA3 Rotor, 15 min, U/min) und für die Präparation der Pseudovirionen haltigen Crude Extracts verwendet.

2.7.4 Reinigung der Pseudovirionen aus Hefe Extrakten „Crude Extracts“

Das Hefepellet wird in 10 ml Extraktionspuffer gelöst, mit Proteaseinhibitoren versetzt und in den Aufsatz einer Mühle (Bead Beater) gegeben. Die Arbeitsschritte werden bei 4 °C oder auf Eis vollzogen, die Puffer sind vorgekühlt. Die Hälfte bis zwei Drittel des Aufsatzes wird mit sterilen Glaskügelchen (Durchmesser 0,5 µm) gefüllt. Zum Aufschluss der Hefen wird die Mühle 2x1 min eingeschaltet dazwischen und danach wird der Aufsatz 2 Min auf Eis abgekühlt. Der Überstand wird in ein SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C 10 min bei 10000 U/min geklärt. Der Überstand wird gesammelt, das Pellet erneut in Extraktionspuffer aufgenommen, um noch intakte Hefen aufzuschließen. Die Mühle wird 2x90 sec eingeschaltet und Kühlpausen werden eingelegt. Der

Überstand wird durch Zentrifugation geklärt und mit Überstand 1 vereinigt. Der Pseudovirionen-haltige Überstand (Crude Extract) wird für die Infektion von Zellen verwendet.

2.7.5 Infektion von Zellen durch HPV16-gfp Pseudovirionen

$5x10^5$ Zellen werden mit 5 ml Crude Extrakt 2-6 Stunden behandelt. Danach werden sie zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in RPMI/FCS/Pen/Strep 48 Stunden bei 37°C kultiviert. Nach den 48 Stunden werden die Zellen am Durchflusscytometer auf GFP Expression hin untersucht (Chalfie, Tu et al. 1994).

2.8 Mathematische Auswertung und Statistische Methoden

Die zu Grunde liegenden Rohdaten wurden in das Programm MS Excel 2000 der Firma Microsoft importiert und ausgewertet. Zur Kontrolle wurden die Berechnungen und Formeln mit einem Rechner (*fx-82A)* der Firma Casio Computer Co.LTD nachvollzogen.

2.8.1 Mittelwert und Standardabweichung

Die Mittelwerte (MW) wurden nach folgender Formel (arithmetisches Mittel) berechnet:

$X=\Sigma x_i/n$

Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$STAB=\sqrt{\sum(xi-MW)^2/n-1}$

2.8.2 Ermittlung der halbmaximalen Hemmstoffkonzentration (IC 50)

Zur Berechnung der Werte wird die Bindung von VLPs an Zellen ohne Inhibitor wird gleich 100% gesetzt, die Messwerte ohne VLPs entsprechen 0% Bindung. Die Inhibitorkonzentration, bei der die Bindung der VLPs um 50% reduziert ist, ergibt den hier verwendeten IC 50 Wert.

2.8.3 Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR)

Das MFIR ergibt sich aus den am FACS gemessenen Channel Mean Werten nach folgender Formel:

MFIR= Channel Mean Messprobe / Channel Mean Kontrolle

Das Verfahren wurde beispielsweise verwendet, um den Einfluss der Zytokinbehandlung auf die Autofluoreszenz der Zellen zu ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Bindung verschiedener Papillomviren an das Polysaccharid Heparin und dessen Derivate

Heparansulfate vermitteln für viele Viren den ersten Kontakt mit der Zelloberfläche. Die Viren werden so an der Zelloberfläche konzentriert, bis ihnen durch einen hochaffinen Rezeptor die Aufnahme in die Zelle ermöglicht wird. Diese Bindung eröffnet den Viren nicht nur die Möglichkeit, in die Nähe eines potentiellen Rezeptors zu gelangen und Schutz vor dem Abbau durch Proteasen des Interzellulärraums zu erhalten, sondern bei Viren wie HSV 1 oder AAV-2 beschleunigt sich die Aufnahme in die Zelle, wenn sie zusätzlich an einen weiteren Rezeptor wie etwa Integrin gebunden sind. Dadurch kann sich intrazellulär eine Proteinplattform bilden, an der Signalmoleküle mehrerer Signalwege gleichzeitig aktiviert werden. Die zusätzliche Aktivierung sorgt für eine effizientere Virusaufnahme in die Zelle. Heparin ist ein Mastzellprodukt, dessen Struktur analog aufgebaut ist wie die sulfatreichen „S“-Domänen der Heparansulfatproteoglycane in der extrazellulären Matrix der Zellen (Gallagher 2001). Es besteht mehrheitlich aus Disacchariden der Struktur Iduronsäure-2-Sulfat-*β(1-4)*-N-Sulfoglucosamin-6-Sulfat. Die Heparansulfatproteoglycane entstehen im Golgi-Apparat durch abwechselnde Polymerisation von N-Acetylglucosamin und Glucuronsäureeinheiten (Esko and Lindahl 2001). Durch Einwirkung zellulärer Sulfotransferasen und Epimerasen werden in einigen Abschnitten D-Glucuronsäuren in L-Iduronsäuren aber auch N-Acetylglucosamine in Sulfoglucosamine umgewandelt (Pinhal, Smith et al. 2001; Rong, Habuchi et al. 2001; Hagner-McWhirter, Li et al. 2004). Dadurch entsteht die segmentierte Struktur der Heparansulfate mit S-Domänen, unmodifizierten Abschnitten und gemischten Regionen. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Heparin und Heparansulfat ist auch für die gerinnungshemmenden Eigenschaften verantwortlich, die beide Moleküle besitzen (Sasaki, Larsson et al. 1999; Vives, Pye et al. 1999; Petitou, Casu et al. 2003).

Konnte man früher noch keine definierte Saccharidsequenz in Heparansulfaten dokumentieren, an die Viren für ihre Aufnahme notwendigerweise binden müssen, so weisen neuere Untersuchungen nun darauf hin, dass eine erfolgreiche Aufnahme von z.B. HSV-1 in Zellen die Bindung an Heparansulfatproteoglycane mit einem selten vorkommenden Glucosaminmolekül voraussetzt, in dem der Sauerstoff am C-3 mit Sulfat verestert wurde (Liu and Thorp 2002). Wesentlich häufiger findet man in zellulären Heparansulfaten Iduronsäuren oder Glucosamine, die an Hydroxylgruppen in der 2- bzw 6-Position durch zelluläre Sulfotransferasen (OST) sulfatiert wurden (Rong, Habuchi et al. 2000; Li, Gong et al. 2001; Jemth, Smeds et al. 2003).

Im Protein werden die negativ geladenen Sulfat- oder Carboxylgruppen der Polysaccharide von basischen Aminosäuren gebunden, während nicht-ionische Wechselwirkungen mit dem Zuckergerüst von aliphatischen Aminosäuren eingegangen werden.
Aus Sequenzvergleichen verschiedener Heparin-bindender Proteine leiteten Cardin und Weintraub ein Konsensus-Motiv ab: XBBXBX, in dem B eine basiche Aminosäure und X eine neutrale oder hydrophobe Aminosäure, meist Tyrosin oder Leucin, darstellt (Cardin and Weintraub 1989; Cardin, Demeter et al. 1991).
Ein solches Konsensus-Motiv findet sich in Form der Aminosäurenabfolge RKRTKTKK auch am Carboxylterminus des HPV 11 Hauptstrukturproteins L1. Dichte Abfolgen basischer Aminosäuren sind bei fast allen Papillomvirus-Typen am Carboxylterminus des L1 Proteins zu finden. In einem aktuellen Report von Joyce et al ist zum ersten Mal eine Bindung von HPV 11 L1 VLPs an Heparin beschrieben worden (Joyce, Tung et al. 1999). Die Bindung darin wurde durch den Carboxylterminus vermittelt. Da die Zielsetzung dieser Arbeit war, die Bindung von Papillomviren an Zellen genauer zu untersuchen, sollte zunächst geklärt werden, ob die Bindung an Heparin auch bei weiteren Papillomvirus-Typen beobachtet werden kann, oder ob es eine Eigenschaft ist, die HPV 11 exklusiv aufweist. Ebenso sollte der Einfluss des L1 Carboxylterminus auf die Bindung von VLPs ermittelt werden.
Zunächst werden bovine Papillomviren aus infiziertem Gewebe extrahiert und L1 VLPs verschiedener Papillomvirustypen hergestellt. Für die Untersuchungen ausgewählt wurden die in unserer Gruppe bearbeiteten Papillomvirustypen HPV 11, HPV 16, HPV 38 und BPV 1. HPV 11 und HPV 16 repräsentieren mukosotrope Papillomviren, von denen HPV 11 als sogenannter „low risk“, HPV 16 als high risk Typ bezeichnet wird, wobei die „risk“-Bezeichnung das Risiko zur malignen Entartung infizierter Zellen beurteilt (zur Hausen 1996). BPV 1 gehört der Gruppe Papillomviren an, die bei Rindern Erkrankungen in den kutanen Hautschichten hervorrufen, beim Menschen jedoch nicht in der Lage sind, eine erfolgreiche Infektion zu etablieren (Campo 1997).

3.1.1 Gewinnung boviner Viren aus infiziertem Gewebe

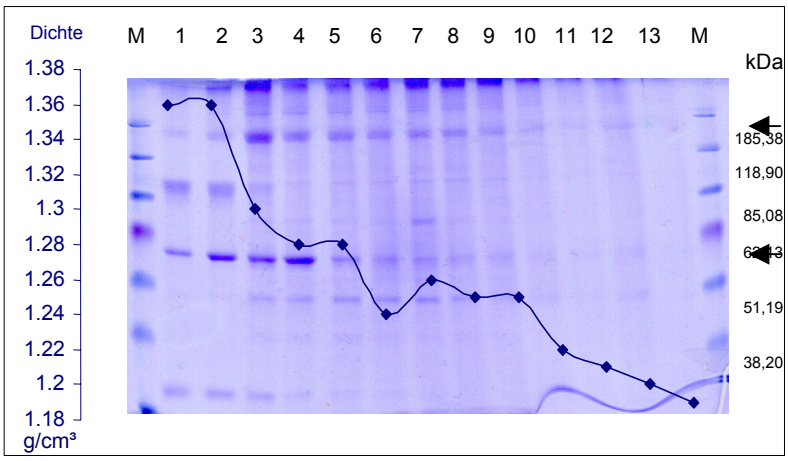
Als Beispiel für die Extraktion boviner Papillomviren aus einer Rinderwarze sind einige der durchgeführten Qualitätskontrollen in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Anwesenheit von BPV-1 in der Warze wurde mit entnommenem Biopsiematerial über eine BPV-1 E2 spezifische Polymerasekettenreaktion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Material wurde durch einen mehrstufigen Prozeß aufgeschlossen und freigesetzte Viren über Zentrifugationen isoliert.
Nach der letzten Zentifugation über einen $CsCl_2$–Dichtegradienten waren die Viren soweit von anderen Bestandteilen gereinigt, dass in der opaquen Lösung Proteinbanden sichtbar wurden (Abb. 3.9 B, linkes Bild).

Der $CsCl_2$–Gradient wurde ausgetropft und Proben einzelner Fraktionen auf ein 12 %-iges, reduzierendes, denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Die enthaltenen Proteine wurden mit Coomassie-Blau eingefärbt (Abb. 3.9 A). Man erkennt einige über mehrere Fraktionen dominierende Proteinbanden. Die mit einem Pfeil in Höhe des erwarteten Molekulargewichts von BPV1 L2 (ca. 77 kDa) gekennzeichnete Proteinbande ist als schwache Bande in Fraktion 1 erkennbar und lässt sich bis Fraktion 12 nachweisen. Das stärkste Signal ist in Fraktion 3 zu sehen. In Höhe des Molekulargewichts von BPV1 L1 (ca. 55 kDa) ist eine Proteinbande von Fraktion 1 bis Fraktion 9 sichtbar. Die am intensivsten gefärbten Banden sind bei Fraktion 2 und 4 zu sehen. Der BPV 1 L1-spezifische Western-Blot in Abb 3.9 C zeigt ein starkes L1 Signal in den Fraktionen 1 bis 4.

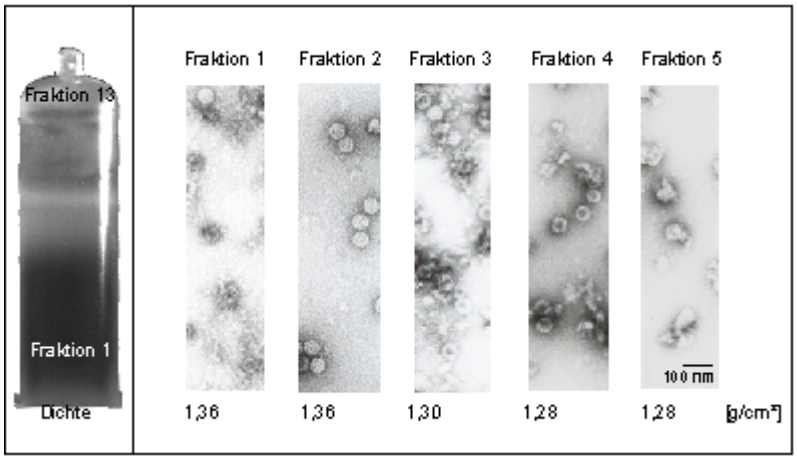
Die gemessene Dichte der Fraktionen ist in Abbildung 3.9. A dargestellt. Erwartet werden die DNA-haltigen Viren bei einer Dichte von ca. 1,32 g/cm³, eine Dichte, die zwischen den Werten der Fraktion 2 (1,36 g/cm³) und der Fraktion 3 (1,30 g/cm³) liegt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen spährische Partikel in allen fünf analysierten Fraktionen. DNA-haltige Viren sind in Fraktion 1, 2 und 3 erkennbar. Fraktion 4 enthält, durch die dunkle Kontrastierung sichtbar gemacht, überwiegend leere Virushüllen. Die in Fraktion 2 enthaltenen Viren verfügen über einen homogenen Durchmesser von ca. 60 nm. Diese Fraktion enthält wenig andere Bestandteile wie beispielsweise Zelltrümmer Kapsomere, Collagene oder Virustrümmer. Fraktion 3 enthält eine große Menge DNA-haltiger Viren: Sichtbar in dieser Aufnahme ist aber, dass ein Teil der Proteinhüllen beschädigt ist und eine Reihe von Proteintrümmern im Präparat vorhanden sind. Da Fraktion 1 bis 5 gleich behandelt wurden, sind diese Proteintrümmer bereits im Gradientenmaterial enthalten und nicht bei der EM Präparation entstanden. Für die nachfolgend dargestellten Versuche wurde mit Viren aus Fraktion 2 gearbeitet.

A



B



C

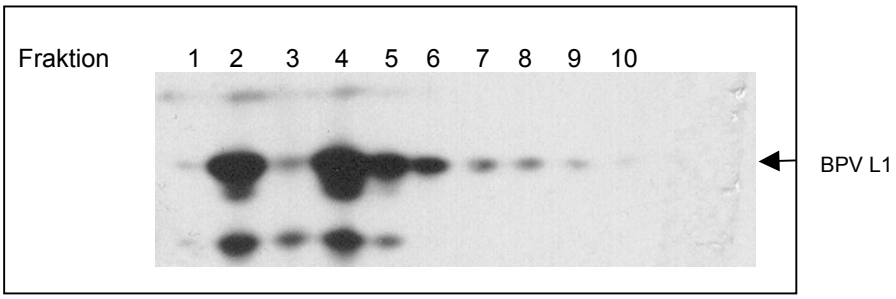


***Abb. 3.9: Extraktion nativer BPV-1 Virionen**. Die nach Austropfen eines $CsCl_2$-Gradienten erhaltenen Fraktionen wurden auf ihren L1 Gehalt und auf die Anwesenheit DNA-haltiger Virionen hin analysiert. Die Nummerierung der Bahnen im Gel und im Western-Blot entspricht der Nummer der untersuchten Gradientenfraktion.*
A: Coomassie-gefärbtes Proteingel. Proben von jeder Faktion wurden entnommen, mit VE-Wasser verdünnt und auf ein 12 %-iges Acrylamidgel geladen. Die am Refraktometer bestimmten Werte der jeweiligen Dichte sind in derselben Abbildung graphisch dargestellt. DNA-haltige Viren besitzen eine Dichte von ca. 1,32 g/cm^3. B: Aufnahme des $CsCl_2$-gefüllten Gradientenröhrchens, in dem nach Zentrifugation (50.000 U/min; 20 °C; 16 h) mehrere Proteinbanden sichtbar sind. B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der ersten fünf Fraktionen. Fraktion 2 enthält DNA-haltige Viren mit homogenem Durchmesser und geringen Verunreinigungen.
C: BPV L1 spezifischer Western-Blot. Detektion mit einem 1:2000 verdünnten polyklonalen Kaninchenserum (Serum #14) und einem Peroxidase-gekopellten Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörper.

3.1.2 Herstellung von Papillomvirus-VLPs

Die aus dem Hauptstrukturprotein L1 bestehenden VLPs wurden aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen aufgereinigt. Mit den Baculoviren wurden H5-Zellen infiziert, die eine größere Ausbeute an L1 ermöglichen. Die in den Insektenzellen exprimierten L1 Proteine lagern sich spontan zu VLPs zusammen. Die bei der BPV 1 Isolation aus Rinderwarzen durchgeführten Qualitätskontrollen (ELISA, Western Blot, Zellbindungsassay) wurden auch für die aus Insektenzellen isolierten L1 VLPs durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Von den mittels ELISA und Western Blot als VLP- bzw. L1 Protein-haltig identifizierten $CsCl_2$–Gradientenfraktionen wurden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt und auf die Anwesenheit symmetrischer VLPs mit einem Durchmesser von ca. 60 nm hin untersucht. Beispiele der VLP-haltigen Fraktionen sind in Abbildung 3.10 für HPV 11, HPV 16 und BPV 1 gezeigt. Trotz guter L1 Signale im Western Blot ließen sich HPV 11 L1 VLPs mit guter Ausbeute in meiner Zellkultur nur aus einem der fünf getesteten Baculo-Virusstöcke herstellen. HPV 16 und BPV 1 Baculovirus-Stöcke verursachten hingegen eine hohe Proteinexpression und lieferten symmetrische, mehrheitlich 60 nm messende VLPs in hoher Ausbeute (Abb. 3.10). HPV 16 L1/L2 VLPs, die neben dem Haupstrukturprotein L1 auch noch L2 enthalten, wurden durch Co-Infektion der Insektenzellen mit zwei Baculo-Virusstöcken erzeugt.

BPV 1 L1∆C VLPs setzen sich aus L1 Proteinen zusammen, deren C-Terminus um 24 Aminosäuren verkürzt ist (Abb. 3.10) (Paintsil, Muller et al. 1996; Muller, Zhou et al. 1997). Bei den HPV 16 L1∆C VLPs sind neben den abgebildeten VLPs auch Kapsomere im Präparat erkennbar. Die BPV 1 L1/E7 VLPs werden aus L1 Proteinen gebildet, deren Carboxylterminus durch ein von BPV 1 E7 abgeleitetes Peptid (54 AS) substituiert wurde. BPV 1 Virionen sind hier als Referenz für die in Insektenzellen erzeugten BPV 1 VLPs mit abgebildet.

Die Herstellung der HPV 16 L1 VLPs in deren cDNA Punktmutationen eingefügt wurden, werden in einem späteren Kapitel behandelt. Die Fotografien der elektronenmikroskopischen Präparate sind dort aufgeführt.

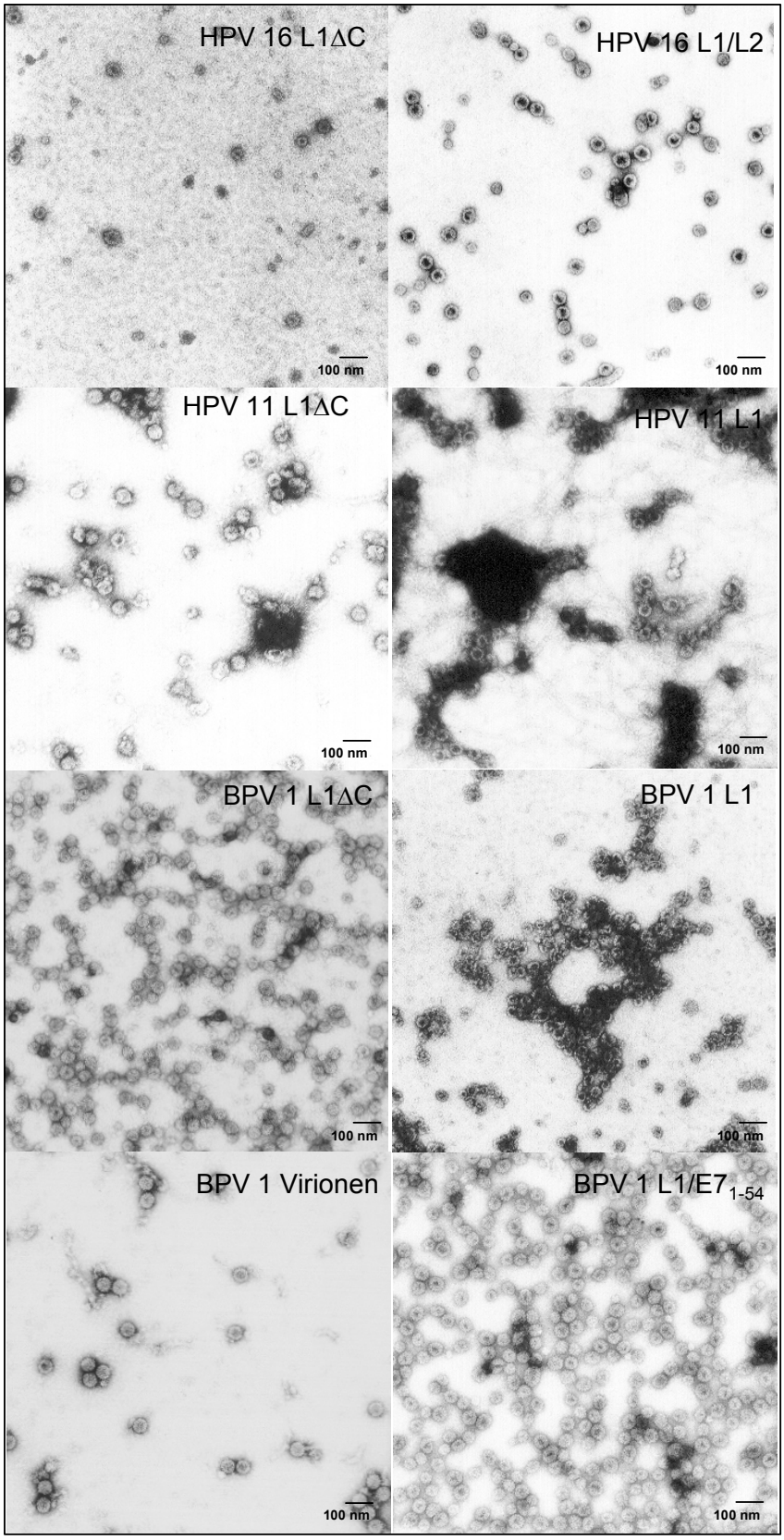


Abb. 3.10: Elektronenmikroskopische Präparate der in Insektenzellen erzeugten L1 VLPs

3.1.3 Quantifizierung des Proteingehalts

Für die nachfolgenden Affinitätschromatographien war es wichtig, dass der Gesamtproteingehalt der Präparationen ermittelt wird, damit die verwendeten Säulen nicht über ihre Kapazität hinaus mit Protein beladen werden. Die Bestimmung des Gesamtproteins der Gradientenfraktionen wurde mittels Absorptionsmessung Coomassie-gefärbter Proben (Bradford-Assay) gegen einen Proteinstandard durchgeführt.

Im Diagramm der Abbildung 3.11 sind die Eichgeraden der Proteinbestimmungen für BPV 1 Virionen, BPV 1 L1 VLPs und HPV 16 L1 VLPs dargestellt und das Bestimmtheitsmaß angegeben.

Der Gehalt an Papillomvirus L1 Protein wurde mit Hilfe eines reduzierenden, denaturierenden Proteingels bestimmt (Abbildung 3.11. A), auf das Verdünnungen der VLP-haltigen Gradientenfraktionen aufgetragen und mit den Banden eines Globulinstandards bekannter Konzentration verglichen wurde. In der Tabelle wird der L1 Proteingehalt dem ermittelten Gesamtproteingehalt gegenüber gestellt. Die hier dargestellten, sehr sauber aufgereinigten Präparationen enthalten zwischen 89 % (HPV 16 L1 VLPs) und 93 % (BPV 1 Virionen) L1 Protein. Bei Baculo-Virusstöcken, die eine geringere L1 Expression zeigten, und bei einigen der HPV 16 $L1_{mut}B \rightarrow A$ VLPs (s. Kapitel 3.3.1) war der Anteil von L1 am Gesamtproteingehalt geringer.

Jede neue Präparation wurde in einem konformationsspezifischen ELISA mit einer im Labor vorliegenden Präparation verglichen. Ebenso wurde die Fähigkeit der erzeugten VLPs an K562-Zellen zu binden genutzt, um in einem Bioassay die Bindefähigkeit der Präparationen mit der im Labor vorliegenden zu vergleichen (Lozzio and Lozzio 1977).

A

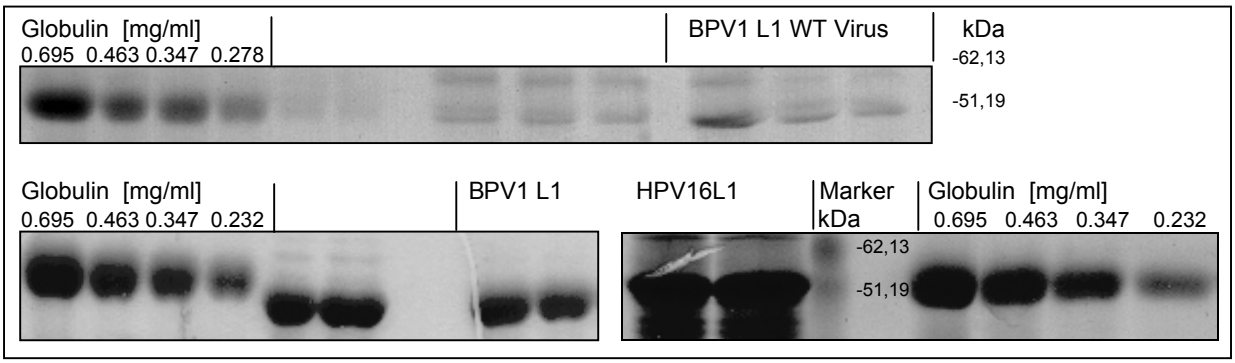


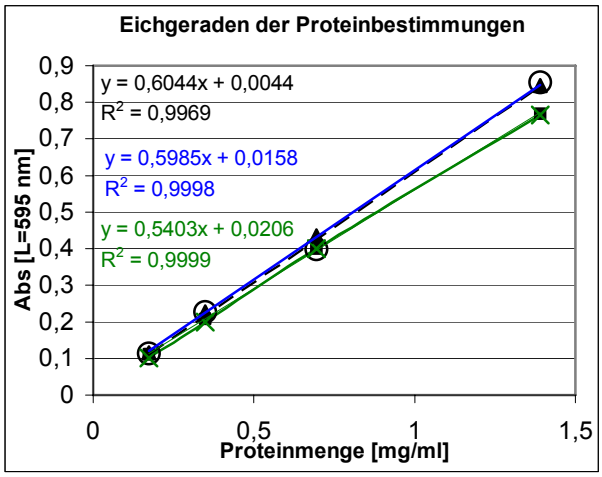
***Abb. 3.11 A: L1 Konzentrationsbestimmung der VLP und Viruspräparationen**. Proben aus den $CsCl_2$ Fraktionen, die im Western Blot und im ELISA ein L1 spezifisches Signal aufwiesen, wurden verdünnt auf ein Polyacryamidgel geladen und mit Coomassie gefärbt. Durch Vergleich der L1 Proteinbande mit den Banden eines bovinen γ-Globulinstandards wurde die L1 Konzentration in den $CsCl_2$-Fraktionen ermittelt. Als Beispiele sind die Proteingele von BPV 1 WT Virus, BPV1 L1 VLPs und HPV 16 L1 VLPs abgebildet.*

	Absorptionsmessung (Gesamtprotein [mg/ml])	Proteingel (L1 Protein [mg/ml])
BPV 1 L1 WT	0,9	0,834
BPV 1 L1 VLP	1,1±0,1	1,042
HPV 16 L1 VLP	4,6±0,8	4,167

Tabelle 1: Vergleich des ermittelten Gesamtprotein-gehalts mit dem L1 Protein-gehalt der Präparationen.

Abb. 3.11 B: Eichgeraden der Gesamtproteinbestimmung.
Spektrophotometrische Messung eines Coomassie-gefärbten Proteinstandards. Dargestellt sind die Mittelwerte.

B



MW Abs.	Faktor	Proteinmenge
0,056	10	0,900
x	*BPV 1 WT Virus*	
0,636	0	0,923
0,182	5	1,237
0,097	10	1,201
▲	*BPV 1 L1 VLP*	
0,463	5	3,794
0,262	10	4,262
0,179	20	5,778
O	*HPV 16 L1 VLP*	

***Tabelle 2: Quantifizierung des Proteingehalts.** Ermittlung der Gesamtproteinmenge [mg/ml] aus den gemessenen Absorptionswerten unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Aufgelistet sind die Mittelwerte mehrerer Absorptionsmessungen. Die Spalte Faktor gibt den jew. Verdünnungsfaktor an.*

3.2 Bindung von Papillomvirus Partikeln und Virionen an immobilisiertes Heparin

3.2.1 Bindung von HPV 16 L1 und HPV 11 L1 VLPs

Um zu untersuchen, ob Heparansulfate und Heparin als Bindungspartner für Papillomviren in Frage kommen, wurde die Bindung von PV L1 VLPs an eine Heparin-Sepharose Säule untersucht. Die Säule wurde zunächst mit BSA auf ihre Fähigkeit hin untersucht passiv Proteine zurückzuhalten. BSA mit seinem isoelektrischen Punkt von 5 trägt bei pH 7 negative Nettoladungen. Die Messung der UV Absorption zeigte neben dem Injektionspeak der durch BSA verursacht wurde keinen weiteren Ausschlag. BSA bindet wie erwartet nicht an das negativ geladene Heparin und wird durch die Struktur des Säulenmaterials nicht unverhältnismäßig lange auf der Säule zurückgehalten. Im Coomassie-gefärbten Proteingel, auf welches Wasch- und Elutions-Fraktionen aufgetragen wurden, ist keine BSA-spezifische Bande zu erkennen Abb 3.13 C.

Nach der Beladung der Säule mit HPV 11 L1 VLPs konnte die Bindung von Protein an die Säule beobachtet werden. Nicht nur HPV 11 L1 VLPs, sondern auch HPV 16 L1 VLPs binden an immobilisiertes Heparin. Die Elution gebundener VLPs wurde über die Änderung der UV-Absorption des Puffers bei einer Wellenlänge von λ=280 nm verfolgt. Die Messung der Leitfähigkeit dokumentierte die lineare Änderung der NaCl-Konzentration im Elutionspuffer. Vergleicht man die Elutionsprofile der beiden HPV VLPs, so erkennt man,

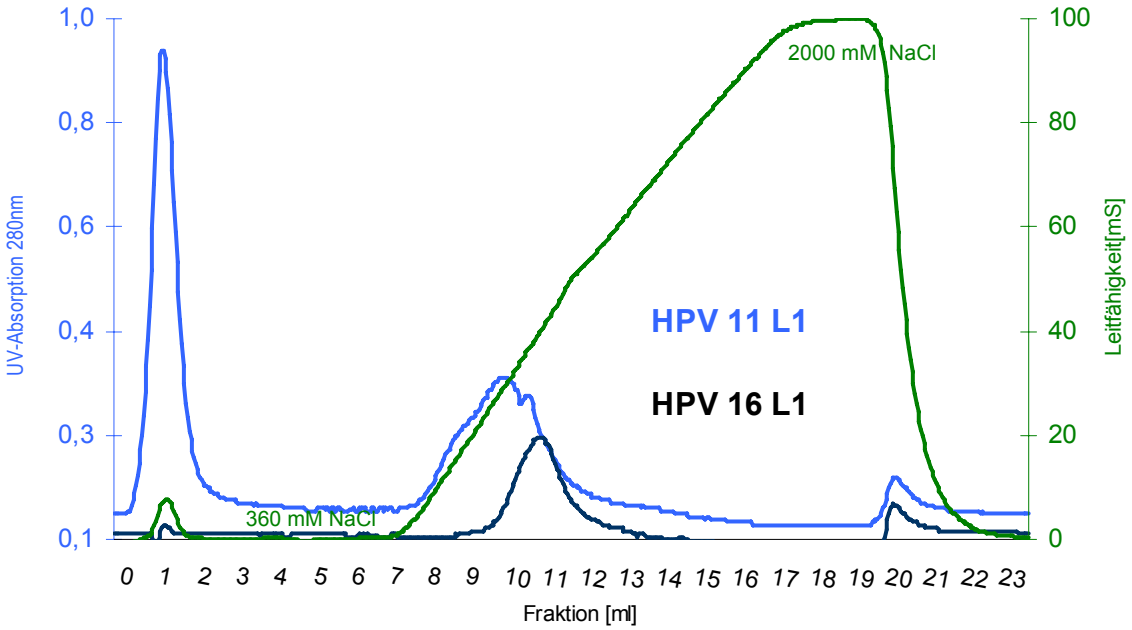
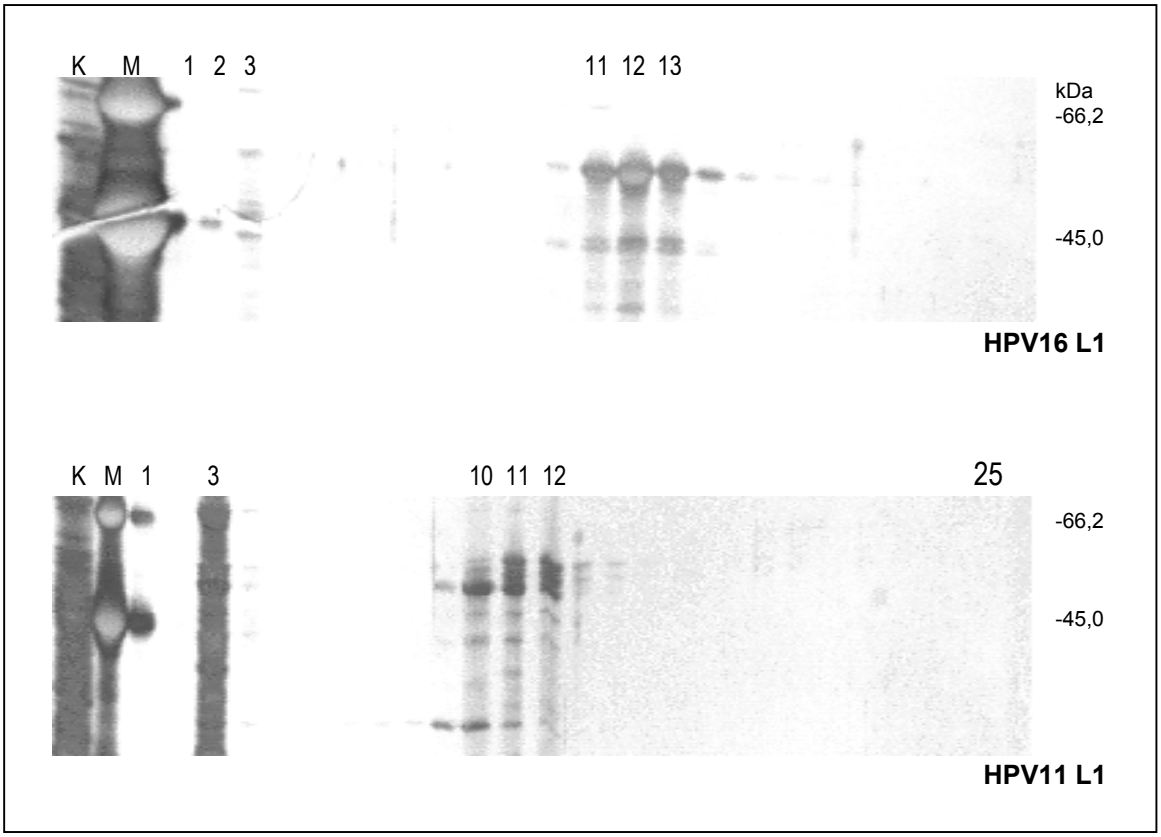


Abb. 3.12: Bindung von HPV 16 L1- und HPV 11 L1 VLPs an Heparin. *Chromatogramm der FPLC-Läufe. Nach Injektion der dialysierten VLPs wurde die Säule mit 5 ml Waschpuffer (50 mM MOPS; 360 mM NaCl) gespült. Die Elution wurde durch einen linearen NaCl-Gradienten erreicht (360-2000 mM NaCl). Die Säule wurde bei den HPV 16 L1 VLPs mit 100 µg, bei den HPV 11 L1 VLPs mit 200 µg Gesamtprotein beladen.*

dass für die Elution von HPV 16 VLPs eine höhere NaCl-Konzentration notwendig ist als für HPV 11 L1 VLPs. Betrachtet man die Silbernitrat-gefärbten Proteingele der Läufe, so wird deutlich, dass ungebundenes L1 Protein und Fremdprotein die Säule noch vor Beginn des Waschprogramms verlässt und in den Fraktionen 1 bis 3 aufgefangen werden kann. Diese frühen Fraktionen können in Abhängigkeit von der Reinheit der VLP Präparation zwischen 6 % (HPV 16) und 50 % (HPV 11) des aufgetragenen Materials enthalten (siehe Abb. 3.13 A). Die Säule wird mit 50 mM MOPS Puffer pH 7; 360 mM NaCl gewaschen.

A



B

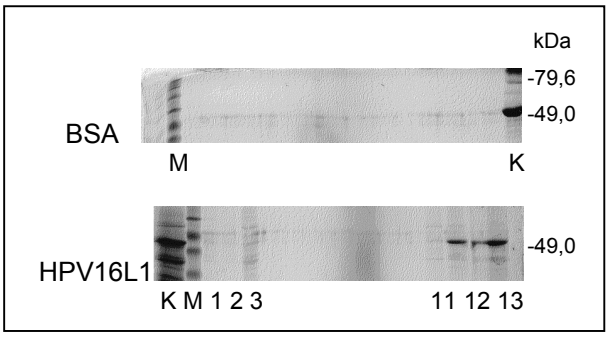


Abb. 3.13: Analyse der FPLC Fraktionen. *A: Um zu analysieren, in welchen Fraktionen L1 Protein enthalten ist, wird eine Acetonfällung durchgeführt, und Proben auf ein 12 %iges Acrylamidgel geladen. Um geringe Mengen Protein nachzuweisen wurden die Gele mit Silbernitrat behandelt. K: Input Kontrolle; M: Low range Marker für Silbergele; 1-25 Fraktionsnummer. B: Die Säulen wurden mit BSA und HPV 16 L1 VLPs auf ihre Bindungsfähigkeit geprüft. Proben der eluierten Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese und Coomasie-Färbung analysiert.K: Inputkontrolle M: Benchmark Proteinmarker*

In den Proben der Waschfraktionen ließ sich mittels Silberfärbung kein Protein nachweisen. Geringe Mengen L1 Protein findet man mit Beginn der Elution bereits in den Fraktionen, die 460 mM NaCl enthalten.

Bei der Elution der HPV 11 L1 VLPs, durch einen linearen NaCl Gradienten sind in den frühen Fraktionen (Fraktion 9) L1 Proteine mit geringerem Molekulargewicht, in der Hauptfraktion (Fraktion 11 und 12) L1 Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kD und L1-Abbauprodukte enthalten. Bei den Läufen mit verschiedenen HPV 16 L1 VLP Präparationen eluierten 50 % bis 70 % des Materials unter dem Hauptpeak. Bei den HPV 11 L1 VLP Präparationen lag der Anteil unter dem Hauptpeak unter 50 %. Eine gute Auflösung der Peaks wurde mit L1 Proteinmengen zwischen 100 und 300 µg erzielt. Die von Hersteller angegebene Kapazität der Säule von 3 mg Thrombin wurde nicht getestet, da mit VLP Konzentrationen von 800 µg L1 VLP (Gesamtproteingehalt der Präparation 1,5-2,5 mg) keine diskrete Elution der VLPs mehr zu erreichen war.

3.2.2 Bindung boviner, DNA-haltiger Papillomviren

Virionen unterscheiden sich von L1 VLPs nicht nur durch die Anwesenheit der viralen DNA und des L2 Proteins im Viruskapsid sondern es wird vermutet, dass einige Abschnitte der L1 Proteine in Viren eine andere Konformation besitzen als im VLP (Modis, Trus et al. 2002). Für HPV 16 L1 und HPV 33 wurde beispielsweise berichtet, dass in benachbarten Pentameren intermolekulare Disulfidbindungen zwischen Cystein 428 und Cystein 175 geschlossen werden (Selinka, Giroglou et al. 2003). Zudem befindet sich eine potentielle DNA-Interaktionsdomäne am Carboxylterminus der PV L1 Proteine, deren Position im VLP immer noch umstritten ist (Chen, Garcea et al. 2000). Daher war es von Interesse, zu untersuchen, ob die Eigenschaft an Heparin zu binden auch bei Virionen, die aus infiziertem Gewebe isoliert wurden, messbar ist.

