

**Entwicklung eines  
Produktions- und DNA-Verpackungs-Systems  
für Virus-ähnliche Partikel des  
humanpathogenen Papillomavirus Typ 16**

**D i s s e r t a t i o n**

**der Fakultät für Biologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt**

**von**

**Marcel-Alexander Jung**

**aus Darmstadt**

**2004**

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2004**

**Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Lutz Gissmann**

**für Tanja und meine Eltern**

### Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Martin Müller für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes sowie für die Betreuung.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans Georg Rammensee für die Übernahme des Gutachtens, die unkomplizierte Abwicklung von Tübingen aus sowie für seine Unterstützung danken.

Gleichermaßen gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann für die stets konstruktive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Pascal Tomakidi danken, der durch seine vorbildliche Motivation und Unterstützung zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Dr. Nico Michel, Sabine Bolte, Dr. Janina Görnemann, Tim Nötzel, Diana Maas, Katja Parsche, Dr. Steffanie Mattil-Fritz, Hinke Dekter, Elisa Kieback und Maja Gasparic aussprechen, die stets zum angenehmen Klima im Labor beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich Sabrina Schumacher, Katalin Palfi, Georg Pougialis sowie Aniko Palfi für die technische Assistenz danken.

Außerdem gilt ein besonderer Dank Dr. Dirk Kuck, Dr. Steffanie Kronenberg und Lars Krüger für die Unterstützung bei der Arbeit mit Ad und AAV.

Genauso dankbar bin ich Birgit Hub für die unermüdliche Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie allen sonstigen Kolleginnen und Kollegen, die durch direkte materielle Hilfe, nützliche Tipps oder wissenschaftliche Diskussion zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders bei Tanja sowie meinen Eltern bedanken, die mir in allen Lagen mit hohem Engagement zur Seite gestanden haben und auf deren Unterstützung ich zu jeder Zeit zählen konnte.

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	PAPILLOMAVIREN .....	1
1.1.1	<i>Klassifizierung und grundlegende Charakteristika.....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Morphologische Kennzeichen .....</i>	<i>1</i>
1.1.3	<i>Genom, Genomaufbau und grundlegende Proteinfunktionen .....</i>	<i>2</i>
1.2	DAS HUMANE PAPILLOMAVIRUS.....	4
1.2.1	<i>Epidemiologie und Übertragung.....</i>	<i>4</i>
1.2.2	<i>Klinik.....</i>	<i>5</i>
1.2.3	<i>Virusproteine und deren Rolle im Infektionszyklus der HPVs.....</i>	<i>5</i>
1.2.4	<i>Behandlung und Vorbeugung von Papillomavirus-assoziierten Erkrankungen.....</i>	<i>13</i>
1.2.5	<i>Problematik der in vitro Herstellung von humanen Papillomaviren .....</i>	<i>15</i>
1.3	ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	18
<b>2.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>20</b>
2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE MATERIALIEN .....	20
2.1.1	<i>Plasmide.....</i>	<i>20</i>
2.1.2	<i>Antikörper .....</i>	<i>20</i>
2.1.3	<i>Synthetische Oligonukleotide (Primer) .....</i>	<i>21</i>
2.2	BIOLOGISCHE MATERIALIEN .....	21
2.2.1	<i>Viren.....</i>	<i>21</i>
2.2.2	<i>Bakterienstämme (E. coli).....</i>	<i>21</i>
2.2.3	<i>Eukaryotische Zell-Linien .....</i>	<i>21</i>
2.3	KULTURMEDIEN UND -LÖSUNGEN.....	22
2.3.1	<i>Bakterienkultur.....</i>	<i>22</i>
2.3.2	<i>Kultur eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>22</i>
2.3.3	<i>Kultur von Insektenzellen.....</i>	<i>23</i>
2.4	MATERIALIEN FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE TECHNIKEN .....	23
2.4.1	<i>Plasmidaufarbeitung in kleinen Mengen aus E. coli („Miniprep“).....</i>	<i>23</i>
2.4.2	<i>Plasmidaufarbeitung in großen Mengen aus E. coli („Maxiprep“).....</i>	<i>23</i>
2.4.3	<i>Präparation von episomaler DNA (nach Hirt).....</i>	<i>24</i>
2.4.4	<i>Transfektion eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>24</i>
2.4.5	<i>Induktion von Apoptose in eukaryotischen Zellen.....</i>	<i>25</i>
2.4.6	<i>Extraktion von virus-ähnlichen Partikeln (VLP) aus Säugierzellen.....</i>	<i>25</i>
2.4.7	<i>Elektrophoresepuffer und -lösungen .....</i>	<i>25</i>
2.4.8	<i>DNA Längenmarker .....</i>	<i>26</i>
2.4.9	<i>Molekulargewichtsmarker für Proteingele.....</i>	<i>26</i>
2.4.10	<i>Western Blot.....</i>	<i>26</i>
2.4.11	<i>Southern Blot.....</i>	<i>27</i>
2.4.12	<i>Infektionsexperimente mit VLPs/PVs .....</i>	<i>28</i>
2.4.13	<i>Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (AAV).....</i>	<i>28</i>
2.4.14	<i>AAV Genomtitration.....</i>	<i>29</i>
2.4.15	<i>Indirekte Immunfluoreszenz .....</i>	<i>29</i>
2.4.16	<i>ELISA .....</i>	<i>29</i>
2.4.17	<i>Radioaktivität.....</i>	<i>30</i>
2.4.18	<i>Elektronenmikroskopie.....</i>	<i>30</i>
2.4.19	<i>Chemikalien.....</i>	<i>30</i>
2.4.20	<i>Enzyme .....</i>	<i>30</i>
2.4.21	<i>Standardlösungen.....</i>	<i>31</i>
2.4.22	<i>Kits .....</i>	<i>31</i>
2.4.23	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>32</i>
2.4.24	<i>Geräte und Hilfsmittel.....</i>	<i>33</i>
2.4.25	<i>Computerprogramme .....</i>	<i>34</i>
<b>3.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>35</b>
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	35
3.1.1	<i>Bakterienkultivierung.....</i>	<i>35</i>
3.1.2	<i>Bakterienkonservierung .....</i>	<i>35</i>
3.1.3	<i>Restriktionsverdau von DNA.....</i>	<i>35</i>
3.1.4	<i>Replikationsanalyse mittels DpnI / HindIII gestützter Restriktion.....</i>	<i>36</i>

3.1.5	<i>Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden</i> .....	36
3.1.6	<i>Auffüllen von 5'-Überhängen</i> .....	37
3.1.7	<i>Ligation</i> .....	37
3.1.8	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i> .....	37
3.1.9	<i>Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen</i> .....	38
3.1.10	<i>Horizontale Agarosegelelektrophorese</i> .....	39
3.1.11	<i>Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen</i> .....	39
3.1.12	<i>Reinigung von DNA durch Phenolextraktion</i> .....	39
3.1.13	<i>Aufkonzentrierung von DNA durch Präzipitation</i> .....	40
3.1.14	<i>Herstellung elektrokompenter E. coli</i> .....	40
3.1.15	<i>Transformation von E. coli durch Elektroporation</i> .....	40
3.1.16	<i>Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterien</i> .....	41
3.1.17	<i>Plasmid-DNA Präparation</i> .....	41
3.1.18	<i>Southern Blot</i> .....	44
3.1.19	<i>Dot Blot (AAV Genom Titration)</i> .....	47
3.1.20	<i>Proteinextraktionsmethoden</i> .....	47
3.1.21	<i>Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz</i> .....	48
3.1.22	<i>„Enzym Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)</i> .....	49
3.1.23	<i>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	49
3.1.24	<i>Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen</i> .....	50
3.1.25	<i>Western Blot und Chemilumineszenz-Nachweis</i> .....	50
3.1.26	<i>Dialyse und Lagerung aufgereinigter Proteine</i> .....	51
3.1.27	<i>Aufreinigung von Proteinen im Saccharosegradienten</i> .....	51
3.1.28	<i>VLP-Blockierungsexperimente mit neutralisierenden Antikörpern</i> .....	52
3.2	<b>KULTUR UND MANIPULATION EUKARYOTISCHER ZELLEN</b> .....	52
3.2.1	<i>Kultur immortalisierter Zelllinien</i> .....	52
3.2.2	<i>Kultur von Insektenzellen</i> .....	52
3.2.3	<i>Kryokonservierung von Zellen</i> .....	52
3.2.4	<i>Bestimmung der Zellzahl und Vitalität</i> .....	53
3.2.5	<i>Transfektion eukaryotischer Zellen</i> .....	53
3.2.6	<i>Induktion von Apoptose</i> .....	55
3.2.7	<i>Herstellung rekombinanter AAV</i> .....	56
3.2.8	<i>Infektion mit rAAV</i> .....	57
3.2.9	<i>Superinfektion mit Adenovirus</i> .....	57
3.2.10	<i>Bakulovirus vermittelte Infektion von Insektenzellen</i> .....	57
3.2.11	<i>VLP- bzw. PV-Infektion von eukaryotischen Zell-Linien</i> .....	58
3.3	<b>ELEKTRONENMIKROSKOPIE</b> .....	59
3.3.1	<i>Nachweis von VLPs in eukaryotischen Zellen</i> .....	59
3.3.2	<i>Nachweis von VLPs in Saccharosegradienten-Fractionen</i> .....	59
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>60</b>
4.1	<b>HERSTELLUNG DES VERPACKUNGSPASMIDS</b> .....	60
4.2	<b>EVALUATION VERSCHIEDENER TRANSFEKTIONSMETHODEN</b> .....	62
4.3	<b>HERSTELLUNG VON VLPs BZW. PVs</b> .....	63
4.3.1	<i>Prinzip der Herstellung von VLPs bzw. PVs</i> .....	63
4.3.2	<i>Expression der VLP-Komponenten</i> .....	65
4.3.3	<i>Replikationsnachweis des Targetplasmids</i> .....	69
4.3.4	<i>Gewinnung von VLPs durch Verwendung von rAAV</i> .....	70
4.3.5	<i>Gewinnung von VLPs durch Verwendung von transienter Transfektion</i> .....	72
4.3.6	<i>VLP Präparationsanalytik</i> .....	76
4.4	<b>INFEKTIONSEXPERIMENTE MIT VORGEKLÄRTEN ZELLEXTRAKTEN</b> .....	79
4.4.1	<i>Blockierung unspezifischer Infektionen durch Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern</i> .....	81
4.5	<b>VLP SEDIMENTATIONSANALYSE MITTELS DICHTEGradientENZENTRIFUGATION</b> .....	81
4.5.1	<i>Vorversuche zur Analyse von VLPs mittels Dichtegradientenzentrifugation</i> .....	82
4.5.2	<i>Hauptversuche zur Analyse von VLPs mittels Dichtegradientenzentrifugation</i> .....	86
4.6	<b>SONSTIGE INFEKTIONSEXPERIMENTE MIT SACCHAROSE-FRAKTIONEN</b> .....	102
4.6.1	<i>Infektion mit kompletten Saccharosegradienten-Fractionen</i> .....	102

<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>103</b>
5.1	DIE EXPRESSIONSREGULATION VON HPV16 L1 UND L2 KANN DURCH KODONOPTIMIERUNG ÜBERWUNDEN WERDEN .....	103
5.2	ASSEMBLIERUNGS- UND VERPACKUNGSVERHALTEN VON VIRUS-ÄHNLICHEN PARTIKELN (VLPs) UNTER VERWENDUNG KODON-OPTIMIERTER EXPRESSIONSPASMIDE .....	104
5.2.1	<i>Modulation der Verpackungseffizienz</i> .....	109
5.3	VLP-PRODUKTIONS- UND PRÄPARATIONSTECHNIKEN .....	110
5.3.1	<i>Herstellung von VLPs mittels rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV)</i> .....	113
5.4	DIE INFESTION MIT UNGEREINIGTEN ZELLEXTRAKTEN FÜHRT ZU UNSPEZIFISCHEN TRANSDUKTIONEN .....	114
5.5	SEDIMENTATIONSVERHALTEN VON VLPs IM SACCHAROSEGRADIENTEN .....	114
5.6	EINFLUSS VON E1 UND E2 AUF DIE REPLIKATION DES TARGETPLASMIDS UND DIE VERPACKUNG VON VLPs .....	118
5.7	VERBESSERUNG DER KAPSIDBILDUNG DURCH VERWENDUNG DES REPLIKATIONSURSPRUNGS UND T-ANTIGENS VON SV40 .....	119
5.8	VERLUST VON VLPs WÄHREND DEN PRÄPARATIONS- UND AUFREINIGUNGSZYKLEN .....	121
5.9	AUSBLICK .....	124
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>126</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>128</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>8-132</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>9-140</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>10-142</b>
<b>11.</b>	<b>IMPRESSUM.....</b>	<b>11-143</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Papillomaviren

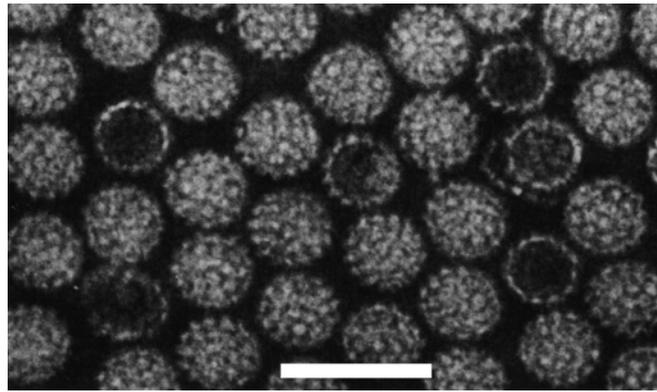
### 1.1.1 Klassifizierung und grundlegende Charakteristika

Papillomaviren, die zur Familie der *Papillomaviridae* gehören (Van Regenmortel 2000) sind weltweit verbreitet und verursachen in der Haut des Menschen sowie bei vielen Wirbeltieren primär gutartige Neubildungen (sog. Warzen oder Papillome). Die Zuordnung eines bestimmten Papillomavirus hinsichtlich seines Genus erfolgt über die Wirtsart, die es infiziert, wobei eine weitere Unterteilung der einzelnen Papillomaviren in Bezug auf ihren Genotyp möglich ist (De Villiers 1994). Ein neuer Typ definiert sich dabei durch eine um mindestens 10% abweichende Sequenzhomologie der Virusproteine E6, E7 und L1 (1.2.3).

Die sehr heterogenen Papillomaviren sind vor allem dadurch gekennzeichnet, dass sie eine ausgeprägte Wirts- und Gewebsspezifität aufweisen. Sie können ausschließlich in der Haut bzw. Schleimhaut des respiratorischen oder anogenitalen Traktes nachgewiesen werden, in dem sie sich nur in differenzierenden Keratinozyten replizieren können (zur Hausen 2000). Diese Eigenschaften erschweren die künstliche Synthese von Papillomaviren *in vitro*.

### 1.1.2 Morphologische Kennzeichen

Vom Erscheinungsbild her sind die Papillomaviren den Polyomaviren sehr ähnlich, weshalb sie auch in früheren Zeiten in der Familie der *Papovaviridae* zusammengefasst wurden. So ist das morphologische Erscheinungsbild der Papillomaviren wesentlich durch ein Kapsid ohne Membranhülle gekennzeichnet. Die Form des Kapsids ist ikosaedrisch (T=7) und besitzt einen Durchmesser von 55nm (Abb. 1-1). Die Analyse der atomaren Struktur wurde vor kurzem beschrieben (Chen, Garcea et al. 2000; Modis, Trus et al. 2002).



**Abb. 1-1: Papillomviruspartikel. Elektronenmikroskopische Darstellung (negativ Kontrast) von HPV1 Virionen. Weißer Größenmarker: 100nm (verändert nach van Regenmortel, 2000, Virus Taxonomy).**

Das Viruskapsid besteht aus dem Haupt- und Nebenstrukturprotein L1 bzw. L2. Es wird von 72 pentameren Kapsomeren gebildet, die aus dem Strukturprotein L1 bestehen (Baker, Newcomb et al. 1991). Kapsomere bilden sich im Zytosol, können die Kernmembran passieren (Merle, Rose et al. 1999) und sind in der Lage neutralisierende Antikörper zu induzieren (Fligge, Giroglou et al. 2001). Während das C-terminale Ende von L1 bei der Kapsidbildung mit benachbarten Kapsomeren in Wechselwirkung tritt (Modis, Trus et al. 2002), sorgen interkapsomere Disulfidbrücken für eine weitere Stabilisierung des Viruskapsids (Li, Beard et al. 1998; McCarthy, White et al. 1998; Sapp, Fligge et al. 1998; Modis, Trus et al. 2002). Das Verhältnis der beiden Strukturproteine zueinander beträgt bei einer infektiösen Einheit 30:1 (L1:L2) und umschließt eine Kopie des viralen Genoms (Baker, Newcomb et al. 1991).

### 1.1.3 Genom, Genomaufbau und grundlegende Proteinfunktionen

Das kovalent geschlossene, zirkuläre und doppelsträngige DNA-Genom ist ca. 8kb groß und liegt – mit Histonproteinen in einer Nukleosomen-ähnlichen Struktur assoziiert – als Superhelix vor (Favre, Breitburd et al. 1977). In infizierten Zellen ist das Virusgenom nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern liegt episomal vor (Lambert 1991). Alle Papillomaviren besitzen einen ähnlichen Genomaufbau und wie Abb. 1-2 entnommen werden kann, lässt sich das Virusgenom in 3 Hauptregionen unterteilen (Chen, Howley et al. 1982): Eine etwa 4kb große Region, die für die zu Beginn des Vermehrungszyklus exprimierten („frühen“) Proteine kodiert, eine weitere etwa 3kb große Region, die die Information für die gegen Ende der Infektion synthetisierten („späten“) Proteine enthält sowie eine etwa 1kb große Region, die sich an die „späte“ Region anschließt und als UTR (untranslatierte Region) bezeichnet wird. Alle in diesen Regionen positionierten Gene werden auf nur einem Strang kodiert und die Transkription erfolgt unter Verwendung von verschiedenen Leserastern (E1-E8 und

L1-L2). Die effektive Nutzung der Leseraster wird in Form zahlreicher Proteinvarianten durch alternatives Spleißen realisiert.