Verwendet wurden BPV 1 Virionen, da sie in ausreichenden Mengen gewonnen werden können. Für BPV 1 läßt sich die Bindung an immobilisiertes Heparin zeigen. Die Elution von geringen Mengen L1 Protein begann bereits mit 460 mM NaCl. Mit jeder Zunahme in der NaCl Konzentration wurde das entsprechende L1 Signal im Western Blot stärker, bis es sein Maximum bei der Fraktion mit 760 mM NaCl erreichet hatte. Die eluierten Fraktionen werden am Elektronenmikroskop auf ihren Gehalt an BPV 1 Virionen und ihre Zusammensetzung aus leeren und vollen Partikel hin untersucht. Im elektronenmikroskopischen Präparat der Fraktion 17 (ca. 460 mM NaCl) sind wenige Viruskapside, darunter leere und DNA-haltige, zu erkennen. Bei Fraktion 21 (ca. 560 mM NaCl) sind wenige VLPs, neben leeren, mehrheitlich DNA-haltige Virionen zu erkennen.

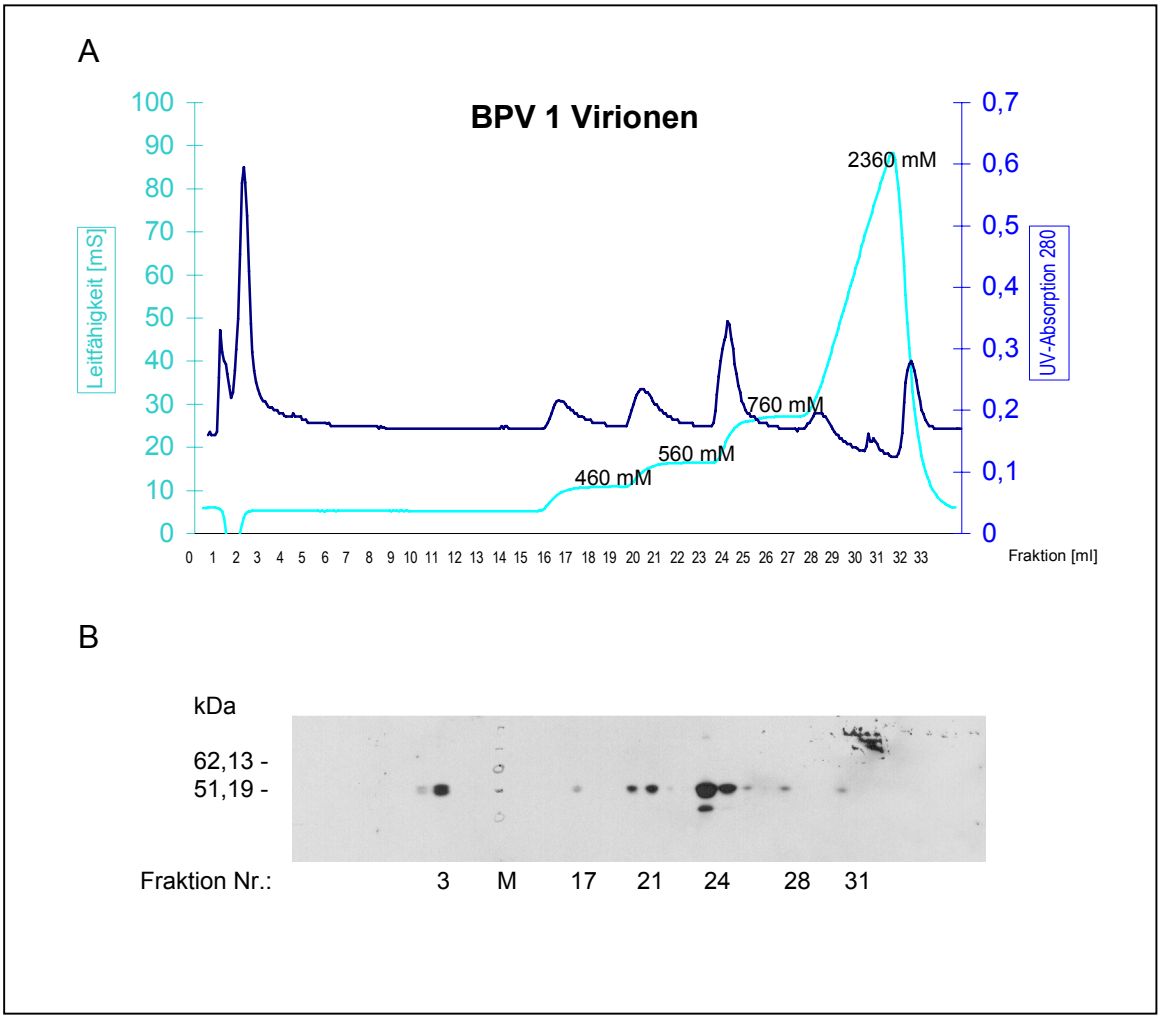


Abb. 3.14: Bindung von BPV 1 Viren an immobilisiertes Heparin. *Die Heparinsäule wurde mit Virionen beladen und mit dem 10-fachen Säulenvolumen Ladepuffer gewaschen, ehe die Elution durch einen stufenförmigen Anstieg der NaCl Konzentration eingeleitet wurde. Die NaCl-Konzentration steigt über 10 ml stufenförmig von 360 mM auf 460 mM, 560 mM, 760 mM dann linear auf 2360 mM an. Die Veränderung der Leitfähigkeit, die die Zugabe von NaCl im Puffer hervorruft, wird während des Laufs gemessen. Die Elution der Virionen wird wie bei einer Proteinelution durch die UV-Absorption der aromatischen Seitenketten bei λ=280 nm, bestimmt.*
Um zu analysieren, in welchen Fraktionen L1 Protein enthalten ist, wurde eine Acetonfällung durchgeführt, und Proben auf ein 12 %iges Acrylamidgel geladen. Mit dem L1 spezifischen Antikörper camvir-1 wurden mittels Western Blot diejenigen Fraktionen identifiziert, in denen das Hauptkapsidprotein L1 eluierte. Im Durchlauf der Fraktion 3 ist bereits L1 enthalten, die nachfolgenden Waschfraktionen ergeben kein Signal. Bei 100 mMolarer Erhöhung der NaCl Konzentration im Puffer auf 460 mM NaCl wird im Western Blot ein schwaches Signal sichtbar (Fraktion 17). Das stärkste Signal ist bei Fraktion 24 zu sehen.

In Fraktion 24, die durch Elution bei ca. 760 mM NaCl aufgefangen wurde, finden sich klumpige Aggregate aus leeren und vollen Partikeln (Daten nicht gezeigt).

Die Präparationen boviner Papillomviren enthalten nach der $CsCl_2$ Zentrifugation meist ein Gemisch aus vollen und leeren Partikeln (Vgl. Kap 3.1.2 Herstellung der PV VLPs). Beobachtet werden kann, dass die leeren Viruskapside der Präparation nicht in einer eigenen Fraktion getrennt von den DNA-haltigen Viruskapsiden eluieren. Die Elution von

BPV 1 Virionen oder BPV 1 VLPs beginnt erst wenn eine NaCl-Konzentration von 460 mM im Puffer überschritten wird.

Alle getesteten Papillomvirus VLPs, HPV 11 L1-, HPV 38 L1-, HPV 16 L1-, HPV 16 L1/L2-, BPV 1 L1-VLPs und BPV 1 L1/L2 Virionen, binden bei dieser Analyse an immobilisiertes Heparin. Weder die Inkorporation der DNA noch die Anwesenheit von L2 im Viruskapsid führt zu einem Verlust der Heparinbindefähigkeit. Die VLP-haltigen Hauptfraktionen eluieren typabhängig zwischen 760 und 1200 mM NaCl. Die geringste Affinität in den Versuchen zeigte BPV 1 gefolgt von HPV 11 und HPV16.

3.2.3 Beitrag basicher Aminosäuren am L1 Carboxylterminus zur Bindung von Papillomviren an Heparin

Ein Konsensus-Motiv, wie es in Heparin-bindenden Proteindomänen vorkommt, findet sich auch am C-Terminus des HPV 11 L1 Proteins (RKRTKTKK). Joyce et al zeigten mit Hilfe bFXa-behandelter HPV11 L1 VLPs, dass die Anwesenheit der basischen Aminosäuren am Carboxylterminus des HPV 11 L1 Proteins für die Bindung der VLPs an Heparin und zelluläre Heparansulfate eine notwendige Voraussetzung ist (Joyce, Tung et al. 1999). Durch bFXa veränderte HPV 11 VLPs binden in den Versuchen von Joyce nicht mehr an Heparin. Die aktivierte bovine Protease bFXa (Stuart-Prower-Faktor) bindet während der sogenannten Gerinnungskaskade Prothrombin und hydrolysiert die nach den Erkennungssequenzen I-E-G-R und I-D-G-R folgende Peptidbindung (Nagai 1984). Weitere in der Literatur vorgestellte Untersuchungen haben ergeben, dass bFXa auch Proteine spalten kann, welche nur eine minimale Erkennungssequenz G-R-(T/I) enthalten, wenn diese Sequenz zugänglich ist (Haley, Doyle et al. 1989). Insofern kann das von Joyce et al mittels HPLC identifizierte Spaltprodukt von 28 Aminosäuren des HPV 11 C-Terminus aus der Spaltung in der G-R-T Sequenz an Arginin-473 hervorgegangen sein. HPV 11 enthält aber im Gegensatz zu HPV 16 noch eine weitere bFXa Erkennungssequenz G-R-G am Beginn der βD-βE Schleife an der Oberfläche des VLPs. Denkbar ist, dass auch dort das Protein gespalten, jedoch kein Peptid freigesetzt wurde. Die geschnittene βD-βE Schleife an der VLP Oberfläche kann dann einen sterischen Einfluß auf die VLP Bindung ausüben. Im EM sind bei Joyce et al intakte VLPs zu erkennen. Weiterhin zeigten Joyce et al, dass ein von der Sequenz des HPV 11 L1 C-Terminus abgeleitetes synthetisches Peptid (15-mer) ungenannter Sequenz an Heparin binden kann, jedoch nicht die Bindungsstärke der HPV 11 L1 VLPs erreichen konnte.

Durch die von Paintsil et al geleisteten Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch eine Deletion im BPV 1 L1 Gen ein carboxy-terminal um 24 Aminosäuren verkürztes L1 Protein erzeugt werden kann, bei dem die Aminosäuren 471-495 eliminiert wurden. Von dieser Deletion betroffen sind auch die am C-Terminus von BPV 1 L1 gelegenen basischen Aminosäuren R_{477}KRRISQKTSSKPAKKKKK$_{495}$. Wie Paintsil et al zeigen konnten, ist die

Fähigkeit des L1 Proteins VLPs zu bilden, nicht von der Carboxy-terminalen Deletion betroffen (Paintsil, Muller et al. 1996).

Die Entfernung des negativ geladenen Aminosäureclusters hat auf die Bildung der BPV 1 L1 Partikel positiven Einfluss. Vergleicht man die elektronenmikroskopischen Präparate (s. Abb. 3.10) der hier hergestellten BPV 1 L1ΔC und BPV 1 L1ΔC-E7$_{1-54}$ VLPs mit den L1 WT VLPs, zeigen die BPV 1 L1ΔC und BPV 1 L1ΔC-E7$_{1-54}$ VLPs eine höhere Ausbeute als der Wildtyp. Zudem weisen die BPV 1 L1ΔC und BPV 1 L1ΔC-E7$_{1-54}$ Partikel eine hohe Homogenität in Aussehen und Durchmesser der Kapside auf. Die Baculo-Virusstöcke und die Insektenzellen wurden durch Dr. M. Müller, die BPV L1ΔC-E7$_{1-54}$ VLPs durch Dr. S. Mattil für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Muller, Zhou et al. 1997; Mattil-Fritz 2002). Die deletierten Bereiche am C-Terminus enthalten eine große Anzahl basischer Aminosäuren. Bei HPV 11 L1 wurde durch die Deletion das C-terminale Peptid KRPAVSKPTAPKRKRTKTKK, bei HPV 16 L1 das Peptid KRKATPTTSSTSTTAKRKKRKL entfernt. Die unterstrichenen Aminosäuren markieren die Kernlokalisationssignale und die potentielle DNA-Interaktionsdomäne des HPV 16 L1 Proteins, die in den L1ΔC Proteinen fehlen.

HPV 11 L1ΔC, HPV 16 L1ΔC ließen sich in den H5-Zellen exprimieren, und VLPs konnten isoliert werden. HPV 16 L1ΔC lieferte geringe Ausbeuten und hatte einen hohen Anteil 30 nm messender VLPs und Kapsomere im Präparat (Abb. 3.10). HPV 11 L1ΔC erzeugte wenige VLPs, im Elektronenmikroskops waren nach der Aufreinigung aber mehrheitlich VLPs mit einem Durchmesser von zirka 60 nm zu sehen.

Die Bindung der Papillomvirus L1ΔC VLPs an Heparin wurde wieder mittels Affinitäts-chromatographie getestet (Abb 3.15). Im Gegensatz zu den Berichten von Joyce kann man bei den nach der Methode von Paintsil et al. hergestellten HPV 11 L1ΔC VLPs beobachten, dass sie in der Lage sind, an Heparin zu binden. Die basischen Aminosäuren am HPV 11 L1 C-Terminus sind hier für die Bindung an die Heparinsäule nicht notwendig. Bei der Western-Blot Analyse der eluierten Fraktionen findet man ein starkes L1 Signal in Fraktionen die bei ca. 890 mM NaCl eluiert wurden (Abb. 3.15).

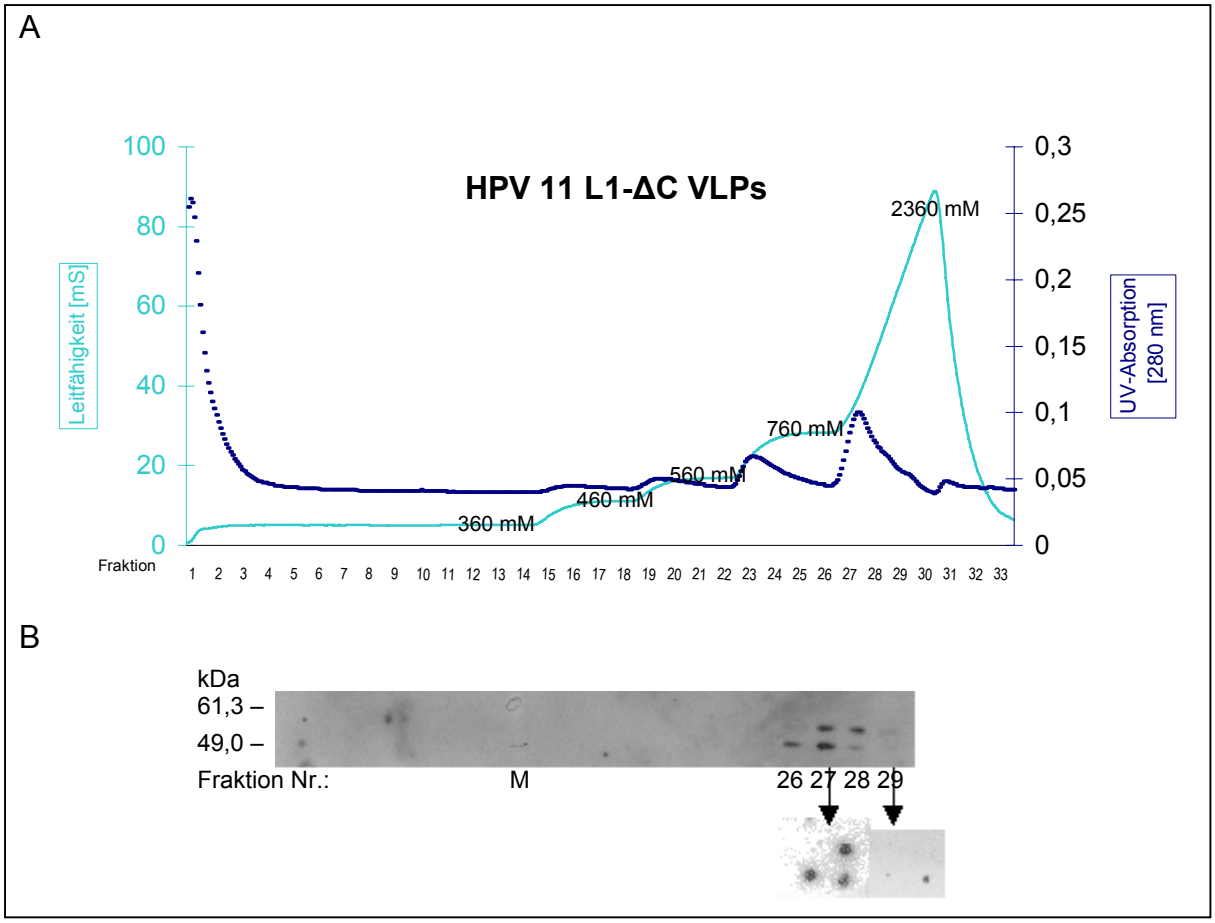


Abb. 3.15: Bindung Carboxy-terminal deletierter HPV 11 L1ΔC VLPs an immobilisiertes Heparin. *Für die Untersuchung wurden jeweils 100 µg dialysierten Gesamtproteins in 500 µl MOPS-Puffer auf die Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde durch einen stufenförmigen NaCl-Gradienten eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden daraufhin auf die Anwesenheit von PV VLPs und L1 Protein analysiert.*
A: Diagramm des FPLC-Laufs mit einer HPV 11 L1 ΔC Präparation. Aufgetragen sind die Leitfähigkeit des Puffers und die Absorption des Eluats bei λ=280 nm über die Fraktion. Das Volumen einer Fraktion beträgt 0,5 ml; die Fließgeschwindigkeit liegt bei 1 ml in der Minute. Mit Beginn der stufenförmigen Elution wurden auch Änderungen in der UV-Absorption verzeichnet. Diese Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von VLPs untersucht. HPV 11 L1ΔC VLPs (Durchmesser = 60 nm) konnten in Fraktion 27 und Fraktion 29 nachgewiesen werden (B). Diese Fraktionen entsprechen einer NaCl-Konzentration im Puffer von 760-800 mM und höher. C: Die Fraktionen, in denen eine Änderung der UV–Absorption gemessen werden konnte, wurden im Western Blot untersucht. Der für Papilomvirus L1 Protein spezifische Antikörper camvir-1 detektiert in Fraktion 27 und Fraktion 28 Protein, dessen Molekulargewicht HPV 11 L1ΔC entspricht (obere Bande). Die untere Bande ist ein L1 Abbauprodukt.

Untersucht man die Fraktionen, die bei geringerer NaCl Konzentration eluierten, am Elektronenmikroskop, so findet man keine VLPs in den Präparaten. Bei 760-800 mM kann man VLPs mit 60 nm Durchmesser erkennen. In Fraktionen, die bei hoher NaCl Konzentration (900-1500 mM NaCl) eluieren, sind diese VLPs auch vorhanden.

Vergleicht man die Menge eluierter VLPs miteinander, so sind im Elektronenmikroskop bei den Fraktionen mit ca. 760-900 mM NaCl die meisten VLPs zu sehen. Mit steigender NaCl-

Konzentration nimmt die Anzahl eluierter VLPs ab. Ebenso verhält sich auch das L1-spezifische Signal, das im Western Blot zu erkennen ist.

Neben der Bindung an immobilisiertes Heparin kann für die HPV 11 L1ΔC VLPs auch eine Bindung an verschiedene Zellinien gezeigt werden. Exemplarisch sind die Daten der VLP-Bindung an die Zellinie K562 gezeigt, einer erythroleukämischen Zellinie, die geringe Mengen Heparansulfat auf ihrer Oberfläche trägt und geringe Mengen PV L1 VLPs und BPV 1 Virionen binden kann (Delwel, Hogervorst et al. 1993; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). K562-α6β1 Zellen sind Transfektanten, die den potentiellen zellulären HPV 6b Rezeptor (Integrin-α6) auf ihrer Oberfläche tragen (Evander, Frazer et al. 1997).

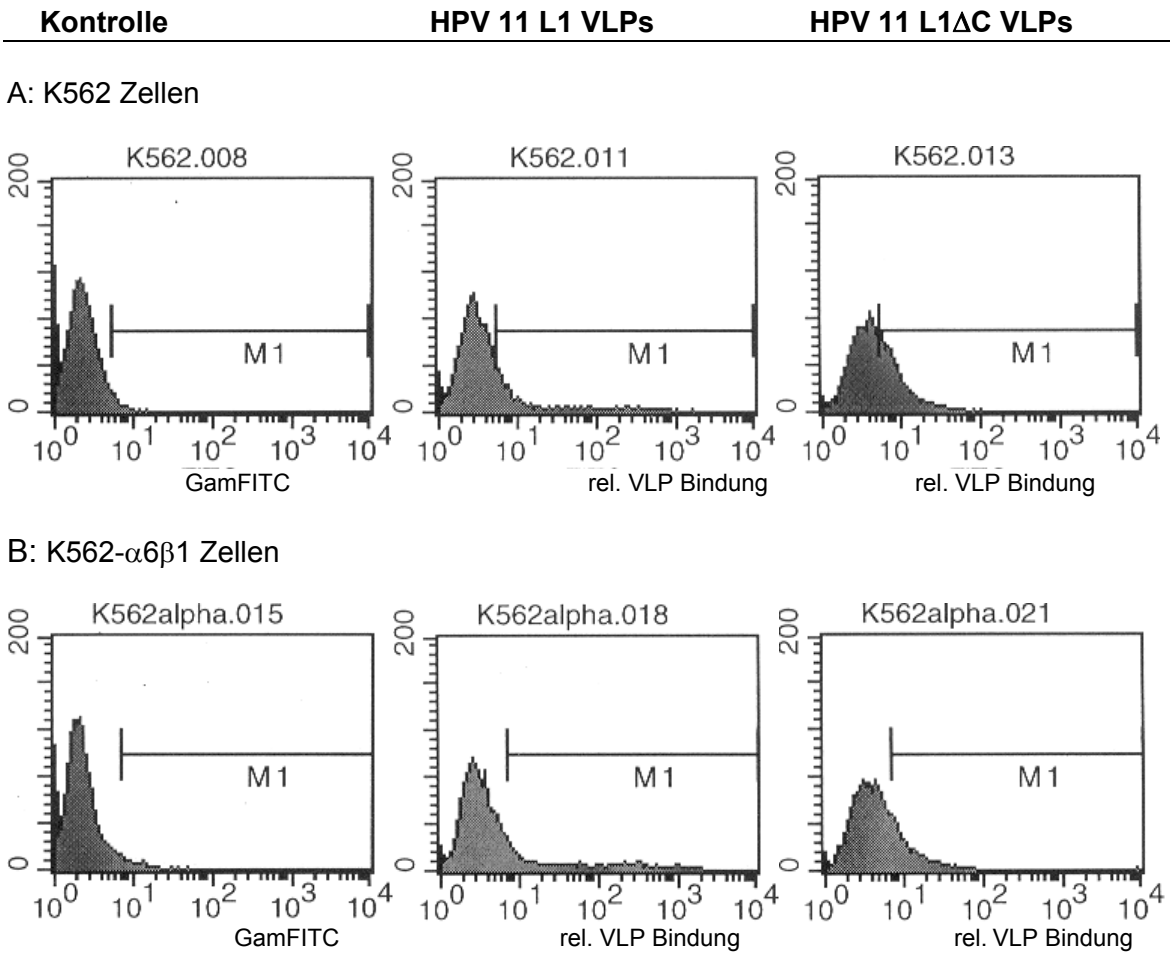
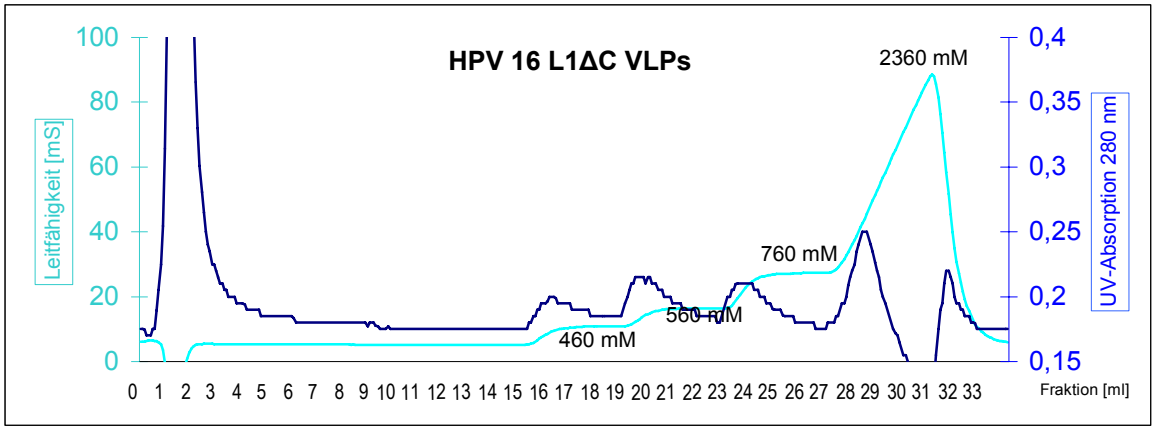


Abb. 3.16: Bindung von HPV 11 L1 VLPs und HPV 11 L1ΔC VLPs an K562-Zellen. *K562-Zellen (2,5x10^5/Ansatz) und K562-α6β1-Integrin positive Zellen (3.5x10^5/Ansatz) wurden bei 0-4 °C 60 Minuten mit den jeweiligen VLPs (4,8 µg L1 Protein) inkubiert. Der Nachweis gebundener HPV11 L1 VLPs erfolgte durch den konformationsspezifischen monoklonalen Antikörper H11.b1, dessen Bindung über einen FITC markierten Zweitantikörper am Durchflußcytometer gemessen wurde. Kontrolliert wurde in separaten Ansätzen die unspezifische Bindung des FITC-markierten Zweitantikörpers sowie die Veränderung der zellulären Autofluoreszenz nach Behandlung mit dialysierten VLP Präparationen und Blocking Reagenz.*

Bei dieser Zellinie ist kein Verlust der VLP Bindung durch Deletion der C-terminalen Aminosäuren am HPV 11 L1 Protein zu erkennen. Ebenso kann für HPV 16 L1ΔC VLPs

gezeigt werden, dass diese Partikel ohne die Anwesenheit des Carboxylterminus eine Bindung mit Heparin eingehen können.

A

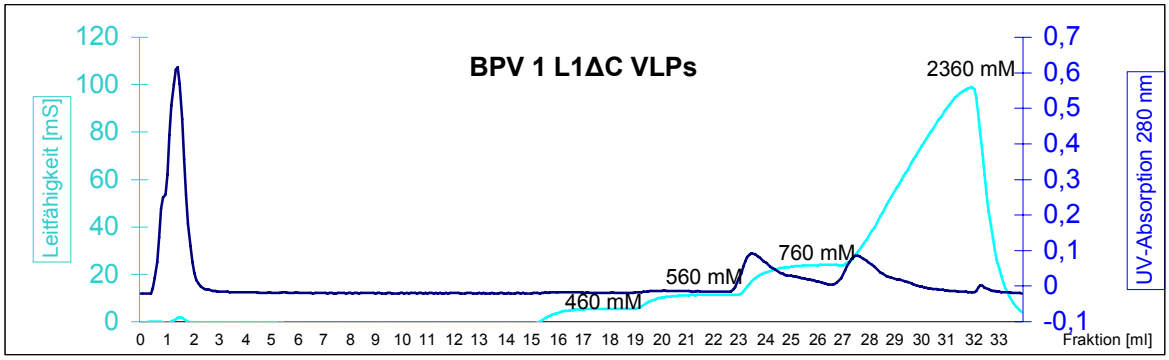


B

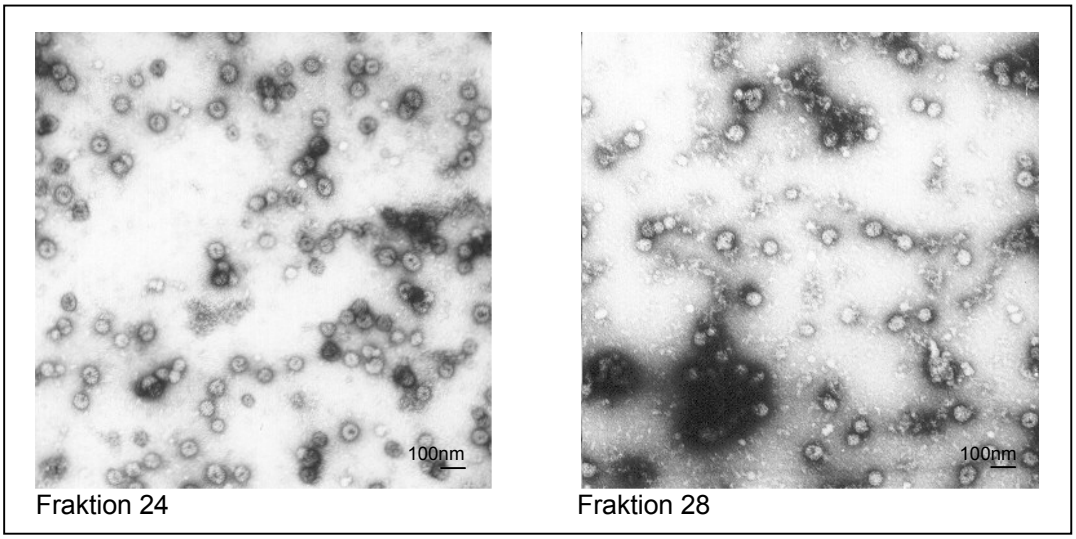
Abb. 3.17: Bindung und Elution von HPV 16 L1ΔC VLPs an immobilisiertes Heparin. *A: Die Änderung der UV-Absorption im Elutionsprofil der HPV 16 L1ΔC VLP Präparation zeigt bereits beim Anstieg der NaCl-Konzentration über 360 mM die Elution von Proteinen von der Säule an.*
B: Ein HPV 16 L1 spezifisches Signal im Western Blot ist bei den Fraktionen, die bei Salz-Konzentrationen im Bereich von 760 mM bis 1500 mM NaCl eluieren, sichtbar. Aufgetragen auf die Säule wurden wieder 100 µg einer dialysierten VLP Präparation. Die Elution wurde durch einen stufenförmigen NaCl-Gradienten eingeleitet (460 mM; 560 mM; 760 mM; 2360 mM). Proben der eluierten Fraktionen wurden mit Aceton gefällt und auf ein 12 %-iges Acrylamidgel geladen, welches anschließend geblottet wurde. L1 Protein wurde mit camvir-1 und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen.

Der Arbeit von Jeanette Paintsil ist nicht nur zu entnehmen, dass der C-Terminus des BPV L1 Proteins deletierbar ist, sondern auch, dass die Aminosäuren an C-Terminus durch Peptidsequenzen ersetzt werden können (Paintsil, Muller et al. 1996). Dieser Eingriff hat keinen Einfluss auf die Bildung von VLPs. Für die Entwicklung einer therapeutischen Vakzine wurden bei sogenannten „chimären“ VLPs die letzten 24 Aminosäuren des L1 Proteins durch eine immunogene Sequenz des BPV 1 E7 Proteins ersetzt (Muller, Zhou et al. 1997). Die Charakterisierung dieser CVLPs wird in der Arbeit von Dr. S. Mattil dokumentiert (Mattil-Fritz 2002). Neben den BPV 1 L1ΔC VLPs wurden auch BPV 1 L1ΔC/E71-54 VLPs auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an Heparin zu binden.

A



B



C

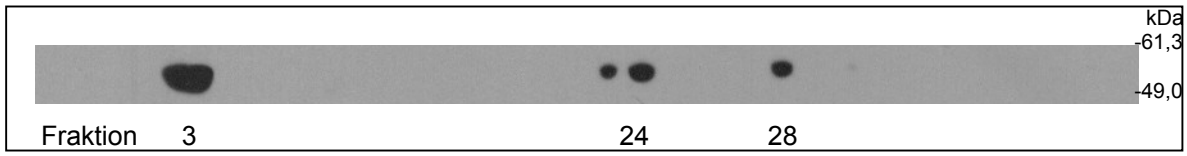
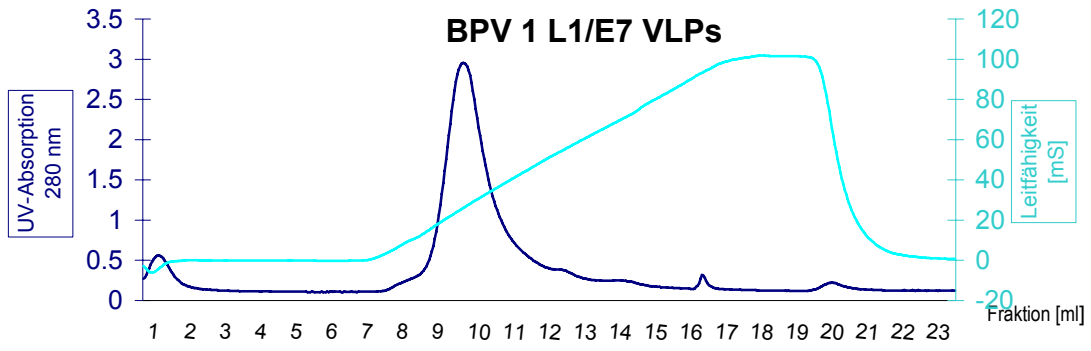


Abb. 3.18: Bindung und Elution carboxy-terminal deletierter BPV 1 L1ΔC VLPs. *Für die Untersuchung wurden jeweils 100 µg dialysierten Gesamtproteins in 500 µl MOPS-Puffer auf die Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde durch einen stufenförmigen NaCl Gradienten eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf die Gegenwart von PV VLPs und L1 Protein analysiert.*
A: Diagramm des FPLC Laufs mit einer BPV 1 L1ΔC Präparation. Aufgetragen sind die Leitfähigkeit des Puffers und die Absorption des Eluats bei λ=280 nm über die Fraktion. Das Volumen einer Fraktion beträgt 0,5 ml; die Fließgeschwindigkeit liegt bei 1 ml in der Minute. Mit Beginn der stufenförmigen Elution wurden auch Änderungen in der UV-Absorption verzeichnet. Diese Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch auf die Anwesenheit von VLPs untersucht. BPV 1 L1ΔC VLPs konnten in Fraktion 24 und Fraktion 28 nachgewiesen werden (B). Diese Fraktionen entsprechen einer NaCl Konzentration im Puffer von 730 bzw. 760-1000 mM NaCl. C: Western Blot mit dem L1 spezifischen Antikörper camvir-1. In den Fraktionen, die kurz nach der Injektion der Probe aufgefangen wurden, ließ sich bei Präparationen mit hohem BPV 1 L1ΔC VLP-Gehalt L1 Protein im Durchlauf (Fraktion 3) nachweisen.

Die BPV 1 L1ΔC VLPs binden an Heparin und können durch NaCl von der Säule eluiert werden. Bei 730-1000 mM NaCl enthalten die Fraktionen VLPs von 60 nm Durchmesser entsprechend ist bei diesen Fraktionen auch ein für BPV 1 L1 spezifisches Signal im Western Blot erkennbar. In den elektronenmikroskopischen Präparaten läßt sich zwischen der bei 730 mM NaCl eluierten VLP Fraktion (Fraktion 24) und der im Bereich von 760 bis 1000 mM (Fraktion 28) eluierten kein Unterschied im Durchmesser der VLPs feststellen. Die bei 730 mM NaCl angefertigten Präparate weisen wenig Proteintrümmer und wenig Kapsomere im Präparat auf, während bei der im Bereich von 760 bis 1000 mM NaCl eluierten Fraktionen einige Kapsomere und zerfallene VLPs sichtbar sind.
Auch bei den chimären BPV 1 L1 VLPs, bei denen der L1 Carboxyl-Terminus durch ein E7 Peptid ersetzt wurde, bleibt die Fähigkeit, an Heparin zu binden, erhalten.

A



B

BPV 1 L1	BPV 1 $E7_{1-54}$
FLAQQDID	MVQGPNT**HR**NLDDSPAGPLLILSPCAGTPT**R**SPAAPDAPDF**R**

Abb. 3.19: Bindung und Elution carboxy-terminal substituerter BPV1 L1/E7 VLPs von einer Heparin-Sepharose Säule. *A: Die Elution erfolgt durch einen linearen Anstieg der NaCl Konzentration von 300-2000 mM. Man erkennt, dass die Proteinelution kurz nach Beginn des Salzgradienten einsetzt. B: Peptidsequenz am neuen C-Terminus. Im VLP sind von den 54 Aminosäuren des E7 Proteins 39 am L1 massenspektroskopisch nachweisbar (Mattil-Fritz 2002). Aminosäuren mit basisch reagierenden Seitenketten sind als Fettdruck markiert.*

Mithilfe der aufgezeichneten FPLC-Läufe konnte die NaCl-Konzentration der Elution ermittelt werden. Das gewälte Progamm an der FPLC registriert für jede physikalische Meßgröße 60 Meßwerte pro Minute. Unter Berücksichtigung der Abweichungen die sich aus dem Versuchsaufbau ergeben wie z.B. das Totvolumen zwischen der UV- und der Leitfähigkeitsmesszelle kann man jedem Absorptionswert eine NaCl Konzentration zuordnen.

Der Beginn des Elutionspeaks und die Peakmitte werden von der Software ermittelt, sie sind aber bei diesen Versuchen auch sehr deutlich im Diagramm oder in der Wertetabelle zu erkennen. Diesen Werten kann man die aus der Leitfähigkeitsmessung resultierenden NaCl-Konzentrationen zuweisen.

	VLP Peak [mM NaCl]	
HPV 11 L1△C	897±10	
HPV 16 L1△C	1201	
BPV 1 L1 △C	727±30	(Peak 1)
BPV 1 L1 △C	817±30	(Peak 2)

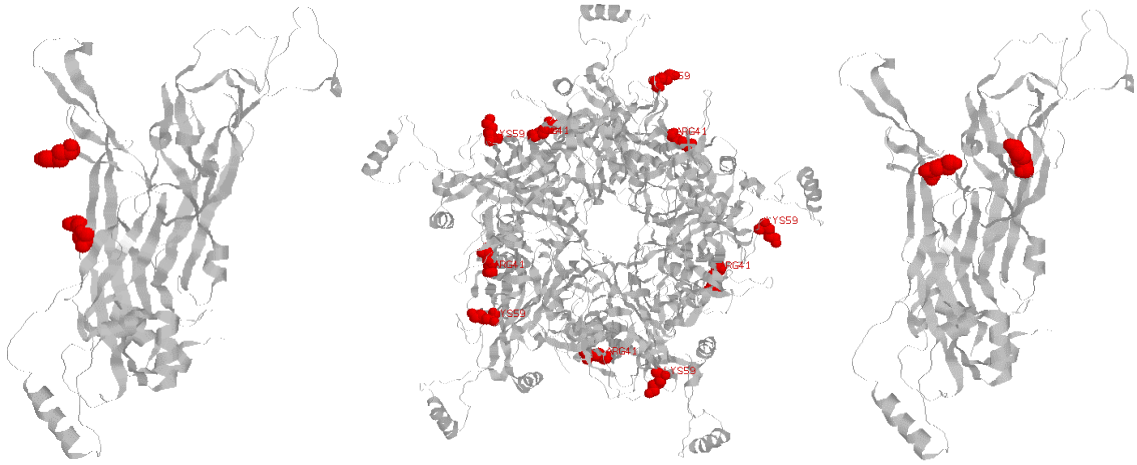
Tabelle 3: Elution der L1ΔC VLPs. *Aus drei Läufen wurde die NaCl Konzentration ermittelt, bei der die Hauptfraktion der L1ΔC-VLPs eluiert. Bei HPV 16 wurden die Läufe mit unterschiedlichen Programmen durchgeführt, so dass hier nur ein Lauf mit stufenförmiger Elution ausgewertet wurde.*

BPV 1 L1ΔC VLPs werden vor den anderen Papillomvirustypen von der Säule eluiert. Dies kann auch für BPV L1 VLPs beobachtet werden. Die Hauptfraktion der HPV 11- HPV 16- oder BPV 1 L1ΔC VLPs eluiert zwischen 730 und 1200 mM NaCl. Die Anwesenheit des Carboxyl-Terminus am L1 Protein ist bei keinem der getesteten VLPs eine notwendige Voraussetzung für die Bindung an immobilisiertes Heparin.

3.3 Beitrag basischer Aminosäuren auf der Virusoberfläche zur Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Heparin

3.3.1 Herstellung der HPV 16 L1 mut B->A VLPs

An der Bindung zellulären Heparansulfats durch Viren, wie beispielsweise Adeno Assoziiertes Virus Typ 2 (AAV 2) oder Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV), sind basische Aminosäuren auf der Virusoberfläche beteiligt (Summerford and Samulski 1998; Baranowski, Ruiz-Jarabo et al. 2000; Qiu, Handa et al. 2000). Um den Einfluß einiger Aminosäuren auf die Bindung von HPV 16 zu untersuchen, wurden basische Aminosäuren der Virusoberfläche gemäß den weiter unten aufgeführten Kriterien gegen Alanin ausgetauscht. Die Struktur „kleiner“ HPV 16 L1 VLPs mit einem Durchmesser von ca 30 nm, die sich aus 12 L1 Pentameren zusammensetzen und eine T=1 Symmetrie aufweisen, wurde 2000 von Chen et al. gelöst (Chen, Garcea et al. 2000). Die unter dem Datenbankeintrag abgelegten Atomkoordinaten werden als pdb Datei in RasMol geöffnet, um durch die räumliche Darstellung eines L1 Pentamers Aminosäuren auszuwählen, die an der Oberfläche liegen und für Moleküle wie beispielsweise Heparansulfat zugänglich sind.

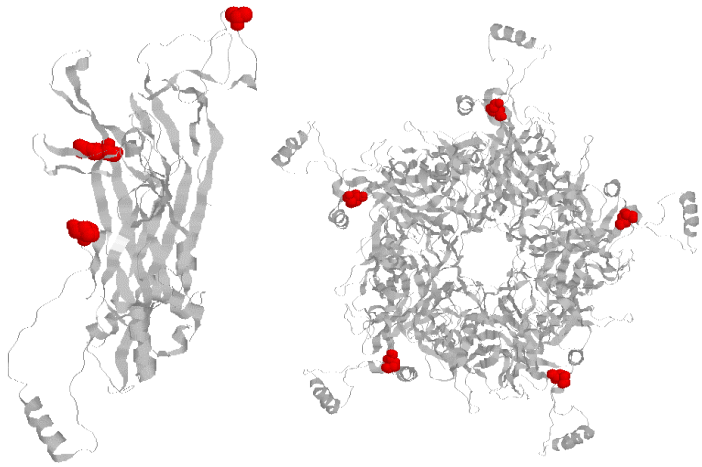


A B C

Abb. 3.20: HPV 16 L1 Monomer und Pentamer. *Topologische Darstellung der Tertiär- und Quartärstruktur des L1 Proteins im 30 nm VLP. Die Sekundärstrukturen sind als Pfeile (β-Faltblätter) und Spiralen (α-Helices) erkennbar. Die basischen Aminosäuren an den Positionen 41, 59, 64 und 171 wurden als Kalottenmodell eingezeichnet.*
A: Die basischen Aminosäuren R41 und K59 im HPV 16 L1 Monomer
B*: HPV 16 L1 Pentamer, von oben gesehen, mit den in rot markieten Aminosäuren R41 und K59 an den Außenseiten des Pentamers.*
C*: Ansicht des HPV 16 L1 Monomers von der Solvens-zugewandten Seite mit den in rot dargestellten Aminosäuren K64 und K171.*

- *(nächste Seite) –*

D: Position der Aminsäuren K356, K443 und G280 im monomeren HPV 16 L1 Protein. K356 befindet sich in dieser Ansicht unterhalb der beiden anderen Aminosäuren. K443 ist in der Mitte und S280 am oberen Bildrand zu sehen. K443 nimmt im Virion eine Position am benachbarten Pentamer ein.
E: L1 Pentamer im 30 nm VLP. Lysin an Position 443 (rot).



D E

Die Kriterien, die Aminosäuren erfüllen müssen, um als mögliche Bindungsstelle für Heparin und Heparansulfat in Frage zu kommen, sind entweder durch die Eigenschaften Heparin-bindender Viren wie FMDV und AAV-2 definiert (Trybala, Bergstrom et al. 1994; Trybala, Bergstrom et al. 1996; Fry, Lea et al. 1999; Kern, Schmidt et al. 2003) oder durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit begründet. Die Auswahlkriterien werden hier kurz vorgestellt:

- Konservierte Aminosäure

  Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimente zeigen, dass drei sehr unterschiedliche PV Typen (HPV 16, HPV 11, BPV 1) an Heparin binden. Zudem ist die Bindung von L1 VLPs eines PV Typs wie z.B. HPV 11 L1 VLPs an K562- oder CV-1-Zellen durch VLPs eines anderen PV Typs kompetierbar. Die Aminosäuren sind deshalb in konservierten Sequenzbereichen zu suchen (Muller, Gissmann et al. 1995).

- Konsensus Motiv

  Die Aminosäuren RKRTKTKK befinden sich am Carboxylterminus des Papillomvirus Typ 11 L1 Proteins. Es gleicht Motiven Heparin-bindender Proteine, jedoch zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, dass die Bindung an Heparin ohne die Beteiligung des C-Terminus stattfindet. Deshalb wurde nach einem ähnlichen Motiv auf dem L1 Protein gesucht. Arginin-, Histidin- und Lysinreiche Abfolgen finden sich auf dem L1 Protein in den β-Faltblättern βC, βF, βI. Die darin enthaltenen zentralen Arginine können nicht mutiert werden, da sie wahrscheinlich für die korrekte Faltung des L1 Proteins essentiell sind. Die am Rand der β-Faltblätter gelegenen Aminosäuren, deren Seitenketten ins Solvens reichen, werden in die Auswahl mit einbezogen.

- Nähe zu aromatischen Seitenketten

  Auf den Kapsiden von AAV-2, HSV-1 und FMDV wird Heparin nicht nur durch positiv geladene Seitenketten gebunden, sondern die zentralen Zucker eines gebundenen Saccharids z.B. (D-Glucosamin-L-Iduronsäure-D-Glucosamin) werden zusätzlich durch eine aromatische Seitenkette koordiniert (Fry, Lea et al. 1999; Qiu, Handa et al. 2000).

- Hypovariable Region

  Das HPV 16 L1 Protein besitzt mehrere flexible Schleifen, die aus dem Pentamer herausragen. In diesen exponierten Bereichen liegen die Bindungsstellen neutralisierender Antikörper und die bisher analysierten HPV 16 Varianten unterscheiden sich in diesen Sequenzbereichen voneinander. Die Bindungsstelle von HS und einem potentiellen Rezeptor wurde von uns daher in den hypovariablen Bereichen vermutet.

- Abstand zwischen den Bindungsstellen

  Die sogenannten S-Domänen im Heparansulfat, in denen hauptsächlich N- und O-sulfonierte Zucker enthalten sind, werden durch Zonen unmodifizierter Disaccharide voneinander getrennt. Besetzt Heparansulfat multiple Stellen auf der Virusoberfläche, liegen auf dem Kapsid etwa 20-50Å zwischen den Bindungsstellen (Fry, Lea et al. 1999; Kern, Schmidt et al. 2003).

Anhand dieser Kriterien wurden folgende Aminosäuren ausgewählt und verändert:

R**41**A
K**59**A
K**64**A
K**171**A
K**356**A
K**443**A

Die Punktmutationen wurden durch Fusions PCR (Ho, Hunt et al. 1989) in das L1 Gen eingefügt. Die Primer wurden nach folgendem Schema synthetisiert:
5´-NNNNNNNNNNNNNXXXNNNNNNNNNN-3´, worin N eine zur cDNA komplementäre Base ist und X eine nicht-komplementäre Base, mit deren Hilfe die Mutationen in die DNA eingefügt werden. Das Basentriplett für Lysin oder Arginin wird durch ein Alanin codierendes

Basentriplett ersetzt. Benachbarte Tripletts wurden so mutiert, dass die Aminosäure erhalten bleibt, über den Mutationsprimer aber eine neue Restriktionschnittstelle eingeführt wird, mit der die Mutation nachgewiesen werden kann (Daten nicht gezeigt).

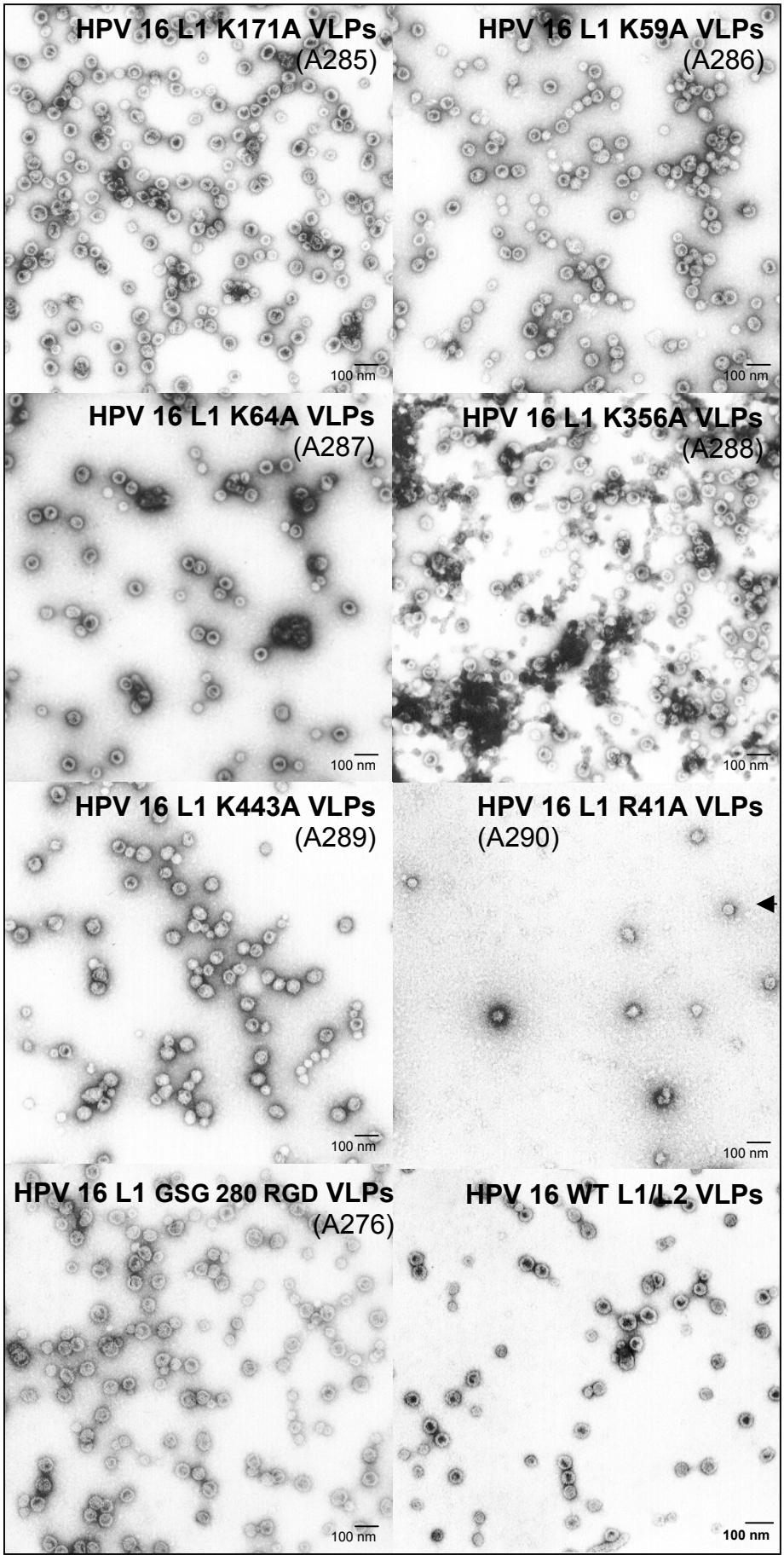
Die PCR Produkte wurden in den bakteriellen Vektor pBluescriptKS kloniert und in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert. Mit den daraus präparierten Fragmenten werden die Bereiche des HPV 16 Wildtyp L1 Gens gegen die mutierten Sequenzen ausgetauscht. Das Vorhandensein der Mutation wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft. Auf dem Agarosegel sah man zusätzliche Banden, die durch die neue Restriktionsschnittstelle entstanden sind (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid wird mit dem linearisierten Baculovirus Genom in Sf9 Zellen transfiziert. Durch Rekombination flankierender Sequenzen wird das L1 Gen unter die Kontrolle des Polyhedrin Promotors gebracht. Infizierte Zellen wurden zur Amplifikation des Baculovirus mehrfach passagiert. Die Herstellung der Virusstöcke wurde mit Unterstützung durch Herrn Dr. M. Müller und Herrn G. Pougialis durchgeführt. Die Expression des L1 Proteins in den Zellen wurde ab Viruspassage 3 durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Nach wiederholtem Passagieren in Sf9 Zellen ließ sich für alle Mutanten die Expression des L1 Proteins nachweisen. Positive Stöcke wurden geerntet und für die Infektion von H5 Zellen verwendet. Die Lysate der H5 Zellen wurden über $CsCl_2$ Gradienten gereinigt und auf das Vorhandensein der Kapside geprüft.

In Abbildung 3.21 sind die Aufnahmen der elektronenmikroskopischen Präparate abgebildet. Bei allen L1-Mutanten, außer $L1_{mut}$R41A, ist das Hauptstrukturprotein noch in der Lage, sich zu VLPs zusammenzulagern. Die Fähigkeit, interpentamere Bindungen mit benachbarten L1 Molekülen einzugehen, war folglich durch die Mutationen nicht beeinträchtigt.

Die Präparate enthalten Partikel unterschiedlichen Durchmessers. Die Mehrheit der abgebildeten Partikel besitzt einen Durchmesser von etwa 60 nm, der vergleichbar ist mit den zu Kontrollzwecken exprimierten HPV 16 L1/L2 VLPs. In dem Präparat der $L1_{mut}$R41A VLPs ist zu erkennen, dass die Ausbeute an VLPs sehr gering ist und die abgebildeten Partikel nicht die Größe und Homogenität der WT HPV 16 L1/L2 VLPs besitzen. Der Durchmesser der HPV 16 $L1_{mut}$R41A VLPs liegt bei etwa 30 nm. Einige der VLPs besitzen eine asymmetrische Form; in einem kleinen, stark kontrastierten VLP sind Feinstrukturen zu erkennen, die Kapsomeren der WT VLPs gleichen (Pfeil).

- *(nächste Seite)* –

Abb. 3.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HPV16 $L1_{mutB->A}$ VLPs. *Die Partikel stimmen im Durchmesser und in der Symmetrie mit den HPV 16 L1/L2 Wildtyp Partikeln überein. Es liegen VLPs mit einem Durchmesser von ca. 60 nm und 30 nm vor. Mit einer Ausnahme (R41A) konnten bei den Präparationen sehr gute Ausbeuten erzielt werden. R41A lieferte ausschließlich VLPs mit einem Durchmesser von ca. 30 nm. In dieser Präparation sind auch Kapsomere zu erkenen.*


HPV 16 L1 K171A VLPs
(A285)
100 nm
HPV 16 L1 K59A VLPs
(A286)
100 nm
HPV 16 L1 K64A VLPs
(A287)
100 nm
HPV 16 L1 K356A VLPs
(A288)
100 nm
HPV 16 L1 K443A VLPs
(A289)
100 nm
HPV 16 L1 R41A VLPs
(A290)
100 nm
HPV 16 L1 GSG 280 RGD VLPs
(A276)
100 nm
HPV 16 WT L1/L2 VLPs
100 nm

3.3.2 Charakterisierung neutralisierender Epitope auf dem HPV 16 L1 Protein und Überprüfung der lokalen Konformation der $L1^{mut\ B->A}$ VLPs

Obwohl in verschiedenen Studien Domänen im L1 Protein identifiziert wurden, die als Bindungsstellen neutralisierender Antikörper in Frage kommen, gibt es nur wenige Informationen, welche Aminosäuren in den neutralisierenden Epitopen für die Bindung der Antikörpermoleküle relevant sind (Ludmerer, Benincasa et al. 1997; Roden, Armstrong et al. 1997; Ludmerer, McClements et al. 2000). Die Gründe hierfür sind zum einen, dass infektiöse Papillomviren in der Zellkultur bisher in ausreichenden Mengen schwer herzustellen waren, und zum anderen, dass die Kristallstruktur des Viruskapsids und die genaue Position einzelner Aminosäuren bis vor Kurzem unbekannt waren. Dominante Epitope, die von HPV 16 L1-spezifischen Antikörpern erkannt werden, sind wie erwartet in den hypervariablen Bereichen (Loops) des L1 Proteins identifiziert worden (Combita, Touze et al. 2002; Carter, Wipf et al. 2003). In der Kristallstruktur sind diese Loops exponiert an der Oberfläche des VLPs positioniert (Modis, Trus et al. 2002). Dominant ist ein Epitop im FG Loop - über 75% getesteter Patienten-Seren reagieren mit diesem Epitop - aber auch gegen die DE- und HI-Schleife des L1 Proteins werden nach experimentellen Immunisierungen und im Verlauf natürlicher Infektionen häufig Antikörper entwickelt (Ludmerer, Benincasa et al. 1996; Ludmerer, Benincasa et al. 1997; White, Wilson et al. 1998; Christensen, Cladel et al. 2001; McClements, Wang et al. 2001; Pastrana, Vass et al. 2001; Carpentier, Fleury et al. 2005 und Carter, Wipf et al. 2003 und 2006). Die Identifizierung der genauen Antikörper-bindungsstelle ist vor allem bei der Weiterentwicklung der prophylaktischen PV Vakzine relevant, da mit dem vorhandenen Impfstoff nur zwei bzw. vier der bekannten high risk HPV Typen (HPV 16 und 18 in der von GSK hergestellten Vakzine bzw. HPV 6, 11, 16 und 18 in der Merck Vakzine) verimpft werden und die in infizierten Individuen vorherrschenden Antikörper nur selten kreuzreaktiv gegenüber anderen PV-Typen sind (Pastrana, Vass et al. 2001; Poland, Jacobson et al. 2005; Harper et al. 2006; Villa, Ault et al. 2006). Zudem zeigen Untersuchungen, dass beispielsweise der Anteil HPV 31 -kreuzreaktiver Antikörperspezies am Gesamtanteil HPV 16 spezifischer Antikörper nur 1% beträgt, was vermutlich zu gering ist, um einen schützende Immunität gegen HPV 31 Infektionen aufzubauen (Fleury, Touze et al. 2006). Durch das Zusammenfassen dominanter Epitope unterschiedlicher HPV Typen wäre es möglich, mit einer Impfung gegen mehr HPV Typen als bisher zu immunisieren.

Die hier durchgeführte Untersuchung mit den hergestellten L1 VLPs verfolgte zwei Ziele:

1.) Festzustellen, ob die Konformation der VLPs soweit erhalten ist, dass die in Bindungsstudien erzielten Ergebnisse auf lokalen Konformationsänderungen, nicht aber auf veränderten Tertiär- oder Quartärstruktur beruhen.

2.) Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper mit Hilfe der HPV 16 $L1_{mutB \rightarrow A}$ VLPs auf ihre konformations-abhängigen Bindungsstellen hin zu charakterisieren.

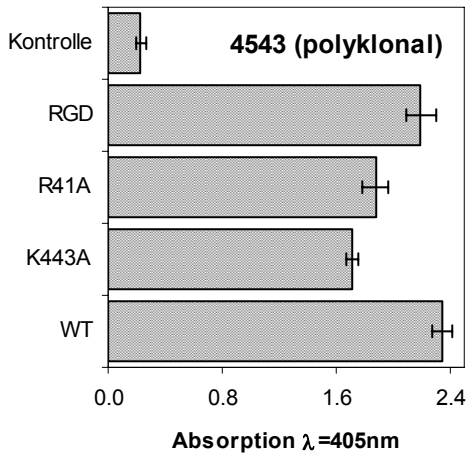
Da mit den Mut $L1_{mutB \rightarrow A}$ VLPs in erster Linie Bindungsstudien durchgeführt werden sollten, wurden die Mutationen bewusst außerhalb der für die Antikörperbindung relevanten Bereiche gesetzt (Ausnahmen: S280G; K443A).

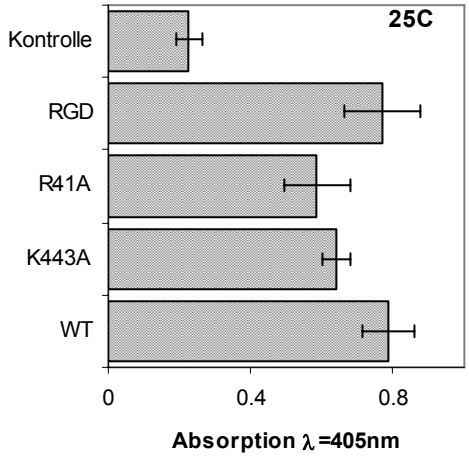
Die Bindung von Antikörpern an die unterschiedlichen HPV 16 $L1_{mutB \rightarrow A}$ VLPs wurde mittels ELISA gemessen, auf den gleiche L1 Mengen aufgetragen wurden. Der relative L1-Gehalt wurde in einem separaten ELISA durch die Bindung des polyklonalen Antikörpers 4543 an die HPV 16 $L1_{mutB \rightarrow A}$ VLPs ermittelt (s. Abbildung 3.26 Kapitel 3.3.3).

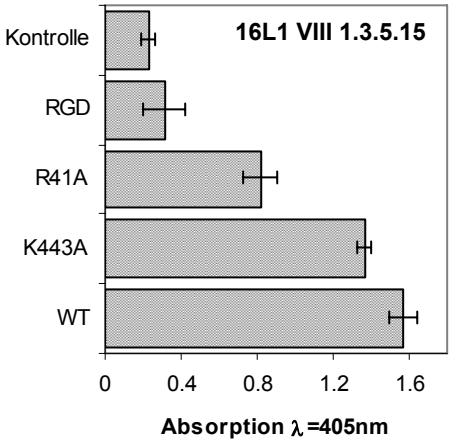
In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse der $L1_{mutB \rightarrow A}$ VLPs, bei denen ein verändertes Bindungsverhalten gemessen wurde, dargestellt. Verglichen wurden die Messwerte von bekannten monoklonalen Antikörpern, deren Bindungsstellen identifiziert sind, mit den Bindungsdaten vorhandener, noch nicht vollständig charakterisierter, Antikörper.

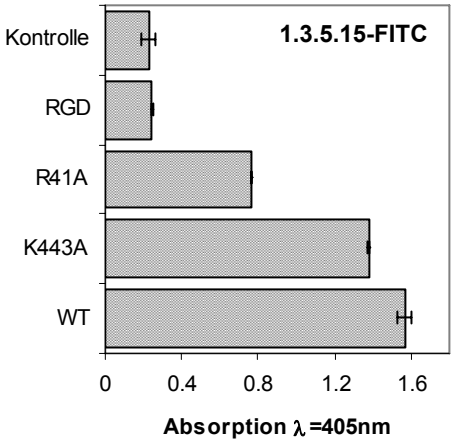
Bei den VLPs HPV 16 $L1_{mut}$R41A, HPV 16 $L1_{mut}$R443A und HPV 16 $L1_{mut}$SGS280RGD war im ELISA eine Verminderung der Reaktivität bei einigen Antikörpern messbar. Die Bindung an diese VLPs und an WT VLPs ist in der Abbildung für jeden getesteten Antikörper einzeln dargestellt. Antikörper, die ähnliche Messwerte lieferten, sind nebeneinander abgebildet. Das polyklonale Kaninchenserum #4543 war in der Lage, in allen Proben HPV 16 VLPs nachzuweisen, und diente als Kontrolle. Außer #4543 war nur der monoklonale Antikörper 25C, ein Subklon des Hybridoms V16.H9, in der Lage, in jedem Ansatz HPV 16 L1 VLPs zu erkennen.

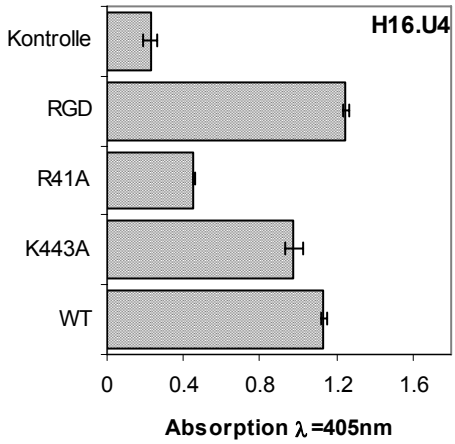
VLPs, deren L1 Proteine durch die Substitution K59A, K64A, K171A oder K356A verändert waren, wurden von allen getesteten Antikörpern gleichermaßen gebunden. Ihre Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

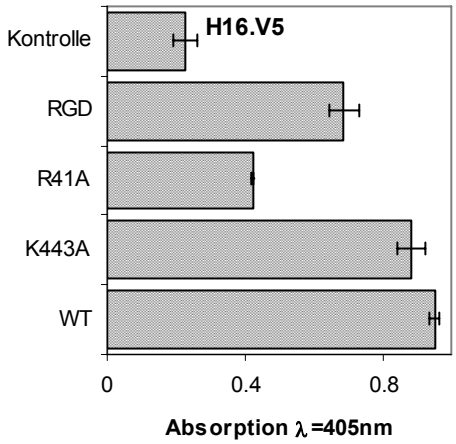

4543 (polyklonal)
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0.0
0.8
1.6
2.4
Absorption λ=405nm

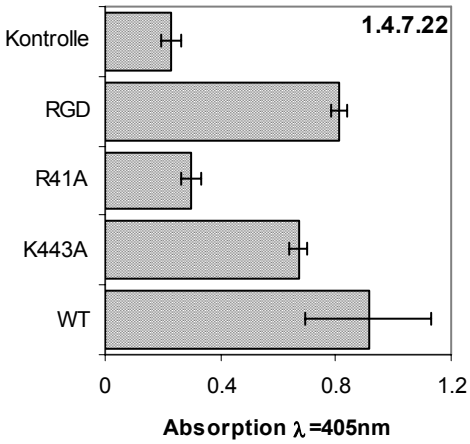

25C
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
Absorption λ=405nm

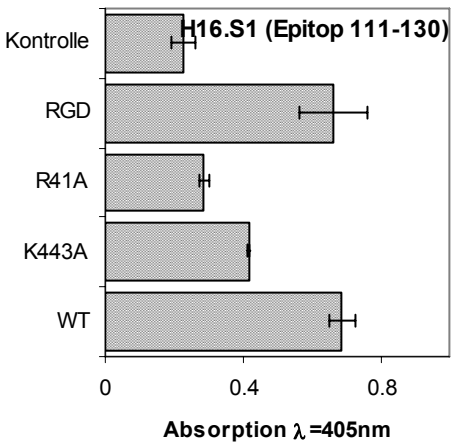

16L1 VIII 1.3.5.15
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
1.2
1.6
Absorption λ=405nm


1.3.5.15-FITC
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
1.2
1.6
Absorption λ=405nm


H16.U4
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
1.2
1.6
Absorption λ=405nm


H16.V5
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
Absorption λ=405nm


1.4.7.22
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
1.2
Absorption λ=405nm


H16.S1 (Epitop 111-130)
Kontrolle
RGD
R41A
K443A
WT
0
0.4
0.8
Absorption λ=405nm

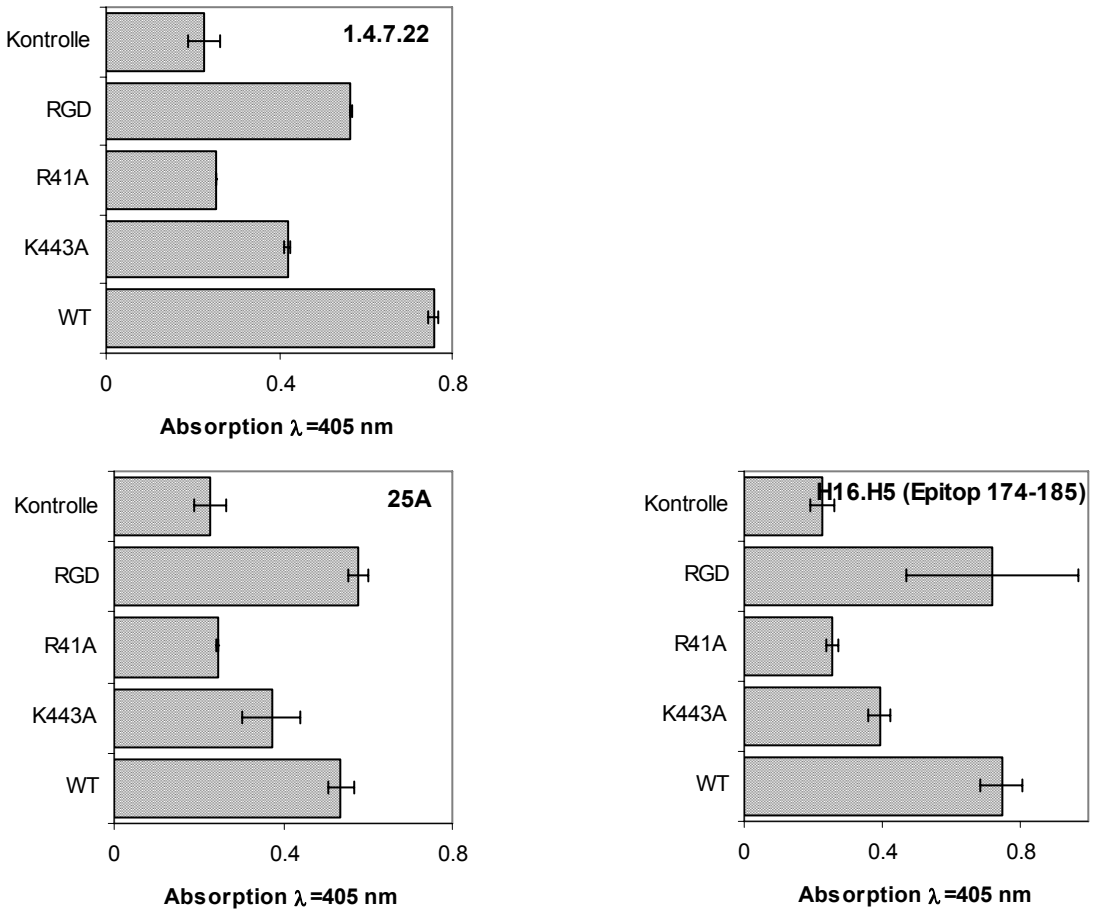


Abb. 3.22: Punktmutationen im L1 Protein bei Arginin 41 oder Lysin 443 beeinflussen die Bindung monoklonaler Antikörper an HPV 16 L1 VLPs. *Die mit den verschiedenen VLPs beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit den in der Abbildung genannten Antikörpern inkubiert. Die Messung ergab, dass einige Antikörper ein ähnliches Bindungsverhalten zeigen. Zum Beispiel erkennen die Antiserum #4543 und der Antikörper 25C alle im Test verwendeten VLPs, während 1.4.7.22, 25A und H16.H5 die VLPs $L1_{mut}$R41A nicht binden, die $L1_{mut}$K443A VLPs um die Hälfte vermindert und $L1_{mut}$RGD VLPs stark binden.*

Testet man den monoklonalen Antikörper aus Hybridom 16L1 VIII 1.3.5.15, so findet man bei der Bindung dieses Antikörpers, dass die Aminosäuren an Position 279-281 in der FG Schleife des L1 Proteins eine wesentliche Rolle bei der Bindung spielen. Aus Hybridom 1.3.5.15 aufgereinigte Antikörper werden wegen ihrer sehr spezifischen Bindung im Antigen-Capture ELISA und bei FACS Analysen eingesetzt. Durch den Austausch von Serin 279 gegen Arginin im L1 Protein kann der monoklonale Antikörper aus Hybridom 16L1 VIII 1.3.5.15 nicht mehr an die VLPs binden. Die Aminosäuren der SGS280RGD Substitution befinden sich auf der Oberfläche der VLPs in der FG Schleife des L1 Proteins, die die variable Region bildet, in der bei Papillomviren die meisten Sequenzunterschiede auftreten (Siehe Abb. 3.23).

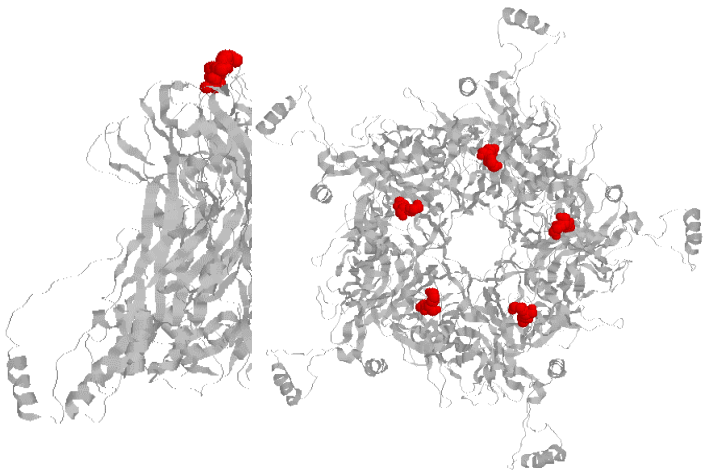


Abb. 3.23: Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins. *Die Sekundärstrukturen sind als Pfeile (β-Faltblätter) und Spiralen (α-Helices) erkennbar. Die Aminosäure 280 ist im L1 Monomer und im L1 Pentamer als rotes Kalottenmodell eingezeichnet. In der Pentamerdarstellung wird die Oberfläche des L1 Pentamers gezeigt. Aminosäure 280 ist in einer der exponiertesten Schleifen, im FG Loop, lokalisiert. Gegen dieses Epitop werden im Verlauf einer natürlichen Infektion sehr häufig Antikörper gebildet. So ist es auch nicht verwunderlich, dass der konformations-spezifische Antikörper 16L1 VIII-1.3.5.15 die L1 VLPs, in deren FG-Loop eine SGS280RGD Substitution vorliegt, nicht mehr binden kann.*

Nicht nur die Veränderung SGS280RGD im L1 Protein, sondern auch die Substitution des Arginins in Position 41 beeinflusst die Bindung der Antikörper 16L1 VIII 1.3.5.15 an die L1 VLPs. Die Aminosäure liegt an der Oberfläche des zylindrischen Pentamers, unterhalb von Aminosäure 280. Vermutlich destabilisiert der Austausch des Arginins die darübergelegen Schleife mit den Aminosäuren 279, 280 und 281, so dass die Konformation des Epitops verändert wird. Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, sind L1 Proteine mit einem Austausch an Position 41 nicht mehr in der Lage 60 nm VLPs zu bilden. Die Konformation der L1 Proteine in den 30 nm messenden VLPs ist soweit verändert, dass eine Reihe von Epitopen durch die HPV 16 L1 $_{mut}$R41A Substitution beeinflusst wird (siehe Abb. 3.24). Das für die korrekte Ausbildung der Tertiär- und Quartästruktur mitverantwortliche Phenylalanin 50 liegt am Ende des bei Arginin 41 beginnenden β-Faltblatts ***β-B2***. Für VLPs mit einer Veränderung in der Aminosäure an Position 50 wurde bereits ein Einfluss auf die Struktur des VLPs und auch auf die Bindung von Antikörpern nachgewiesen (White, Wilson et al. 1998; Carter, Wipf et al. 2003 und 2006). Dies wird hier auch für die Aminosäure an Position 41 beobachtet.

Von 10 getesteten monoklonalen Antikörpern kann nur Antikörper 25C an die HPV 16 L1 $_{mut}$R41A VLPs so stark binden wie an Wildtyp L1 VLPs. Bei den monoklonalen Antikörpern H16.U4, H16.V5, H16.H5, H16.S1, 1.4.7.22 und 25A verringert sich die Bindung an HPV 16 L1$_{mut}$R41A VLPs gegenüber der Bindung an HPV 16 Wildtyp VLPs deutlich. Auf Grund der beobachteten verringerten Reaktivität der Antikörper mit diesen VLPs und der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ist das β-Faltblatt ***β-B2,*** welches die Aminosäuren R41 und F50 beherbergt vermutlich nicht nur an den L1 Monomerkontakten beteiligt, wie es in der Atomstruktur und in Abbildung 3.24 zu sehen ist, sondern darüberhinaus auch für die Assemblierung der Pentamere zu 60 nm VLPs entscheidend. Der Einfluss der R41A

Substitution ist weitreichend, da auch ein Epitop, welches von dem monoklonalen Antikörper H16.V5 gebunden wird, betroffen ist. Sein Epitop, wird in einer von White et al durchgeführten Untersuchung von 75% aller getesteten, humanen Seren erkannt (White, Wilson et al. 1998 und Carter, Wipf et al. 2003 und 2006). Das Epitop wurde bei den Aminosäuren 270-290 und 345-348, am Anfang und am Ende der FG-Schleife, d.h. in einem exponierten Loop an der Oberfläche des VLP identifiziert. Hingegen befindet sich R-41 in der Nähe des Interpentamerraums (s. Abb. 3.24) also einige Å vom FG-Loop und damit auch von der Bindungsstelle des H16.V5 Antikörpers entfernt. Beobachtet wurde, dass sich die Bindung des Antikörpers H16.V5 an die HPV 16 $L1_{mut}$R41A VLPs um mehr als die Hälfte verringert, verglichen mit der Bindung an HPV 16 L1 WT VLPs.

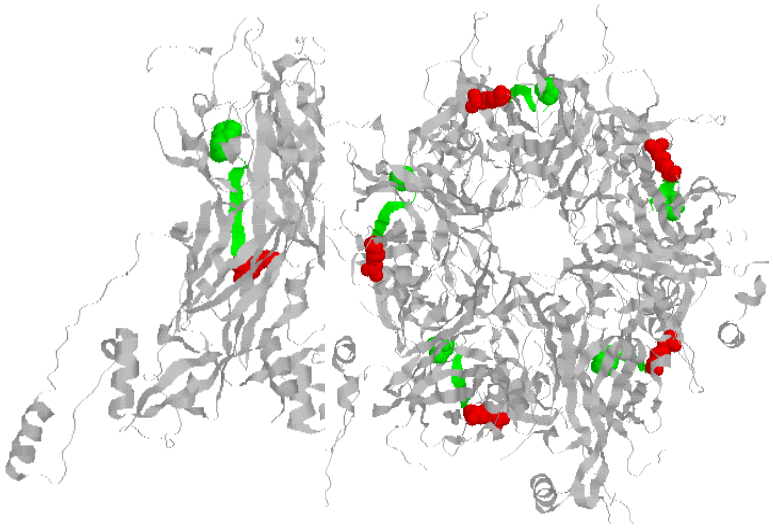


Abb. 3.24: Darstellung der Aminosäuren Arginin-41 (rot) und Phenylalanin-50 (grün, als Kalottenmodell) in der Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins. *Zur besseren Übersicht ist vom Pentamer ein Schnitt parallel zur Oberfläche dargestellt. Man erkennt, dass beide Aminosäuren das β-Faltblatt **β-B2** (grün) begrenzen. Die Bedeutung des Phenylalanins in Position 50 für die Ausbildung einer korrekten Tertiär- und Quartärstruktur des HPV 16 L1 Proteins wurde bereits in der Literatur beschrieben (s. Text). Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Beobachtungen weisen eine vergleichbare Relevanz für das Arginin in Position 41 bzw. die Position des β-Faltblatts **β-B2** (grün) nach.*

Die Substitution von Lysin an Position 443 und die Substitution bei Aminosäure 280 beeinflussen die Bindung des Antikörpers H16.V5 an die entsprechenden VLPs jedoch nicht. Ebenso verhält sich Antikörper H16.U4. Seine Bindungsstelle wird bei den Aminosäuren 427-445 vermutet (Carter, Wipf et al. 2003). Die Bindungsdaten zeigen, dass H16.U4, genauso wie H16.V5, nur von der R41A-Substitution betroffen ist. Veränderungen der bei Aminosäure 50 benachbarten Aminosäuren Lysin-59, Lysin-64 und Lysin-171, welche ausserhalb des β-Faltblatts ***β-B2*** liegen, haben keinen Einfluss auf die Bindung der Antikörper H16.U4 und H16.V5 oder die Bildung der 60 nm VLP Struktur (Daten nicht gezeigt). Ebenso hat die Veränderung der Aminosäure Lysin-443 nur einen geringen, kaum messbaren Einfluss auf die Bindung von H16.U4. Der Antikörper H16.U4 bindet deshalb vermutlich an Anfang des von den Aminosäuren 427-445 gebildeten Peptids. Die Bindungsdaten von H16.U4 veranschaulichen, dass die veränderte Aminosäure an Position 443, die L1 Konformation im VLP nur lokal beeinflusst und die Quartärstruktur davon nicht betroffen ist.