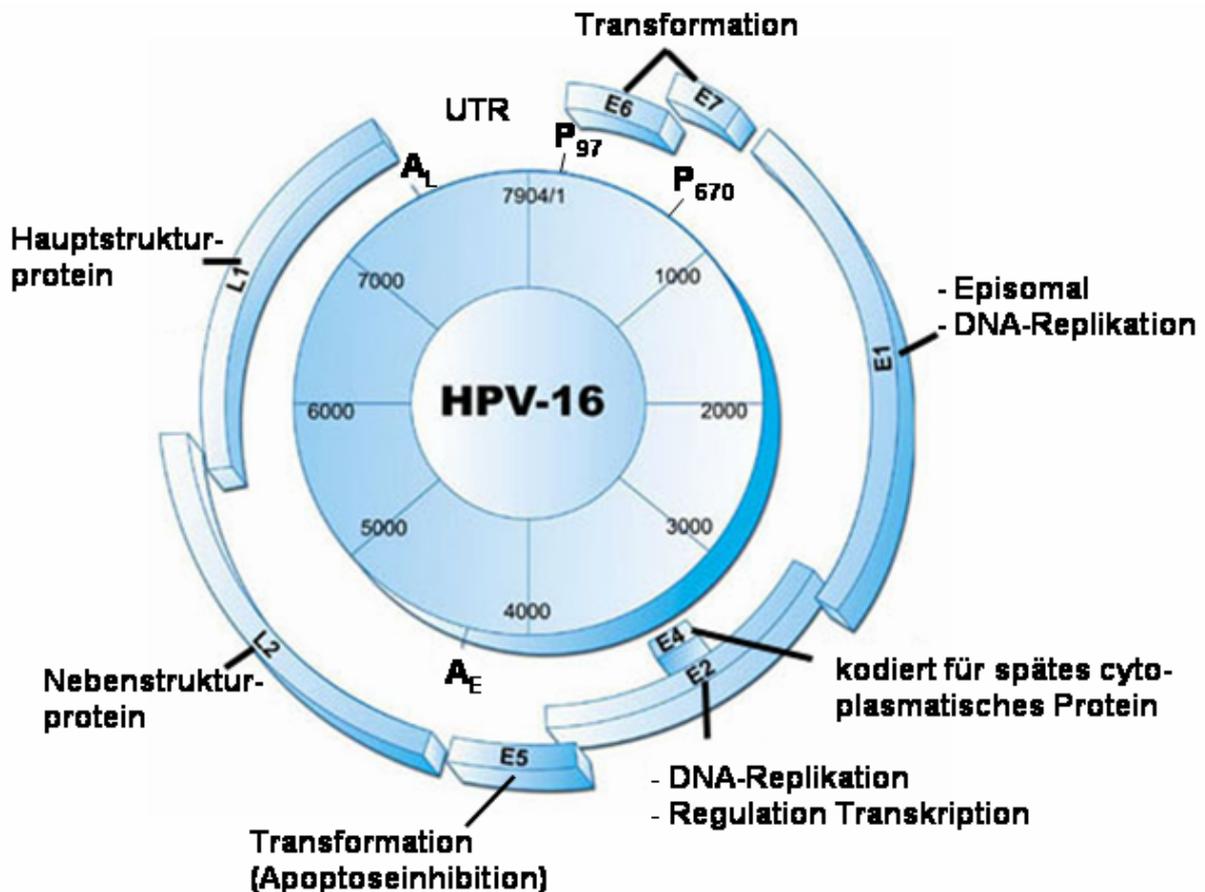


Abb. 1-2: Genomaufbau der Papillomaviren am Beispiel des humanpathogenen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16). Das Genom besitzt eine Größe von 7905bp. Lage und Funktion der einzelnen Gene wie indiziert (siehe auch Text). P<sub>97</sub>/P<sub>670</sub>: Promotoren; E1-E6: Gene der frühen Region; L1-L2: Gene der späten Region; UTR: untranslatierte Region; A<sub>E</sub>: Poly-A-Sequenz der frühen Region; A<sub>L</sub>: Poly-A-Sequenz der späten Region (verändert nach Biomedlab, U.S.A., 2002).

Die Funktion der frühen Region erstreckt sich dabei auf Bereiche der Virusreplikation, Transkriptionsregulation, Zellzykluskontrolle bzw. Zelltransformation (Schwartz 1998; zur Hausen 2002) sowie der Immunsuppression des Wirts. Die Expression der frühen Proteine erfolgt in allen Zellen, die mit Papillomaviren infiziert sind.

Die späten Proteine hingegen dienen der Bildung von L1-Hauptstruktur- und L2-Nebenstrukturproteinen, die ausschließlich in distalen und terminal differenzierten Zellschichten des *stratum granulosum* bzw. des *stratum corneum* synthetisiert werden (Laimins 1993; Howley 1996). Der Abschluss eines Replikationszyklus hängt von der terminalen Differenzierung der infizierten Epithelzellen ab (Howley 1996).

Die UTR kodiert für keine viralen Proteine, sondern trägt eine Reihe *cis*-wirksamer Kontrollelemente wie Promotoren, Enhancer, den Replikationsursprung sowie Bindungsstellen für E1, E2 und Transkriptionsfaktoren (zur Hausen 1996; Parker, Zhao et al. 1997).

## 1.2 Das humane Papillomavirus

### 1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Wie bereits beschrieben, verursachen Papillomaviren Warzen in Haut- und Schleimhautepithelien und gehören damit zu dem über 15%-igen Anteil der weltweiten Tumorerkrankungen, die mit Virusinfektionen assoziiert sind. Dabei sind solche Papillomaviren am weitesten verbreitet, die gewöhnliche Warzen an Händen und Füßen verursachen. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass viele HPV-Typen bei bestimmten malignen Erkrankungen gehäuft auftreten (siehe weiter unten). Bis heute sind 110 HPV-Typen identifiziert und sequenziert. (zur Hausen 2000; Modrow 2003). Die HPV-Typen werden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt: zum Einen in die Gruppe der Typen „niedrigen Risikos“ und zum Anderen in die Gruppe der „hoch Risiko“-Typen. Die Typen „niedrigen Risikos“ (z.B. HPV-6, -11, -42, -43, -44) infizieren den Mund- und Rachenraum und manifestieren sich durch gutartige Hyperplasien. Im anogenitalen Bereich können sie zu Hyperkeratosen (*Condyloma acuminata*) führen. Die „hoch Risiko“-Typen (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -56) hingegen sind an fast allen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) ursächlich beteiligt (Bosch, Manos et al. 1995; Munoz 1996; Walboomers, Jacobs et al. 1999), aus denen sich Zervixkarzinome entwickeln können.

Das Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) gehört zu den Karzinomen (CX) des anogenitalen Traktes, die einen Anteil von 12% an der Gesamtzahl aller bekannten Krebsarten bei Frauen besitzen, und ist die zweithäufigste gynäkologische Malignität weltweit (Pisani 2002). Es wird verursacht durch die persistente Infektion mit bestimmten HPV-Typen der „hoch Risiko“ Gruppe (zur Hausen 1977; IARC 1995) und ist durch ein Auftreten von 400.000 neuen Fällen (bei 300 Mio. Neuinfektionen) pro Jahr gekennzeichnet (Parkin, Pisani et al. 1999; zur Hausen 2000). So konnte HPV-16 beispielsweise in 50-60% (Bosch, Manos et al. 1995) und HPV-18 in bis zu 20% aller HPV positiven Tumorbiopsien nachgewiesen werden. Selbst 25% der oralen Krebsarten enthalten DNA der anogenitalen HPV-Typen (Gillison 2001).

Die Übertragung der genitalen Papillomaviren, die durch Mikrotraumata der basalen Zellschichten propagiert wird (Howley 1996), erfolgt ab einem Alter von 5 Jahren durch direkten Kontakt mit infizierten Hautgewebe oder über kontaminierte Gegenstände im familiären Bereich. Daneben können Papillomaviren aber z.B. auch in Schwimmbäder übertragen werden. Ab dem jugendlichen Alter werden Papillomaviren häufig durch sexuellen Kontakt übertragen. Neben der Übertragung von Papillomaviren während des Geburtsvorgangs werden Warzenbildungen und maligne Entartungen auch häufig bei immunsupprimierten Personen (HIV-Infizierten oder Trans-

plantationspatienten) beobachtet. Die Krankheitsanfälligkeit gegenüber seltenen Hauterkrankungen mit multipler Warzenbildung (z.B. *epidermodysplasia verruciformis*) kann zudem durch eine autosomal rezessiv vererbte Prädisposition erhöht werden. Weitere Risikofaktoren, die einen Krankheitsausbruch begünstigen, können Tabakkonsum, Schwangerschaft, Einnahme von Kontrazeptiva, Koinfektionen mit anderen Viren (z.B. Herpes oder HIV) sowie die Trägerschaft bestimmter HLA-Allele sein. Während die engmaschige medizinische Versorgung in den industrialisierten Ländern eine Früherkennung und – zum großen Teil mögliche – Therapie von infizierten Patienten gewährleistet, ist die Verbreitung der HPV assoziierten Krankheiten in Entwicklungsländern weitaus höher.

### 1.2.2 Klinik

Papillomaviren verursachen in den infizierten Bereichen lokale Zellproliferationen. Die Zeitspanne zwischen einer primären Infektion mit HPVs der „hoch Risiko“ Gruppe und einer möglichen Manifestation des Zervixkarzinoms beträgt 20-40 Jahre. Die Existenz von HPVs in über 90% aller Karzinome bedeutet allerdings nicht, dass alle Frauen, die Kontakt mit HPV hatten, eine persistierende Infektionsform in Verbindung mit dem Übergang zu zervikalen intraepithelialen Neoplasien oder zervikalen Karzinomen entwickeln. Im Gegenteil: die Entstehung eines Zervixkarzinoms stellt grundsätzlich ein außergewöhnliches Ereignis im Verlauf der natürlichen Infektion dar (zur Hausen 1996; Tindle 2002), weshalb sich die Manifestationsquote derzeit auf etwa 1 Zervixkarzinom pro 750 infizierte Patientinnen beläuft (Eiben, Velders et al. 2002). Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass sich gutartige Warzenerkrankungen genauso wie frühe präkanzeröse CIN-Läsionen spontan zurückbilden können (Ho 1998). Bei vielen HPV Infektionen können sogar überhaupt keine klinischen Symptome festgestellt werden. Außerdem fällt auf, dass sich manche HPV Typen durch eine charakteristische Pathohistologie oder eine bestimmte Lokalisation im Körper auszeichnen (z.B. plantare Warzen: Fußsohle; flache Warzen: Arme, Beine, Gesicht). Entsprechend ihres Infektionsortes unterscheidet man HPVs, die den kutanen und den Schleimhaut-Bereich befallen.