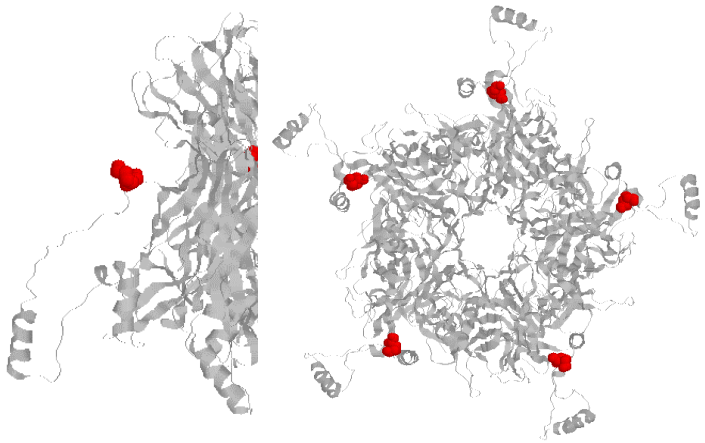


Abb. 3.25: Position der Aminosäure Lysin 443 (rot) innerhalb der Quartär- und Tertiärstruktur des L1 Proteins im 30 nm VLP. *Die Position dieser Aminosäure unterscheidet sich im Virion wesentlich. Sie bindet im Virion an ein benachbartes Pentamer. Die K443A Substitution hat einen Einfluss auf die Reaktivität der Antikörper H16.H5 und H16.S1, deren Bindungsstellen aber bei den AS 111-130 bzw. 174-182 und nicht bei 443 vermutet werden. Hingegen ist der Einfluss dieser Substitution auf die Bindung von H16.U4 an VLPs nur gering, obwohl seine Bindungsstelle bei den AS 427-445 vermutet wird. Dies lässt sich sehr gut mit der Atomstruktur von Modis et al. erklären, in der das Peptid 247-445 wie ein Band um das L1 Pentamer gewunden ist und auch Bereiche der von AS 100-200 gebildeten Strukturen kontaktieren kann (Modis, Trus et al. 2002).*

Das Epitop, welches der monoklonale Antikörper H16.H5 bindet, wird bei den Aminosäuren 174-185 vermutet (Roden, Armstrong et al. 1997). Es wird sowohl vom Austausch des Arginins in Position 41 als auch von der Veränderung des Lysins an Position 443 beeinflusst. Das gleiche gilt für den Antikörper H16.S1, dessen Epitop bei den Aminosäuren 111-130 identifiziert wurde (Ludmerer, Benincasa et al. 1997). Er erkennt HPV 16 L1 $_{mut}$R41A VLPs nicht und bindet an HPV 16 L1 $_{mut}$K443A VLPs nicht so stark wie an WT L1 VLPs.

Bei den monklonalen Antikörpern 25A und 1.4.7.22 sind ähnliche Bindungsdaten messbar wie bei H16.H5 und H16.S1. Die Bindung wird nicht durch die Veränderung in dem dominanten Epitop der FG Schleife (SGS280RGD) beeinflusst, aber der Austausch der unterhalb gelegenen Aminosäure 41 oder der Aminosäure 443 verringert die Bindung an diese VLPs. Die Antikörper binden vermutlich an ein Epitop, das bei den Aminosäuren 50-150 liegt und entweder durch das in der Nähe gelagerte Lysin-443 stabilisiert wird oder Lysin-443 als Teil seiner Bindungsstelle erkennt.

Die Daten bestätigen die von Modis et al. 2002 aufgestellte Hypothese, dass Lysin-443 für Antikörper zugänglich sein kann (Sapp, Kraus et al. 1994; Modis, Trus et al. 2002; Schafer, Florin et al. 2002). Die Bindungsstelle von H16.S1 (111-130) und H16.H5 (174-182) wird deutlich von der Veränderung bei Lysin 443 beeinflusst, in dem das gemessene Signal im ELISA halbiert wird.

Ob durch die Veränderung ein direkter oder indirekter Einfluss ausgeübt, wird lässt sich nicht sicher aussagen, da die Bindungsstelle von H16.H5 beispielsweise in der Nähe der Disulfidbindung (C175) liegt und ein indirekter, destabilisierender Einfluss auf dieses Epitop in im Falle einer geschlossenen Disulfidbindung nicht möglich erscheint (Roden, Armstrong et al. 1997). Jedoch zeigen die Versuche von Buch et al. und Sapp et al., dass in einem VLP

nicht jedes Cystein-175 eine Disulfidbindung ausgebildet hat, was eine Fragilität des Epitops denkbar macht und so durchaus einen indirekten Einfluss zulassen kann (Selinka, Giroglou et al. 2003; Buck, Pastrana et al. 2005).

Viel eher ist es jedoch denkbar, dass die Bindungsstelle in unmittelbarer Nähe liegt und von der Veränderung in der Ladungsverteilung durch die K443A Substitution betroffen ist. Zu bedenken ist zudem, dass Lysin 443 einer sehr flexiblen Region im L1 angehört. Diese Region im L1 umschlingt das benachbarte Pentamer und hat dadurch vielfältige Möglichkeiten, direkte wie indirekte, an der Bindung der Antikörper H16.H5 und H16.S1 beteiligt zu sein. Die Versuche zeigen, dass sich die durch Austausch einzelner Aminosäuren hervorgerufenen Veränderungen (Ausnahme: R41A) auf lokale Konformationsänderungen beschränken. Die Tertiär- und Quartärstruktur der L1 Proteine ist davon nicht betroffen, so dass mit diesen VLPs Zellbindungsanalysen durchgeführt werden können. Die Epitope der untersuchten Antikörper sind in der u.g. Tabelle noch einmal zusammengefasst.

Anti HPV 16	***Bindung an $L1_{B->A}$VLPs***			***Publiziertes***	***Vermutetes***
Antikörper	***R41A***	***SGS280-RGD***	***K443A***	***Epitop***	***Epitop***
H16.S1	**--**	**++**	**-**	**111-130**	**-**
H16.H5	**--**	**++**	**-**	**174-185**	**-**
H16.U4	**-**	**++**	**+**	**427-445**	**bei 427**
H16.V5	**-**	**+**	**++**	**270-290 und 345-348**	**-**
25C	**+**	**++**	**++**	**-**	**(polykl.)**
25A	**--**	**++**	**-**	**-**	**443**
1.3.5.15	**+**	**--**	**++**	**-**	**280**
1.4.7.22	**--**	**++**	**-**	**-**	**100-150**
4543 (polykl.)	**++**	**++**	**++**		

Tabelle 4: Zusammenfassung bekannter und vermuteter Antikörperbindungsstellen.
Die im ELISA gemessene Bindungsstärke der Antikörper wurde zur Beurteilung in 4 Klassen eingeteilt und mit entsprechenden Symbolen bezeichnet: ***--*** *: keine Bindung;* ***-*** *: sehr geringe Bindung;* ***+*** *: verminderte Reaktivität;* ***++*** *: Bindung entspricht der Bindung an WT VLPs. Die Antikörper 25 A und 25 C sind Subklone von V16.H9. Während 25A eine verminderte Reaktivität bei den $L1_{mut}$K443A VLPs zeigt reagiert 25C mit allen getesteten VLPs. Vermutlich besitzt 25 C trotz Subklonierung noch keinen monoklonalen Ursprung.*

3.3.3 Einfluss der Mutationen auf die Bindung von HPV 16 L1 mut B->A VLPs an Heparin

Der Einfluss der Aminosäurensubstitution auf das Bindungsverhalten der HPV 16 $L1_{mutB->A}$ VLPs wurde mittels Affinitätschromatographie, konformations-spezifischem ELISA und Bindung an HaCaT-Zellen untersucht. Die Bindung der HPV 16 $L1_{mutB->A}$ VLPs an immobilisiertes Heparin wird auf einer Heparin-Sepharose Säule und durch Elution mit einen stufenförmigen NaCl- Gradienten bestimmt.

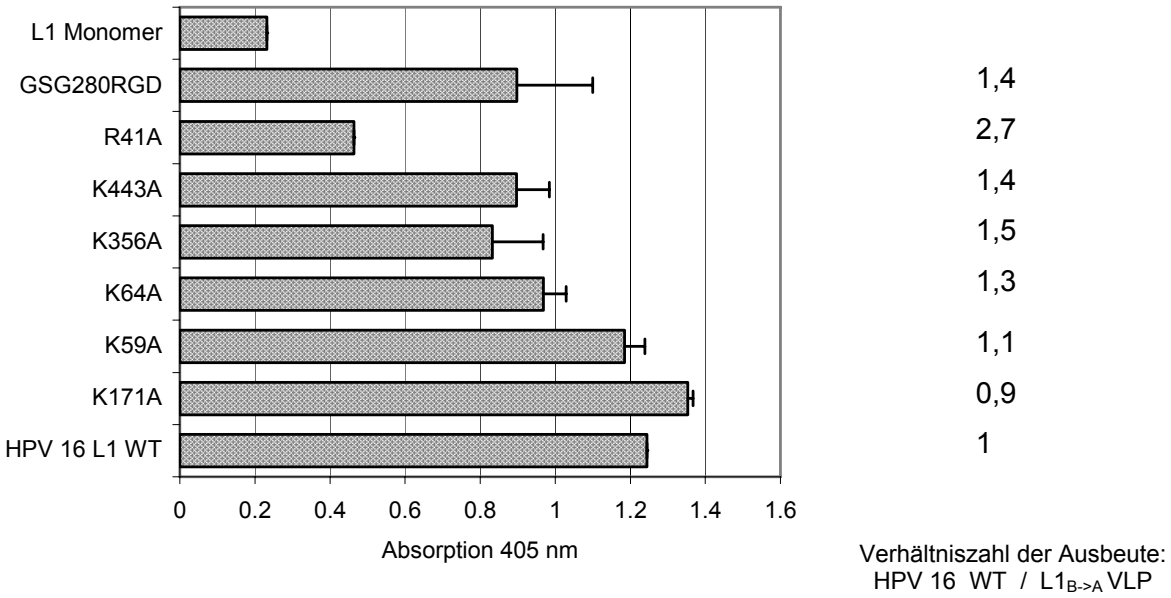


Abb. 3.26: Konzentrationsunterschiede in den VLP–Präparaten. *Die L1-VLPs wurden in einer 1:12.800 Verdünnung auf Mikrotiterplatten gecoatet. Der Nachweis erfolgte über das konformations-spezifische, polyklonale Kaninchenserum #4543 und einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Die VLPs der L1mutR41A-Mutation zeigten bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung einen geringen VLP Gehalt. Auch in diesem Assay misst man mit ihren Proben die geringsten Werte. Die VLPs wurden in den nachfolgenden Assays entsprechend ihrer hier ermittelten Verhältniszahlen eingesetzt. Die Berechnung wurde auf die Messwerte von HPV 16 L1 WT VLPs bezogen.*

Für alle HPV 16 $_{L1mutB->A}$ VLPs kann die Bindung an immobilisiertes Heparin gezeigt werden. Das Elutionsverhalten einiger Mutanten weicht von dem der Wildtyp VLPs ab. $L1_{mut}$K171A VLPs eluieren etwas später als WT L1 VLPs; der Unterschied ist aber gering.

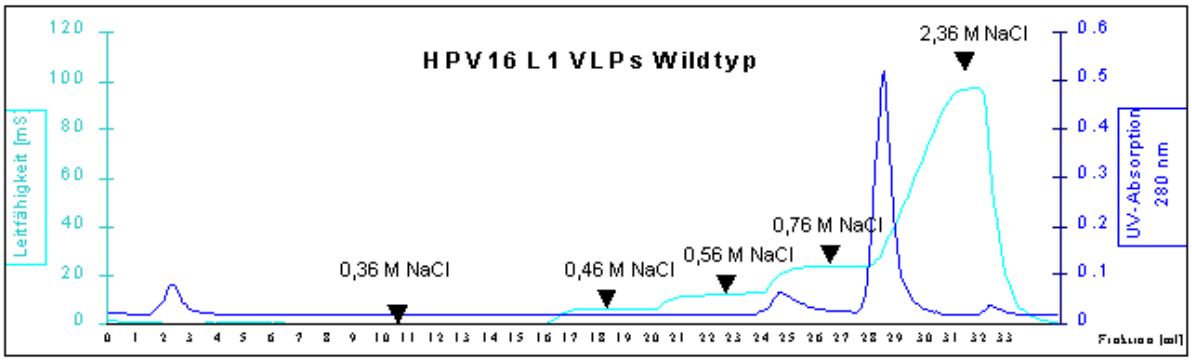
$L1_{mut}$K59A VLPs und $L1_{mut}$K64A VLPs zeigen keine Änderung in ihren Bindungseigenschaften, während L1 VLPs bei denen Arginin in Position 41, unweit von Position 59 und 64, verändert wurde als Doppelpeak eluieren. Die Ausprägung der Doppelpeaks schwankt in Abhängigkeit von der Präparation. VLPs unter dem zweiten Peak verlassen bei noch höherer NaCl-Konzentration die Säule.

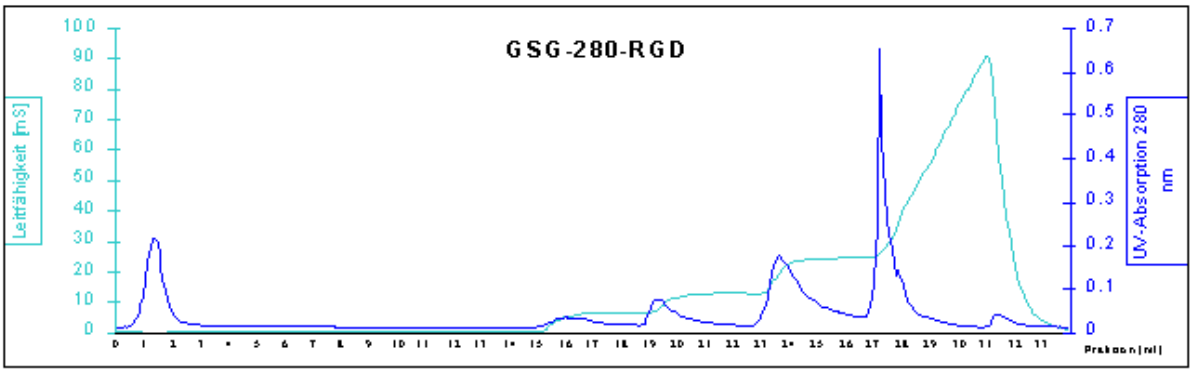
In den elektronenmikroskopischen Präparaten der VLPs, deren Arginin an Position 41 verändert wurde, konnte man erkennen, dass die Ausbeute an VLPs geringer ist als bei Wildtyp L1. Auch der Durchmesser und die Symmetrie der HPV 16 $L1_{mut}$R41A VLPs weichen

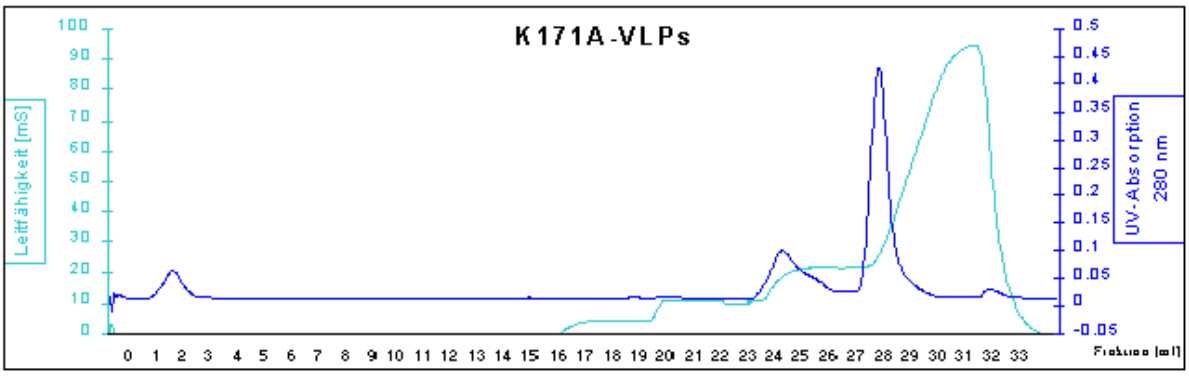
mit etwa 30 nm deutlich von den WT L1 VLPs und DNA-haltigen Virionen ab. Vergleicht man die Bindung an Heparin, findet man, dass für die Elution dieser VLPs eine ca. 170 mM höherere NaCl Konzentration notwendig ist als für die Elution der HPV 16 WT L1 VLPs.

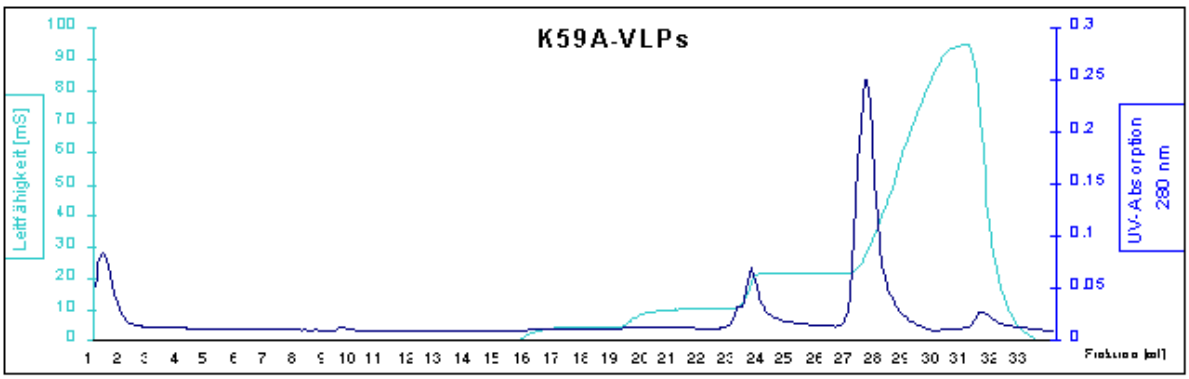
HPV 16 VLP	**Elutionsbeginn mM NaCl**
WT L1	**880**
SGS280RGD	**890**
285 K171A	**870**
286 K59A	**880**
287 K64A	**880**
288 K356A	**880**
289 K443A	**880**
290 R41A Peak 1	**1050**
290 R41A Peak 2	**1260**

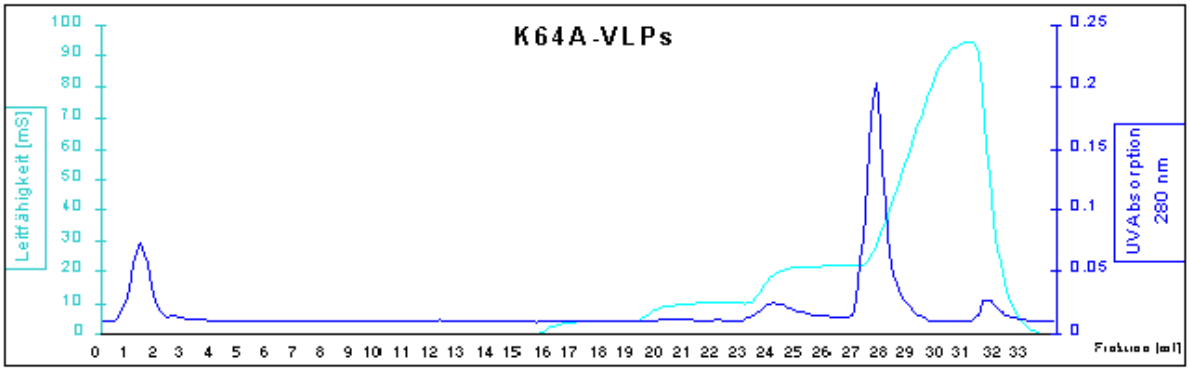
Tabelle 5: Elution der HPV 16 L1$_{mutB->A}$ VLPs. *Der Elutionsbeginn der HPV 16 VLPs wurde markiert und die entsprechende NaCl Konzentration berechnet. Dabei wurden die unterschiedlichen Laufweiten zur UV- und Leitfähigkeitsmesszelle berücksichtigt.*


HPV16 L1 VLPs Wildtyp
0,36 M NaCl
0,46 M NaCl
0,56 M NaCl
0,76 M NaCl
2,36 M NaCl
Leitfähigkeit [mS]
UV-Absorption 280 nm


GSG-280-RGD
Leitfähigkeit [mS]
UV-Absorption 280 nm


K171A-VLPs
Leitfähigkeit [mS]
UV-Absorption 280 nm


K59A-VLPs
Leitfähigkeit [mS]
UV-Absorption 280 nm


K64A-VLPs
Leitfähigkeit [mS]
UV-Absorption 280 nm

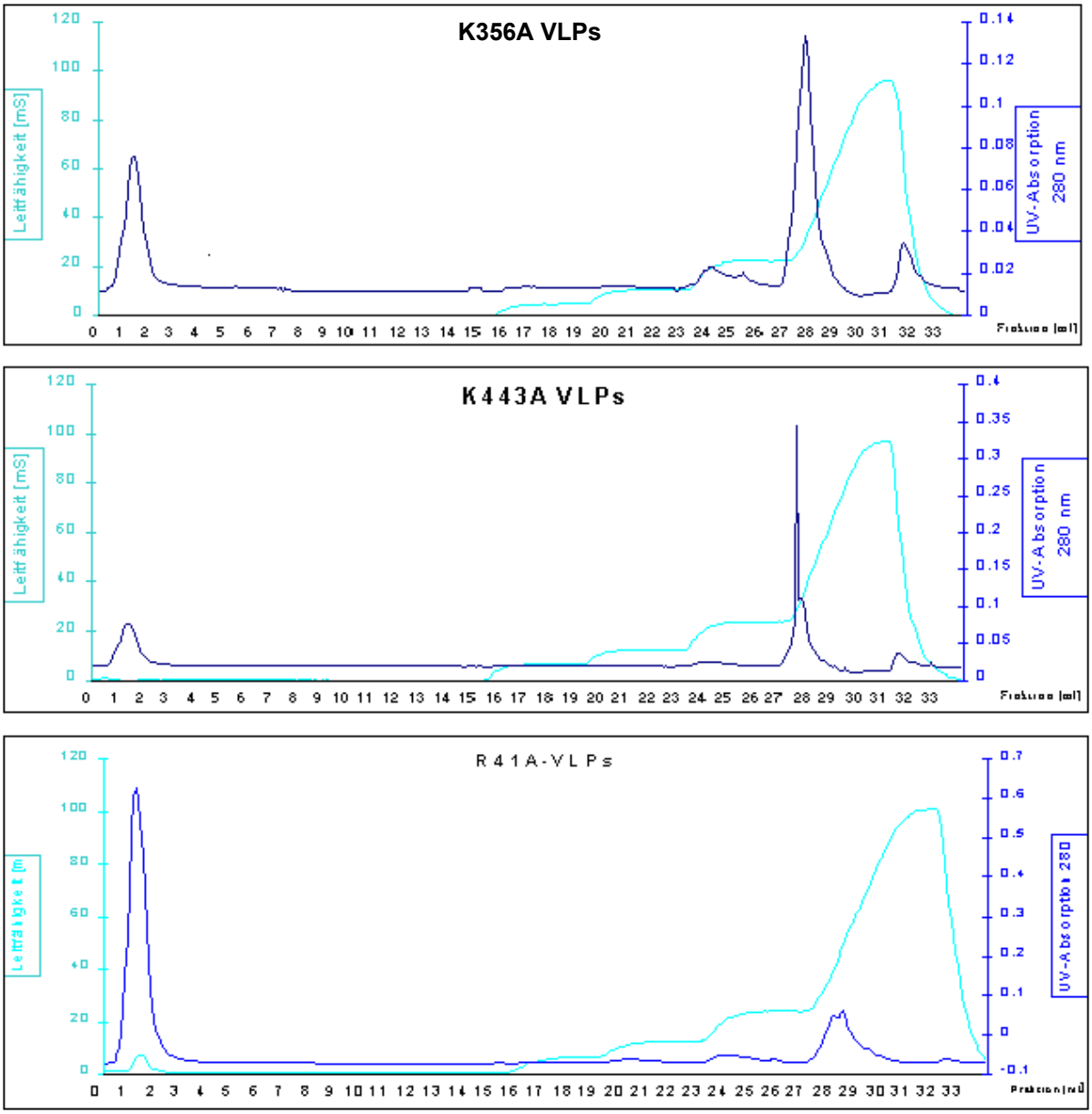


Abb. 3.27: Bindung der HPV 16 $L1_{mut\ B->A}$ VLPs an immobilisiertes Heparin. *Abgebildet sind die Elutionen durch einen NaCl-Gradienten, der stufenförmig von 0,36 M bis 2,36 M anstieg. Die Änderung der NaCl Konzentration im Puffer ist durch die Änderung der Leitfähigkeit dargestellt. Die Elution der VLPs wird mittels UV-Absorption verfolgt. Die Fraktionsnummern der x-Achse entsprechen dem zeitlichen Ablauf. Jede Fraktion enthält 1 ml, die Flußrate lag bei 1 ml in der Minute.*

3.3.4 Einfluss der Mutationen auf die Bindung von HPV 16 L1mutB->A VLPs an HaCaT-Zellen

Um zu untersuchen, ob Punktmutationen im L1 Protein einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von VLPs an Zellen haben, wird die Bindung der HPV 16 $L1_{mutB->A}$ VLPs an HaCaT-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz am Durchflusscytometer gemessen. Für die Versuche wurden die Zellen mit EDTA-haltigem Puffer geerntet und in DMEM-Puffer mit den HPV 16 $L1_{mutB->A}$ VLPs inkubiert. Gebundene VLPs wurden durch den L1-spezifischen, polyklonalen Kaninchenantikörper (#4543) am FACS nachgewiesen.

Die HPV 16 $L1_{mut}$K171A VLPs sowie HPV 16 $L1_{mut}$K59A VLPs und HPV 16 $L1_{mut}$K64A VLPs binden an HaCaT Zellen, ohne dass Unterschiede zu WT L1 VLPs bei der FACS-Analyse sichtbar werden.

Bei den HPV 16 $L1_{mut}$K443A VLPs ist die Bindung geringer, eine zweite Population wird als Schulter am Hauptpeak sichtbar.

Bei Bindung der HPV 16 $L1_{mut}$R41A VLPs an HaCaT-Zellen traten in der FACS-Analyse Unterschiede zu den WT L1 VLPs auf. Die Zellpopulation spaltet sich in zwei Subpopulationen auf, und es erscheint ein Doppelpeak, wie es auch bei der Bindung der HPV 16 $L1_{mut}$R41A VLPs an immobilisiertes Heparin beobachtet werden konnte. Die linke Population zeigt eine geringe VLP Bindung, während die rechte Zellpopulation VLPs sehr stark gebunden hat. Da die VLP Präparation der $L1_{mut}$R41A VLPs inhomogen war sind mehrere Möglichkeiten denkbar, die dieses veränderte Bindungsverhalten erklären könnten. Durch die Veränderung der Aminosäure in Position 41 können sich nur noch VLPs mit geringerem Durchmesser bilden. Duch die veränderte Konformation wird der Zutritt zum Interpentamerraum leichter, möglicherweise liegen auch veränderte Interpentamerkontakte vor, so dass die Heparinpolymere zusätzliche Bindungsstellen erreichen können (Chen, Garcea et al. 2000; Modis, Trus et al. 2002). Einige Kapsomere waren nicht vollständig zu VLPs aggregiert, so ist es denkbar, dass im Inneren verborgene Aminosäuren nun zugänglich sind und an der Bindung teilnehmen können.

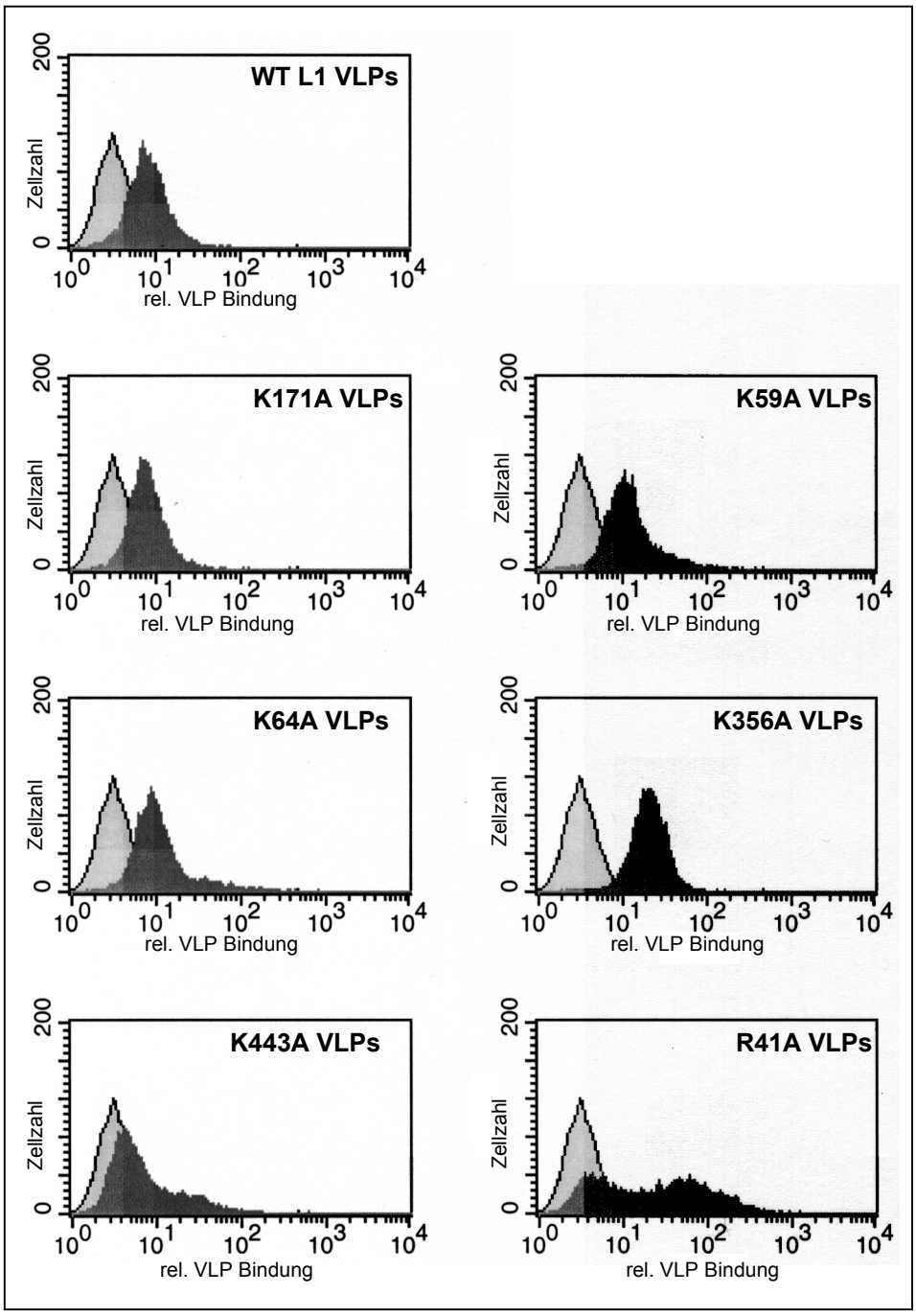


Abb. 3.28: Bindung der HPV 16 L1 $_{mutB->A}$ VLPs an HaCaT-Zellen. *Die Bindung der VLPs konnte mittels präadsorbiertem, polyklonalem Kaninchenserum #4543 (1:2000) und FITC markiertem Zweitantikörper (Ziege anti Kaninchen IgG 1:1000) am Durchflußcytometer nachgewiesen werden. Bei den L1 R41A VLPs teilt sich die Zellpopulation in einen gering bindenden und einen stark bindenden Anteil auf. Die Präparation enthielt VLPs mit 30 nm Durchmesser und inhomogener Gestalt. Bei den L1 K443A VLPs wird eine Schulter am Hauptpeak sichtbar. Die L1 K443A VLP Präparation enthält überwiegend VLPs mit einem Durchmesser von 60 nm. Verwendet wurden 3x10^5 Zellen/Ansatz und auf 1,4 µg HPV 16 WTL1 Protein bezogene Äquivalente der L1$_{mut}$R-A VLPs*

3.4 Bindung unterschiedlicher Papillomvirus VLPs an Keratino-, Lympho- und Erythrocyten

3.4.1 Bindung von PV VLPs und Virionen an Erythrocyten

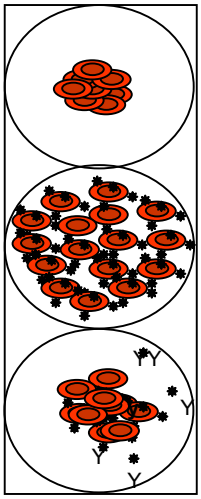
Eine Reihe von Viren ist in der Lage Erythrocyten zu agglutinieren. Diese Eigenschaft wurde für die Charakterisierung und Identifizierung zellulärer Rezeptoren von Viren der Polyomavirusgruppe, HSV-1 oder B19 Parvovirus genutzt (Fried, Cahan et al. 1981; Brown, Anderson et al. 1993; Trybala, Svennerholm et al. 1993). Durch die Bindung der Viren an Erythrocyten werden diese quervernetzt und in der Mikrotiterplatte immobilisiert. Ein diffuser Zellrasen bedeckt dann vollständig den Boden der Vertiefung. Inhibieren gegen Viren gerichtete Antikörper die Hämagglutination, so werden die Erythrocyten in der Probe wieder mobil und rollen in der Mitte der Vertiefung zu einem intensiv-roten Klümpchen zusammen. Das System eignet sich als schnelles Hochdurchsatzverfahren zur gleichzeitigen Testung mehrerer Verdünnungsreihen verschiedener Polyanionen und unterschiedlicher Papillomviren, um die wirksamen Konzentrationsbereiche für die nachfolgenden Zell-basierenden FACS-Assays herauszufinden.

Abb. 3.29: Schema des Hämagglutinationstests

Freie Erythrocyten in PBS

Hämagglutination durch Virusbindung

Hemmung der Häm-agglutination durch virusneutralisierende Antikörper (Antikörper dargestellt durch „Y“)



Bovine Papillomviren sind in der Lage, murine Erythrocyten zu agglutinieren (Favre, Breitburd et al. 1974). Roden et al. zeigten, dass alle Antikörper, die im Hämagglutinationshemmtest die Bindung von BPV 1 Virionen an murine Erythrocyten verhinderten, auch In-vivo die Infektion von BPHK-Zellen durch BPV 1 Virionen verhindern konnten (Roden, Hubbert et al. 1996).

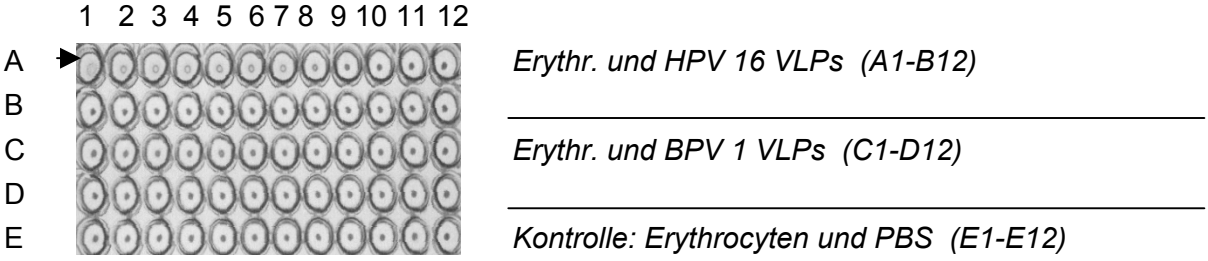


Abb. 3.30: Erythrocyten aus Ratte werden durch HPV 16 VLPs agglutiniert. *HPV 16 L1 VLPs nicht aber BPV 1 L1 VLPs sind in der Lage die Erythrocyten zu agglutinieren (Agglutination A1-A7; s. Pfeil). 6x10^6 Erythrocyten wurden mit HPV 16 L1 VLPs (0,6 µg L1 Protein in A1) inkubiert. HPV 16 und BPV 1 wurden jeweils in A1 und C1 vorgelegt und seriell von A1 bis B12 bzw. von C1 bis D12 verdünnt. E diente als Kontrollreihe.*

Zunächst soll geklärt werden, ob auch HPV 16 VLPs in der Lage sind Erythrocyten zu agglutinieren und ob Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten und Papillomviren feststellbar sind. Dazu wurden Erythrocyten aus Maus, Ratte, Meerschwein, Kaninchen und Pferd mit HPV 16 VLPs zusammengegeben und bis zum Sichtbarwerden der Komplexe inkubiert. Auf Abbildung 3.30 erkennt man, dass HPV 16 VLPs auch Erythrocyten aus Ratte agglutinieren können. Die agglutinierenden Eigenschaften von BPV 1 VLPs unterscheiden sich von HPV 16, da BPV 1 weder die Erythrocyten aus Ratte noch die aus Pferdeblut agglutiniert. Um einen Einfluss von $CsCl_2$ auf die Versuche auszuschließen, wurden die VLPs 10 min gegen VE-Wasser dialysiert. Beginnende Hämolyse konnte nach 48-96 Stunden Inkubation bei 4-8°C beobachtet werden. Sie betraf jedoch alle Proben, unabhängig von den zugesetzten Substanzen. Die Tabelle faßt die Ergebnisse des Hämagglutinationstest der verschiedenen getesteten Virustypen zusammen.

Erythrocyten	***HPV 16***	***BPV 1***	***HPV 11***	***HPV11 ΔC***
Maus	*agglutiniert*	*agglutiniert*	*agglutiniert*	*agglutiniert*
Ratte	*agglutiniert*	*keine HA*	*n.b.*	*n.b.*
Meerschwein	*agglutiniert*	*agglutiniert*	*n.b.*	*n.b.*
Kaninchen	*agglutiniert*	*agglutiniert*	*n.b.*	*n.b.*
Pferd	*agglutiniert*	*keine HA*	*n.b.*	*n.b.*

Tabelle 6: Hämagglutinationseigenschaften von HPV 16 VLPs , BPV 1 VLPs und HPV 11 VLPs bei Erythrocyten verschiedener Spezies. *(HA=Hämagglutination; n.b.=nicht bestimmt)*

Die Fähigkeit, Erythrocyten zu agglutinieren, ist eine gemeinsame Eigenschaft verschiedener Papillomvirustypen. HPV 16-, HPV 11- und BPV 1 L1 VLPs und BPV 1 Virionen sind alle in der Lage, murine Erythrocyten zu agglutinieren. HPV 16 VLPs agglutinieren nicht nur murine Erythrocyten sondern auch Erythrocyten aus Ratte, Meerschwein, Kaninchen und Pferd. Obwohl noch nicht klar ist, ob die Bindung bei Erythrocyten und anderen Zelltypen an dasselbe Molekül erfolgt, ist in beiden Fällen ein konserviertes Molekül der Bindungspartner der Papillomviren. Auch in diesen Versuchen spielte die Anwesenheit des HPV 11 L1C-Terminus keine Rolle, da auch HPV 11 L1ΔC VLPs in der Lage waren, murine Erythrocyten zu agglutinieren (Paintsil, Muller et al. 1996; Muller, Zhou et al. 1997; Li, Liu et al. 2004). Feststellbar ist auch die mangelnde Hämagglutination von BPV-1 bei equinen Erythrocyten, eine Eigenschaft, wie sie auch für HPV und humane Erythrocyten zu beobachten ist (Roden, Hubbert et al. 1995).

3.4.2 Einfluss verschiedener Polysaccharide auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Erythrocyten

Da Polysaccharide wie Heparin und Heparansulfat auf Grund der vorangegangenen Chromatographien als Bindungspartner für HPV 16 in Frage kommen, sollte mit Hilfe des Hämagglutinationstests untersucht werden, ob Heparin und seine Derivate um HPV 16 L1 VLPs kompetieren und möglicherweise bestehende Virus-Zellkomplexe auflösen können.

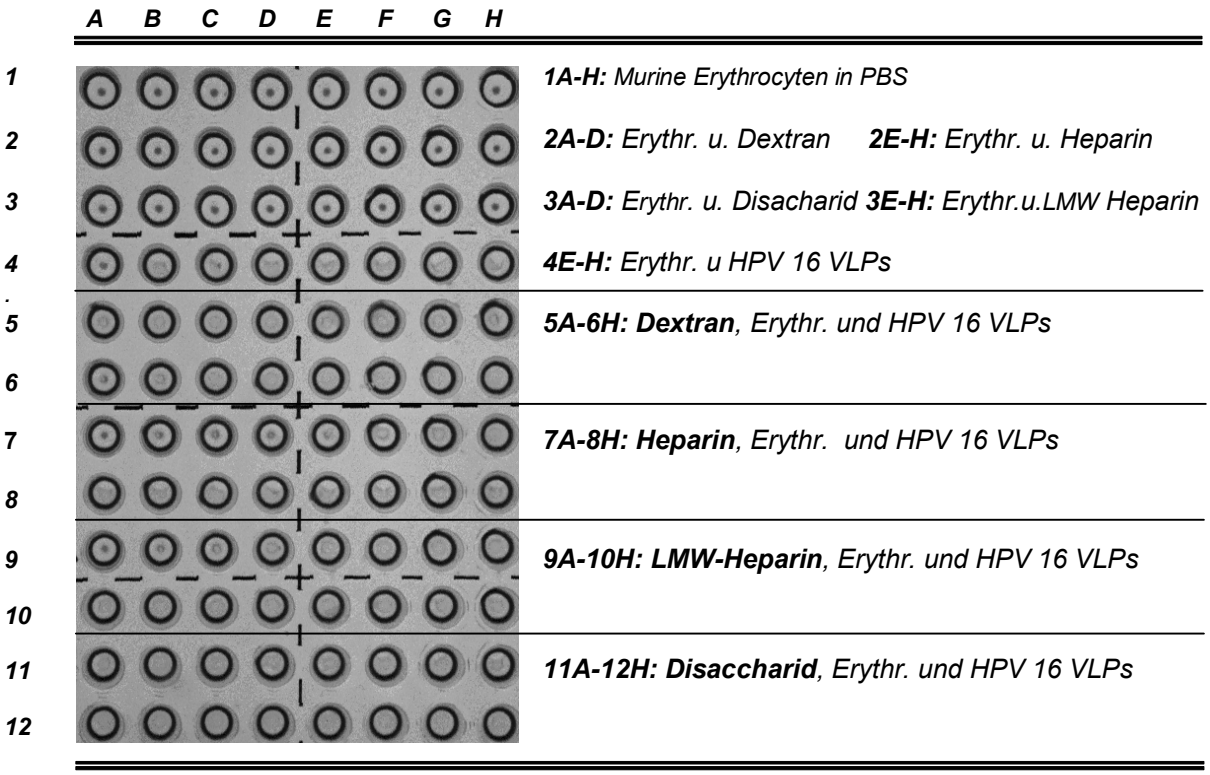


Abb. 3.31: Heparin und Low Molecular Weight Heparin, *nicht aber Dextran und das Disaccharid UA2SGlcNS6S (siehe Text) sind in der Lage, die durch HPV 16 VLPs vermittelte Hämagglutination zu verhindern.*
In die Vertiefungen wurden 4x10^6 murine Erythrocyten mit HPV 16 L1 VLPs (7 µg/ml) oder PBS gegeben. Die Heparinderivate oder Dextran wurden aus den vorbereiteten, seriellen Verdünnungen in die Vertiefungen pipettiert (50 µl). Die jeweils höchsten Konzentrationen in diesem Test sind in Vertiefung:

- *5 A Dextran 1mg/ml (100 µM);*
- *7 A Heparin 0,01 mg/ml (0,75 µM);*
- *9 A LMW Heparin 0,1 mg/ml (33 µM);*
- *11 A UA2SGlcNS6S-Disacharid 2 mg/ml (3000 µM).*

Die Erythrocyten werden mit den HPV 16 VLPs in Anwesenheit von Heparin in einer 96-well Rundbodenplatte gemischt und 3 Stunden bei 4-8°C inkubiert. In dieser Zeit sind in den Vertiefungen, in denen nur HPV 16 VLPs und Erythrocyten vorlagen, die Erythrocyten agglutiniert. In den Vertiefungen, in die Heparin gegeben wurde, konnte Heparin die

Agglutination ab einer Konzentration von 0,75 µM verhindern. Bei Low Molecular Weight Heparin, dessen durchschnittliches Molekül aus 5-6 Disacchariden besteht, wurde die Agglutination ebenfalls verhindert, wenn es mit einer Konzentration von mindestens 33 µM eingesetzt wurde. Dextran mit einem Molekulargewicht von 10.000 Da kann die Hämagglutination auch bei hoher Konzentration nicht verhindern. Heparin ist reich an Sulfatgruppen. Um zu testen, ob die durch die Sulfatgruppen eingebrachte negative Ladung ausreicht, um die Bindung an Erythrocyten zu inhibieren, wurde ein Disaccharid getestet, welches drei Sulfatgruppen trägt. Das darin enthaltene, am Stickstoff und am Sauerstoff sulfonierte Glucosamin (GlcNS6S) wird z.B an den Heparinbindungsstellen der Virionen des FMDV 0_1BFS Virus oder auch vom basischen Fibroblastenwachstumfaktor (bFGF) gebunden (Faham, Hileman et al. 1996; Jackson, Ellard et al. 1996). Bei der Wechselwirkung mit FMDV geht eine der Sulfatgruppen des Glucosamins eine ionische Bindung mit einem Arginin ein (Fry, Lea et al. 1999). Im Hämagglutinationstest zeigt sich aber, dass die Zugabe des Disaccharids nicht ausreicht, um die Bindung von HPV 16 VLPs an Erythrocyten zu verhindern.

Um zu testen, ob bereits gebildete HPV 16 VLP-Erythrocyten-Komplexe durch Heparin gelöst werden können, wurden Heparin, Low Molecular Weight Heparin oder das Disaccharid dem Hämagglutinationshemmtest nach erfolgter Hämagglutination zugegeben.

Die Erythrocyten wuden 3 Stunden oder über Nacht mit HPV 16 VLPs bei 4-8°C inkubiert. Zu den gebildeten Komplexen wurden Heparin, LMW Heparin oder Disaccharide zugegeben. Die Versuche ergeben, dass die gebildeten Komplexe durch die Gabe von Heparin oder Low Molecular Weight Heparin lösbar sind. Das von Heparin abgeleitete Disaccharid, dessen Zuckerfolge von FMDV und bFGF gebunden werden kann, ist auch in der höchsten Konzentration nicht in der Lage, mit den HPV 16 L1 VLPs um die Bindung an Erythrocyten zu kompetieren.

Bei der Heparinlösung ist eine Hämagglutinationshemmung ab 3,42 µg/ml (0,26 µM) zu beobachten. Um mit LMW Heparin einen Hemmung zu erzielen, werden höhere Konzentrationen benötigt. Eine Hemmung ist in Abb. 3.32 in E8 mit 39 µg/ml (13 µM) zu erkennen. Eine Heparin-resistente Komplexbildung, die nach mehrstündiger Inkubation der Viren mit Zellen stattfinden kann und darauf zurückzuführen ist, dass gebundenes Virus vom niedrigaffinen Heparansulfat auf ein hochaffines Rezeptormolekül übergeht, war für Erythrocyten unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht zu beobachten.

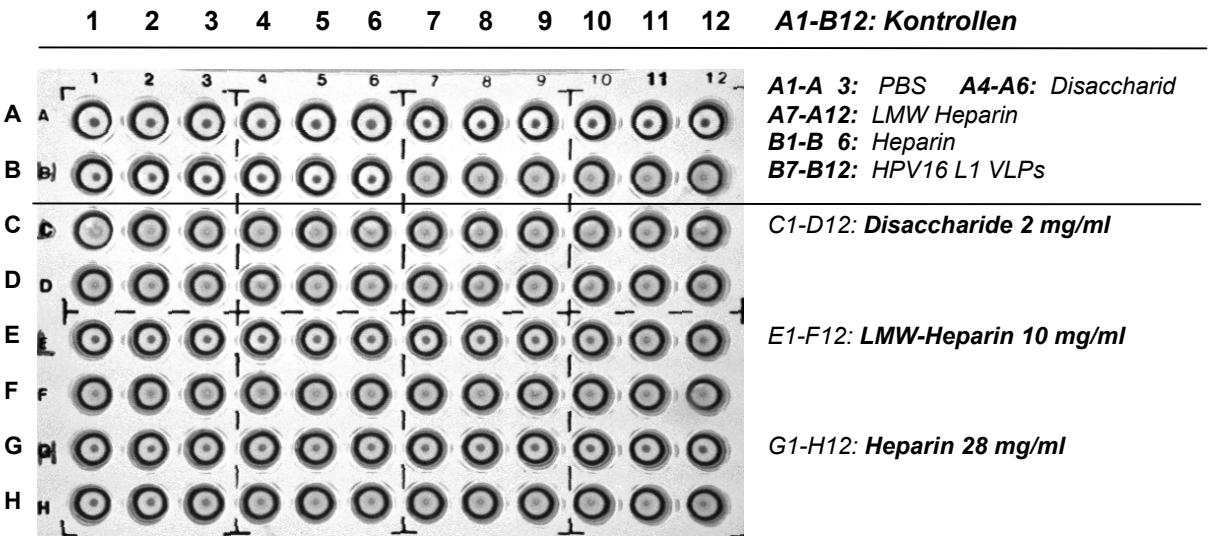
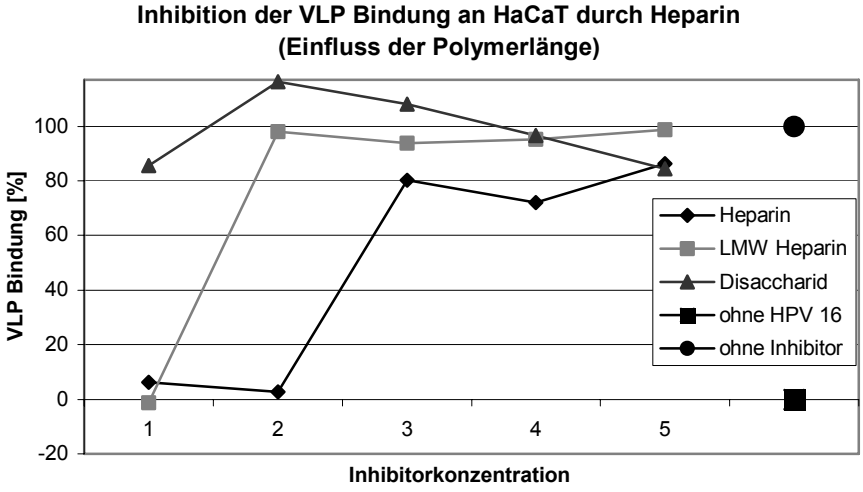


Abb. 3.32: Heparin und LMW-Heparin lösen bestehende HPV 16 VLP–Erythrocyten Agglutinate.
Nach Ü/N-Inkubation bei 4-8°C, wurde der Einfluß einiger Heparinderivate auf bestehende HPV 16 VLP-Erythrocyten Komplexe untersucht.
C1-D12 enthält die seriellen Verdünnungen des Disaccharids UA2SGlcNS6S.
Die Serie beginnt im C1 mit 2 mg/ml und endet in D12 mit $2{,}4x10^{-7}$ mg/ml.
E1-F12 enthalten LMW-Heparin.
Die Vedünnungsserie beginnt in E1 mit 10 mg/ml. Eine Agglutinationshemmung ist von E1 bis E8 (39 µg/ml) zu beobachten.
G1-H12 wurde Heparin zugesetzt.
Die Hämagglutinationshemmung ist von G1 bis H2 (3,42 µg/ml) zu beobachten.
Kontrollreihen: A1-A3: $6x10^6$ Erythrocyten wurden in PBS in die indizierten Vertiefungen pipettiert. Es ist nach der Ü/N-Inkubation keine Agglutination festzustellen.
Die Vertiefungen A4-A12 enthalten die Substanzkontrollen: Für das UA2SGlcNS6S-Disacharid in A4-A6, LMW Heparin in A7-A12 und Heparin in B1-B6. B7-B12 enthält die Agglutinationskontrollen. Dort wurden den vorliegenden Erythrocyten HPV 16 L1 (10 µg/ml) in Form von VLPs zu Beginn des Versuchs zugegeben. Ebenso wurden auch die Vertiefungen C1-H12 behandelt. Die vorher angesetzten Vedünnungen der Heparinderivate wurden sehr langsam in die Vertiefungen gegeben, damit bestehende Agglutinate nicht durch Scherkräfte zerstört oder verändert werden.

3.4.3 Inhibition der HPV 16 VLP Bindung an humane Keratinocyten und Lymphocyten durch Polysaccharide

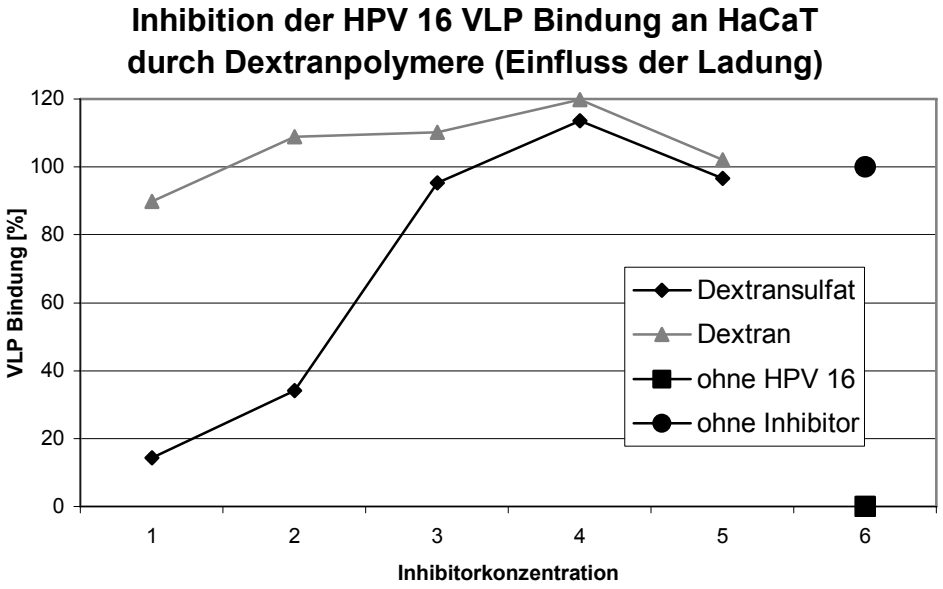
Mit den Ergebnissen des Hämagglutinationshemmtests, dass die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an murine Erythrocyten durch Heparin kompetierbar ist, sollten nun humane Zellinien untersucht werden, für die eine Bindung von PV L1 VLPs bereits beobachtet werden konnte. Für die Untersuchung wurden HaCaT-Zellen mit EDTA-haltigem Puffer geerntet, nach dem Waschen mit den HPV 16 VLPs zusammen gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert, um die Aufnahme der VLPs in die Zellen zu verhindern. Anschließend wurden zu den Zellen entweder Heparin, LMW Heparin, ein Disaccharid, Dextran oder Dextransulfat gegeben und die Zellen nach erfolgter Inkubation am Durchflusscytometer analysiert. Man kann beobachten, dass Heparin die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT-Zellen, eine prämaligne, immortale Keratinocytenlinie kompetiert. Ebenso erkennt man, dass LMW Heparin dieselben kompetitiven Eigenschaften zeigt wie Heparin die dafür notwendige Konzentration bei LMW Heparin aber um den Faktor 75 höher liegt.



Inhibitor [µg/µl]	1	2	3	4	5
Heparin	0,28	$2{,}8\times10^{-3}$	$2{,}8\times10^{-5}$	$2{,}8\times10^{-8}$	$2{,}8\times10^{-11}$
LMW Heparin	0,21	$2{,}1\times10^{-3}$	$2{,}1\times10^{-5}$	$2{,}1\times10^{-8}$	$2{,}1\times10^{-11}$
Disaccharid	2,0	$2{,}0\times10^{-2}$	$2{,}0\times10^{-4}$	$2{,}0\times10^{-7}$	$2{,}0\times10^{-10}$

Abb. 3.33: Heparin und LMW Heparin inhibieren die VLP Bindung an HaCaT-Zellen. *Die eingesetzten Inhibitor Konzentrationen sind im Diagramm mit einer Ziffer indiziert und für jede Substanz in der Tabelle aufgeführt. Der Wert für die 100 % Bindung ergab sich aus dem Mittelwert der Proben, in denen Zellen nur mit HPV 16 inkubiert wurden. 0% Bindung entsprach Zellen ohne HPV 16 VLPs aber in Anwesenheit der Testsubstanzen und Antikörper.*
Die Werte dieser Abbildung und die Werte der nachfolgenden Abbildung stammen aus derselben Messung; sie wurden zur besseren Übersicht in zwei Diagrammen dargestellt. Pro Ansatz wurden $3x10^5$ Zellen und 1,4 µg L1 Protein (VLPs) eingesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die am Durchflußcytometer gemessenen „Channel-Mean"-Werte wurden zur Auswertung herangezogen.

Die aus diesem Versuch ermittelten IC_{50} Werte liegen für Heparin bei 1,4 µg/ml; für LMW Heparin ergibt sich ein IC_{50} Wert von 106 µg/ml. Der Vergleich der in der Abbildung 3.33 eingezeichneten Kurven (siehe auch Abb. 3.34 Dextransulfat) zeigt, dass die Inhibition einem sigmoidalen Verlauf folgt und dass die jeweilige Steigung der Kurve substanzabhängig ist. Das eingesetzte Disaccharid ist aus der Struktur des alpha-Antithrombin-bindenden Pentasaccharids abgeleitet (Yamada, Yoshida et al. 1993). Darin ist es mit seinen Sulfatgruppen essentiell für die Bindung des Proteins und für die antikoagulierenden Eigenschaften (Lindahl 1999). Das Disaccharid ist bei den im Reaktionsgemisch herrschenden pH Werten von 7,2-7,4 negativ geladen. Bei den eingesetzen Konzentrationen von bis zu 2,0 µg/µl ist es nicht in der Lage, die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT Zellen zu lösen.



Inhibitor [µg/µl]	1	2	3	4	5
Dextran	2,0	$2{,}0\times10^{-2}$	$2{,}0\times10^{-4}$	$2{,}0\times10^{-7}$	$2{,}0\times10^{-10}$
Dextransulfat	0,24	$2{,}4\times10^{-3}$	$2{,}4\times10^{-5}$	$2{,}4\times10^{-8}$	$2{,}4\times10^{-11}$

Abb. 3.34: Dextransulfat inhibiert die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT-Zellen. *Die eingesetzten Konzentrationen sind im Diagramm mit einer Ziffer indiziert und für Dextran und Dextransulfat in der Tabelle aufgeführt.. In jedem Ansatz wurden $3x10^5$ Zellen mit 1,4 µg L1 Protein (VLPs) eingesetzt. Auch in diesem Experiment wurden die Zellen mit den VLPs vorinkubiert und anschließend mit den vorbereiteten Inhibitorlösungen versetzt. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen mit FITC-markiertem Erstantikörper versetzt und am FACS auf HPV 16 Bindung hin analysiert.*

Mit Dextransulfat und Dextran wurden weitere Polymere untersucht, die bestimmte Eigenschaften aufweisen (Baba, Snoeck et al. 1988; Christensen, Reed et al. 2001). Dextran ist ein wasserlösliches Polysaccharid, das aus Saccharose aufgebaut wird. Das Sulfat des Dextrans wirkt als Heparinoid und wird als solches therapeutisch eingesetzt. Dextran ist in den getesteten Konzentrationen nicht in der Lage, die Bindung der VLPs an HaCaT-Zellen zu beeinflussen. Hingegen konnte das geladene Dextransulfat die Bindung der VLPs sehr wirkungsvoll inhibieren. Die Werte der vollständigen Inhibition und die errechneten IC_{50} Werte sind bei Dextransulfat mit denen des LMW-Heparins vergleichbar obwohl Dextransulfat eine geringere Ladungsdichte aufweist. Hinzu kommt aber das höhere Molekulargewicht des verwendeten Dextransulfats, so dass diese Eigenschaften möglicherweise synergetisch bei der beobachteten Inhibition zusammenwirken. Die durchschnittlichen Molekulargewichte der verwendeten Heparinpräparationen sowie die IC_{50} Werte sind für die geladenen Polysaccharide in einer Tabelle zusammengefasst.

	Ø Molekulargewicht	IC $_{50}$	Vollständige Inhibition	
			Konzentration	Molarität
Heparin	13 000 Da	1,41 [µg/ml]	$2{,}8 \times 10^{-3}$ [µg/µl]	0,21 µM
LMW Heparin	3 000 Da	106 [µg/ml]	0,21 [µg/µl]	70 µM
Dextransulfat	10 000 Da	120 [µg/ml]	0,24 [µg/µl]	24 µM

Tabelle 7: Ermittelte Inhibitorkonzentrationen aus den Versuchen mit HaCaT Zellen. *IC 50 gibt den Wert der halbmaximalen Inhibition an. Zur Ermittlung wurde die HPV 16 VLP Bindung ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt und die gemessene Autofluoreszenz behandelter Zellen gleich 0%. Die Spalte Inhibition gibt diejenige Konzentration an, bei der im Assay kein gebundenes HPV 16 mehr an den Zellen detektiert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Literatur sind zusätzlich zu Konzentration und Molekulargewicht auch die Molarität der Lösungen angegeben. Die Werte beziehen sich auf $3x10^5$ HaCaT-Zellen und 1,4 µg HPV 16 L1 (als VLP).*

Die kompetitive Wirkung von Heparin auf die VLP Bindung an Zellen wurde bei weiteren Zellinien getestet. K562, eine humane erythroleukämische Zellinie, und THP-1, eine humane Macrophagenzellinie, wurden untersucht (Lozzio and Lozzio 1977; Tsuchiya, Yamabe et al. 1980). Beide Zellinien exprimieren geringe Mengen Heparansulfat auf ihrer Oberfläche und sind dennoch in der Lage HPV 16 L1 VLPs zu binden. Auch bei diesen Zelltypen lässt sich der Anteil gebundener L1 VLPs durch die Anwesenheit von Heparin reduzieren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellinien, auf denen HS nachweisbar war, waren in der Lage, VLPs verschiedener Papillomvirus Typen zu binden. Zellen mit einem hohen Heparansulfatgehalt, verfügten über die Möglichkeit, größere Mengen VLPs zu binden als jene, die wenig oder kein HS auf ihrer Oberfläche trugen.

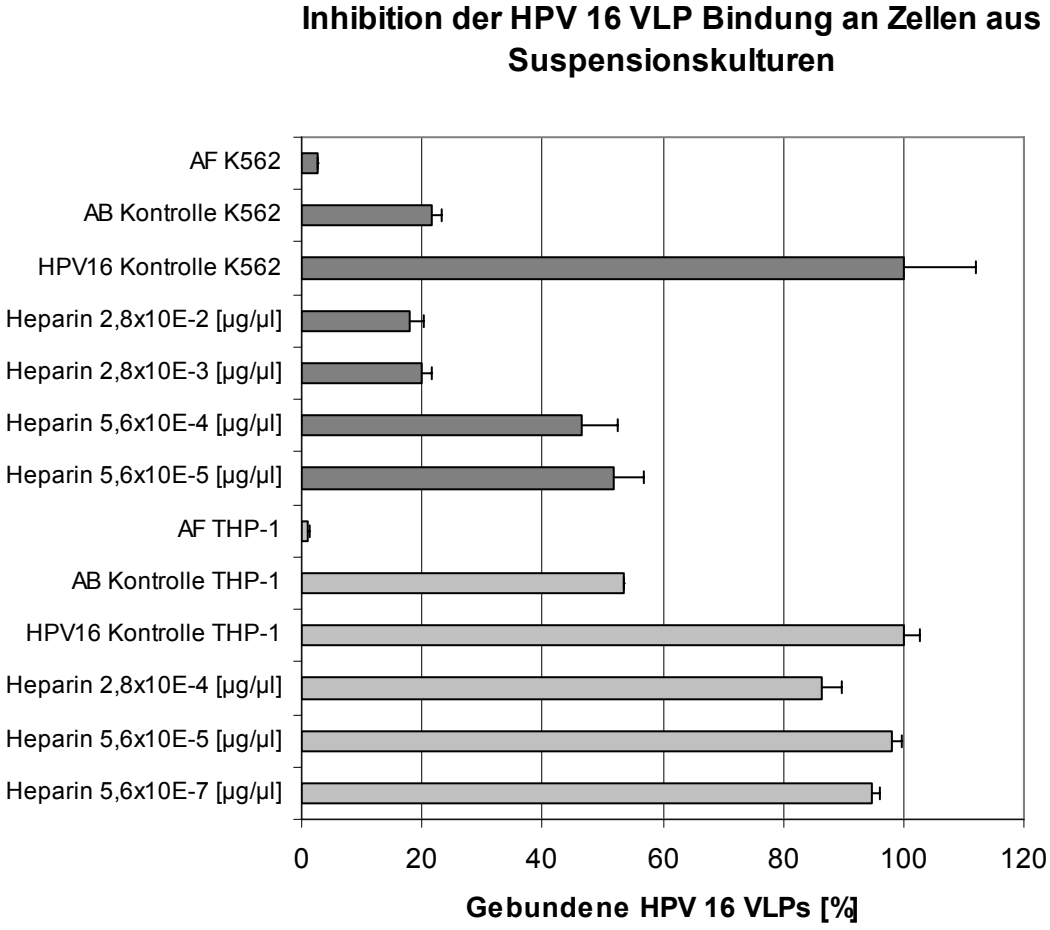


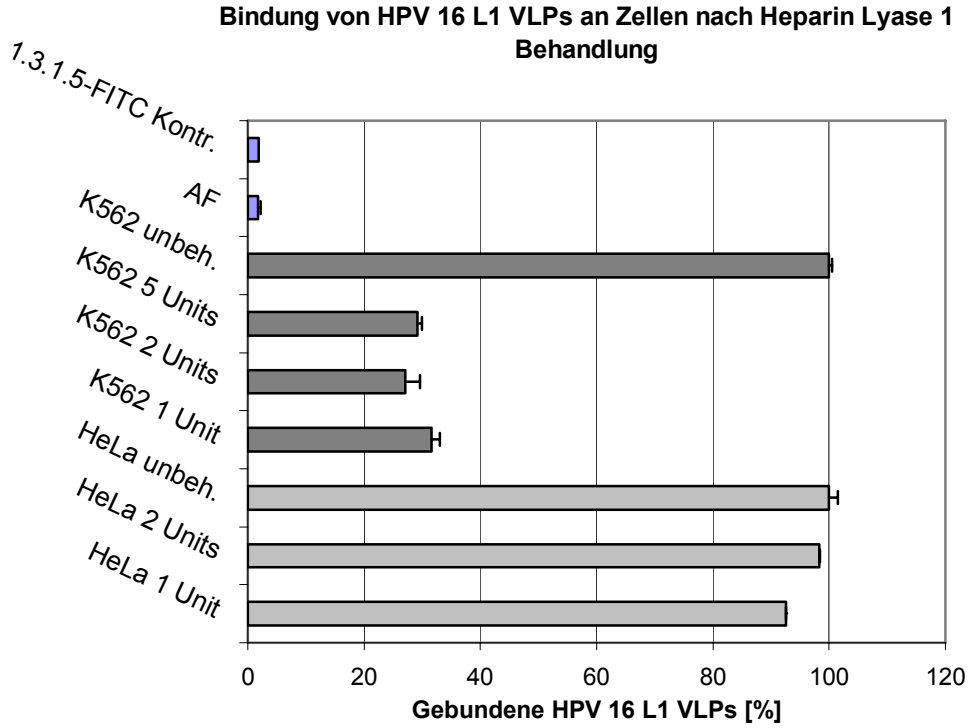
Abb. 3.35: Heparin kompetiert die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an K562- und THP-1-Zellen.
Die Zellen ($6x10^5$/Ansatz) wurden mit 4,48 µg HPV 16 L1 VLPs inkubiert und die Bindung durch Zugabe von Heparin kompetiert. Zur Ermittlung wurde die HPV 16 VLP Bindung ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt und die gemessene Autofluoreszenz behandelter Zellen gleich 0%. Gebundene HPV 16 VLPs wurden durch Bindung des FITC-gekoppelten Fab-Fragments (mAB 1.3.5.15) nachgewiesen.

3.4.4 Heparin-Lyase 1 Behandlung von K562-Zellen führt zu einer Reduktion der HPV 16 VLP Bindung

Das Enzym Heparin-Lyase 1 (Heparinase I) hydrolysiert die glycosidische Bindung zwischen 2-O-sulfatierter Iduronsäure und N-sulfatierten Glucosaminen (Toida, Hileman et al. 1996; Liu, Shriver et al. 1999). Das Enzym schneidet bevorzugt in Regionen mit hohem Sulfatgehalt und hohem Iduronsäuregehalt. In den vorangegangenen Bindungstests zeigte sich, dass Zellen, auf denen HS nachweisbar ist, auch in der Lage sind, HPV 16 L1 VLPs zu binden. Um zu testen, ob der enzymatische Abbau von Heparansulfaten eine Verringerung in der VLP-Bindung bewirkt, wurden Zellen mit Heparinase 1 behandelt und die Bindung von HPV 16 L1 VLPs getestet.

Während in diesem Versuch 1 Unit des Enzyms Heparin-Lyase 1 bei HeLa-Zellen nicht ausreicht, um signifikant die Bindung von HPV 16 VLPs an diese Zellen zu senken, reicht diese Enzymkonzentration bei K562-Zellen aus, um den Anteil gebundener HPV 16 L1 VLPs deutlich zu reduzieren.

A



B

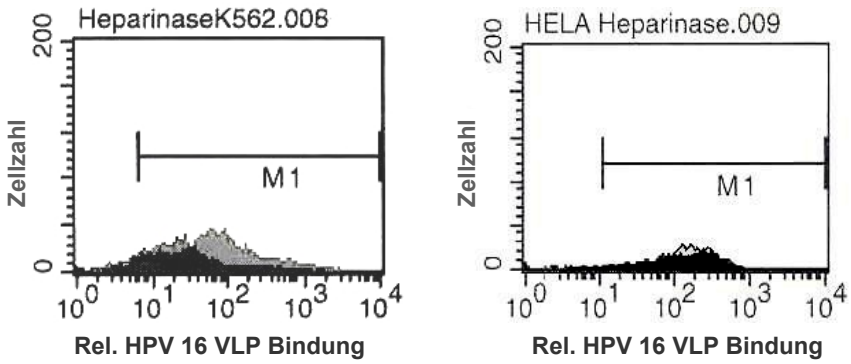


Abb. 3.36: Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Heparinase-1 behandelte Zellen. *A: Auswertung der Bindungsdaten. Mit HPV 16 L1 VLPs (4,48 µg) inkubierte K562-Zellen (5x10^4/Ansatz) zeigen nach Heparinase-1-Behandlung einen Verlust in der HPV 16 L1 VLP Bindung. Unabhängig von der Menge des eingesetzten Enzyms reduziert sich der Anteil gebundener VLPs um 69 % bis 70% auf ca. 30 % residuale Bindung nach enzymatischer Behandlung. HeLa-Zellen zeigen bei den hier verwendeten Enzymkonzentrationen keine Änderung ihrer HPV 16 L1 VLP Bindefähigkeit. Der für die Heparinaseaktivität notwendige Puffer veränderte die Autofluoreszenz der Zellen und wurde daher auch bei den Kontrollen eingesetzt.*
B: Rohdaten, Bindung von HPV 16 L1 VLPs an unbehandelte (graues Histogramm)und Heparinase behandelte (schwarzes Histogramm; 2 Units) K562- und HeLa-Zellen.

Eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration führt zu keiner weiteren Verminderung der HPV 16 Bindung. Dies ist für den enzymatischen Abbau durch Heparin-Lyasen bekannt. Eine bestimmte Menge von Oligosacchariden bleibt in der Reaktion unverdaut zurück, selbst wenn Enzymüberschuß und zusätzlich Heparin Lyase II und III eingesetzt werden (Yamada, Yoshida et al. 1993; Liu, Shriver et al. 1999). Die für die Heparin-Lyase I zugänglichen Bindungsstellen auf den K562 Zellen wurden vermutlich abgebaut. Eine residuale Bindung von 30 % bleibt bei K562 erhalten.

3.5 Einfluss des Heparansulfat Core Proteins auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass das Enzym Heparin-Lyase 1 die Bindung von HPV 16 VLPs an K562-Zellen beeinflussen kann, sollte untersucht werden, ob eine Veränderung in der Heparansulfatexpression weitere Hinweise auf die Beteiligung zellulären Heparansulfats bei der Bindung von HPV 16 L1 VLPs gibt. K562-Zellen exprimieren geringe Mengen Syndecan 3 und Betaglycan. Glypican Core Proteine wurden bei ihnen nicht nachgewiesen (Saphire, Bobardt et al. 2001). Betaglycan cDNA und Primer waren nicht verfügbar, so dass sich die ersten Untersuchungen auf die Syndecan-3 Core Proteine konzentrieren sollten.
Die in der Zellmambran verankerten HSPG-Core-Proteine gehören mehrheitlich den Syndecanen oder Glypicanen an. Jedoch kann auf Keratinocyten auch eine Spleißvariante des Hyaluronsäurerezeptors (CD44), die das Exon V3 enthält, vorkommen. Exon V3 codiert das Glycosaminoglycan-Additionsmotif SGXG welches eine Modifizierung mit HS erhält (Bennett, Jackson et al. 1995; Jackson, Bell et al. 1995). Während Core-Proteine wie Agrin, Perlecan oder Collagen XVIII nicht in der Zellmembran verankert sind, sondern in der extrazellulären Matrix vorliegen und dort ihre Bindungspartner wie beispielsweise Integrine kontaktieren, werden Syndecane und Glypicane über Transmembrandomänen bzw. GPI-Moleküle in der Zellmembran verankert (Iozzo 2001). Die Syndecane, die hier untersucht werden gehören einer Transmembranproteinfamilie an, die aus den vier Mitgliedern Syndecan-1 bis Syndecan-4 besteht. Jedes Mitglied besitzt ein spezifisches, aber teilweise mit anderen überlappendes Expressionsmuster (Zimmermann and David 1999). Zum Beispiel findet sich Syndecan-1 vor allem bei Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs, Syndecan-2 (Fibroglycan) auf endothelialen Zellen, Syndecan-3 (Neurosyndecan) auf neuronalen Zellen und Syndecan-4 (Amphiglycan) auf jedem dieser Zelltypen (Romaris, Coomans et al. 1999; Filla, David et al. 2004).

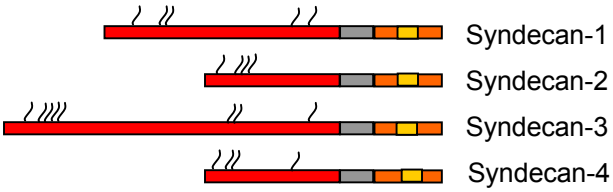
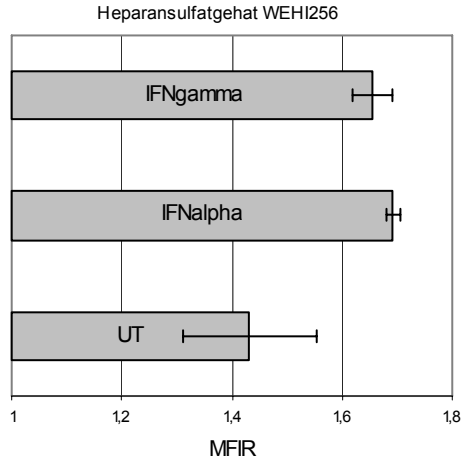


Abb. 3.37: Organisation der Syndecan Familie. *Die extrazellulären Domänen tragen die Heparansulfatketten und sind in der Lage HS-bindende Wachstumsfaktoren wie bFGF zu binden. Die konservierte cytoplasmatische Region C1 der Syndecane bindet direkt die Proteinkinase C und über Adapterproteine Tubulin oder Src-Kinasen. In den variablen Regionen unterscheiden sich die Syndecane voneinander. Abbildung verändert nach Zimmermann et al. (Zimmermann and David 1999). Legende zu Abbildung 3.37:*

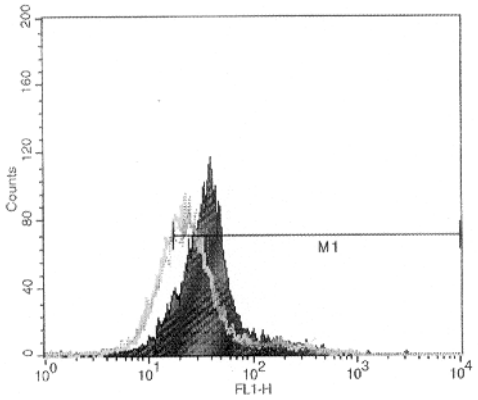
N-terminale extrazelluläre Domäne
Transmembranregion
C1 und C2 konservierte Regionen der Cytosolischen Domäne
Variable Region
Glucosaminoglycankette

Eine der Aufgaben, die Syndecane im Gewebe erfüllen, ist die Verankerung der Zellen mit der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus leiten Moleküle wie beispielsweise Syndecan-4 extrazellulärer Signale in das Zellinnere. Jedes der Syndecane ist über seine Heparansulfatanteile in der Lage, Wachstumsfaktoren wie etwa bFGF, zu binden.
Zytokine können die Syndecan Expression auf Fibroblasten aus Rattenleber und auf Ratten Hepatocyten regulieren (Sebestyen, Gallai et al. 2000). Ebenso kann die Expression von Syndecan-2 neben weiteren Molekülen, wie CD64 und MHCII, auf humanen Macrophagen durch die Behandlung mit LPS, IL-1α oder TNFα hervorgerufen werden (Clasper, Vekemans et al. 1999). Durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Zawatzky war bekannt, dass auf Zellen der murinen Macrophagenvorläufer WEHI265.1 Syndecan-3 Core Proteine exprimiert werden (Nickolaus 1996). Eine Behandlung der Zellen mit murinem Interferon-α induzierte in diesen Zellen die Synthese von Syndecan-3 mRNA (Nickolaus 1996). Physiologisch ist dadurch gewährleistet, dass die Zellen unspezifisch Zytokine aus dem umgebenden Medium binden und so deren am entsprechenden Zytokinrezeptor herrschende Konzentration unmittelbar erhöht wird wie es beispielsweise für bFGF beobachte wurde (Elenius, Maatta et al. 1992; Steinfeld, Van Den Berghe et al. 1996). Dadurch wird die Zytokinwirkung auf die Zielzelle erhöht. Nach Stimulation der WEHI256.1 Zellen mit IFNα, aber auch mit IFNγ, lässt sich eine Erhöhung des Heparansulfats auf der Zelloberfläche durch den HS- und Heparin-spezifischen monoklonalen Antikörper mAB570 am Durchflusscytometer nachweisen. Neben der erhöhten Heparansulfatexpression auf der Zelloberfläche beobachtet man, dass die Kapazität stimulierter Zellen, HPV 16 L1 VLPs zu binden, gesteigert wird.

A



B



C

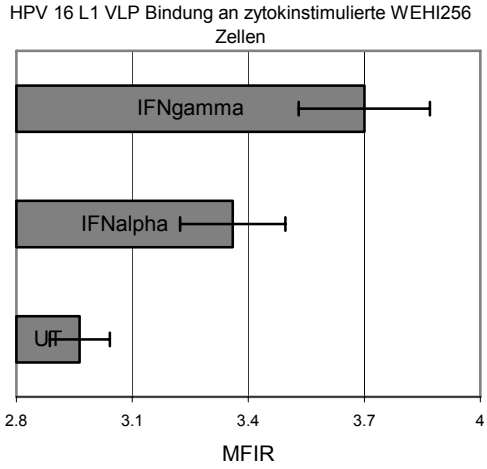
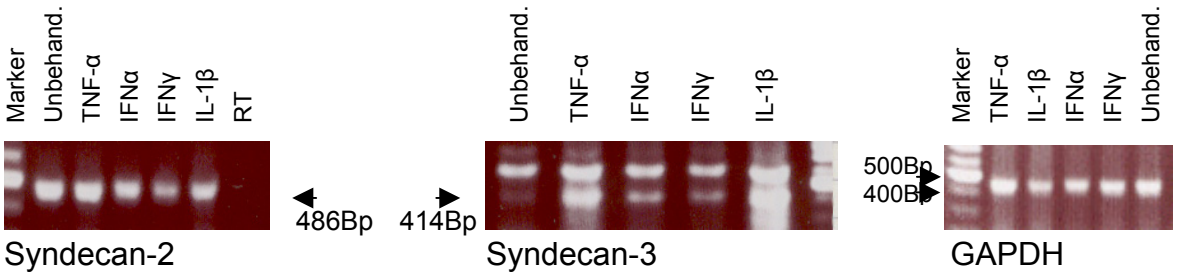


Abb. 3.38: Heparansulfatgehalt und HPV 16 L1 VLP-Bindung an murine WEHI256-Zellen nach Zytokinstimulation. *A: Veränderung des HS-Gehalts nach IFNγ und IFNα Stimulation (UT: Untreated). B: Histogramm unbehandelter (Linie) und behandelter Zellen (gefülltes Histogramm) nach Bindung von HPV 16 L1 VLPs (11,2 µg L1 Protein) C: Balkendiagramm der HPV 16 L1 VLP Bindung an IFNγ und IFNα behandelte WEHI265 Zellen. Für den HS-Nachweis wurden die Zellen mit dem Heparin– und HS-bindenden Antikörper mAB570 inkubiert und gebundener Antikörper über einen FITC-markierten Zweitantikörper am Durchflußcytometer nachgewiesen. Die auf den Zellen vorhandenen Fc-Rezeptoren wurden durch den Zusatz von Kaninchenserum blockiert. Da bei jedem Ansatz die Autofluoreszenz der zytokinbehandelten Zellen und die Zweitantikörperkontrolle gemessen wurde, wurden aus den Messwerten die Mean Fluorescence Intensity Ratios gebildet und in der Abbildung dargestellt (MFIR=Channel Mean Messprobe / Channel Mean Kontrollen). Gebundene HPV 16 L1 VLPs wurden durch das FITC markierte Fab Fragment des 1.3.5.15 Anikörpers nachgewiesen.*

Nachdem bei den murinen Zellen eine Veränderung in der HPV 16 VLP Bindung gemessen werden konnte, wurden auch humane Zellinien getestet. Für diese Tests wurde ein ähnliches System mit den humanen Macrophagenvorläuferlinien THP-1 und U937 genutzt. Hier kann gezeigt werden, dass THP-1 und U937-Zellen die Expression von HS auf der Zelloberfläche erhöhen, wenn sie mit den humanen Zytokinen IFNα, IFNγ, IL-1β oder TNFα behandelt werden.