### 1.2.3 Virusproteine und deren Rolle im Infektionszyklus der HPVs

Bei den meisten Warzen handelt es sich um selbstlimitierende Erkrankungen, die durch das angeborene bzw. adaptive Immunsystem erfolgreich bekämpft werden können (Stern 2000; Tindle 2002). Im Zuge der Virusevolution wurden aber molekulare Mechanismen hinzugewonnen, durch die geeignete intrazelluläre Bedingungen für die Replikation oder die Abwehr von Kontrollmechanismen des Immunsystems

ermöglicht werden konnten (Munger and Phelps 1993; zur Hausen 1996; Eiben, Velders et al. 2002; O'Brien 2002; Tindle 2002). Diese Mechanismen schufen die Grundlage für den primär nicht reproduktiven Infektionsverlauf von HPVs, Zellen zu unkontrolliertem Wachstum antreiben zu können und sich gleichzeitig der Wirkung des Immunsystems auf die infizierten Zellen weitgehend zu entziehen. Die ablaufenden Interaktionen zwischen viralen und zellulären Proteinen sind vielfältig (zur Hausen 1996; Zwerschke 2000; Munger and Howley 2002) und werden unter 1.2.3.1 näher erläutert. Für die Entwicklung eines zervikalen Karzinoms ist es von zentraler Bedeutung, dass es zu mehreren Mutationen im zellulären Genom kommt (Gissmann 1992; Stern 2000).

Allen Warzenformen ist gemeinsam, dass sie eine intakte, unveränderte basale Epithelschicht aufweisen, die den Infektionsherd vom peripheren Blut und innen liegenden Schichten abtrennt (Abb. 1-3). Einer Ausbreitung der Viren in die Blutbahn und der damit verbundenen Exposition gegenüber dem Immunsystem wird somit entgegengewirkt.

Die Rolle der Virusproteine, die für die Prozesse der Transformation, Replikation und Transkriptionsregulation verantwortlich sind, wird im Folgenden näher erläutert.

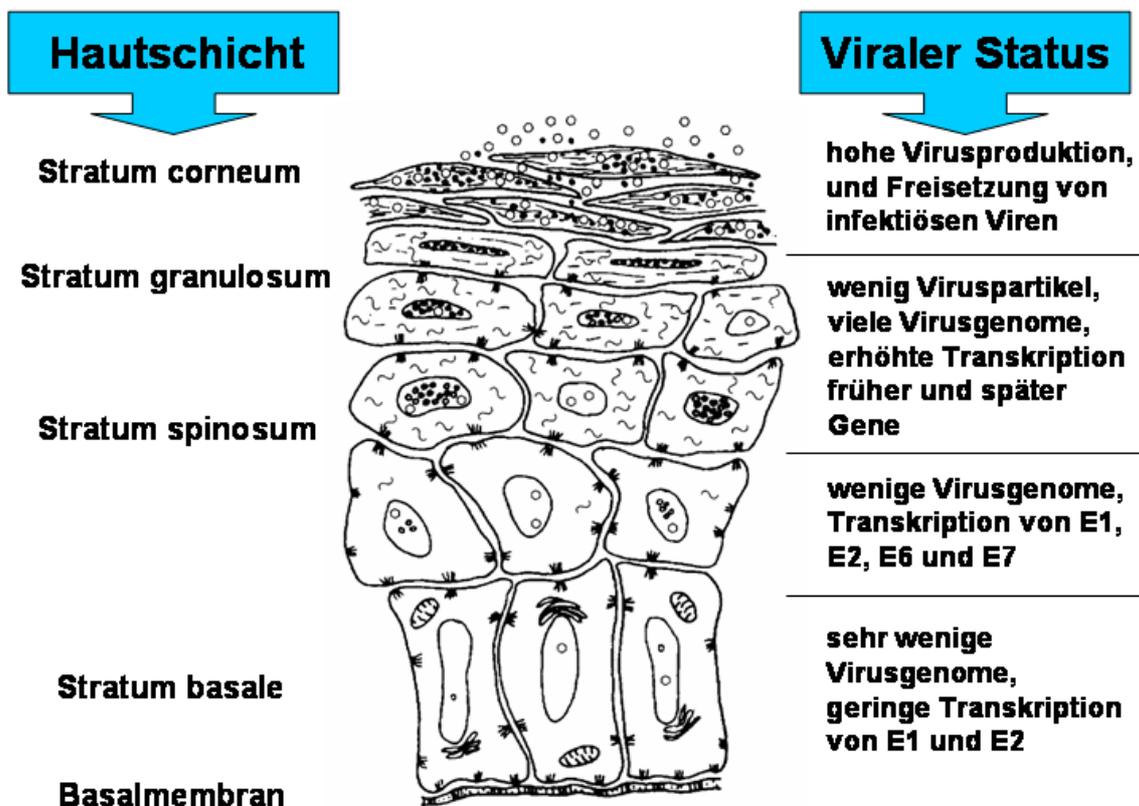


Abb. 1-3: Abhängigkeit der Genexpression der Papillomaviren vom Differenzierungsgrad der Epidermiszellen. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Epidermis. Offene Kreise in den Zellkernen: Papillomavirusgenom; schwarze Punkte: infektiöse Viruspartikel (verändert nach (Cossart 1995)).

### 1.2.3.1 Die frühen Proteine

#### Infektionsphase:

Nachdem die Viren über kleinste Zerstörungen (Läsionen) in den äußeren Keratinozytenschichten in die basale Epithelschicht eingedrungen sind, findet die Aufnahme in die dort befindlichen Zellen – vermutlich über die Bindung an spezifische Rezeptoren (1.2.3.2; S.10) sowie die dadurch vermittelte Endozytose – statt. Der Transport der Viren zu den Kernporen erfolgt möglicherweise entlang der Mikrotubuli des Zytoskeletts der Zelle (Liu, Qi et al. 2001). In den infizierten Zellen kommt es zunächst zu einer teilweisen Unterdrückung der viralen Genexpression (Abb. 1-3). Währenddessen der Promotor  $P_{670}$  (Abb. 1-2; S.3) erst in differenzierten Keratinozyten aktiviert wird (Grassmann 1996), kontrolliert der Hauptpromotor,  $P_{97}$  (Abb. 1-2; S.3), die Expression des HPV16-Genoms schon zu Beginn des viralen Lebenszyklus (Smotkin and Wettstein 1986). Durch die Teilung der Basalzellen erfolgt eine laterale Verbreitung des episomal vorliegenden Genoms, welches zu diesem Zeitpunkt eine geringe Anzahl an Kopien pro Zelle aufweist (50-400 Kopien). Die Proteine E1 und E2 spielen bei der Replikation des Virusgenoms eine wichtige Rolle (Lusky and Botchan 1985; Seo, Muller et al. 1993a): Auf der einen Seite gibt es eine Variante des E1 (E1-M) in undifferenzierten und für die lytische Infektion nicht permissiven Epithelzellen, die für die episomale Aufrechterhaltung des Virusgenoms zuständig ist. Auf der anderen Seite besitzt eine weitere Variante (E1-R) eine wichtige Rolle bei der produktiven Replikation in ausdifferenzierten Epidermiszellen, die einen lytischen Ablauf der Infektion erlauben. Außerdem kann E1 in Abwesenheit von E2 mit niedriger Affinität an eine palindromische Sequenz (AT-reiche Regionen) der UTR binden (Ustav 1991) und besitzt neben seiner ATP-abhängigen Helikase-Aktivität die Fähigkeit zur Interaktion mit der zellulären DNA-Polymerase  $\alpha$ . Varianten des E2 (E2-TA bzw. E2-TR) besitzen neben replikativen (Seo, Muller et al. 1993a) auch transkriptionelle Aufgaben als Transaktivator bzw. Transrepressor (Phelps and Howley 1987), die sowohl durch die N-terminale Transaktivierungsdomäne als auch durch die C-terminal DNA-bindende und dimerisierungsvermittelnde Domäne ermöglicht werden. Neben der Transkriptionsregulation von E6 und E7 (siehe weiter unten) kann E2 eine  $G_1$ -Zellzyklus-Arretierung, Apoptose oder Seneszenz in HPV positiven Zellen bewirken (Desaintes, Demeret et al. 1997; Desaintes, Goyat et al. 1999; Wells, Francis et al. 2000). Erst kürzlich wurde E2 die Interaktion mit den Transkriptionsaktivatoren C/EBP- $\alpha$  und - $\beta$  nachgewiesen, was darauf hinweisen könnte, dass E2 bei der Verstärkung des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten beteiligt ist (Hadaschik,

Hinterkeuser et al. 2003), der bei HPV induzierten Läsionen durch E6 und E7 supprimiert ist (siehe weiter unten).