A: **THP-1**



B: **U937**

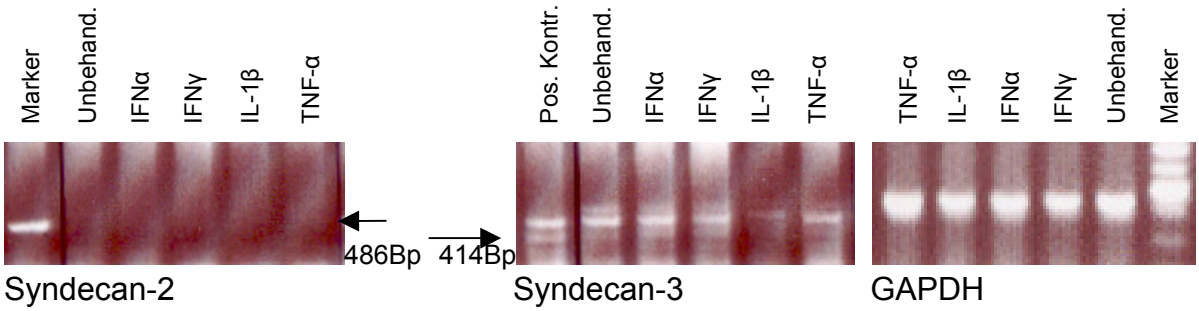


Abb. 3.39: RT-PCR zum Nachweis der Syndecan-2 und Syndecan-3 mRNA. *A: THP-1-Zellen B: U937-Zellen. Durch die verwendeten Primer wird in der PCR ein 486 Basenpaare grosses Fragment des Syndecan-2 Gens und ein 414 Basenpaare grosses Fragment des Syndecan-3 Gens amplifiziert.*

In THP-1-Zellen ist die mRNA von Syndecan-2 bereits in unbehandelten Zellen nachweisbar. Die Behandlung der Zellen erhöht die Synthese nicht. Das Signal für Neurosyndecan (Syndecan-3) mRNA, welches in unbehandelten Zellen nur als diffuse Bande zu sehen ist, verstärkt sich in TNFα und IL-1β behandelten THP-1 Zellen deutlich. Bei den IFNα- oder IFNγ-behandelten Zellen fällt die Erhöhung der Syndecan-3 mRNA geringer aus.

In U937-Zellen war keine Syndecan-2 mRNA nachweisbar. Die mRNA ließ sich nicht durch die Behandlung mit den o.g. Zytokinen induzieren. Hingegen ist Syndecan-3 mRNA in unbehandelten U937-Zellen vorhanden. Eine geringe Erhöhung in der Synthese lässt sich durch IFNα- oder IFNγ-Behandlung der Zellen erzielen. Neben der RNA-Extraktion wurden Zellen dieser Erntepools gleichzeitig einer Heparansulfat und HPV-16 Bindungsanalyse

unterzogen. In diesen Versuchen erzeugte die Stimulation mit IL-1β bei THP-1-Zellen und IFNγ bei U937-Zellen die größte Veränderung im Heparansulfatgehalt auf der Zelloberfläche. Bei THP-1 war die Erhöhung gößer als bei U937-Zellen. Dies korrelierte mit den Ergebnissen der PCR-Reaktionen. Die Banden der induzierten Syndecan-2 und Syndecan3-mRNAs waren bei THP-1-Zellen stärker als bei U937-Zellen.

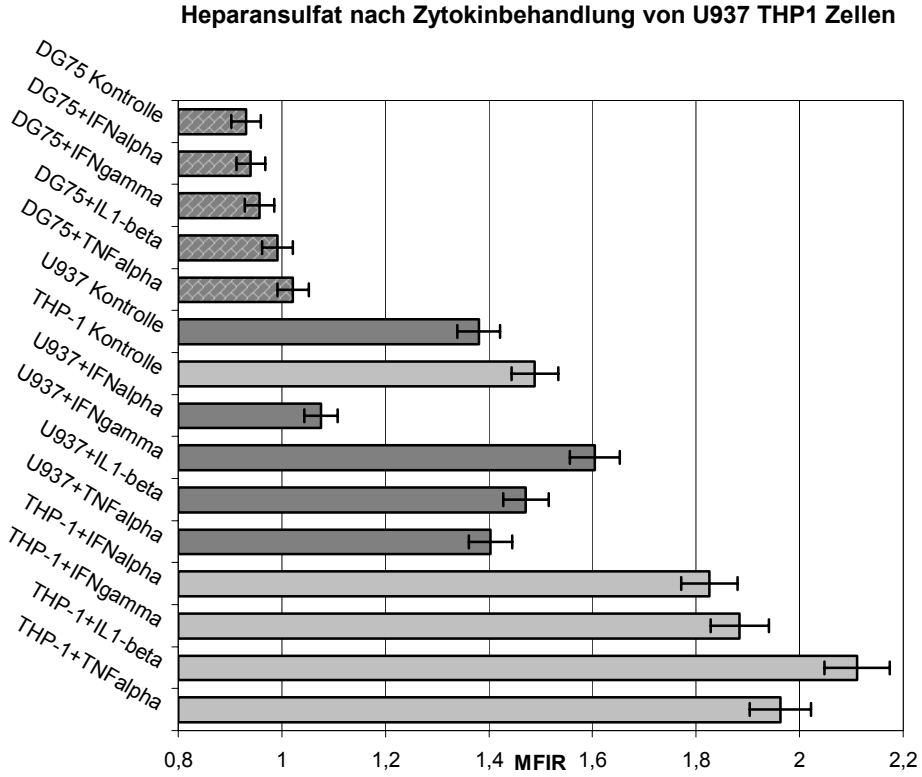


Abb. 3.40: Heparansulfat dreier Zellinien nach Zytokinstimulation. *Getestet wurden DG75-, U937- und THP-1 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Heparin– und HS-bindenden Antikörper mAB570 inkubiert und über Bindung des Fluoreszenz-markierten Fab Fragments eines Ziege-anti-Maus IgGs am Durchflusscytometer nachgewiesen. Da bei jedem Ansatz die Autofluoreszenz der zytokinbehandelten Zellen und die Zweitantikörperkontrolle gemessen wurde, werden aus den Daten die Mean Fluorescence Intensity Ratios gebildet (MFIR=Channel-Mean Messprobe/Channel-Mean Kontrollen) und in der Abbildung dargestellt.*

Es konnte beobachtet werden, dass die Stimulation mit Zytokinen wie erwartet nur zelltypspezifisch anwendbar ist, um HS auf der Zelloberfläche zu induzieren. DG75, eine PV bindungsnegative Zellinie, die aus einem Burkitt´s Lymphom isoliert wurde und kein nachweisbares HS auf ihrer OF trägt, lässt sich durch die hier verwendeten Zytokine nicht zur HS-Expression stimulieren. Bei U937-Zellen ist eine Erhöhung in der Bindung von HPV 16 L1 VLPs messbar. Die IFNγ stimulierten Ansätze zeigen bei diesen Zellen die größte Erhöhung.

Bei den untersuchten THP-1-Zellen werden nach Behandlung mit Zytokinen ebenfalls Veränderungen bei der Bindung von HPV 16 L1 VLPs messbar. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen ist die Veränderung weniger stark als bei den U937-Zellen.

Jedoch sieht man auch bei diesen Zellen eine Erhöhung in der HPV 16 L1 VLP Bindung nach Zytokinstimulation.

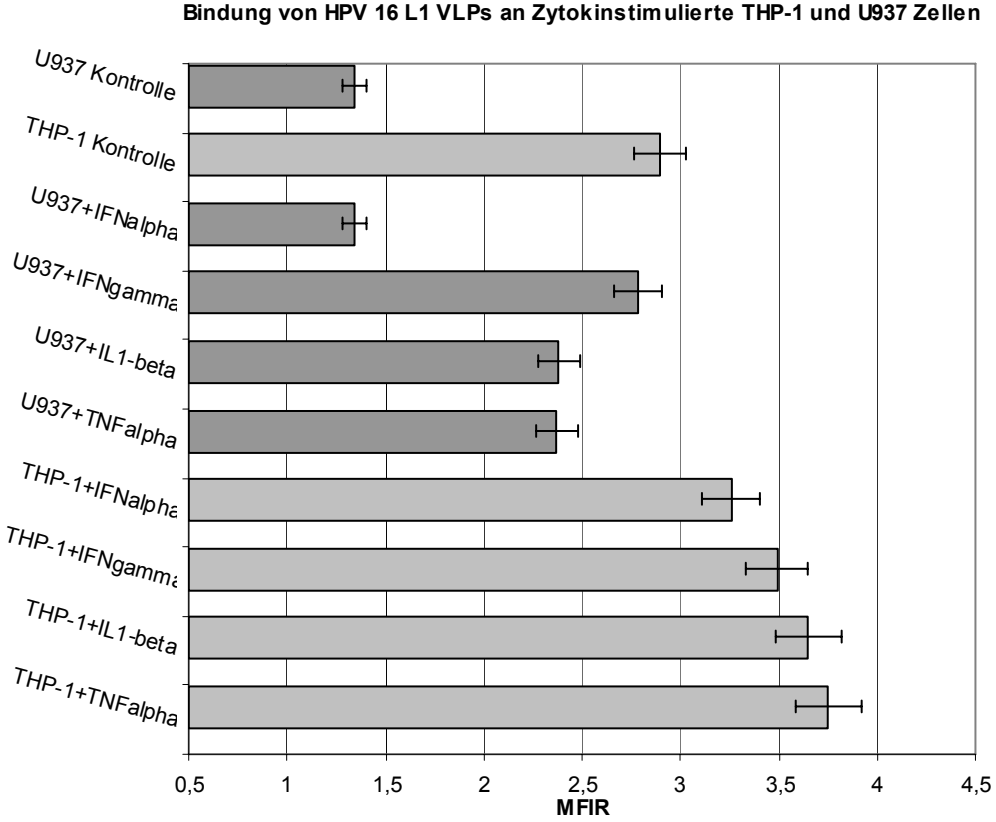


Abb. 3.41: Bindung von HPV 16 L1 VLPs an U937- und THP-1-Zellen. *Die Zellen wurden mit 11,2 µg L1 Protein in Form von VLPs inkubiert und der gebundene Anteil durch den FITC-gekoppelten Fab Teil des 1.3.5.15 Antikörpers am Durchflusscytometer nachgewiesen. Die U937 Kontrolle und die THP-1 Kontrolle stellen die Messungen unbehandelter Zellen dar. Da bei jedem Ansatz die Autofluoreszenz der zytokinbehandelten Zellen gemessen wurde, wurden aus den Daten die Mean Fluorescence Intensity Ratios gebildet (MFIR=Channel-Mean Meßprobe / Channel-Mean Autofluoreszenz) und dargestellt.*

Der HS-spezifische monoklonale Antikörper mAB570 ist nicht in der Lage die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an diese Zellinien zu blockieren (Daten nicht gezeigt). Heparin hingegen kompetiert mit den Zellen um die HPV 16 VLP Bindung, wenn es zu THP-1 Zellen gegeben wird (s. Kap 3.4.3 Abb. 3.35). Ziel war es, die Expression von HS auf der Zelloberfläche zu erhöhen, um durch die Veränderung in der HPV 16 VLP Bindung Hinweise auf die Beteiligung zellulären HS zu erhalten. Eine Bindung von HPV 16 L1 VLPs an die durch Zytokine zusätzlich induzierten Fc-Rezeptoren konnte durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Dass weitere Moleküle, die hier nicht betrachtet wurden, durch die Zytokinbehandlung induziert wurden, ist nicht auszuschließen. So ist beispielsweise eine Induktion von Syndecan-1 denkbar. Durch die Erhöhung der Syndecan-mRNA-Synthese und die gemessene Erhöhung von Heparansulfaten auf der Zelloberfläche ist zu vermuten, dass die veränderte Bindung der VLPs auf die Erhöhung der Polysaccharide zurüchgeführt werden kann. Die Versuche zeigen, dass bei murinen WEHI256-Zellen eine Erhöhung in der

Syndecan-3 Expression mit erhöhter Bindung von HPV 16 L1 VLPs an diese Zellen korreliert. Die Heparansulfate, die von murinen Core Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert werden, werden von den HPV 16 L1 VLPs als Bindungspartner akzeptiert. Bei U937-Zellen erfolgt die Bindung von HPV 16 L1 VLPs Syndecan-2 unabhängig. In THP-1-Zellen wird vor allem Syndecan-2-mRNA induziert und eine erhöhte HPV 16 L1 VLP Bindung an die behandelten Zellen ist messbar. Der Einfluss weiterer Core Proteine konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Shafti-Keramat et. al zeigen in ihrer Arbeit jedoch, dass eine Internalisierung von HPV 11 Virionen in K562-Zellen unabhängig vom Syndecan Typ stattfinden kann, da sowohl bei Syndecan-1-positiven wie auch bei Syndecan-4-positiven K562-Zellen eine erhöhte Bindung und Aufnahme gegenüber den untransfizierten K562 Parentalzellen beobachtet werden konnte (Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003).

3.6 Untersuchung der Integrin Komplexe α6β1 und α6β4 bei der Bindung und Infektion von Zellen durch Papillomviren

3.6.1 Herstellung Integrin-α6 positiver Zellen

Integrin-α6 wurde 1997 von Evander et al. als ein möglicher Rezeptor für HPV 6b publiziert (Evander, Frazer et al. 1997; McMillan, Payne et al. 1999). Um die Rolle von Integrinen bei der Bindung von Papillomviren an Zellen zu untersuchen, wurden die Integrin-α6β4-negativen Zellinien K562 und DG75 ausgewählt. Beide Zelltypen wachsen in Suspensionskultur, so dass sie ohne Trypsin oder EDTA-Behandlung geerntet werden können. K562-Zellen sind in der Lage, PV L1 VLPs zu binden. Sie gehören aber zu den Zelltypen die nicht die höchste VLP Bindung aufweisen (vergl. Abb. 3.45 HeLa-Zellen). Werden DG75-Zellen mit denselben VLP Konzentrationen behandelt, lässt sich kein PV L1 spezifisches Signal im Western Blot oder am FACS nachweisen. Erst wenn die Konzentration in den Proben stark erhöht wird, kann auch bei DG75 ein L1-Signal erzeugt werden.

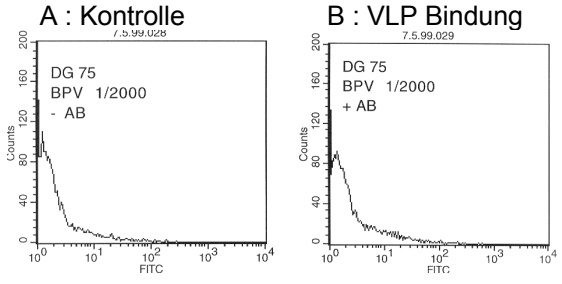


Abb. 3.42: DG75-Zellen und BPV 1 L1 VLPs. *A: BPV 1 L1 VLPs und spezifischer, monoklonaler Erstantikörper 5B6 wurden zu DG75-Zellen gegeben und die Fluoreszenz am Durchflusscytometer gemessen. B: Nach Zugabe des an Maus IgG1 bindenden-, FITC-markierten Zweitantikörpers bleibt der Peak VLP-behandelter DG75-Zellen in der ersten Dekade der relativen FITC Fluoreszenz bestehen.*

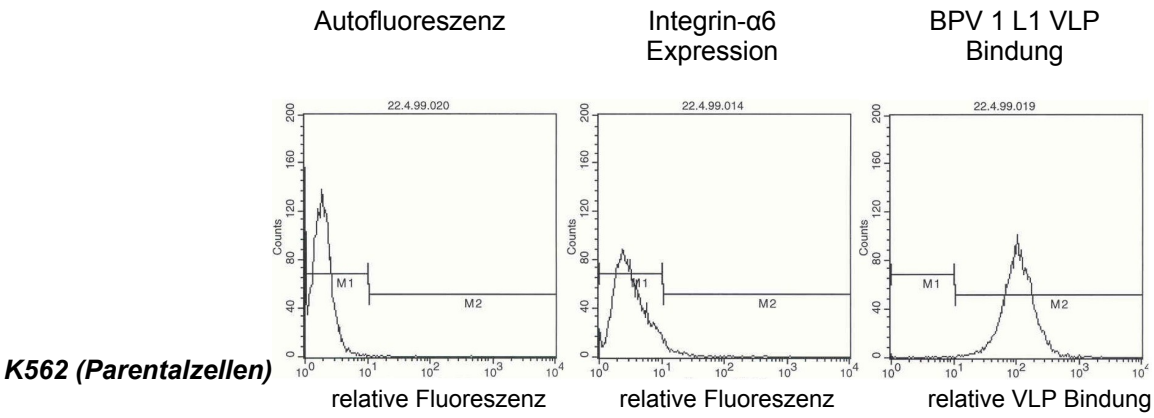
Ausgehend von diesen Parentalzellinien wurden stabil exprimierende, α6β1/β4-Integrin-positive Transfektanten hergestellt. Die K562-Zellen und das α6- bzw. β4-Integrin-Expressionsplasmid wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. A. Sonnenberg zur Verfügung gestellt (Hogervorst, Kuikman et al. 1991; Delwel, Hogervorst et al. 1993). Die DNA wurde als zirkuläres Plasmid über Elektrotransformation in die Zellen geschleust, und die Zellen über die entsprechende, auf dem Plasmiden codierte Antibiotikaresistenz selektiert. Wie man in Abb 3.43 sieht, lag der Anteil Integrinα6β1-positiver Zellen in der Kultur nach der Selektion nur bei 20%. Deshalb wurden Integrinα6-positive Zellen durch eine oder mehrere Zellsortierungen in der Kultur angereichert. Damit ließ sich der Anteil Integrin-α6β1 und -α6β4 positiver Zellen an der Kultur bei K562-Zellen auf über 80% steigern (vergl. K562-α6β1 in Abb. 3.43 u. 3.45). Bei den DG75-Zellen dauerte es etwa 14 Tage bis sich die Kultur von der Zellsortierung erholt hatte. Ein großer Anteil der Zellen zeigte nach dieser Zeit keine Integin Expression mehr, so dass der Anteil Integrin-α6β1 positiver Zellen bei den DG75 Kulturen etwa 20% betrug.

	Autofluoreszenz	Integrin-α6 Expression		BPV 1 L1 VLP Bindung
		Zellen in Region M2 [%]	Zellen in Region M1 [%]	
K562	0,10	3,47		99,80
K562α6β1	3,76	26,66		98,46
K562α6β4	1,32	82,98		99,72
DG75	1,92		2,60	1,48
DG75α6β1	3,14		19,77	3,90

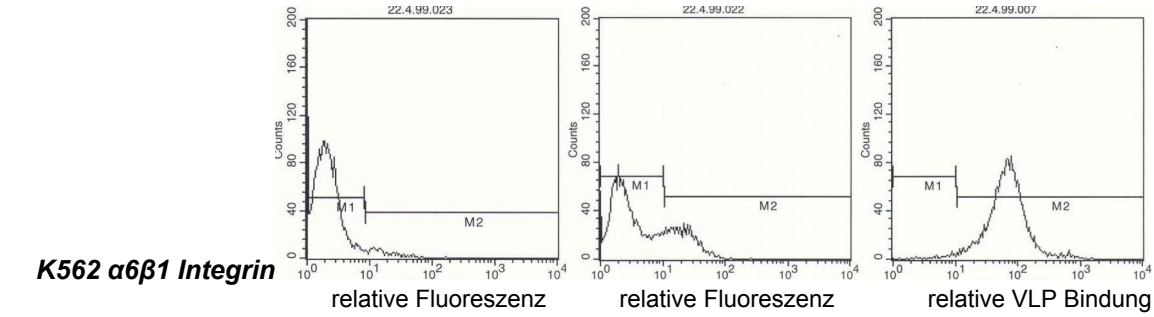
Tabelle 8: Integrin Expression und BPV 1 L1 VLP Bindung. *Die Integrin-α6 Expression und die Bindungseigenschaften der unterschiedlichen Zelltypen aus Abb. 3.43 sind hier zusammengestellt. Man erkennt bei den DG75-α6β1 Zellen, dass sie trotz Integrin-α6 Expression keine höhere Affinität für BPV 1 L1 VLPs zeigen.*

- *(nächste Seite) –*

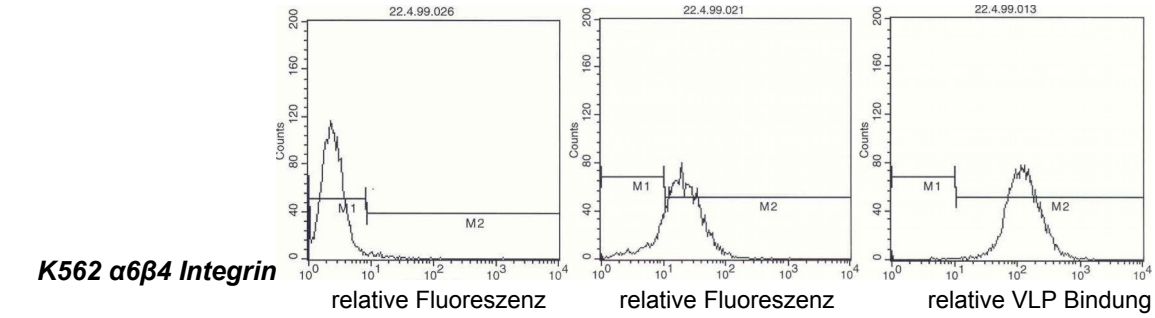
Abb. 3.43: Autofluoreszenz, Integrin-α6 Expression und VLP Bindung Integrin-α6 transfizierter K562- und DG75-Zellen. *Die Integrin-α6 Expression liegt nach Selektion der Zellen in Antibiotika-haltigem Medium bei etwa 20 % in der DG75 Kultur und bei ca. 27% in der K562 Kultur. Bei den K562 α6β1-Integrin Transfektanten ist eine Bindung von BPV 1 L1 VLPs meßbar, während DG75-α6β1-Integrin Transfektanten keine signifikante Änderung ihrer Fluoreszenz nach Behandlung mit BPV 1 L1 VLPs zeigen. Für die Messungen der Integrin Expression wurden 5x10^5 Zellen mit dem Integrin-α6 spezifischen, monoklonalem Antikörper GoH3 inkubiert und gebundener Anitkörper durch einen FITC-markierten Zweitantikörper nachgewiesen (GamFITC). Gebundene BPV 1 L1 VLPs wurden durch den konformationsspezifischen, monoklonalen Antikörper 5B6 als Erstantikörper und einen FITC-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen.*



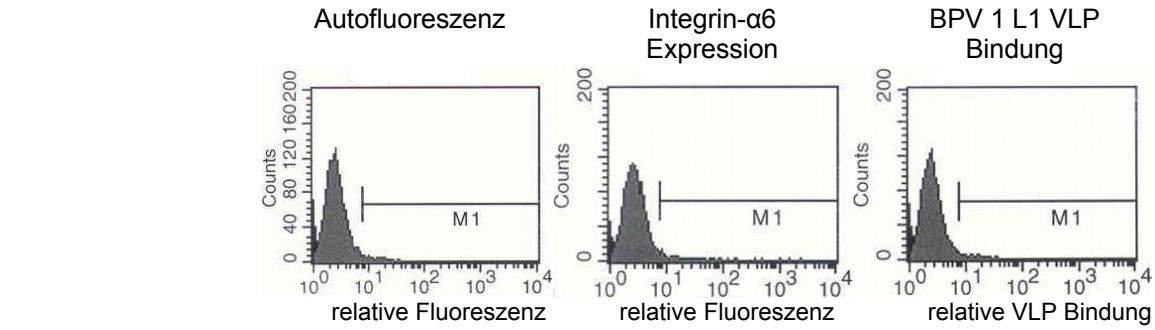
K562 (Parentalzellen)



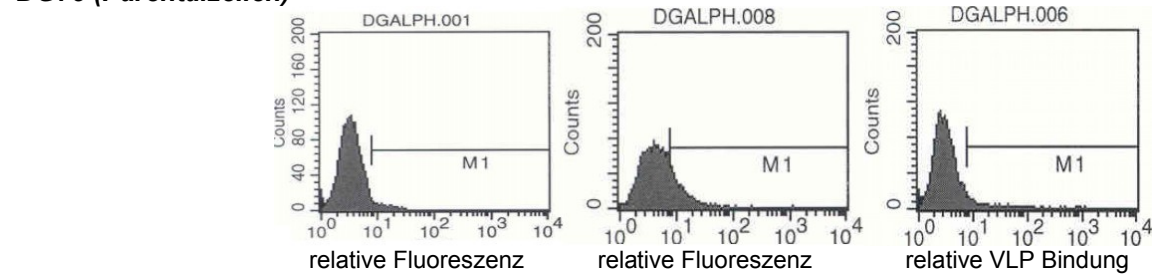
K562 α6β1 Integrin



K562 α6β4 Integrin



DG75 (Parentalzellen)



DG75 α6β1 Integrin

3.6.2 Integrin α6β1- und α6β4-unabhängige Bindung von PV-VLPs an K562-Zellen

Bei den DG75-α6β1-Zellen (Abb. 3.43) kann die Bindung von BPV-1 L1 VLPs nicht beobachtet werden, obwohl bei 20% der Zellen Integrin-α6 auf der Oberfläche nachweisbar war. Die Untersuchung der Integrin-α6β1-positiven K562-Zellen zeigte, dass diese in der Lage waren BPV1 L1 VLPs, BPV 1 L1ΔC VLPs und BPV 1 Virionen zu binden. Jedoch ist auch zu sehen, dass ihre Integrin-negativen Parentalzellen genauso in der Lage sind, BPV 1 L1 VLPs zu binden (s. Abb 3.44).

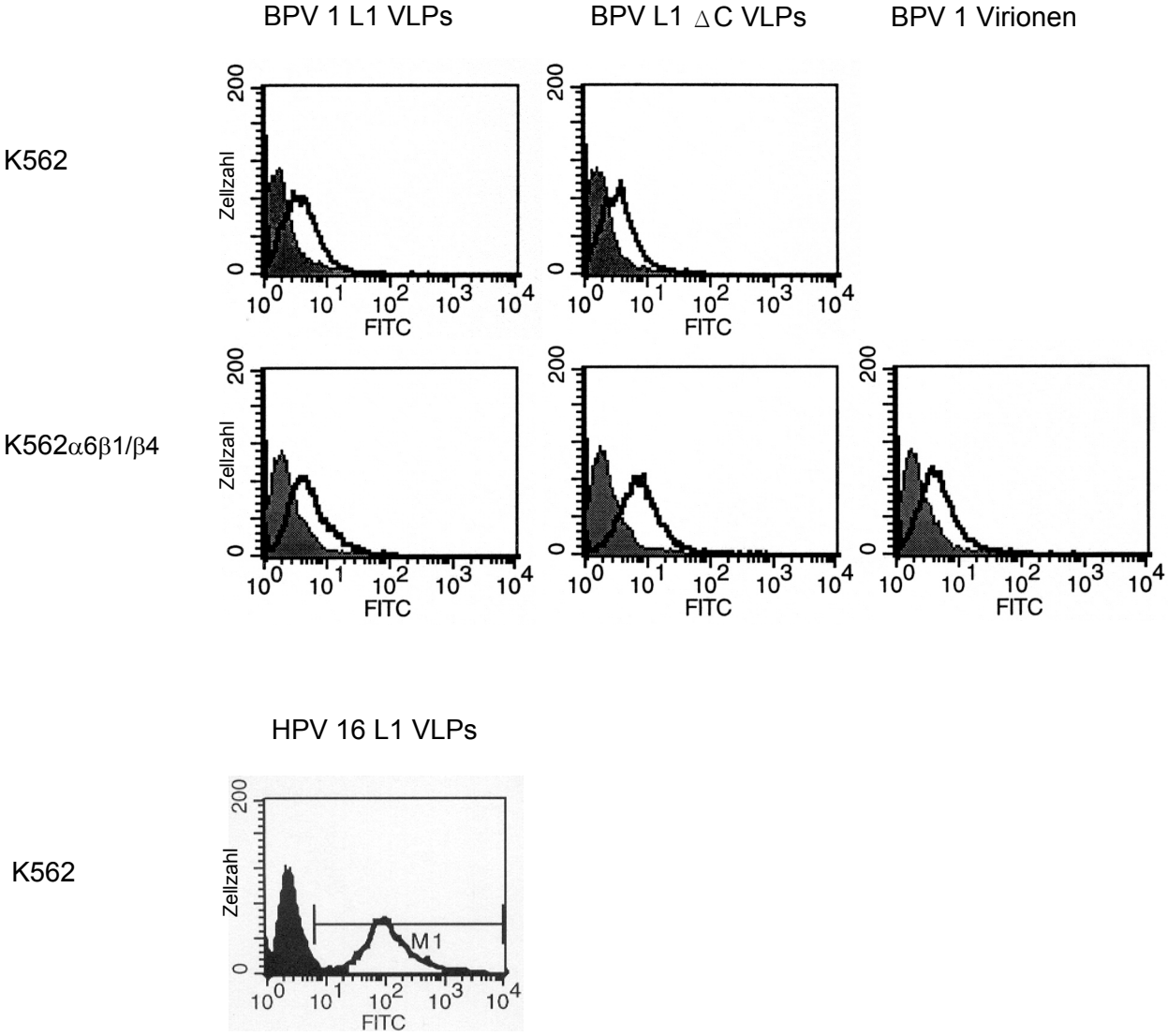


Abb. 3.44: Bindung von BPV 1 L1 VLPs, BPV 1 L1△C VLPs und BPV Virionen an K562 und K562-Integrin-α6β4 -positive Zellen. *K56-Zellen binden HPV 16 L1 VLPs, BPV 1 L1 VLPs und BPV 1 L1△C VLPs. (Jeweils 8x10^5 Zellen und ca. 5µg L1 Protein). Bei den α6β1/β4-Integrin transfizierten K562-Zellen ist keine Änderung in den Bindungseigenschaften messbar, wenn man sie mit ihren Parentalzellen vergleicht.*

3.6.3 Einfluss neutralisierender Antikörper auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Integrin-α6-positive Zellen

Um zu testen, ob der von Evander et al. beschriebene Integrin-α6 spezifische, monoklonale Antikörper GoH3 die Bindung von PV L1 VLPs an Zellen blockieren kann, wurden Integrin-negative K562-Zellen sowie Integrin-α6β1 positive K562 und Integrin-α6-positive HeLa-Zellen mit dem Integrin-α6 blockierenden Antikörper GoH3 behandelt (Aumailley, Timpl et al. 1990; Evander, Frazer et al. 1997). In der Abbildung 3.45 ist die höchste getestete Antikörperkonzentration (5µg/ml) dargestellt. Man erkennt, dass der Antikörper keinen Einfluß auf die Bindung ausüben kann. Dies ist auch bei den Integrin-α6β1-positiven Transfektanten zu beobachten, ebenso wie bei den Integrin-α6-positiven HeLa-Zellen. Die Bindung der PV VLPs und der BPV 1 Virionen an diese Zellinien erfolgt Integrin-α6 unabhängig.

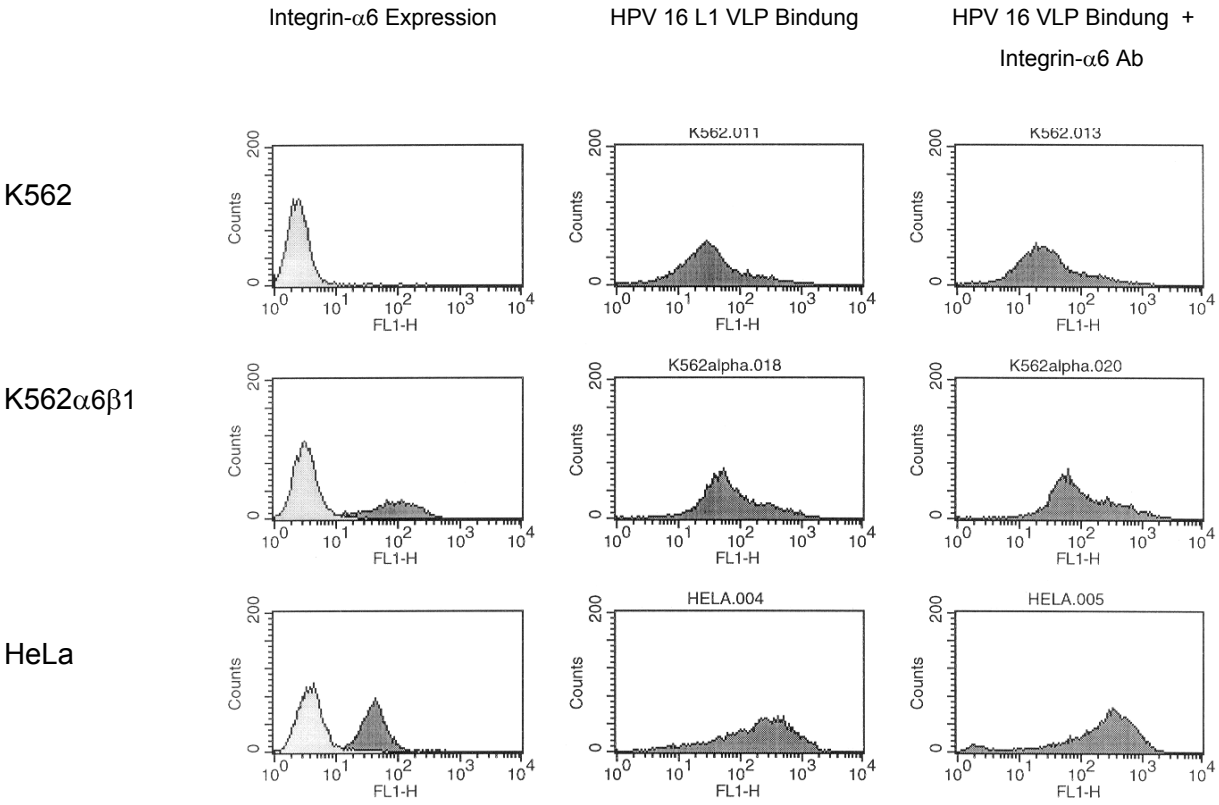


Abb. 3.45: Einfluss des Integrin-α6 blockierenden Antikörpers GoH3 auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an K562- und HeLa-Zellen. *Die Integrin-α6 Expression der Zellen wurde am Durchflußcytometer gemessen. Bei den HPV 16 L1 VLP behandelten Ansätzen wurde der gebundene Anteil mittels FITC-markiertem, monoklonalen 1.3.5.15 Antikörper nachgewiesen. K562, K562α6β1-Integin-positive und HeLa-Zellen (8x10^5) binden HPV 16 L1 VLPs. Das stärkste Fluoreszenzsignal ist bei HPV 16 VLP-behandelten HeLa-Zellen messbar. Verglichen mit der HPV 16 VLP Bindung von HeLa-Zellen binden K562-Zellen geringere Mengen HPV 16 VLPs. Das Bindungsverhalten von K562 und K562α6β1-Integrin Transfektanten ist in diesem Assay identisch. Der Integrin-α6 spezifische Antikörper GoH3 (1µg/Ansatz) hat bei keiner der Zellinien einen Einfluß auf die Bindung der HPV 16 L1 VLPs.*

3.6.4 Integrin α6β1- und α6β4-unabhängige Infektion von K562-Zellen durch HPV 16-gfp Pseudovirionen

Um den Beitrag der Integrin Komplexe α6β1 und α6β4 bei der Infektion von Zellen durch Papillomviren zu untersuchen, wurden die in *Saccharomyces Cerevisiae* generierten HPV 16-*gfp* Pseudovirionen genutzt (Rossi, Gissmann et al. 2000).

Für die Infektion werden die Zellen zwei Stunden mit den pseudovirionen-haltigen Hefe Extrakten behandelt. Als Reportergen wird *egfp* durch die HPV 16 Pseudovirionen in die Zelle gebracht. Das Ausmaß der Transduktion kann mittels Durchflusscytometrie analysiert werden.

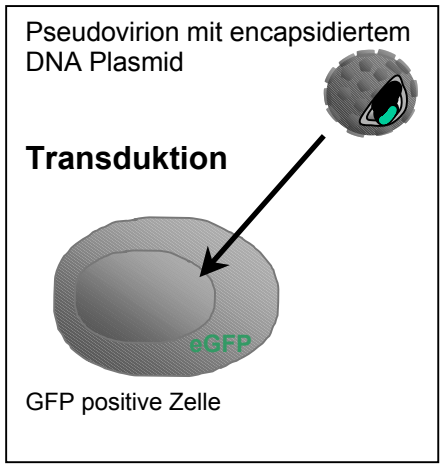
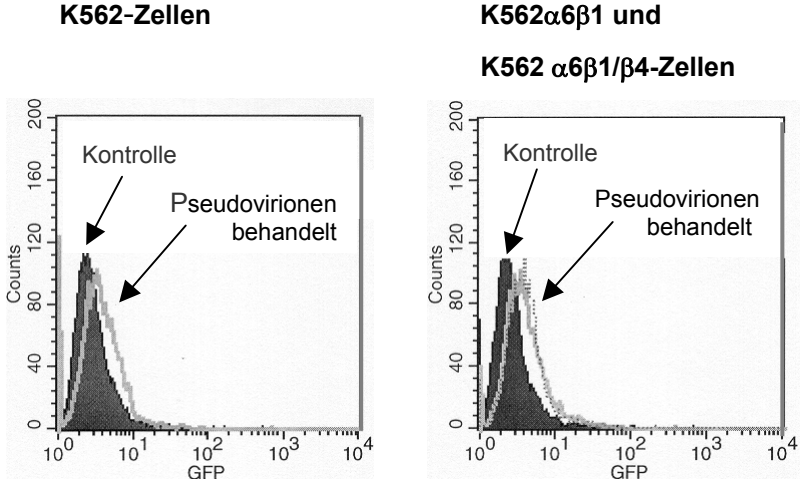


Abb. 3.46: Prinzip der Pseudovirioneninfektion. *Die in den Hefezellen exprimierten L1- und L2 Proteine von HPV16 bilden Kapside und schließen dabei das 7,2 kb große, egfp codierende DNA-Plasmid mit ein. Das Plasmid trägt neben dem CMV-Promotor die Long Control Region des HPV 16 Genoms, von der vermutet wird, dass sie für die Verpackung der DNA ins Kapsid notwendig ist. Wenn das Plasmid in den Zellkern gelangt ist und dort erfolgreich transkribiert wird, kann in einer infizierten Zelle das gebildete eGFP Protein nachgewiesen werden (Rossi et al).*

K562-Zellen, die entweder den Integrin Komplex α6β1 oder Integrin α6β4 und α6β1 auf ihrer Oberfläche tragen, können durch die HPV 16-*gfp* Pseudovirionen infiziert werden. Die Transduktion in K562-Zellen ist wesentlich geringer als in dem von Rossi et al. verwendeten ID13 Zellsystem, in dem 30%-50% der Zellen infiziert werden konnten (Rossi, Gissmann et al. 2000). Die Integrin-negative K562 Parentalzellinie ist im gleichen Ausmaß infizierbar wie ihre Transfektanten. Für die Infektion dieser Zellinie ist der durch Evander et al. beschriebene Integrin-Komplex nicht notwendig (Evander, Frazer et al. 1997; McMillan, Payne et al. 1999; Drobni, Mistry et al. 2003).

A



B

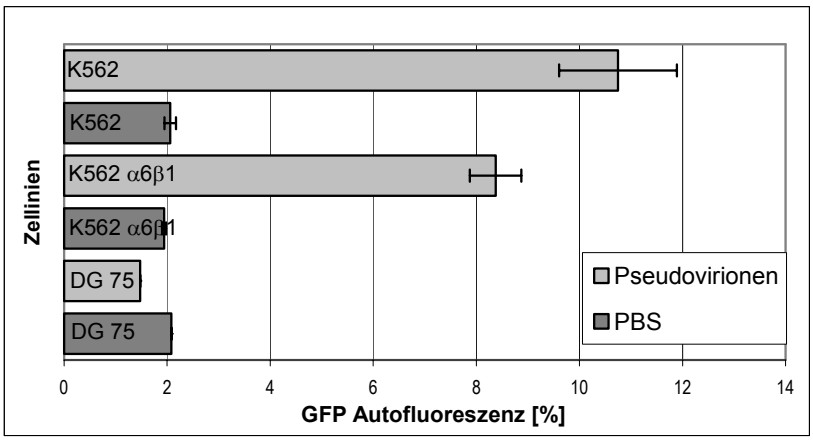


Abb. 3.47: In-vitro Transduktion von eGFP in Zellen durch Infektion der K562-Zellen mit HPV 16 Pseudovirionen. *A: Histogramme Integrinα6-negativer und Integrinα6-positiver K562-Zellen nach Pseudovirioneninfektion. Sowohl in K562-Zellen als auch in $\alpha 6\beta 1$-Integrin-positiven K562-Zellen ist eine Verschiebung der Peakmitte und die Ausbildung einer Schulter am Peak messbar.*
B: Balkendiagrammdarstellung der in vitro Transduktion von eGFP in K562- und DG75-Zellen.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Obwohl Papillomviren schon früh als Tumorviren identifiziert wurden und seither große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt wurden, ist die Biologie der Papillomviren noch nicht vollständig verstanden.

Lange Zeit war kein zellulärer Rezeptor und damit keine molekulare Grundlage der Virus-Zell Interaktion bekannt. Erst in den vergangenen zehn Jahren wurden einige Moleküle als potentielle Rezeptoren benannt und eine Clathrin-abhängige Aufnahme der Viren postuliert. Um weitere Erkenntnisse über die Bindung von Papillomviren an Zellen zu erhalten, wurden durch die vorliegende Arbeit Daten zur Integrin-unabhängigen Infektion von Zellen und zur Interaktion von Papillomviren mit Heparin und Heparansulfatderivaten gesammelt. Mittels modifizierter L1 VLPs, war es möglich eine Aussage über die Beteiligung des C-Terminus an der Heparinbindung zu treffen und Bindungsstellen von Antikörpern aus vorhandenen Hybridomüberständen zu identifizieren.