### Virusamplifikation und Transformation der Wirtszelle:

Treten die Virus-infizierten Zellen in den Differenzierungsprozess ein und gelangen in suprabasale Schichten, werden weitere frühe Gene des Virusgenoms aktiviert. Da der Lebenszyklus der Papillomaviren mit dem Differenzierungsgrad der Epithelzellen eng verbunden ist, folgt diesem Vorgang eine erhöhte Replikationsrate des Virusgenoms und folgende, den frühen Genen entsprechende, Proteine werden synthetisiert: Das im Golgi-Apparat, dem endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran lokalisierte E5-Protein konnte bei bovinen Papillomaviren (BPV) als das wichtigste Onkogen identifiziert werden (Burkhardt 1989; Cohen, Goldstein et al. 1993). E5 kann das Aktin-Zytoskelett von Zellen rearrangieren, endozytären Transport inhibieren und Signaltransduktionsabläufe beeinflussen (Thomsen, van Deurs et al. 2000; Kabsch and Alonso 2002). Bei der Entwicklung eines malignen Phänotyps wird das virale Genom häufig im E2-Leserahmen geöffnet und in das Wirtsgenom integriert (Schwarz, Freese et al. 1985). Da der für E5 kodierende Bereich in humanen Karzinomzellen im Zuge dieses Integrationsprozesses deletiert wird, wurde diesem Protein im Kontext der HPV-Infektion eine Rolle in der frühen Phase des HPV-Lebenszyklus zugeordnet (Schwarz, Freese et al. 1985). Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen verstärkt, die Wechselwirkungen von E5 mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren aufwies (Hwang, Nottoli et al. 1995). Außerdem konnte E5 erst kürzlich eine wichtige Bedeutung bei der Inhibition von Apoptose nachgewiesen werden (Kabsch and Alonso 2002; Zhang 2002).

Eine noch bedeutendere Rolle wird den ebenfalls in der frühen Phase exprimierten HPV-Proteinen E6 und E7 hinsichtlich ihrer transformierenden Fähigkeiten zugeschrieben: Sie induzieren ein sowohl für die Replikation des Virusgenoms als auch für die Kapsidsynthese geeignetes intrazelluläres Milieu und werden in allen befallenen Zellen gebildet. Die Inhibition der Proteinexpression von E6 und E7 führt zu einer Blockierung des malignen Phänotyps zervikaler Karzinomzellen. Beide sind unabhängig voneinander in der Lage, verschiedene Zell-Linien *in vitro* zu immortalisieren, wobei diese Eigenschaft durch die Ko-Expression beider Gene verstärkt werden kann (Munger 1989; Mc Dougall 1994). E6 und E7 stimulieren die Zellzyklusprogression und verändern die Apoptoserate der infizierten Zellen, in dem sie mit den Tumorsuppressoren p53 (Werness, Levine et al. 1990) bzw. pRB (Dyson, Howley et al. 1989) interagieren und in der Folge degradieren (Munger and Howley 2002; Scheffner and Whitaker 2003). E6 ist weiterhin dazu in der Lage das pro-apoptotische Pro-

tein BAK (Jackson 2000) abzubauen und führt somit zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität. Daneben bewirkt E6 die Aktivierung der Telomerase und führt zu einer Degradationsinhibition der Familie der SRC-Kinasen (Oda 1999; Veldman, Hori-kawa et al. 2001). Durch die Degradation von pRB durch E7 wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und p16 hoch reguliert (Kiyono 1998). Die hohe E2F-Aktivität kann wiederum zu einer Induktion von Apoptose in E7-positiven Zellen führen. Außerdem kommt es durch E7 zu einer Aktivierung der S-Phasen Gene *Cyclin A* und *E* (Zerfass 1995) sowie zu einer abnormalen Vermehrung von Centrosomen, die eine Voraussetzung für die Entstehung aneuploider Zellen ist (Duensing 2001). Diese Beobachtungen weisen auf einen synergistischen Effekt der beiden transformierenden Proteine E6 und E7 hin (zur Hausen 2002), (Hawley-Nelson, Vousden et al. 1989), der unter nicht-malignen Umständen durch E2 negativ kontrolliert wird. Kommt es zur Integration des Virusgenoms in das Genom der Wirtszelle, so wird die Repressionsfunktion von E2 außer Kraft gesetzt (Romanczuk, Thierry et al. 1990; Bechtold, Beard et al. 2003). Neben der möglichen Deletion mehrerer Virusgenombereiche (Schwarz, Freese et al. 1985; Wagatsuma 1990) kann es zu einer erhöhten – durch zelluläre Promotoren gesteuerten – Expressionsrate von E6 und E7 kommen. Die transformierende Wirkung von E6 und E7 ist bei „hoch Risiko“-Typen am höchsten und bei „niedrig Risiko“-Typen entsprechend gering ausgeprägt. Wichtig ist jedoch, dass die alleinige Expression der beiden Proteine grundsätzlich nicht ausreicht, humane Zellen zu transformieren. So müssen sich weitere Ereignisse (wie z.B. eine hohe Genominstabilität, Mutationen oder Aneuploidie) anschließen, die die Progression der Zellen zum malignen Phänotyp bewirken.

Abschließend ist zu erwähnen, dass die Proteine E5-E7 immunsuppressive Aktivitäten in der infizierten Zelle ausüben (Frazer, Thomas et al. 1999; O'Brien 2002; Tindle 2002).

Die Zuordnung des E4-Gens zur frühen Region ist zwar aufgrund seiner Position im Genom zulässig, jedoch rechnet man heute das korrespondierende Protein eher der späten Region zu. Die exakte Funktion des Proteins ist dabei weitgehend ungeklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass es in der Schicht der differenzierenden Zellen lokalisiert, mit dem Keratin-Cytoskelett assoziiert und bei dessen Zusammenbruch am Ende des HPV-Lebenszyklus beteiligt ist (Doorbar, Ely et al. 1991). Es konnten jedoch bis jetzt noch keine transformierenden Eigenschaften für E4 nachgewiesen werden (zur Hausen 2002). Neueste Untersuchungen bezüglich des produktiven Zyklus bei CRPV zeigten, dass E4 zur DNA-Amplifikation und L1-Expression benötigt wird (Peh, Brandsma et al. 2004).

Außerdem konnten zwar die Leseraster E3 und E8 identifiziert, allerdings keine für sie spezifischen Proteine nachgewiesen werden.

### 1.2.3.2 Die späten Proteine

Wie bereits erwähnt, findet die Synthese der späten Proteine ausschließlich in terminal differenzierten Keratinozyten statt (siehe auch Abb. 1-3). Hierzu zählen die Strukturproteine L1 (Hauptstrukturprotein) und L2 (Nebenstrukturprotein), die eine Größe von 57kDa (L1) bzw. 72kDa (L2) besitzen und bei einem infektiösen Viruspartikel in einem Verhältnis von 30:1 (L1:L2) vorliegen (Baker, Newcomb et al. 1991). Die Expression der späten Gene wird durch Polyadenylierungssequenzen, die sich am Ende der frühen Region befinden, sowie durch Transkriptionsfaktoren, die erst in differenzierten Zellen vorhanden sind, minimiert (Baker and Noe 1989). Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, wie z.B. die Verwendung von in der Wirtszelle selten vorkommenden Kodons oder eine hohe mRNA Instabilität, sorgen für eine weiterhin herabgesetzte Expression der späten Gene.

#### L1-Charakteristik

Das aus ca. 500 AS bestehende Hauptstrukturprotein L1 ist das am höchsten konservierteste Protein bei Papillomaviren und lokalisiert im Zellkern nach alleiniger Expression auf homogen verteilte Weise. Wie unter 1.1.2 bereits kurz erläutert, bilden die L1-Proteine Pentamere. Sie sind dazu befähigt, sich spontan zusammenzulagern und ein aus 360 Kopien bestehendes Viruspartikel zu bilden (Zhou, Sun et al. 1992). Kommt es zum Einschluss des Virusgenoms in das Viruspartikel, so erhöht sich der Quervernetzungsgrad zwischen den L1-Kapsomeren. Weiterhin bindet das L1-Protein an den Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die Benennung der hauptverantwortlichen Rezeptoren unterliegt einer intensiven Diskussion. So konnten für die HPV-Typen 6 und 16  $\alpha_6\beta_4$ -Integrine als Bindungspartner identifiziert werden. Bei HPV-11, -13 sowie bei BPV-4 scheint dies aber nicht der Fall zu sein. Zusätzlich konnte eine Interaktion von L1 mit Heparansulfat, Zelloberflächen Glykosaminoglykanen und F<sub>c</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden (Evander, Frazer et al. 1997; Joyce, Tung et al. 1999; Sibbet, Romero-Graillet et al. 2000; Da Silva, Velders et al. 2001a). Da es sich aber bei diesen Rezeptorkandidaten nicht um zelltyp-spezifische Moleküle handelt, muss die hohe Gewebsspezifität der humanen Papillomaviren durch andere Faktoren verursacht werden: Man geht davon aus, dass entweder ein weiterer, bisher noch nicht identifizierter Sekundärrezeptor existiert oder dass die Spezifität durch Vorgänge hervorgerufen wird, die erst nach Aufnahme des Virus in die Zelle zum tragen kommen. Die Notwendigkeit mehrerer Rezeptoren, die eine Vi-

rusbindung an Zellen und die darauf folgende Virusaufnahme ermöglichen, wurde schon in anderen Virussystemen beobachtet (Sattentau and Weiss 1988; Fantini, Cook et al. 1993; Spear 1993; Wickham, Mathias et al. 1993).

### L2 Charakteristik

Das aus 455-475 AS bestehende L2-Protein ist im Vergleich zu L1 weniger konserviert. Es besitzt einerseits dieselbe Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Wirtszelle wie L1 und andererseits ist dessen Expressionsstärke ebenso wie die des L1 nur gering. Dem im Zellkern in punktuell verteilten PODs (*PML onkogene Domänen*) lokalisierten L2 (Day, Roden et al. 1998) konnten zelluläre Interaktionspartner zugewiesen werden (Gornemann, Hofmann et al. 2002) und es ist für die erfolgreiche Verpackung des Virusgenoms notwendig (Zhou, Sun et al. 1994; Zhao, Sun et al. 1998). Nach Ko-Expression von L1 und L2 bzw. E2 und L2 können sowohl L1 als auch E2 in subnukleären Domänen identifiziert werden (Day, Roden et al. 1998). Bezogen auf den Assemblierungs- und Verpackungsprozess wurde die Rolle des L2 in soweit beschrieben, dass es E2 und L1 in PODs akkumuliert. Im Anschluss daran kommt es dort zur Kapsidbildung und DNA-Verpackung, wobei E2 anschließend wieder freigesetzt wird um weitere Virusgenome für die Verpackung zu rekrutieren. Außerdem zeigten andere Interaktionsstudien von L2 und E2, dass durch L2 die E2-TA-abhängige (1.2.3.1) transkriptionelle Aktivierung inhibiert wird, wobei es aber zu keiner Beeinflussung der Replikation des Virusgenoms kommt (Heino, Zhou et al. 2000).

### Kapsidbildung durch L1 und L2:

Weitere Studien ergaben, dass L2 mit L1-Kapsomeren im Zytosol Komplexe bilden kann, die in den Kern transportiert werden können (Florin, Sapp et al. 2002). Zwar sind die bei Polyomaviren beobachteten Kapsidbildungsintermediate (Yuen and Consigli 1985) bei Papillomaviren bisher noch nicht beschrieben worden, doch konnte bei Überexpressionsstudien über die Existenz von irregulären kleinen Kapsiden (Zhou, Doorbar et al. 1991; Sasagawa, Pushko et al. 1995) oder tubulären Strukturen (Kirnbauer, Taub et al. 1993; Sasagawa, Pushko et al. 1995) berichtet werden. Bei N-terminalen Deletionsmutanten von HPV16 L1 konnte darüber hinaus die Entstehung von kleinen Kapsiden beobachtet werden, die nur aus 12 Kapsomeren bestehen (Chen, Garcea et al. 2000). Assemblierungsstudien mit BPV1 L1 und BPV1 L2 zeigten, dass die Interaktion der beiden Strukturproteine über spezifische Aminosäurereste erfolgt (Okun, Day et al. 2001). Außerdem war zu beobachten, dass die Assemblierung der Strukturproteine typ-spezifisch ist: So ist es beispielsweise nicht

möglich, Kapside zu synthetisieren, die aus BPV1 L1 und HPV16 L2 bestehen. Auch die Verwendung von chimären L2, das aus BPV1 L2 und HPV16 L2 zusammengesetzt ist, konnte in Kombination mit BPV1 L1 zu keiner erfolgreichen Partikelassemblierung führen. Darüber hinaus zeigten diese Studien, dass L2 im Gegensatz zu vollständig assemblierten Kapsiden nur an L1 Kapsomere binden kann, was darauf hinweist, dass die Inkorporation des L2 in die Kapsidhülle während und nicht nach dem Assemblierungsprozess stattfindet (Okun, Day et al. 2001).

### Infektiosität von HPV16:

Die Inkorporation von 12 Kopien der L2-Proteine in ein durch L1 assembliertes Viruspartikel bzw. spezielle N- und C-terminale Aminosäuren verstärken die virale Infektiosität (Roden, Day et al. 2001) und beeinflussen möglicherweise den Zelltropismus der Papillomaviren (Kawana, Kawana et al. 2001). Grundlage für diese Annahme ist die Identifikation neutralisierender Epitope (Liu, Gissmann et al. 1997; Kawana, Kawana et al. 2001), mit deren Hilfe gezeigt werden konnte, dass sich das L2-Molekül zumindest teilweise an der Oberfläche der Kapside befindet. Außerdem konnten in diesem Zusammenhang Bindungsstudien mit L2-Peptidfragmenten durchgeführt werden, die nach Präinkubation die Infektion von Pseudovirionen verhindern konnten. Dass L2 dabei eine starke Bindung mit epithelialen Zellen einging, wies auf seine Beteiligung am Zelltropismus hin. Ein entsprechender Rezeptor konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

### Regulation der späten Gene

Die Expression der späten Gene unterliegt einer engen transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation. Neben den zuvor genannten Polyadenylierungssignalen (1.2.3.2, S.10) oder den *cis*-wirksamen Kontrollelementen (1.1.3, S.3) existieren auf der transkriptionellen Ebene noch Hinweise auf differenzierungsabhängige Promotoren (Baker and Howley 1987; Grassmann 1996). Ergänzende Arbeiten beschreiben eine *per se* sehr schwache Aktivität der natürlichen Promotoren der Papillomaviren (Kennedy, Haddow et al. 1991). Auf der posttranskriptionellen Ebene geht man davon aus, dass sich negativ regulatorische RNA-Elemente aus der UTR sowie der kodierenden Region für die differenzierungsabhängige Expression der späten Gene genauso verantwortlich zeichnen (Kennedy, Haddow et al. 1991; Tan, Felber et al. 1995; Sokolowski, Zhao et al. 1997; Schwartz 1998; Collier, Oberg et al. 2002) wie die Kodon-Zusammensetzung (1.2.5; S.16) und die daraus folgende, effektive Nutzung des tRNA-Angebotes.

#### 1.2.4 Behandlung und Vorbeugung von Papillomavirus-assoziierten Erkrankungen

Eine gezielte Therapie der größtenteils ungefährlichen Hautwarzen ist nicht nötig. Sie werden überwiegend aus kosmetischen Gründen beseitigt oder wenn sie sich an störenden Stellen befinden. Die dazu verwendeten Techniken erstrecken sich von kryotherapeutischen Maßnahmen, Verätzung mit  $\text{AgNO}_3$ , Induktion von Keratolyse durch Salizylsäure, lokale oder systemische Interferonapplikation, Lasertherapie, Elektroexzision oder -koagulation bis hin zur chirurgischen Entfernung. Die durch Papillomaviren hervorgerufenen, malignen Erkrankungsformen werden hauptsächlich durch operative Eingriffe entfernt. Eine frühzeitige Diagnose ist mitentscheidend für die Prognose der Erkrankung, da maligne Papillome im fortgeschrittenen Stadium nach Vaskularisation des *in situ* Karzinoms entartete Zellbestandteile in die Blutbahn abgeben und zur Metastasierung ganzer oder auch bisher nicht betroffener Organe beitragen können. Die Herstellung von attenuierten humanen Papillomaviren war bisher nicht möglich (Modrow 2003).

Dennoch wurden in den letzten Jahren eine Reihe interessanter Strategien zur Impfstoffherstellung entwickelt, die sowohl therapeutisch- als auch prophylaktisch-orientiert sind (Stern 2000; Da Silva, Eiben et al. 2001; Gissmann 2001):

Die prophylaktische Impfung zielt dabei darauf ab, vor Infektionen humaner Papillomaviren der „hoch Risiko“-Gruppe zu schützen. Dabei wird versucht, im Bereich der Schleimhautepithelien die Produktion neutralisierender Antikörper gegen die Strukturproteine L1 und L2 auszulösen (Stern 2000). Die Erzeugung von cytotoxischen Immunreaktionen liegt anderen Ansätzen zu Grunde, durch die es zu einer Therapie von Zellen kommt, die trotz prophylaktischer Impfung mit HPV infiziert wurden. Das Hauptinteresse der prophylaktischen Impfstrategien gilt momentan der Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs), die – wie bereits erwähnt – durch Überexpression des Strukturgens L1, allein oder in Kombination mit L2 hergestellt werden können (Schiller 1999). VLPs sind infektiösen Partikeln morphologisch sehr ähnlich und durch das Fehlen von verpackter Virus-DNA nicht infektiös. Immunisierungsstudien im Tiermodell zeigten, dass durch VLPs hohe Titer an L1-spezifischen Antikörpern induziert werden können, die infektiöse Papillomaviren *in vivo* neutralisieren und somit eine primäre Infektion verhindern können (Breitburd, Kirnbauer et al. 1995; Christensen, Reed et al. 1996; Kirnbauer, Chandrachud et al. 1996). Erste klinische Studien zeigten eine gute Verträglichkeit der HPV16 L1 VLP-basierten Impfstoffe sowie eine im Vergleich zu placebo-behandelten Frauen deutlich reduzierte Häufigkeit HPV16 primärinfizierter Patientinnen (Koutsky, Ault et al. 2002). Andere prophyl-

laktische Impfstrategien beschäftigten sich mit der Immunisierung mittels fusionierter HPV16 L1E7- bzw. Partikel-vermittelter COPV L1-Gene (Leder, Kleinschmidt et al. 2001; Stanley, Moore et al. 2001) oder der intranasalen Immunisierung mit L1-synthetisierenden, attenuierten Bakterien (Da Silva, Eiben et al. 2001).

Ein prinzipielles Problem der prophylaktischen Impfung und den damit zusammenhängenden klinischen Studien liegt in der langen Latenzzeit der humanen Papillomaviren begründet: Nicht nur eine kurzfristige Aussage über den Erfolg einer Impfstudie ist fast unmöglich, sondern auch die Abnahme der in hohem Maß auftretenden Zervixkarzinome würde, selbst bei Einsatz von (theoretisch) 100% erfolgreichen Impfstoffen, erst nach mehreren Jahrzehnten messbar werden.