4.2 Beurteilung des Integrin-α6 Komplexes als potentieller Papillomvirusrezeptor

Als mögliche Papillomvirus-Rezeptoren für HPV 6b wurden bereits 1997 durch Evander et al. die Integrin Komplexe $\alpha 6\beta 4$ und $\alpha 6\beta 1$ beschrieben. Evander et al. stützte sich dabei auf Präzipitationen und Bindungsexperimente mit VLPs, da es kein Pseudovirionensystem für HPV 6 gab (Evander, Frazer et al. 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit HPV 16 L1 VLPs zeigen, dass HPV 16 nicht auf Integrin $\alpha 6$ bei der Bindung an Zellen angewiesen ist. Im Gegensatz zu McMillan et al. ließ sich durch die Expression von α6β4-Integrin auf DG75-Zellen keine Bindung von HPV 16 VLPs an diese Transfektanten induzieren (McMillan, Payne et al. 1999). Ebenso war die Bindung der HPV 16 L1 VLPs nicht durch den Integrin-$\alpha 6$-spezifischen Antikörper GoH3 hemmbar (Aumailley, Timpl et al. 1990).

Auch die Infektion von Zellen durch HPV 16 L1/L2 Pseudovirionen verläuft Integrin-$\alpha 6$ unabhängig. Daraus schließen wir, dass Integrin-$\alpha 6\beta 4$ und -$\alpha 6\beta 1$ nicht die universellen Rezeptoren für Papillomviren sein können.

Kürzlich veröffentlichte Studien von Sibbet et al. und Giroglou et al. zeigen vergleichbare Ergebnisse für die Papillomviren BPV 4 und HPV 33 (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Giroglou, Florin et al. 2001). BPV 4-haltige Viruspräparationen waren in der Lage, Integrin-$\alpha 6$-unabhängig Keratinocyten zu infizieren. Ebenso ließen sich Integrin-negative COS-7 Zellen mit HPV 33 Pseudovirionen infizieren.

Nachdem die Integrin Komplexe $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ durch diese Beobachtungen nicht mehr als allgemeiner Rezeptor für Papillomviren angesehen wurden, rückten Glycosaminglycane in

den Blickpunkt des Interesses. Die ubiquitär auf den Oberflächen vieler unterschiedlicher Zelltypen vorhanden Moleküle können, wenn sie als PV Rezeptoren in Frage kommen, die beobachtete Bindung von PV an eine Vielzahl unterschiedlicher Zellinien erklären (Qi, Peng et al. 1996; Da Silva, Velders et al. 2001).

4.3 Rolle von Polysacchariden bei der Bindung von Papillomviren an Zellen

Die Bindung von HPV 11 L1 VLPs wurde 1999 von Joyce et al. an immobilisiertes Heparin berichtet (Joyce, Tung et al. 1999). Tatsächlich zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeiten, dass die Bindung an Heparin bei mehr Papillomviren als nur HPV 11 beobachtet werden kann. HPV 16 L1 VLPs und BPV 1 Virionen binden in der Affinitätschromatographie ebenfalls an immobilisiertes Heparin. Die Ionenstärke (0,8M NaCl) des verwendeten Elutionspuffers, mit dem HPV 11 VLPs in den Versuchen von Joyce eluierten, liegt nach Recherchen von Joyce et al. in einem Bereich, wie sie auch für die Elution der Heparin bindenden Glycoproteine gC und gD von HSV 1 notwendig ist (Tal-Singer, Peng et al. 1995; Wu, Lundblad et al. 1995). Bei HSV 1 gelten Heparansulfate als low-affinity Rezeptoren, die gebunden werden, bevor die Rezeptoren HveA, HveB (Nectin 2), HveC (Nectin1) oder HveD gebunden werden, die die Aufnahme einleiten (WuDunn and Spear 1989; Shieh, WuDunn et al. 1992 und Spear, Shieh et al. 1992). BPV 1 VLPs, BPV 1 Virionen sowie HPV 16 L1 VLPs und HPV 16 L1/L2 VLPs eluieren in den hier durchgeführten Affinitätschromatographien bei vergleichbaren Ionenstärken. Neuere Untersuchungen weisen bei einer stetig wachsenden Zahl von Papillomviren eine Beteiligung von HS bei der Bindung an Zellen und eine HS-abhängige Aufnahme in unterschiedliche Zelltypen wie Keratinocyten oder dendritische Zellen nach (Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003; Yan, Peng et al. 2004; Bousarghin, Hubert et al. 2005; Patterson, Smith et al. 2005). Die hier erzielten Ergebnisse mit eingeschlossen, sind bislang HPV 6b, 11, 16, 18, 31, 33, 38, 39, 45, 58, 59 und 68 sowie BPV 1 und BPV 4 als Heparin-bindend identifiziert worden (Joyce, Tung et al.1999; Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Combita, Touze et al. 2001; Giroglou, Florin et al. 2001).

4.3.1 Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Bindung von PV an Zellen

Nachdem in dieser Arbeit die Bindung an immobilisiertes Heparin nicht nur für HPV 11 L1 VLPs, sondern auch für BPV 1 und HPV 16 L1 VLPs gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss freien Heparins auf die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Zellen untersucht.

Der von Roden et al. beschriebene Hämagglutinationshemmtest (HHT) wurde bisher nur zur Testung neutralisierender Antikörper verwendet (Favre, Breitburd et al. 1974; Roden, Hubbert et al. 1995). Roden zeigte, dass die im HHT wirksamen Antikörper diejenigen sind, von denen bekannt ist, dass sie eine Infektion von Zellen durch CRPV, BPV 1 oder HPV 11

verhindern (Christensen, Kreider et al. 1990; Roden, Hubbert et al. 1996). Eine Einschränkung des Systems ist, wie Roden bereits feststellte, darin zu sehen, dass Antikörper, die die Virusaufnahme in einem späteren Schritt hemmen (wie z.B. mAB 5B4, der das Uncoating von BPV 1 verhindert), im HHT nicht als virusneutralisierend identifiziert werden (Booy, Roden et al. 1998). Durch den HHT können Aussagen gewonnen werden, die die Bindung der Papillomviren beschreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das System zum ersten Mal für die Untersuchung heparinoid wirkender Substanzen eingesetzt. Wie sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, ließen sich die mit dem HHT ermittelten Daten sehr gut auf die Inhibition der VLP Bindung bei anderen Zelltypen übertragen. Die Substanzen, die HPV 16 im HHT inhibierten, waren auch bei HaCaT-, THP-1-, und K562-Zellen wirksam. Joyce et al. beobachteten bei HPV 11 VLPs die bereits für andere Heparin-bindende Viren beschriebene Abhängigkeit der Virusneutralisation vom Molekulargewicht der Heparinpräparation und der vorhandenen Ladung (Joyce, Tung et al. 1999). Ebenso dokumentiert ein neuer Bericht die Abhängigkeit der Inhibition der HPV 33 Pseudoviren-Infektion von vorhandenen O- und N-Sulfaten in den inhibitorisch wirksamen Heparinpräparationen (Selinka, Giroglou et al. 2003). Auch wir konnten damals beobachten, dass die Effizienz der durch Heparin, niedermolekulares Heparin oder Dextransulfat verursachten Inhibition bei der Bindung von HPV 16 L1 VLPs im HHT abhängig von der vorhandenen negativen Ladung und dem Molekulargewicht war. Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 kDa konnte die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an murine Erythrocyten oder HaCaT-Zellen nicht verhindern und bereits bestehende HPV 16 L1 VLP-Erythrocytenkomplexe nicht auflösen. Dextransulfat (10 kDa) hingegen verhinderte die Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT-Zellen sehr effizient und löste auch bestehende HPV-Zell Komplexe wieder auf. Die Eigenschaft von Dextransulfat, Heparansulfat-abhängige Virusbindungen zu neutralisieren, wurde beispielsweise auch bei der Bindung von HSV-1 an GMK-AH Zellen (Green Monkey Kidney-Zellen) oder von AAV-2 an Zellen beobachtet (Lycke, Johansson et al.; Qiu, Handa et al. 2000). Aber auch andere Heparinanaloge wie beispielsweise Carrageen, ein in der Nahrungsmittelindustrie verwendeter Algenextrakt, wurde kürzlich als sehr effizienter Wirkstoff zur Inhibition der Virus Zell Bindung bei Pseudovirioneninfektionen mit HPV 16, 18, 31 und 45 vorgeschlagen (Buck, Thompson et al. 2006). Substanzen aus Seealgen wurden bereits für HIV, CMV und HSV als antivirale Wirkstoffe untersucht (Baba, Snoeck et al. 1988; Witvrouw and De Clercq 1997). Ebenso ist die Wirksamkeit sulfatierter Polysaccharide wie Cellulosesulfat, Dextransulfat und Polystyrensulfonat bei der Neutralisierung der Virusbindung von HPV 11, 40 und BPV 1 seit einiger Zeit dokumentiert (Christensen and Reed 2001). Die Ergebnisse von Buck et al. zeigen, dass Carragen um das 10^2- bis 10^3-Fache niedriger eingesetzt werden kann, um denselben inhibitorischen Effekt zu erzielen wie Heparin. Mit den in der vorliegenden Arbeit

berechneten IC_{50} Werten ist Dextransulfat (10 kDa) nicht so effizient wie das hochmolekulare Heparin mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von 13 kDa. Die wirksame Konzentration des Dextransulfats liegt in einem Konzentrationsbereich, in dem das getestete niedermolekulare Heparin (3 kDa) ebenfalls inhibitorisch auf die Zellbindung wirkt. Evander und Drobni publizierten 2003 die Inhibition der Bindung von HPV 16 L1 VLPs an HaCaT-Zellen durch Heparin, bei der eine 50 %ige Reduktion in der Bindung (IC_{50}) mit 0,5 µg/ml und eine vollständige Inhibition mit 5 µg/ml Heparin beobachtet wurde (Drobni, Mistry et al. 2003). Dies entspricht der Größenordnung unserer Messwerte bei HaCaT-Zellen. Hingegen weichen die Daten von Joyce et al. mit HPV 11 VLPs und fixierten HaCaT-Zellen von den hier ermittelten Daten ab. Joyce ermittelte für HMW Heparin (17,5 kDa) IC_{50}= 239 nM und für Dextransulfat (5 kDa) IC_{50}= 21,7 µM. Dies führe ich weniger auf die Unterschiede zwischen HPV 11 und HPV 16 zurück, in deren Sequenzen eine fast identische Anzahl basischer Aminosäuren enthalten ist, sondern vielmehr darauf, dass sich die Molekulargewichte der von Joyce et al. verwendeten Heparine und Dextrane um 5 kDa von den hier verwendeten unterscheiden. Die Heparinpräparationen stellen Gemische unterschiedlicher Polymerlängen dar; so setzt sich das hochmolekulare Heparin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 13 kDa aus Polymeren zwischen 6 kDa und 25 kDa zusammen. Der Einfluss des Molekulargewichts kann deshalb keiner definierten Polymerlänge zugeschrieben werden; jedoch zeigen die Versuche mit Disacchariden, dass eine Mindestanzahl an Sacchariden vorhanden sein muss. Ein von dem Alpha-Antithrombin bindenden Pentasaccharid abgeleitetes Disaccharid (Toida, Hileman et al. 1996; Fry, Lea et al. 1999) weist mit seiner Carboxylat- und den drei Sulfatgruppen eine hohe negative Ladung auf, war aber in der höchsten der hier getesteten Konzentrationen von 2 mg/ml nicht in der Lage, mit den Erythrocyten um die HPV 16 L1 Bindung zu kompetieren. Diese Ergebnisse ließen sich bei der Bindung von HPV 16 VLPs an HaCaT-Zellen reproduzieren. Arbeitsgruppen, die ähnliche Disaccharide zur Kompetition von VLPs einsetzten, erhielten bei HPV 11 und HPV 33 vergleichbare Ergebnisse (Giroglou, Florin et al. 2001; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Erst das niedermolekulare Heparinderivat LMW Heparin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 3 kDa kann die Bildung von HPV 16 L1–Erythrocytenkomplexen verhindern. Es musste weitaus konzentrierter eingesetzt werden als Heparin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 13 kDa. Heparin Konzentrationen von 3,4 µg/ml reichten aus, um durch HPV 16 VLPs agglutinierte Erythrocyten zu lösen.

Die Abhängigkeit der Inhibition vom Molekulargewicht des eingesetzten Heparins ist bei der Bindung von HSV-1 an GMK-AH Zellen (Green Monkey Kidney-Zellen) durch Lycke et al mit fraktionierten Oligosacchariden sehr detailliert untersucht worden (Lycke, Johansson et al. 1991). Lycke et al. zeigten, dass ein Dekasaccharid die Minimalgröße darstellt, um

inhibtorisch bei HSV-1 und HSV-2 wirksam zu sein. Die maximale Inhibition wurde bei HSV 1 mit 16 Sacchariden erzielt (Lycke, Johansson et al. 1991).
Eine Abhängigkeit der Kompetition vom Molekulargewicht des eingesetzten Heparins konnte für humanpathogene Papillomviren von Joyce et al. bei HPV 11 unter Verwendung der Molekulargewichte 17,5 und 5 kDa beobachtet werden, von Giroglou et al bei HPV 33 sowie hier bei HPV 16 mit den verwendeten Molekulargewichten von 13 kDa und 3 kDa (Joyce, Tung et al. 1999; Giroglou, Florin et al. 2001).

4.3.2 Heparinase-Behandlung von Zellen

Die Beteiligung zellulärer HSPGs bei der Bindung von HPV 16 L1 VLPs an Zellen wurde indirekt durch Heparinase- und Zytokinbehandlung der Zellen gezeigt. Heparin Lyase 1 kann Heparansulfate auf der Zelloberfläche abbauen, wenn O-sulfonierte Saccharidsequenzen vorhanden sind (Gong, Jemth et al. 2003). Bei K562-Zellen wurde der Anteil vorhandener HS soweit reduziert, dass die Kapazität der behandelten Zellen zur Bindung von HPV 16 VLPs abnahm (30% verbliebene Bindung). Auf HeLa-Zellen konnte eine solche Reduktion mit den eingesetzten Enzymmengen nicht beobachtet werden; die Abnahme bei HeLa-Zellen lag zwischen 3 und 9 Prozent. Das Verbleiben von PV Bindungsstellen auf Heparinase behandelten Zellen wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet, in denen mit ca 10- bis 20-fach höheren Enzymmengen und verschiedenen Enzymen gearbeitet wurde (Giroglou, Florin et al. 2001; Selinka, Giroglou et al. 2002; Drobni, Mistry et al. 2003; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Charakteristisch für das Enzym ist, dass es einen gewissen Anteil unverdauter Oligosaccharide zurück lässt (Yamada, Yoshida et al. 1993; Liu, Shriver et al. 1999). Joyce et al. arbeiteten mit vergleichbaren Enzymmengen (1-2U) und beobachteten bei behandelten HaCaT-Zellen zwischen 30-40% residuale Bindung. Sie führten dies darauf zurück, dass das Enzym, dessen Optimum bei 43°C liegt, bei 25°C eingesetzt wurde (Joyce, Tung et al. 1999).
In einer neueren Arbeit mit HPV 31 wird die verbliebene PV-Bindung und die Infizierbarkeit der Zellen nach Heparinase-Behandlung nicht den Eigenschaften des Enzyms zugeschrieben. Patterson und Kollegen schließen aus der Beobachtung, dass die Infektion von Keratinocyten durch HPV 31 weder durch Heparinasen noch durch freies Heparin signifikant gesenkt werden kann, dass HPV 31 an Keratinocyten einen unbekannten Papillomvirus Rezeptors bindet, der eine Heparansulfat-unabhängige Bindung und Infektion durch HPV 31b ermöglicht (Patterson, Smith et al. 2005). Auch bei der Bindung von HPV 5 Pseudovirionen an HeLa-Zellen wurde festgestellt, dass Heparin oder ∫-Carrageen die Infektion nicht neutralisieren kann (Buck, Thompson et al. 2006). COS-7 und K562-Zellen entsprechen nicht Zelltypen, in denen eine produktive PV Infektion In-vivo abläuft (Giroglou, Florin et al. 2001). Daher ist es möglich, dass die hier verwendeten Zellen den PV Rezeptor der Keratinocyten bzw. des Wirtsgewebes nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Jedoch wurden

in Arbeiten von Sibbet et al. und Kirnbauer et al. sowohl für HPV 11 als auch für BPV 4 eine Heparinase-sensitive und HS-abhängige Infektion primärer Keratinocyten, aber auch K562-Zellen gezeigt (Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). Es ist möglich, dass HPV 31 b und HPV 5 vom Verhalten der bisher untersuchten PV Typen abweichen.

Um die in dieser Arbeit nach Heparinase-Behandlung beobachtete residuale Bindung von HPV 16 an K562-Zellen einem noch unbekannten Molekül zuzuschreiben, fehlen ausreichend umfangreiche Daten. Es kann für die hier verwendeten K562-Zellen gezeigt werden, dass die Bindung Integrin-α6 unabhängig erfolgt und HSPGs an der HPV Bindung beteiligt sind.

4.3.3 PV zeigen bei der Bindung an Zellen keine Spezifität für ein HS Core Protein

Unsere Untersuchung zeigte auch, dass die durch Zytokine induzierte Expression verschiedener Core Proteine insoweit Einfluss auf die Bindung von Papillomviren hat, als dass die auf der Zelloberfläche zusätzlich erscheinenden Heparansulfate Bindungstellen für zusätzliche PV VLPs bieten (Selinka, Giroglou et al. 2002; Shafti-Keramat, Handisurya et al. 2003). In den murinen WEHI256.1-Zellen wird die Expression von Syndecan-3 (N-Syndecan) stark durch Interferon-α stimuliert (Nickolaus 1996). Physiologisch können die Zellen dadurch mehr HS-bindende Wachstumsfaktoren, wie bFGF, aus dem umgebenden Medium auf ihren Zelloberflächen binden und den entsprechenden Rezeptoren präsentieren. Hier konnte ich zeigen, dass diese mit murinem Interferon-α behandelten WEHI 265.1-Zellen in der Lage waren, bis zu 15% mehr HPV 16 VLPs an ihrer Oberfläche zu binden als unbehandelte WEHI 265.1-Zellen. Die Heparansulfat tragenden Core Proteine, vor allem aber deren Polysaccharide sind zwischen verschiedenen Tierarten so stark konserviert, dass HPV 16 VLPs auch die Heparansulfate muriner Zellen binden können. Möglicherweise nutzen Papillomviren Zellen mit erhöhtem HS Gehalt, um diese Zellen, die auf ein Teilungssignal durch Wachstumsfaktoren warten, zu infizieren. Ob die erhöhte HPV Bindung tatsächlich mit einer erhöhten Aufnahme einhergeht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Jedoch dokumentierten Shafti-Keramat et al. eine solche Beobachtung bei K562-Zellen (Shafti-Keramat, Handisurya, Kirnbauer et al. 2003).

In den von mir untersuchten humanen THP-1-Zellen konnte Syndecan-2 und Syndecan-3 mRNA nachgewiesen werden (Clasper, Vekemans et al. 1999; Sebestyen, Gallai et al. 2000). Entsprechend der Intensität des RT-PCR Signals waren auch die durch einen HS-bindenden monoklonalen Antikörper (mAB570) nachgewiesenen Heparansulfate auf der Oberfläche von TNFα- und IL1β-behandelten Zellen erhöht. In U937-Zellen ließ sich Syndecan-2 mRNA nicht nachweisen und nicht durch Zytokinbehandlung induzieren. Die Zellen enthielten aber Syndecan-3 mRNA und trugen Heparansulfate auf ihrer Oberfläche.

Sie waren in der Lage, nach Stimulation mit Zytokinen, vermehrt HPV16 L1 VLPs zu binden. In der vorliegenden Arbeit wurden Macrophagen-Vorläuferzellen verwendet. Da die Zytokinstimulation gerade in diesen Zellen eine Reihe von Mechanismen in Gang setzt, könnten neben Syndecanen noch weitere Moleküle induziert worden sein, die Bindungsstellen für HPV 16 zur Verfügung stellen (Clasper, Vekemans et al. 1999; Sebestyen, Gallai et al. 2000). Durch Vorversuche konnte geklärt werden, dass in Abwesenheit neutralisierender Antikörper eine direkte Bindung von VLPs an Fc-Rezeptoren nicht stattfindet (Freyschmidt, Alonso et al. 2004).

Eine bevorzugte oder spezifische Bindung von HPV 16 an ein bestimmtes Core-Protein murinen oder humanen Ursprungs lässt sich aus diesen Versuchen noch nicht ableiten. Diese Ergebnisse jedoch werden durch eine neuere Untersuchung über Syndecan-1-, Syndecan-2- oder Glypican-1-transfizierte K562-Zellen von Shafti-Keramat und Kirnbauer ergänzt (Shafti-Keramat, Handisurya, Kirnbauer et al. 2003). Die Bindung von HPV 16 VLPs an die K562 Transfektanten hing nicht von der Identität des Core-Proteins ab, sondern nur von der Menge des daran gebundenen Heparansulfats. Ergänzend zu den in dieser Arbeit betrachteten Betaglycan, Syndecan-2 und -3, zeigt die Arbeit von Shafti-Keramat et al., dass sich der Heparansulfatgehalt auf der Oberfläche von K562-Zellen durch Transfektion mit Syndecan-1, Syndecan-4 oder Glypican-1 codierenden Plasmiden erhöhen lässt. Diese Erhöhung geht sowohl mit einer gesteigerten HPV 16 VLP-Bindungsfähigkeit als auch mit einer erhöhten Infizierbarkeit der K562-Zellen durch HPV 11 Virionen einher (Shafti-Keramat, Handisurya et al.2003).

Eine Gemeinsamkeit der von uns untersuchten Zellen war die Syndecan-3 Induktion nach Zytokinbehandlung in WEHI256.1 und U937-Zellen (Nickolaus 1996). Bei den hier verwendeten Zellinien konnte die Bindung von HPV 16 VLPs an Neurosyndecan-positive Zellen (WEHI256.1 und K562) und die Aufnahme von HPV 16 Pseudovirionen in die Betaglycan-und Neurosyndecan-positive Zellinie K562 beobachtet werden. Weitere Core Proteine wie Glypikane standen im Rahmen dieser Arbeit für die Untersuchung nicht zur Verfügung. Um die Rolle von Syndecan-3 bei Bindung und Aufnahme von PV in Zellen zu untersuchen, sind Untersuchungen weiterer Zellinien, wie beispielsweise Keratinocyten, notwendig.

4.3.4 Einfluss des L1 Carboxylterminus auf die PV Bindung an immobilisiertes Heparin

Die Bindung von HPV 11 an immobilisiertes Heparin soll nach Joyce im wesentlichen durch die basischen Aminosäuren am C-Terminus des L1 Proteins vermittelt werden (Joyce, Tung et al. 1999). Die hier durchgeführten Untersuchungen für den Carboxylterminus von HPV 11 L1, aber auch Studien mit den C-terminalen Deletionsmutanten von HPV 16 L1 und BPV 1 L1 zeigen, dass es sich bei diesem Teil der L1 Proteine nicht um die essentielle Heparin

Bindungsstelle handelt. Wir sahen, dass die basischen Aminosäuren dieser Region bei HPV 11 L1 nicht notwendig für die Bindung sind und dass auf der Oberfläche des Viruskapsids liegende, basische Aminosäuren des L1 Proteins die Bindung an immobilisiertes Heparin aufrechterhalten, wenn 20 Aminosäuren am C-Terminus fehlen. Dies war nicht nur für HPV 11 L1 VLPs zu beobachten, sondern auch für HPV 16 VLPs an deren L1-C-Terminus 34 Aminosäuren fehlten und VLPs des bovinen Papillomvirustyps 1 die eine Deletion von 24 Aminosäuren erfahren hatten (Paintsil, Muller et al. 1996; Muller, Zhou et al. 1997). Eine neuere Arbeit von Modis und Harrison, in der die Atomkoordinaten kleiner HPV 16 L1 VLPs in die aus Kryo-EM von BPV 1 Virionen gewonnenen Elektronendichten modelliert werden, positioniert die C-terminalen Sekundärstrukturen des L1 Proteins, die α-Helix h4 und die α-Helix h5 neu (Modis, Trus et al. 2002). Dadurch kann im Virion eine Disulfidbindung durch die Cysteine C175 und C428 benachbarter Pentamere entstehen (Sapp, Fligge et al. 1998). Die Strukturen, die im HPV 16 L1-Protein von den AS 430-474 gebildet werden, und an die Disulfidbindung anschliessen positionieren sich dann am benachbarten Pentamer. Vergleicht man die Form eines Pentamers mit der eines Zylinders, so windet sich im Virion diese C-Terminale Struktur außen an einem benachbarten Zylinder hinab. Während die α-Helix h4 im Virion ihre Position ganz erheblich verändert, unterscheidet sich die relative Lage der α-Helix h5 im VLP und im Virion in nur einem wesentlichen Punkt, dass sie in BPV 1 Virionen ihre Position im Inneren eines benachbarten Pentamers einnimmt, während sie in „kleinen“ HPV 16 VLPs im Inneren des eigenen Pentamer liegt. Die letzte durch ihre Atomkoordinaten bestimmte Aminosäure ist HPV 16 L474. Diese Aminosäure weist ins Zentrum des Pentamers. Alle hier verwendeten VLPs tragen ihre Deletionen oder Substitutionen C-terminal von dieser Aminosäure. Ihre genaue Platzierung im VLP ist daher unbekannt. Ebenso tragen auch die von verschiedenen Arbeitsgruppen bearbeiteten L1ΔC VLPs ihre Deletionen jenseits der Aminosäure 474. In den von Modis und Kollegen publizierten Strukturen sind etwaige an L474 anschließende Reste nicht auf der Oberfläche zu finden, diese Hypothese steht im Einklang mit den hier ermittelten Bindungsdaten unserer L1ΔC VLPs (Modis, Trus et al. 2002). Jedoch ist der C-Terminus eine sehr flexible Region, so dass dessen tatsächliche Position in einem modifizierten VLP noch nicht endgültig geklärt ist. Während Bousarghin mit HPV 16 L1 VLPs, deren C-Terminus um 9 Aminosäuren verkürzt wurde, einen Verlust der Heparinbindefähigkeit dokumentiert, zeigen Arbeiten von Giroglou et al., dass eine Deletion der letzten 22 Aminosäuren am C-Terminus von HPV 33 L1 weder die Heparinbindung noch die Infektion von Zellen beeinflußt (Giroglou, Florin et al. 2001; Bousarghin, Touze et al. 2003). Vergleicht man die 20-34 Aminosäuren umfassenden Deletionen miteinander, fällt auf, dass bei HPV 11 L1ΔC und HPV 33 L1ΔC eine ähnliche Sequenz nach α-Helix h5 folgt, in der bei HPV 11 anstatt der drei Lysine drei Arginine enthalten sind. Bei den HPV 16 L1ΔC

und BPV 1 L1ΔC Proteinen wird der neue C-Terminus durch die α-Helix h5 und eine bzw. zwei daran anschließende Aminosäuren gebildet.

HPV 33	L**K**A**K**P**K**L	HPV 11	Y**R**G**R**TSA (**R**)
HPV 16	DI	BPV 1	A

Dies kann das identische Verhalten der L1ΔC VLPs bei der Bindung an Heparin erklären, welches von uns und anderen Arbeitsgruppen beobachtet wird (Giroglou, Florin et al. 2001).

Der Einfluss der am C-Terminus liegenden Aminosäuren auf die Bindung ist geringer als erwartet, da auch die Substitution des BPV 1 Carboxylterminus durch ein vom BPV 1 E7 Protein abgeleitetes, 54 Aminosäuren großes Peptid keinen meßbaren Einfluß auf die Bindung der VLPs an immobilisiertes Heparin hatte. Wie Paintsil et al, Müller et al und S. Mattil zeigten, lassen sich 60 nm VLPs mit Substitutionen in C-terminalen Bereichen des L1 Protein nur realisieren, wenn die Substitutionen carboxylterminal von α-Helix h5 (K475) angebracht werden und eine Größe von 60 AA nicht überschreiten (Paintsil, Muller et al. 1996; Muller, Zhou et al. 1997; Mattil-Fritz 2002). Sie liegen dann außerhalb der für die Interpentamer-Kontakte verantwortlichen Strukturen und ragen im Einklang mit der derzeitigen Atomstruktur der VLPs vermutlich ins Innere des VLP, ohne die L1-L1 Kontaktflächen zu destabilisieren. Wir konnten feststellen, dass die Substitution am BPV 1 L1 C-Terminus keinen sterischen Einfluss auf die Bindung an Zellen oder an immobilisiertes Heparin ausübt.

4.4 Betrachtung potentieller Rezeptor–Bindungstaschen

4.4.1 Potentielle Rezeptor-Bindungstaschen und Bindungsstellen monoklonaler Antikörper

Die Heparin Bindungsstelle auf dem Viruskapsid wird in ihrer Struktur sicherlich einem Cluster basischer Aminosäuren entsprechen, wie man ihn von anderen Heparin- und Heparansulfat-bindenden Viren wie beispielsweise FMDV, HSV 1 oder AAV 2 kennt (Fry, Lea et al. 1999; Qiu, Handa et al. 2000; Kern, Schmidt et al. 2003). Nun tragen aber die L1 Proteine von HPV 16 und BPV 1 kein Konsensusmotiv, wie es von Cardin und Weintraub beschrieben wurde (Cardin and Weintraub 1989; Cardin, Demeter et al. 1991). Daher wurden auf der Oberfläche des L1 Proteins liegende ähnliche Motive durch Punktmutationen verändert.

Einige der Punktmutationen liegen in den von Chen et al. 2000 prognostizierten potentiellen Rezeptorbindungstaschen (Chen, Garcea et al. 2000). Chen und Garcea verglichen die dreidimensionale Struktur des L1 Proteins mit der des VP-1 Proteins von Polyoma, um durch Vergleich einer bereits bekannten Rezeptorbindungstasche eine ähnliche Region im L1 zu identifizieren (Stehle, Yan et al. 1994; Stehle and Harrison 1996). Vertiefungen auf der L1

Oberfläche, die durch einen Rezeptor gebunden werden können, werden demnach durch die BC, EF, und FG Schleifen geschaffen.
Die Aminosäuren K59 und K64 liegen im konservierten Bereich der BC Schleife, K171 in der EF Schleife und damit in der Nähe der vermuteten Disulfidbindung, die Cystein 175 eingeht. Die Aminosäuren SGS279-281 liegen in der variablen Region der FG Schleife.

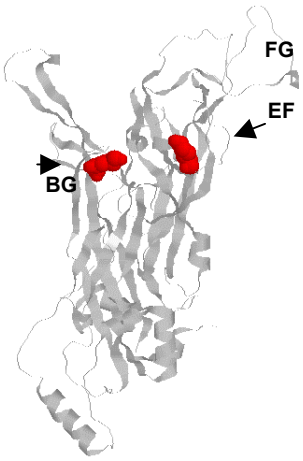


Abb. 4.48: Position der Rezeptorbindungstaschen in der Tertiärstruktur des L1 Proteins. *Die BG und die EF Schleife sind mit einen Pfeil markiert. Die FG Schleife ist beschriftet. Die zwischen den Schleifen liegenden Vertiefungen wurden durch Chen et al. als potentielle Rezeptorbindungstaschen beschrieben. Lysin-59 und Lysin-64 sind als Kalottenmodell eingezeichnet.*

Die Substitution der Aminosäuren K59, K64, K171 oder K356 in den prognostizierten Rezeptorbindungstaschen durch Alanin führt zu keiner Veränderung in der Bindung der VLPs an HaCaT-Zellen. In den vermuteten Bindungstaschen liegen weitere Aminosäuren, die für die Bindung eines zellulären Rezeptors in Frage kommen. Sie sind jedoch Bestandteil von Sekundärstrukturen und wurden nicht verändert. 300 der 504 Aminosäuren im L1 Protein werden nach Analysen von Chen und Garcea et al. für die Bildung der Tertiärstruktur benötigt (Chen, Casini et al. 2001). Das Arginin an Position 41 ist Teil des β-Faltblatts-B2. Die Substitution durch Alanin führt zu L1 Proteinen, die 30 nm VLPs bilden. Dies zeigt, dass einzelne Arginine in Sekundärstrukturen verändert werden können. R41 stellt vermutlich eine Ausnahme dar. Die Erkenntnisse, die durch die Arbeiten von Paintsil und El Hindi gewonnen wurden, belegen, dass Mutationen, die die Sekundärstrukturen betreffen, sich auf die VLP Bildung fatal auswirken (Paintsil, Muller et al. 1996). L1 Proteine, deren Arginin R 109 im β-Faltblatt-**D** oder R 365 im β-Faltblatt-**I** verändert wurden, waren nicht mehr fähig zu VLPs zu aggregieren (El Hindi, pers. Kommunikation). Dass die Punktmutation (R41A) in einer Sekundärstruktur toleriert wird, lässt sich möglicherweise durch die Anordnung des Beta-Faltblatts erklären. Das β-Faltblatt B2 liegt nicht im Inneren des Proteins wie β-Faltblatt-**D** und Abschnitte von β-Faltblatt-**I**. Die genauen Veränderungen in der Struktur des L1 Proteins durch die Substitution an Position 41 lassen sich nur indirekt nachweisen. Die Substitution an Position 41 verändert die Form der VLPs und die Bindung an immobilisiertes Heparin im Vergleich zu Wildtyp VLPs. Die VLPs sind unsymmetrisch und erreichen nur noch 30 nm

Durchmesser. Sie eluieren bei 0,17 M höherer NaCl Konzentration von der Heparin Säule als wildtyp L1 VLPs.

Bei den Heparin-bindenden Viren AAV-2 oder Pseudorabies ist nicht nur ein Proteinabschnitt an der HS Bindung beteiligt, sondern mehrere Regionen auf dem Viruskapsid/Protein koordinieren gemeinsam ein Oligosaccharid (Trybala, Bergstrom et al. 1996; Summerford and Samulski 1998; Kern, Schmidt et al. 2003). Bei Pseudorabiesvirus zum Beispiel, einem porcinen Alpha-Herpesvirus, ist es notwendig, alle drei beteiligten Heparinbindungsmotive im Glykoprotein gC zu deletieren, um die Bindung zu verhindern (Rue and Ryan 2002). Problematisch sind umfangreiche Deletionen bei Papillomviren deshalb, weil das L1 Protein der Papillomviren im Gegensatz zum den Glykoproteinen der Herpesviridae die Struktur des Viruskapsids ausbildet.

Die Region des L1 Proteins, in der die Aminosäuren 41 und 443 positioniert sind, verändert ihre Konformation durch die Substitution mit Alanin soweit, dass einige monoklonale Antikörper nicht mehr binden können. Für die von uns verwendeten monoklonalen Antikörper konnten mit Hilfe der Punktmutationen Hinweise auf deren Bindungsstellen gewonnen werden. Der im Rahmen dieser Arbeit für durchflusscytometrische HPV 16 Nachweise eingesetzte monoklonale Antikörper 1.3.5.15-FITC (Fab-Fragment) bindet in der FG Schleife bei den Aminosäuren 279-281 an HPV 16 VLPs. In den durch die Aminosäuren 100-200 gebildeten Regionen im L1 Protein erkennen die Antikörper der Hybridome 25A und 1.4.7.22 ihre Bindungsstellen. Lysin 443 liegt im Interpentamerraum am Ende der flexiblen prolinreichen Gelenkregion, die die C-terminalen Abschnitte der L1 Proteine zu benachbarten Pentameren hin ausrichten. Der Interpentamerraum ist nach der Betrachtung von Modis und Harrison zugänglich für Moleküle, die in der Größe vergleichbar sind mit den 4 x 5 x 7,5 nm großen Fab-Fragmenten eines neutralisierenden Antikörpers (Modis, Trus et al. 2002). Daher vermuten sie in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2002 Epitope zwischen den Pentameren. Lysin 443 ragt in der neueren, verfeinerten Atomstruktur nicht mehr exponiert aus dem Viruskapsid heraus, sondern liegt am Rand eines benachbarten Pentamers. Tatsächlich spielt es bei der Antigenerkennung der monoklonalen Antikörper H16.S1 und H16.H5 eine Rolle.

Insofern ist es denkbar, dass auch potentielle Rezeptoren zwischen den Pentameren binden können. Auch Polysaccharide wie HMW Heparin oder Heparansulfat wären bei einer bestimmten Polymerlänge in der Lage, sich dort anzuordnen. Der Interpentamerraum ist durch die mittels Röntgenstrukturanalyse und Kryo-Elektronenemikroskopie gewonnenen Daten noch nicht endgültig charakterisiert. Bedingt durch die Notwendigkeit homogener Proteinkristalle für die Röntgenstrukturanalyse wurden HPV 16 L1ΔN VLPs kristallisiert (Chen, Casini et al. 2001). Dadurch fehlen die Atomkoordinaten aminoterminaler Aminosäuren, die im Interpentamerraum vermutet werden (Modis, Trus et al. 2002). In der

vorliegenden Arbeit habe ich mich deshalb auf eine mögliche Bindungsstelle bei den Aminosäuren 41 bis 80 konzentriert. Diese Region ist an der Bildung einer Tertiär/Quartärstruktur beteiligt, die basische Aminosäuren an den Seitenflächen der Pentamere exponiert. Ob diese Region ausschließlich von Antikörpern gebunden wird oder an der Bindung zellulärer Heparansulfate und zellulärer Rezeptoren beteiligt ist, ist Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen.

4.4.2 Der Einfluss von L2 auf die Bindung von Papillomviren

Viele Untersuchungen beschäftigen sich mit der Rolle des Nebenkapsidproteins L2 im Viruspartikel. Dessen Position in Viruskapsid ist noch nicht geklärt. Sowohl der Carboxyl- wie auch der Aminoterminus tragen eine große Anzahl positiv geladener Aminosäuren, von denen vermutet wird, dass sie für die Organisation der viralen DNA im Viruskapsid verantwortlich sind (Zhou, Sun et al. 1994; Ishii, Ozaki et al. 2005). Untersuchungen zur Zellbindung durch Zhou und Müller dokumentieren, dass bei der Bindung von L1 VLPs, L1/L2 VLPs und BPV1 Virionen keine Unterschiede beobachtet werden, wenn L2 im VLP vorhanden ist (Muller, Gissmann et al. 1995; Zhou, Gissmann et al. 1995). Dies ließ sich hier mittels Affinitätschromatographie auch für die Bindung an Heparin zeigen. Die von Zhou und Müller verwendeten CV-1 Zellen tragen Heparansulfate auf ihrer Oberfläche, und so kann man mit der hier dokumentierten Bindung von BPV 1 Virionen und L1 VLPs an Heparin vermuten, dass die beobachtete Bindung über Heparansulfatproteoglykane an die CV-1 Zellen erfolgte. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von L2 im VLP oder im Viruskapsid die Infektion nicht bei der Heparansulfat-abhängigen Bindung an Zellen sondern in einem späteren Schritt, zum Beispiel bei der Freisetzung der viralen DNA aus dem Endosom, beeinflusst bzw. eine Interaktion mit t-SNARE Rezeptoren im Endoplasmatischen Reticulum ermöglicht (Yang, Day et al. 2003; Bossis, Roden et al. 2005; Kamper, Day et al. 2006).

4.4.3 Bindung an antigenpräsentierende Zellen

Von großem Interesse ist die Aufnahme von PV in die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) des Immunsystems. Die als prophylaktische Vakzine entwickelten und durch Mattil et al. getesteten BPV1 L1/E7 CVLPs zeigten sich in einer ersten klinischen Studie als gut verträgliche Vakzine bei der Behandlung des equinen Sarkoids (Mattil-Fritz 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gemeinsame Eigenschaft von BPV 1 L1/E7 CVLPs, L1ΔC VLPs und BPV 1 Virionen die Bindung an Heparin ist. So kann man annehmen, dass sich der erste Schritt der Interaktion von BPV 1 L1/E7 CVLPs mit HSPG-haltigen Zellen nicht von dem der BPV 1 Virionen unterscheidet.

Neuere Arbeiten zeigen nun, dass Heparansulfate auf der Oberfläche dendritischer Zellen durch HPV 16 und HPV 6b für die Bindung und Aufnahme genutzt werden (Yan, Peng et al.

2004; Bousarghin, Hubert et al. 2005). Die Bindung und die Aufnahme von HPV in diese Zellen wurde als Heparinase II-sensitiv, blockbar sowohl durch Anti CD16 Antikörper als auch durch Polysaccharide, beschrieben (Fausch, Da Silva et al. 2005). Die Aufnahme der VLPs in die DC soll wie für andere Zelltypen bereits gezeigt, Clathrin-abhängig über Endocytose erfolgen (Day, Lowy et al. 2003; Fausch, Da Silva et al. 2003). Im Gegensatz dazu wird die Assoziation von HPVs mit und die Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen epithelialer Gewebe (Langerhanszellen), als Heparansulfat-unabhängig beschrieben (Yan, Peng et al. 2004; Bousarghin, Hubert et al. 2005). Die Aufnahme in Langerhanszellen ist derzeit noch umstritten, da mit CFDA-SE-/Fluorochrom markierten HPV 16 VLPs eine Aufnahme über Coated Pits in Vesikel mit Clathrin Morphologie beobachtet wurde, während bei HPV 6b L1 VLPs Caveoloe beteiligt sein sollen (Yan, Peng et al. 2004; Bousarghin, Hubert et al. 2005).