In den vergangenen Jahren sind neben prophylaktischen Ansätzen auch Strategien zur therapeutischen Behandlung von Papillomavirusinfektionen entwickelt worden. Bei den therapeutischen Ansätzen steht v.a. die Induktion von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) des Immunsystems im Vordergrund (Gissmann 2001), die zur Eliminierung von Virus-infizierten Zellen führen sollen. Während in den prophylaktischen Ansätzen die Verwendung der späten Proteine im Vordergrund steht, setzt man bei den therapeutischen Impfstrategien bevorzugt frühe Gene oder deren Proteine ein, da sie gleich zu Beginn des HPV-Lebenszyklus exprimiert werden und somit bei bereits bestehender HPV-Infektion vom Immunsystem erkannt werden können. Der eigentliche Infektionsprozess durch Papillomaviren wird bei diesem Behandlungsansatz nicht verhindert. Man geht aber davon aus, dass auf diese Weise die Erkennung von HPV-infizierten, maligne entarteten Zellen durch das Immunsystem verbessert und somit die Entwicklung von Tumoren verhindert wird. Die umfangreiche Gruppe der therapeutischen Impfstoffe umfasst dabei im wesentlichen Peptid-, Protein- und Zell-basierte, virale sowie aus reiner DNA bestehende Immunisierungsmodelle (Da Silva, Eiben et al. 2001; Gissmann 2001; Eiben, Velders et al. 2002). Insgesamt kann hier festgehalten werden, dass die nebenwirkungsfreien therapeutischen Impfstoffe in ihrer Wirkungsweise bei Krebspatienten zu unterschiedlich guten Ergebnissen geführt haben. Im Gegensatz dazu stehen Patienten mit CIN, VIN und AIN, bei denen bessere Resultate erzielt werden konnten. Ausgehend von aktuellen klinischen Studien muss zusammenfassend festgestellt werden, dass nach wie vor eine geringe Übereinstimmung zwischen den induzierten Immunreaktionen sowie den messbaren Krebsheilungen zu beobachten ist (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Gissmann, DKFZ Heidelberg).

Ein weiterer, sehr viel versprechender Impfstoff wurde durch sog. chimäre VLPs (cVLPs) generiert. Dieser Impfstoff vereinigt die Ziele der prophylaktischen und the-

therapeutischen Impfstrategien, in dem er einerseits aus dem viralen Strukturgen L1 und andererseits aus verschiedenen, antigenen CTL-Epitopen des Tumormarkers E7 besteht. Zwar ist dabei ein kleiner Teil (34 AS) des C-terminalen Ende von L1 durch besagte E7-Fragmente ersetzt worden, jedoch zeigte dies keine negativen Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Assemblierung von Partikeln (Muller, Zhou et al. 1997). Immunisierungsstudien bei Mäusen bewiesen zudem, dass cVLPs Virusneutralisierende Antikörper sowie E7-spezifische CTL Antworten induzieren konnten (Schafer, Muller et al. 1999), die die Mäuse wiederum vor dem Wachstum injizierter – E7-positiver – Tumorzellen schützen konnten. Die Verwendung von cVLPs als Impfstoff im menschlichen Organismus wird derzeit in klinischen Studien der Phase I/II analysiert.

### 1.2.5 Problematik der *in vitro* Herstellung von humanen Papillomaviren

Die Untersuchung des Lebenszyklus der Papillomaviren wird hauptsächlich dadurch erschwert, dass die Herstellung von humanen Papillomaviren *in vitro* aufgrund der strikten Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der virusproduzierenden Zellen nur schwer möglich ist. Diese Abhängigkeit manifestiert sich in normalen Zellkultursystemen v.a. durch das sehr niedrige Expressionsniveau der Strukturgene.

Die Kultivierung eines differenzierenden Zellsystems ist bisher nur in Form des „Raft-Culture-Systems“ (organotypisches Zellkultursystem) möglich, in dem zur Simulation von mehrdimensionalen Gewebestrukturen mit differenzierenden Keratinozyten auf einer Fibroblasten- bzw. Kollagenmatrix gearbeitet wird (Meyers, Frattini et al. 1992; Chow and Broker 1997; Frattini, Lim et al. 1997). Dieses System ist jedoch sehr aufwendig, kostenintensiv und hinsichtlich der damit erzielbaren Virusausbeute sehr umstritten, so dass man sich in der Vergangenheit darum bemühte, alternative Systeme zur Herstellung von HPV Pseudovirionen zu entwickeln. Neben der Möglichkeit, BPV-Virionen direkt aus Rinderwarzen zu präparieren, können auch Virus-ähnliche Partikel (VLPs) hergestellt werden (Zhou, Sun et al. 1992). Sie bestanden in den anfänglichen Versuchen nur aus dem Hauptstrukturprotein L1, beinhalteten kein virales Genom, aber besaßen den infektiösen Partikeln ähnliche morphologische Eigenschaften (Hagensee, Olson et al. 1994). Hinsichtlich der Herstellung von Pseudovirionen kamen die folgenden viralen Expressionssysteme zur Anwendung:

Die erste Synthese von Pseudovirionen gelang unter Verwendung von Semliki-Forest-Viren in Hamsterzellen, die eine Überexpression der HPV16 Strukturproteine sowie die stabile Replikation des BPV-Genoms ermöglichten (Heino, Dillner et al. 1995; Roden, Greenstone et al. 1996). Dabei konnte der Vorteil von Alphaviren, denen die Semliki-Forest-Viren zuzuordnen sind, genutzt werden, sich in großen Men-

gen im Zytoplasma zu vermehren. Weitere Ansätze beschäftigten sich mit der getrennten Herstellung von Strukturproteinen mittels rekombinanter Bakuloviren und darauf folgender Assemblierung sowie Verpackung mit DNA im zellfreien System (Kawana, Yoshikawa et al. 1998). Außerdem konnten Produktionssysteme für BPV1 L1-Partikel entworfen werden, die auf der Verwendung von rekombinanten Vaccinia-Viren basierten (Zhou, Stenzel et al. 1993). Anhand von Hybrid-mRNAs, die Transportelemente von HIV1 oder SRV1 enthielten, konnte in anderen Versuchen gezeigt werden, dass eine Expressionssteigerung von HPV16 L1 erzielt werden kann (Tan, Felber et al. 1995). Des Weiteren konnte die Synthese der Strukturproteine sowie die Verpackung von DNA in Hefezellen durchgeführt werden (Rossi, Gissmann et al. 2000). Aus Gründen der eingeschränkten Reproduzierbarkeit bzw. der vielseitigen Auswirkungen von rekombinanten Viren auf das zelluläre Programm konnten diese Systeme aber nur bedingt zum Verständnis einzelner Schritte im Lebenszyklus der humanen Papillomaviren beitragen. Außerdem bestand ein weiteres Problem mancher Systeme darin, zwar Partikel produzieren zu können, die aber (i) nicht infektiös oder (ii) nicht in der Lage waren, sich nach Infektion zu vermehren. Eine der nativen Situation möglichst gerecht werdende Analyse der Virusaufnahme, Virusprozessierung, Replikation und Vermehrung nach Infektion war somit nur schwer möglich.

### Kodon-Optimierung als Mittel zur Expressionssteigerung von Proteinen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Expressionsplasmide enthalten die HPV16 Strukturgene in – an den Menschen angepasster – Kodon-optimierter Form (Leder, Kleinschmidt et al. 2001):

In Abhängigkeit der Spezies erfolgt die unterschiedlich häufige Verwendung redundanter Kodons für gleiche Aminosäuren. Ausgangspunkt hierfür ist die Degeneration des genetischen Kodes (Nierenberg 1965). So ist in den meisten Zellen auf der einen Seite die Erkennung verschiedener AS durch sog. isoakzeptierende tRNAs möglich und auf der anderen Seite existieren viele tRNAs mit verschiedenen Kodonerkennungssequenzen, die für eine bestimmte AS spezifisch sind. Die unterschiedliche Verfügbarkeit bestimmter tRNA-Gruppen beim Translationsprozess wurde bereits zwischen verschiedenen Organismen sowie im Vergleich verschiedener Gewebetypen eines bestimmten Organismus beschrieben (Smith 1996). Variable tRNA-Verteilungen konnten sowohl in neoplastischen als auch in ausdifferenzierten Zellen innerhalb des selben Organismus beobachtet werden (Kanduc 1997). Aus dieser Beobachtung kann die unterschiedlich hohe Expression eines bestimmten Gens in verschiedenen Organismen erklärt werden (Smith 1996) und verdeutlicht die wichtige Rolle der Kodonverwendung bei der Genregulation. Dass die Kodonverwendung in

direkter Korrelation zu einer gesteigerten Expressionseffizienz von Proteinen steht (Holm 1986), konnte beispielsweise bei der gesteigerten Erythropoetinproduktion (Kim, Oh et al. 1997), bei der verbesserten Expression des HIV1-Strukturgens *env* (Haas, Park et al. 1996) bzw. des HIV1-Gruppen-spezifischen Antigens *gag* (Deml, Bojak et al. 2001) gezeigt werden. Da der GC-Gehalt von Virusgenomen meist weit unter dem Genom der Wirtszellen liegt (Strauss 1996), kann auf eine unterschiedliche Kodonverwendung geschlossen werden.