Eine erhöhte HS Expression kann auch bei APCs zu einer erhöhten VLP Bindung führen. Denkbar ist, dass die vermehrte Bindung an APCs auch eine erhöhte Aufnahme und Antigenpräsentation verursachen kann, während verstärktes Shedding von Heparansulfat mit den Zellen um die CVLPs kompetieren wird. Die hier bei Macrophagen- bzw monocytären Zellinien erfolgreiche Stimulation mit Zytokinen ist bei Dendritischen Zellen nur *ex-vivo* denkbar.

4.5 Rezeptor-vermittelte Bindung und Aufnahme von Papillomviren in Zellen

Aus den bisher in der Literatur verfügbaren Daten und den hier erzielten Ergebnissen lässt sich für die Rezeptor-vermittelte Bindung und die Aufnahme von Papillomviren in Zellen folgendes Modell entwerfen:

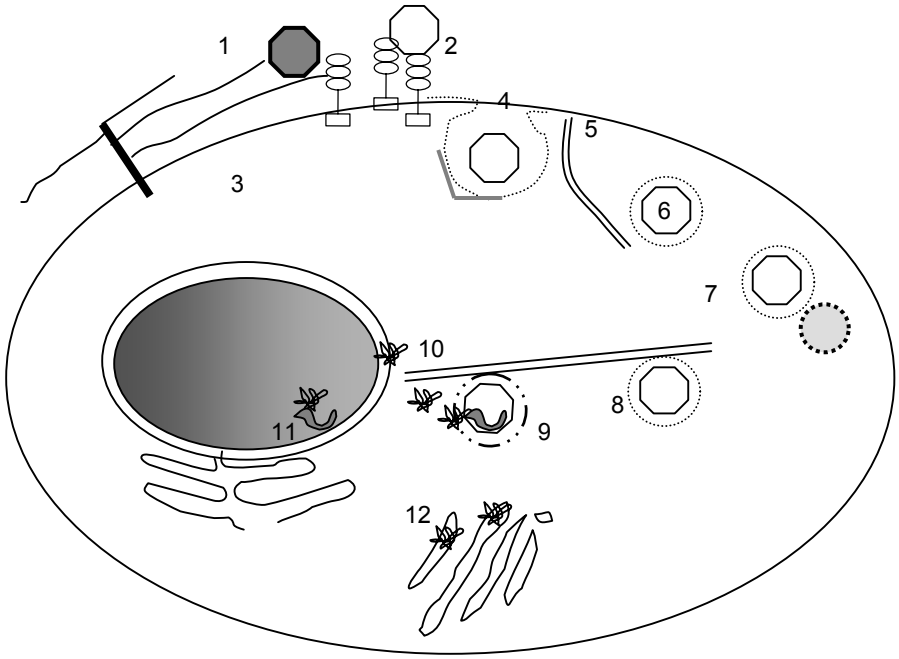


Abb. 4.49: Rezeptor-vermittelte Aufnahme von PV in Zellen

1. Papillomviren binden an Heparansulfate der Zelloberfläche und möglicherweise an sezerniertes Laminin, welches sich in verwundeten Haut- und Schleimhautbereichen befindet.
2. Der Übergang auf einen hochaffinen Rezeptor, der in den Keratinocyten die Virusaufnahme vermittelt, ist noch nicht bekannt.
3. Heparansulfat tragende Syndecan Core Proteine können die Aufnahme von Papillomviren in Zellen einleiten. Die Rolle der in der ECM enthaltenen Sulfotransferasen oder Heparanasen bei der Mobilisierung gebundener PV ist noch nicht untersucht.
4. In der Zellmembran entstehen coated Pits (EM). Das Clathrin Adapter Protein AP2 kann nachgewiesen werden. Clathrin coated vesicles werden in EM Präparaten an der Zellmembran beobachtet. Eine Ausnahme bilden HPV 31 und -58, für die eine Caveolae-abhängige Aufnahme beobachtet wurde.
5. Bei den frühen Transportvorgängen ist möglicherweise das Cytoskelett involviert, da dieser Schritt als Chlorpromazine-sensitiv beschrieben wird.

6. Co-Lokalisation mit Transferrin, einem Marker früher Endosomen
7. Nach einiger Zeit kann man in den Vesikeln den lysosomalen Marker LAMP-1 nachweisen, der durch eine Fusion zwischen PV-haltigen Endosomen und zellulären Lysosomen zu den L1 Proteinen gelangt ist.
8. Papillomviren werden in non-coated Vesikeln entlang der Mikrotubuli transportiert.
9. Es existieren Hinweise, dass eine Freisetzung der viralen DNA aus dem Endosom durch die lysogenen Eigenschaften des L2 C-Terminus erfolgen kann.
10. Für HPV 16 und HPV 45 Kapsomere konnte eine Interaktion mit Untereinheiten des nukleären Import Rezeptors Importin α2β1 an der Kernmembran gezeigt werden.
11. EM Aufnahmen und Immunfluoreszenzen BPV 1 infizierter Zellen weisen Kapsidproteine und die virale DNA im Nucleus nach.
12. Ein Teil der aufgenommenen Kapsidproteine findet sich noch in den Zisternen des Golgi Apparates.

4.6 Ausblick

Nachdem Heparansulfaten (HS) eine zentrale Rolle bei der Bindung humaner und boviner Papillomviren (PV) zugewiesen werden konnte, ist auch der Einfluss der HS Core Proteine bei der Bindung und der Aufnahme von PV von Interesse. Endgültig geklärt ist die Rolle der Syndecane bei der Aufnahme von PV noch nicht; es steht aber fest, dass sie dabei einen größeren Einfluss ausüben als Glypicane. Die noch offenen Fragen, ob alle Syndecane (Syndecan 1 bis 4) in der Lage sind, die Internalisierung von PV in unterschiedliche Zelltypen einzuleiten, werden vermutlich bald beantwortet sein. Ein zweiter hochaffiner Rezeptor, auf dessen Existenz es immer wieder indirekte Hinweise gab, ist in der Zwischenzeit nicht publiziert worden. Da aber bei mehreren, unterschiedlichen Heparin-bindenden Viren zusätzliche Moleküle als Co-Rezeptoren beschrieben wurden, ist eine solche Entdeckung auch bei den Papillomviren denkbar.

Nachdem 1999 erstmals eine Interaktion zwischen HPV 11 und Heparin nachgewiesen werden konnte, wurden in der vergangenen Zeit immer mehr PV identifiziert, die an Heparin und Heparansulfat binden und deren Internalisierung durch freies Heparin inhibiert werden kann (Joyce et al. 1999). Für HPV 16 und BPV 1 konnte die Bindung in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden; ebenso wurde es in der Zwischenzeit für die humanen „high risk“ Papillomviren 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 und 68 aber auch für „low risk“ Papillomviren wie HPV 11 und HPV 6b dokumentiert. Neuere Untersuchungen geben nun Hinweise darauf, dass sich PV Typen in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden können, da beispielsweise HPV 31 eine Heparin-unabhängige Bindung mit Keratinocyten eingeht (Patterson et al. 2005).

Seit der Entdeckung der PV-HS Interaktion werden mehrere HS-ähnliche Substanzen getestet, die bei anderen Heparansulfat-bindenden Viren als Mikrobizid eingesetzt werden (Christensen, Reed et al. 2001; Buck, Thompson et al. 2006). Die Identifikation einer definierten Saccharidsequenz im Heparansulfat, die für die Auswahl und die Infektion der Wirtszellen durch PV essentiell ist, gestaltet sich auf Grund der strukturellen Vielfalt der Heparansulfate, vor allem aber wegen der geringen Verfügbarkeit definiert modifizierter Oligosaccharide sehr aufwändig.

Jedoch ist es durch die Aufklärung der HPV 16 L1 VLP Struktur und die verbesserten Atomkoordinaten in den c-terminalen Domänen des L1 Proteins möglich, die Position umstrittener Regionen im VLP besser zu charakterisieren (Chen, Garcea et al. 2000). Dadurch ist die Identifikation weiterer Bindungsstellen für Antikörper, Heparansulfate oder Rezeptoren auf dem Viruskapsid zu erwarten.

5 Literaturverzeichnis

Ashrafi, G. H., M. R. Haghshenas, et al. (2005). "E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I." Int J Cancer **113**(2): 276-83.

Aumailley, M., R. Timpl, et al. (1990). "Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8." Exp Cell Res **188**(1): 55-60.

Baba, M., R. Snoeck, et al. (1988). "Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus." Antimicrob Agents Chemother **32**(11): 1742-5.

Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, et al. (2000). "Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage." J Virol **74**(4): 1641-7.

Bedell, M. A., J. B. Hudson, et al. (1991). "Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation." J Virol **65**(5): 2254-60.

Bennett, K. L., D. G. Jackson, et al. (1995). "CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor." J Cell Biol **128**(4): 687-98.

Benson, J. D., R. Lawande, et al. (1997). "Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins." J Virol **71**(10): 8041-7.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

Blitz, I. L. and L. A. Laimins (1991). "The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro." J Virol **65**(2): 649-56.

Booy, F. P., R. B. Roden, et al. (1998). "Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 A resolution." J Mol Biol **281**(1): 95-106.

Boring, C. C., T. S. Squires, et al. (1994). "Cancer statistics, 1994." CA Cancer J Clin **44**(1): 7-26.

Borradori, L. and A. Sonnenberg (1996). "Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 647-56.

Bosch, F. X. and S. de Sanjose (2002). "Human papillomavirus in cervical cancer." Curr Oncol Rep **4**(2): 175-83.

Boshart, M., L. Gissmann, et al. (1984). "A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer." Embo J **3**(5): 1151-7.

Bossis, I., R. B. Roden, et al. (2005). "Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection." J Virol **79**(11): 6723-31.

Bousarghin, L., P. Hubert, et al. (2005). "Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells." J Gen Virol **86**(Pt 5): 1297-305.

Bousarghin, L., A. Touze, et al. (2003). "Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor." J Gen Virol **84**(Pt 1): 157-64.

Bousarghin, L., A. Touze, et al. (2003). "Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells." J Virol **77**(6): 3846-50.

Bousarghin, L., A. Touze, et al. (2004). "Positively charged synthetic peptides from structural proteins of papillomaviruses abrogate human papillomavirus infectivity." J Med Virol **73**(3): 474-80.

Brielmeier, M., J. M. Bechet, et al. (1998). "Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection." Nucleic Acids Res **26**(9): 2082-5.

Briggs, M. W., J. L. Adam, et al. (2001). "The human papillomavirus type 16 E5 protein alters vacuolar H(+)-ATPase function and stability in Saccharomyces cerevisiae." Virology **280**(2): 169-75.

Brown, D. R., D. Kitchin, et al. (2006). "The human papillomavirus type 11 E1--E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope." Virology **345**(1): 290-8.

Brown, K. E., S. M. Anderson, et al. (1993). "Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus." Science **262**(5130): 114-7.

Buck, C. B., D. V. Pastrana, et al. (2005). "Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays." Methods Mol Med **119**: 445-62.

Buck, C. B., C. D. Thompson, et al. (2006). "Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection." PLoS Pathog **2**(7): e69.

Campo, M. S. (1997). "Bovine papillomavirus and cancer." Vet J **154**(3): 175-88.

Cardin, A. D., D. A. Demeter, et al. (1991). "Molecular design and modeling of protein-heparin interactions." Methods Enzymol **203**: 556-83.
Cardin, A. D. and H. J. Weintraub (1989). "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." Arteriosclerosis **9**(1): 21-32.
Carpentier, G. S., M. J. Fleury, et al. (2005). "Mutations on the FG surface loop of human papillomavirus type 16 major capsid protein affect recognition by both type-specific neutralizing antibodies and cross-reactive antibodies." J Med Virol **77**(4): 558-65.
Carter, J. J., G. C. Wipf, et al. (2003). "Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1." J Virol **77**(21): 11625-32.
Carter, J. J., G. C. Wipf, et al. (2006). "Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera." J Virol **80**(10): 4664-72.
Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.
Chen, T. M. and V. Defendi (1992). "Functional interaction of p53 with HPV18 E6, c-myc and H-ras in 3T3 cells." Oncogene **7**(8): 1541-7.
Chen, X. S., G. Casini, et al. (2001). "Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1." J Mol Biol **307**(1): 173-82.
Chen, X. S., R. L. Garcea, et al. (2000). "Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16." Mol Cell **5**(3): 557-67.
Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
Chow, L. T. and T. R. Broker (1997). "In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences." Clin Dermatol **15**(2): 217-27.
Christensen, N. D. (2005). "Emerging human papillomavirus vaccines." Expert Opin Emerg Drugs **10**(1): 5-19.
Christensen, N. D., N. M. Cladel, et al. (2001). "Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types." Virology **291**(2): 324-34.
Christensen, N. D., R. Kirnbauer, et al. (1994). "Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes." Virology **205**(1): 329-35.
Christensen, N. D., J. W. Kreider, et al. (1990). "Monoclonal antibody-mediated neutralization of infectious human papillomavirus type 11." J Virol **64**(11): 5678-81.
Christensen, N. D., C. A. Reed, et al. (1996). "Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus." J Virol **70**(2): 960-5.
Christensen, N. D., C. A. Reed, et al. (2001). "Papillomavirus microbicidal activities of high-molecular-weight cellulose sulfate, dextran sulfate, and polystyrene sulfonate." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3427-32.
Clasper, S., S. Vekemans, et al. (1999). "Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action." J Biol Chem **274**(34): 24113-23.
Combita, A. L., A. Touze, et al. (2002). "Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses." J Virol **76**(13): 6480-6.
Combita, A. L., A. Touze, et al. (2001). "Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate." FEMS Microbiol Lett **204**(1): 183-8.
Conrad, M., D. Goldstein, et al. (1994). "The E5 protein of HPV-6, but not HPV-16, associates efficiently with cellular growth factor receptors." Virology **200**(2): 796-800.
Crawford, L. V. and E. M. Crawford (1963). "A Comparative Study of Polyoma and Papilloma Viruses." Virology **21**: 258-63.
Culp, T. D. Budgeon, L. R. Christensen, N. D. (2006). "Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix componenet secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor." Virology **347** (1): 147-159.
Da Silva, D. M., D. V. Pastrana, et al. (2001). "Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines." Virology **290**(2): 350-60.
Da Silva, D. M., M. P. Velders, et al. (2001). "Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells." Int Immunol **13**(5): 633-41.
Dartmann, K., E. Schwarz, et al. (1986). "The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11." Virology **151**(1): 124-30.

Davidson, E. J., R. L. Faulkner, et al. (2004). "Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulval intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7)." Vaccine **22**(21-22): 2722-9.

Day, P. M., D. R. Lowy, et al. (2003). "Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway." Virology **307**(1): 1-11.

Day, P. M., R. B. Roden, et al. (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**(1): 142-50.

De Melker, A. A. and A. Sonnenberg (1996). "The role of the cytoplasmic domain of alpha 6 integrin in the assembly and function of alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4." Eur J Biochem **241**(1): 254-64.

de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.

Delwel, G. O., F. Hogervorst, et al. (1993). "Expression and function of the cytoplasmic variants of the integrin alpha 6 subunit in transfected K562 cells. Activation-dependent adhesion and interaction with isoforms of laminin." J Biol Chem **268**(34): 25865-75.

Deng, W., B. Y. Lin, et al. (2004). "Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase." J Virol **78**(24): 13954-65.

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

Doorbar, J., S. Ely, et al. (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." Nature **352**(6338): 824-7.

Dower, W. J., J. F. Miller, et al. (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-45.

Drobni, P., N. Mistry, et al. (2003). "Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester labeled papillomavirus virus-like particles fluoresce after internalization and interact with heparan sulfate for binding and entry." Virology. **310**(1): 163-72.

Durst, M., A. Kleinheinz, et al. (1985). "The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours." J Gen Virol **66 (Pt 7)**: 1515-22.

Elenius, K., A. Maatta, et al. (1992). "Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan." J Biol Chem **267**(9): 6435-41.

Epstein, A. L., Levy, R., Kim, H., Henle, W., Henle, G., and Kaplan, H. S., (1978). "Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines." Cancer **42**: 2379-2391.

Esko, J. D. and U. Lindahl (2001). "Molecular diversity of heparan sulfate." J Clin Invest. **108**(2): 169-73.

Evander, M., I. H. Frazer, et al. (1997). "Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses." J Virol **71**(3): 2449-56.

Faham, S., R. E. Hileman, et al. (1996). "Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor." Science **271**(5252): 1116-20.

Fausch, S. C., D. M. Da Silva, et al. (2003). "Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells." Cancer Res. **63**(13): 3478-82.

Fausch, S. C., D. M. Da Silva, et al. (2005). "Heterologous papillomavirus virus-like particles and human papillomavirus virus-like particle immune complexes activate human Langerhans cells." Vaccine **23**(14): 1720-9.

Favre, M., F. Breitburd, et al. (1974). "Hemagglutinating activity of bovine papilloma virus." Virology **60**(2): 572-8.

Favre, M., G. Orth, et al. (1975). "Human papillomavirus DNA: physical map." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(12): 4810-4.

Filla, M. S., G. David, et al. (2004). "Distribution of syndecans 1-4 within the anterior segment of the human eye: expression of a variant syndecan-3 and matrix-associated syndecan-2." Exp Eye Res **79**(1): 61-74.

Fleury, M. J., A. Touze, et al. (2006). "Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31." Arch Virol **151**(8): 1511-23.

Florin, L., K. A. Becker, et al. (2006). "Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2." J Virol **80**(13): 6691-6.

Florin, L., K. A. Becker, et al. (2004). "Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70." J Virol **78**(11): 5546-53.

Frattini, M. G. and L. A. Laimins (1994). "Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12398-402.

Frattini, M. G., H. B. Lim, et al. (1996). "In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 3062-7.

Frazer, I. H., R. Thomas, et al. (1999). "Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity." Immunol Rev **168**: 131-42.

Freyschmidt, E. J., A. Alonso, et al. (2004). "Activation of dendritic cells and induction of T cell responses by HPV 16 L1/E7 chimeric virus-like particles are enhanced by CpG ODN or sorbitol." Antivir Ther. **9**(4): 479-89.

Fried, H., L. D. Cahan, et al. (1981). "Polyoma virus recognizes specific sialyligosaccharide receptors on host cells." Virology **109**(1): 188-92.

Fry, E. E., S. M. Lea, et al. (1999). "The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex." Embo J **18**(3): 543-54.

Fusenig, N. E., Boukamp, P., Breitkreuz, D., Karjetta, S. and Petrusevska, R. T. (1987). "Oncogenes and Malignant Transformation of Human Keratinocytes." Anticarciogenesis and Radiation Protection. Plenum Publishing Group, New York **1**: 227-231.

Gallagher, J. T. (2001). "Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu." J Clin Invest. **108**(3): 357-61.

Giroglou, T., L. Florin, et al. (2001). "Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate." J Virol **75**(3): 1565-70.

Gissmann, L., W. Osen, et al. (2001). "Therapeutic vaccines for human papillomaviruses." Intervirology **44**(2-3): 167-75.

Goldie, S. J., D. Grima, et al. (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**(6): 896-904.

Goldstein, A. L., Chirigos, M. A. (1981). Lymphokines and Thymic Hormones: Their Potential Utilization. New York, Raven Press.

Gong, F., P. Jemth, et al. (2003). "Processing of macromolecular heparin by heparanase." J Biol Chem **278**(37): 35152-8.

Gornemann, J., T. G. Hofmann, et al. (2002). "Interaction of human papillomavirus type 16 L2 with cellular proteins: identification of novel nuclear body-associated proteins." Virology **303**(1): 69-78.

Hagensee, M. E., N. Yaegashi, et al. (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**(1): 315-22.

Hagner-McWhirter, A., J. P. Li, et al. (2004). "Irreversible glucuronyl C5-epimerization in the biosynthesis of heparan sulfate." J Biol Chem **279**(15): 14631-8.

Haley, P. E., M. F. Doyle, et al. (1989). "The activation of bovine protein C by factor Xa." J Biol Chem **264**(27): 16303-10.

Hallez, S., J. M. Brulet, et al. (2004). "Pre-clinical immunogenicity and anti-tumour efficacy of a deleted recombinant human papillomavirus type 16 E7 protein." Anticancer Res **24**(4): 2265-75.

Harper, D. M., E. L. Franco, et al. (2006). "Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial." Lancet **367**(9518): 1247-55.

Heino, P., J. Zhou, et al. (2000). "Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2." Virology **276**(2): 304-14.

Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-9.

Hoffmann, R., B. Hirt, et al. (2006). "Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance." J Virol **80**(9): 4431-9.

Hogervorst, F., I. Kuikman, et al. (1991). "Molecular cloning of the human alpha 6 integrin subunit. Alternative splicing of alpha 6 mRNA and chromosomal localization of the alpha 6 and beta 4 genes." Eur J Biochem **199**(2): 425-33.

Horton, R. M., H. D. Hunt, et al. (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**(1): 61-8.

Howley, P. M., M. Scheffner, et al. (1991). "Oncoproteins encoded by the cancer-associated human papillomaviruses target the products of the retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 149-55.

Huang, S. M. and D. J. McCance (2002). "Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF." J Virol **76**(17): 8710-21.

Hubert, P., J. H. Caberg, et al. (2005). "E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions." J Pathol **206**(3): 346-55.
Innis, M. A., K. B. Myambo, et al. (1988). "DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9436-40.
Iozzo, R. V. (2001). "Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions." J Clin Invest. **108**(2): 165-7.
Ishii, Y., S. Ozaki, et al. (2005). "Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding." Virus Genes **31**(3): 321-8.
Jackson, D. G., J. I. Bell, et al. (1995). "Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon." J Cell Biol **128**(4): 673-85.
Jackson, S. and A. Storey (2000). "E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage." Oncogene **19**(4): 592-8.
Jackson, T., F. M. Ellard, et al. (1996). "Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate." J Virol **70**(8): 5282-7.
Jemth, P., E. Smeds, et al. (2003). "Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase substrate specificity." J Biol Chem **278**(27): 24371-6.
Joyce, J. G., J. S. Tung, et al. (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**(9): 5810-22.
Kamper, N., P. M. Day, et al. (2006). "A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes." J Virol. **80**(2): 759-68.
Kern, A., K. Schmidt, et al. (2003). "Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids." J Virol. **77**(20): 11072-81.
Kim, S. H., Y. S. Juhnn, et al. (2006). "Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt." Cell Mol Life Sci **63**(7-8): 930-8.
Kirnbauer, R., L. M. Chandrachud, et al. (1996). "Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization." Virology **219**(1): 37-44.
Kirnbauer, R., J. Taub, et al. (1993). "Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles." J Virol **67**(12): 6929-36.
Klumpp, D. J. and L. A. Laimins (1999). "Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1." Virology **257**(1): 239-46.
Klumpp, D. J., F. Stubenrauch, et al. (1997). "Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication." J Virol **71**(11): 8186-94.
Krieg, P. A. and D. A. Melton (1984). "Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs." Nucleic Acids Res **12**(18): 7057-70.
Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
Laimins, L. A. (1993). "The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer." Infect Agents Dis **2**(2): 74-86.
Lancaster, W. D., C. Olson, et al. (1977). "Bovine papilloma virus: presence of virus-specific DNA sequences in naturally occurring equine tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(2): 524-8.
Laquerre, S., R. Argnani, et al. (1998). "Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread." J Virol **72**(7): 6119-30.
Le Pecq, J. B. (1971). "Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurement of their associated enzymes." Methods Biochem Anal **20**: 41-86.
Li, J. P., F. Gong, et al. (2001). "Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate." J Biol Chem **276**(23): 20069-77.
Li, W., H. Liu, et al. (2004). "Carboxyl terminus truncated human papillomavirus type 58 L1 protein maintains its bioactivity and ability to form virus-like particles." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **24**(6): 537-9.
Lindahl, U. (1999). "What else can 'Heparin' do?" Haemostasis **29 Suppl S1**: 38-47.
Liu, J., Z. Shriver, et al. (1999). "Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues." J Biol Chem **274**(53): 38155-62.
Liu, J. and S. C. Thorp (2002). "Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections." Med Res Rev. **22**(1): 1-25.

Liu, W. J., Y. M. Qi, et al. (2001). "Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules." Virology **282**(2): 237-44.
Liu, Y., I. H. Frazer, et al. (2001). "Efficiency of delivery of DNA to cells by bovine papillomavirus type-1 L1/L2 pseudovirions." Appl Microbiol Biotechnol **56**(1-2): 150-6.
Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 362-72.
Lowy, D. R. and J. T. Schiller (2006). "Prophylactic human papillomavirus vaccines." J Clin Invest **116**(5): 1167-73.
Lozzio, B. B. and C. B. Lozzio (1977). "Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia." Int J Cancer **19**(1): 136.
Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-34.
Ludmerer, S. W., D. Benincasa, et al. (1996). "Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11." J Virol **70**(7): 4791-4.
Ludmerer, S. W., D. Benincasa, et al. (1997). "A neutralizing epitope of human papillomavirus type 11 is principally described by a continuous set of residues which overlap a distinct linear, surface-exposed epitope." J Virol **71**(5): 3834-9.
Ludmerer, S. W., W. L. McClements, et al. (2000). "HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain." Virology **266**(2): 237-45.
Lycke, E., M. Johansson, et al. (1991). "Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process." J Gen Virol **72**(Pt 5): 1131-7.
Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." Oncogene **20**(54): 7874-87.
Mattil-Fritz, S. (2002). "Chimäre Virus-ähnliche Partikel des Bovinen Papillomavirus Typ 1: Herstellung, Charakterisierung und Verwendung in einer klinischen Phase-I- Studie zur Immuntherapie des equinen Sarkoids." Dissertation.
Mazurek, S., W. Zwerschke, et al. (2001). "Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex." Biochem J **356**(Pt 1): 247-56.
McCance, D. J., R. Kopan, et al. (1988). "Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7169-73.
McClements, W. L., X. M. Wang, et al. (2001). "A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1." Virology **289**(2): 262-8.
McMillan, N. A., E. Payne, et al. (1999). "Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells." Virology **261**(2): 271-9.
Melton, D. A., P. A. Krieg, et al. (1984). "Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter." Nucleic Acids Res **12**(18): 7035-56.
Middleton, K., W. Peh, et al. (2003). "Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers." J Virol **77**(19): 10186-201.
Modis, Y., B. L. Trus, et al. (2002). "Atomic model of the papillomavirus capsid." Embo J. **21**(18): 4754-62.
Modrow, S. and D. Falke (1997). Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
Muller, M., L. Gissmann, et al. (1995). "Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species." J Virol **69**(2): 948-54.
Muller, M., J. Zhou, et al. (1997). "Chimeric papillomavirus-like particles." Virology **234**(1): 93-111.
Nagai, K. a. T., C. (1984). "Generation of beta-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia Coli*." Nature **309**: 810-812.
Nickolaus, P. (1996). Charakterisierung des If-1 Effekts und molekulare Klonierung von Interferon-induzierbaren cDNAs, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
Niessen, C. M., F. Hogervorst, et al. (1994). "The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin." Exp Cell Res **211**(2): 360-7.
Nishimura, A., T. Nakahara, et al. (2006). "Requirement of E7 oncoprotein for viability of HeLa cells." Microbes Infect **8**(4): 984-93.
Oh, S. T., S. Kyo, et al. (2001). "Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites." J Virol **75**(12): 5559-66.

Okun, M. M., P. M. Day, et al. (2001). "L1 interaction domains of papillomavirus l2 necessary for viral genome encapsidation." J Virol **75**(9): 4332-42.
Paintsil, J., M. Muller, et al. (1996). "Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation." Virology **223**(1): 238-44.
Palefsky, J. M., J. M. Berry, et al. (2006). "A trial of SGN-00101 (HspE7) to treat high-grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive individuals." Aids **20**(8): 1151-5.
Pastrana, D. V., W. C. Vass, et al. (2001). "NHPV16 VLP vaccine induces human antibodies that neutralize divergent variants of HPV16." Virology **279**(1): 361-9.
Patterson, N. A., J. L. Smith, et al. (2005). "Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate." J Virol. **79**(11): 6838-47.
Pepinsky, R. B., E. J. Androphy, et al. (1994). "Specific inhibition of a human papillomavirus E2 trans-activator by intracellular delivery of its repressor." DNA Cell Biol **13**(10): 1011-9.
Petitou, M., B. Casu, et al. (2003). "1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site." Biochimie **85**(1-2): 83-9.
Pfister, H., F. Nurnberger, et al. (1981). "Characterization of a human papillomavirus from epidermodysplasia verruciformis lesions of a patient from Upper-volta." Int J Cancer **27**(5): 645-50.
Pinhal, M. A., B. Smith, et al. (2001). "Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A. **98**(23): 12984-9. Epub 2001 Oct 30.
Poland, G. A., R. M. Jacobson, et al. (2005). "Immunogenicity and reactogenicity of a novel vaccine for human papillomavirus 16: a 2-year randomized controlled clinical trial." Mayo Clin Proc. **80**(5): 601-10.
Potter, H., L. Weir, et al. (1984). "Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(22): 7161-5.
Prakash, S. S., S. R. Grossman, et al. (1992). "Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator." Genes Dev **6**(1): 105-16.
Pray, T. R. and L. A. Laimins (1995). "Differentiation-dependent expression of E1--E4 proteins in cell lines maintaining episomes of human papillomavirus type 31b." Virology **206**(1): 679-85.
Qi, Y. M., S. W. Peng, et al. (1996). "Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein." Virology **216**(1): 35-45.
Qiu, J., A. Handa, et al. (2000). "The interaction of heparin sulfate and adeno-associated virus 2." Virology **269**(1): 137-47.
Rangasamy, D., K. Woytek, et al. (2000). "SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation." J Biol Chem **275**(48): 37999-8004.
Regenmortel, M. H. V. v. (2001). Papillomaviridae. Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses
7th report of the international comittee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, London.
Roberts, S., I. Ashmole, et al. (1993). "Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells." Virology **197**(1): 176-87.
Roden, R. and T. C. Wu (2003). "Preventative and therapeutic vaccines for cervical cancer." Expert Rev Vaccines **2**(4): 495-516.
Roden, R. B., A. Armstrong, et al. (1997). "Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope." J Virol **71**(8): 6247-52.
Roden, R. B., P. M. Day, et al. (2001). "Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection." J Virol **75**(21): 10493-7.
Roden, R. B., H. L. Greenstone, et al. (1996). "In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype." J Virol **70**(9): 5875-83.
Roden, R. B., N. L. Hubbert, et al. (1995). "Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor." J Virol **69**(8): 5147-51.
Roden, R. B., N. L. Hubbert, et al. (1996). "Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition." J Virol **70**(5): 3298-301.
Roden, R. B., R. Kirnbauer, et al. (1994). "Interaction of papillomaviruses with the cell surface." J Virol **68**(11): 7260-6.
Roden, R. B., W. H. t. Yutzy, et al. (2000). "Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes." Virology **270**(2): 254-7.
Romaris, M., C. Coomans, et al. (1999). "Molecular polymorphism of the syndecans. Identification of a hypo-glycanated murine syndecan-1 splice variant." J Biol Chem **274**(26): 18667-74.

Rong, J., H. Habuchi, et al. (2000). "Expression of heparan sulphate L-iduronyl 2-O-sulphotransferase in human kidney 293 cells results in increased D-glucuronyl 2-O-sulphation." Biochem J **346 Pt 2**: 463-8.
Rong, J., H. Habuchi, et al. (2001). "Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase." Biochemistry **40**(18): 5548-55.
Rose, R. C., W. Bonnez, et al. (1993). "Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles." J Virol **67**(4): 1936-44.
Rossi, J. L., L. Gissmann, et al. (2000). "Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in Saccharomyces cerevisiae." Hum Gene Ther **11**(8): 1165-76.
Rue, C. A. and P. Ryan (2002). "Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparan sulfate proteoglycans." J Gen Virol **83**(Pt 2): 301-9.
Saphire, A. C., M. D. Bobardt, et al. (2001). "Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages." J Virol **75**(19): 9187-200.
Sapp, M., C. Fligge, et al. (1998). "Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines." J Virol **72**(7): 6186-9.
Sapp, M., U. Kraus, et al. (1994). "Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein." J Gen Virol **75**(Pt 12): 3375-83.
Sapp, M. and H. C. Selinka (2005). "Generation and applications of HPV pseudovirions using vaccinia virus." Methods Mol Med. **119**: 463-82.
Sapp, M. and H. C. Selinka (2005). "Pseudovirions as specific tools for investigation of virus interactions with cells." Methods Mol Biol. **292**: 197-212.
Sasagawa, T., P. Pushko, et al. (1995). "Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast Schizosaccharomyces pombe." Virology **206**(1): 126-35.
Sasaki, T., H. Larsson, et al. (1999). "Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin." Embo J **18**(22): 6240-8.
Schafer, F., L. Florin, et al. (2002). "DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo." Virology. **295**(1): 172-81.
Scheffner, M., J. M. Huibregtse, et al. (1994). "Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8797-801.
Scheffner, M., K. Munger, et al. (1992). "Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins." Embo J **11**(7): 2425-31.
Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-36.
Scheffner, M. and N. J. Whitaker (2003). "Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system." Semin Cancer Biol **13**(1): 59-67.
Scheinfeld, N. and D. S. Lehman (2006). "An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts." Dermatol Online J **12**(3): 5.
Scheinfeld, N. S. (2006). "Treatment of verruca vulgaris." Skinmed **5**(1): 37-8.
Schwarz, E., U. K. Freese, et al. (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." Nature **314**(6006): 111-4.
Sebestyen, A., M. Gallai, et al. (2000). "Cytokine regulation of syndecan expression in cells of liver origin." Cytokine **12**(10): 1557-60.
Selinka, H. C., T. Giroglou, et al. (2003). "Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations." J Virol. **77**(24): 12961-7.
Selinka, H. C., T. Giroglou, et al. (2002). "Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions." Virology. **299**(2): 279-287.
Shafti-Keramat, S., A. Handisurya, et al. (2003). "Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses." J Virol. **77**(24): 13125-35.
Shapiro, D. J. (1981). "Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA." Anal Biochem **110**(1): 229-31.
Shieh, M. T., D. WuDunn, et al. (1992). "Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans." J Cell Biol **116**(5): 1273-81.
Shope, R. E. a. H., E. W. (1933). "Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology." J. Exp. Med. **58**: 607-624.
Sibbet, G., C. Romero-Graillet, et al. (2000). "alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4." J Gen Virol **81 Pt 6**: 1629.
Song, S., A. Liem, et al. (2000). "Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis." Virology **267**(2): 141-50.

Sonnenberg, A., J. Calafat, et al. (1991). "Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion." J Cell Biol **113**(4): 907-17.
Sonnenberg, A., C. J. Linders, et al. (1990). "The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties." J Cell Sci **96**(Pt 2): 207-17.
Sparkowski, J., Anders, J., and Schlegel, R. (1994). "Mutation of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein at amino acid 17 generates both high- and low- transforming variants." Journal of Virology **68**(9): 6120-3.
Spear, P. G., M. T. Shieh, et al. (1992). "Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus." Adv Exp Med Biol **313**: 341-53.
Stehle, T. and S. C. Harrison (1996). "Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments." Structure **4**(2): 183-94.
Stehle, T., Y. Yan, et al. (1994). "Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment." Nature **369**(6476): 160-3.
Steinfeld, R., H. Van Den Berghe, et al. (1996). "Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican." J Cell Biol **133**(2): 405-16.
Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." Semin Cancer Biol **9**(6): 379-86.
Stunkel, W. and H. U. Bernard (1999). "The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression." J Virol **73**(3): 1918-30.
Summerford, C. and R. J. Samulski (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." J Virol **72**(2): 1438-45.
Sun, X. Y., I. Frazer, et al. (1995). "Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein." Virology **213**(2): 321-7.
Suprynowicz, F. A., G. L. Disbrow, et al. (2005). "Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16?" Virology **332**(1): 102-13.
Tal-Singer, R., C. Peng, et al. (1995). "Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules." J Virol **69**(7): 4471-83.
Thomas, M., D. Pim, et al. (1999). "The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV." Oncogene **18**(53): 7690-700.
Toida, T., R. E. Hileman, et al. (1996). "Enzymatic preparation of heparin oligosaccharides containing antithrombin III binding sites." J Biol Chem **271**(50): 32040-7.
Trybala, E., T. Bergstrom, et al. (1996). "Mode of interaction between pseudorabies virus and heparan sulfate/heparin." Virology **218**(1): 35-42.
Trybala, E., T. Bergstrom, et al. (1994). "Localization of a functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulphate." J Gen Virol **75**(Pt 4): 743-52.
Trybala, E., B. Svennerholm, et al. (1993). "Herpes simplex virus type 1-induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate." J Virol **67**(3): 1278-85.
Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-6.
Unckell, F., R. E. Streeck, et al. (1997). "Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33." J Virol **71**(4): 2934-9.
Vambutas, A., J. DeVoti, et al. (2001). "Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport." Clin Immunol **101**(1): 94-9.
Vandepapeliere, P., R. Barrasso, et al. (2005). "Randomized controlled trial of an adjuvanted human papillomavirus (HPV) type 6 L2E7 vaccine: infection of external anogenital warts with multiple HPV types and failure of therapeutic vaccination." J Infect Dis **192**(12): 2099-107.
Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J.and McCawley, P. (1977). "The Establishment of Two Cell Lines from the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Nuctuidae)." In Vitro **13**: 213-217.
Villa, L. L., K. A. Ault, et al. (2006). "Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18." Vaccine **24**(27-28): 5571-83.
Vives, R. R., D. A. Pye, et al. (1999). "Sequence analysis of heparan sulphate and heparin oligosaccharides." Biochem J **339 (Pt 3)**: 767-73.
Volpers, C., F. Unckell, et al. (1995). "Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells." J Virol **69**(6): 3258-64.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-9.
Walker, E. B., L. L. Lanier, et al. (1982). "Characterization and functional properties of tumor cell lines in accessory cell replacement assays." J Immunol **128**(2): 852-9.
Wei, J., L. M. Shaw, et al. (1997). "Integrin signaling in leukocytes: lessons from the alpha6beta1 integrin." J Leukoc Biol **61**(4): 397-407.
White, W. I., S. D. Wilson, et al. (1998). "In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16." J Virol **72**(2): 959-64.
Witvrouw, M. and E. De Clercq (1997). "Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs." Gen Pharmacol **29**(4): 497-511.
Woytek, K. J., D. Rangasamy, et al. (2001). "Effects of mutations within two hydrophilic regions of the bovine papillomavirus type 1 E1 DNA-binding domain on E1-E2 interaction." J Gen Virol **82**(Pt 10): 2341-51.
Wu, H. F., R. L. Lundblad, et al. (1995). "Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin." Blood **85**(2): 421-8.
WuDunn, D. and P. G. Spear (1989). "Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate." J Virol **63**(1): 52-8.
Xiao, B., J. Spencer, et al. (2003). "Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2363-8.
Yamada, S., K. Yoshida, et al. (1993). "Structural studies on the bacterial lyase-resistant tetrasaccharides derived from the antithrombin III-binding site of porcine intestinal heparin." J Biol Chem **268**(7): 4780-7.
Yan, M., J. Peng, et al. (2004). "Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells." Virology **324**(2): 297-310.
Yang, R., P. M. Day, et al. (2003). "Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection." J Virol **77**(6): 3531-41.
Zhang, B., A. Srirangam, et al. (2005). "HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes." Oncogene **24**(15): 2585-8.
Zhao, K. N., K. Hengst, et al. (2000). "BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions." Virology **272**(2): 382-93.
Zheng, Z. M. and C. C. Baker (2006). "Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation." Front Biosci **11**: 2286-302.
Zhou, J., J. Doorbar, et al. (1991). "Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein." Virology **185**(2): 625-32.
Zhou, J., L. Gissmann, et al. (1995). "Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions." Virology **214**(1): 167-76.
Zhou, J., X. Y. Sun, et al. (1994). "Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence." J Virol **68**(2): 619-25.
Zhou, J., X. Y. Sun, et al. (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**(1): 251-7.
Zimmermann, P. and G. David (1999). "The syndecans, tuners of transmembrane signaling." Faseb J **13 Suppl**: S91-S100.
zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F55-78.
zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.

6 Appendix

6.1 Tagungsbeiträge

Katja Parsche, Rainer Zawatzky, Catherine Sautes, Arnaud Sonnenberg and Martin Müller (2002). „Interaction of Papillomaviruses with cell surface molecules“. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Virologie. Posterpräsentation. Erlangen, 8.-11. April 2002

Katja Parsche (2001). “Interaction of Papillomaviruses with cells In-vitro“ and “Introduction into the Biology of HPV”. 5th Graduiertenkolleg for PhD students of the DKFZ. Vortrag und Posterpräsentation. Oberreifenberg, 13.-15. Mai 2001

Katja Parsche, Catherine Sautes, Arnaud Sonnenberg and Martin Müller (2001). „Interaktionen von Papillomviren mit Heparin und zellulärem Heparansulfat“ DKFZ Graduierten Programm, Präsentation wissenschaftlicher Arbeiten. Posterpräsentation. Heidelberg, 15.-18. Januar 2001

Katja Parsche, Juan Rossi, Arnaud Sonnenberg and Martin Müller (2000). „Interaktionen von Papillomvirem mit Zellen in vitro – Integrin-α6 entscheidet nicht über eine erfolgreiche Infektion“ DKFZ Graduierten Programm, Präsentation wissenschaftlicher Arbeiten. Posterpräsentation. Heidelberg, 10.-14. Januar 2000