Auch im Fall der humanen Papillomaviren ist eine Diskrepanz zwischen den im Virusgenom und den im menschlichen Organismus bevorzugten Kodons zu beobachten. Diese scheinbar schlechte Anpassung des Virus an den Wirt hat allerdings den Nutzen, die immunogenen Viruskapside nicht übermäßig bzw. in einer zu frühen Phase des Lebenszyklus zu generieren. Die an den Menschen angepasste Kodonoptimierung („Humanisierung“) wurde sowohl für HPV16 L1 als auch für HPV16 L2 mittels PCR durchgeführt und unterscheidet sich von der Originalsequenz zu 78,8% (L1) bzw. 88,5% (L2). Die Aminosäuresequenz der synthetisierten Proteine blieb daher unverändert.

Im Kontext der Expressionssteigerung von Strukturproteinen der Papillomaviren bzw. der Produktion von Pseudovirionen konnte die Wirkungsweise von optimierten Kodons zuerst an BPV1 L1 Molekülen beobachtet werden (Zhou, Liu et al. 1999). Allerdings konnte in diesen Versuchen nicht belegt werden, dass es bei den sequenziellen Veränderungen nicht evtl. zu einer Inaktivierung von potentiell inhibitorischen RNA-Elementen kommt.

Die Expressionseffizienz der humanisierten HPV16 L1- und L2-Gene konnte durch die Humanisierung unter der Kontrolle des CMV-Promotors um ein Vielfaches gesteigert werden (bisher unveröffentlicht). Die Verwendung der humanisierten Gene konnte im Vergleich zu den ursprünglichen Konstrukten selbst in Pflanzenzellen zu deutlich erhöhten Expressionsraten führen.

### 1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Pathogenese viraler Erkrankungen ist die Analyse aller Faktoren, die bei der Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle, dem Viruseintritt in die Zelle sowie bei der postinfektiösen Virusprozessierung eine Rolle spielen. Grundlage für solche Analysen ist die möglichst unbegrenzte Verfügbarkeit von infektiösen und replikationskompetenten Viren, die mit Hilfe von zügig durchführbaren und leicht zu handhabenden *in vitro* Produktionssystemen hergestellt werden. Um die bei einer HPV-Infektion ablaufenden Prozesse möglichst gut untersuchen zu können, sollten die Virionen außerdem unter Bedingungen erzeugt werden, die der nativen Vermehrungssituation möglichst nahe kommen.

Ein diesen Kriterien entsprechendes *in vitro* Produktionssystem konnte für das humanpathogene Papillomvirus Typ16 bis heute noch nicht entwickelt werden. Ein Hauptgrund dafür liegt in der sehr starken Expressionskontrolle der späten Gene von HPV16, die für die Bildung der gleichnamigen Virushüllproteine L1 und L2 verantwortlich sind. Neben der Produktion ist auch die Verpackung der Kapside mit DNA im natürlichen System auf sich differenzierende Zellen beschränkt. Die für diese enge Regulierung verantwortlichen Faktoren sind weitgehend ungeklärt. Untersuchungen bei der künstlichen Herstellung von infektiösen Virionen des Bovinen Papillomavirus zeigten, dass eine wirtsunabhängige Produktion (hier in Hefen) prinzipiell durchgeführt werden kann. Dies war ein Anhaltspunkt dafür, dass die für den Differenzierungsprozess der Zelle notwendigen Faktoren keine entscheidende Rolle zu haben scheinen. Zwar wurden beispielsweise mehrere Herstellungssysteme auf Basis von viralen Expressionssystemen (Semliki-Forestvirus, Vacciniavirus) entwickelt, doch konnten diese viele der o.g. Kriterien nicht erfüllen.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde daher eine neue Strategie entwickelt, die strikte Regulation der Kapsidgenexpression zu überwinden. Dazu wurde eine Humanisierung (1.2.5; S.16) der HPV16 L1- und L2-Gene auf Kodonebene durchgeführt und in Vor-experimenten bewiesen, dass durch diese Vorgehensweise im Vergleich zu den Wildtyp Proteinen eine um den Faktor  $10^4$ - $10^5$  erhöhte Proteinexpression erreicht werden kann.

Es wurde darauf die Hypothese aufgestellt, dass die posttranskriptionelle Regulation durch die Humanisierung durchbrochen wird und unabhängig vom Zelltyp Virus-ähnliche Partikel (VLPs), die aus dem Hauptstrukturelement HPV16 L1 sowie dem

Nebenstrukturelement HPV16 L2 bestehen, hergestellt werden können. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Verpackung solcher VLPs mit beliebiger DNA möglich ist und diese durch die infektiöse Eigenschaft verpackter Partikel (=Pseudovirionen) in Zellen transduziert werden kann. Die Weiterentwicklung dieses Gedanken zu einer VLP-Kombinationsvakzine schien zudem viel versprechend.

In Fortführung der gewonnenen Erkenntnisse sollte nun in dieser Arbeit geklärt werden, in welchen Zellsystemen eine optimale Ko-Expression der humanisierten HPV16 L1- und L2-Gene durchgeführt werden kann bzw. in wie weit und unter welchen Bedingungen die Herstellung von VLPs aus den humanisierten Elementen L1 und L2 möglich ist. Außerdem sollte versucht werden, die VLPs mit DNA zu verpacken bzw. ein dementsprechend reproduzierbares Verpackungssystem zu etablieren. Schließlich sollte zur Charakterisierung der so gewonnenen VLPs geklärt werden, ob die verpackten VLPs in der Lage sind, andere Zellen zu infizieren und die in ihnen verpackte DNA zu transduzieren.

## 2. Material

### 2.1 Molekularbiologische Materialien

#### 2.1.1 Plasmide

##### Plasmid zur bakteriellen Klonierung:

pBlueskriptII KS (+)                      Stratagene, Amsterdam, Niederlande

##### Plasmide zur eukaryotischen Genexpression:

pcDNA3.1(-)                                  Invitrogen, Groningen, Niederlande  
pUF3    (Zolotukhin, Potter et al. 1996)

pUR $\beta$  #150: Das Plasmid basiert auf den eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pUR; Es enthält das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des CMV Promotors (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Martin Müller, DKFZ, Heidelberg).

#65: Das Plasmid basiert auf dem prokaryotischen Klonierungsvektor sp65. Es enthält das komplette HPV16 Genom.

##### Plasmide zur Herstellung von VLPs:

Die genauen Plasmidkarten, die zur Herstellung der VLPs verwendet wurden, können dem Anhang entnommen werden (s. Kapitel 9).

##### Plasmide zur Herstellung von rekombinanten Adeno-assoziierten Viren:

pDG    Laborbestand J.Kleinschmidt (DKFZ)  
(Grimm, Kern et al. 1998)

#### 2.1.2 Antikörper

##### Erstantikörper:

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Referenz
Camvir	HPV16 L1	Maus	(Kulski, Sadleir et al. 1998)
#20	HPV16 L2	Kaninchen	(Gornemann, Hofmann et al. 2002)
#4543	HPV16 L1	Kaninchen	Laborbestand M.Müller (DKFZ)
1.3	HPV16 L1	Maus	(Muller, Zhou et al. 1997)
B1	AAV Kapside	Maus	(Wobus 2000)
A20	AAV Kapside	Maus	(Wobus 2000)
T-AG	SV40 T-Antigen	Maus	(MacArthur and Walter 1984)

##### Zweitantikörper:

Ziege anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase-konjugiert                      Sigma, Deisenhofen  
Ziege anti-Maus IgG/IgM, Meerrettichperoxidase-konj.                      Sigma, Deisenhofen  
Ziege anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert    Dianova, Hamburg

Ziege anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert

Sigma, Deisenhofen

### 2.1.3 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

#### Targetplasmid (UTR):

Primer 1:

TTT GAT ATC GTT TTC TGC AGA CCT AGA TCA G

Primer 2:

AAA GAT ATC GTG CAT AAA ATG TCT GCT TTT ATA C

#### SV40 Sondenherstellung:

Primer 1:

TTT GAA TTA ATT CTG TGG AAT GT

Primer 2:

TTT CCA AAA AAG CCT CCT CAC TAG

## 2.2 Biologische Materialien

### 2.2.1 Viren

Ad-5: Wildtyp Adenovirus Typ 5 (Laborbestand J. Kleinschmidt, DKFZ-Heidelberg)

A194: Für humanisiertes HPV16 L1 rekombinantes Bakulovirus (Laborbestand M. Müller, DKFZ-Heidelberg)

### 2.2.2 Bakterienstämme (E. coli)

#### DH5 $\alpha$

Genotyp: *supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* ( $r_K^- m_K^+$ )  
*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 deoR**

#### JM101

Genotyp: *supE thi  $\Delta$ (*lac-proAB*) F'[*traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup>*  
*lacZ* $\Delta$ M15]*

#### MC1061

Genotyp: F<sup>-</sup>*araD139  $\Delta$ (*ara-leu*)7696 galE15 galk16  $\Delta$ (*lac*)X74*  
*rpsL* (Str<sup>r</sup>) *hsdR2* ( $r_K^- m_K^+$ ) *mcrA mcrB1*

### 2.2.3 Eukaryotische Zell-Linien

293 Adenovirus 5 (E1A/B) transformierte humane embryonale Nierenzellen

293-T Adenovirus 5 (E1A/B) transformierte humane embryonale Nierenzellen, die das Gen für das T-Antigen des Simian Virus 40 enthalten

293-TT Adenovirus 5 (E1A/B) transformierte humane embryonale Nierenzellen, die das Gen für das T-Antigen des Simian Virus 40 in sehr großen Mengen enthalten (Überexpression)

911 Adenovirus 5 (E1A/B) transformierte humane embryonale Retinoblasten Zell-Linie

BHK-21 Zell-Linie aus Hamsterniere (*Mesocricetus auratus*)(ATCC Nummer: CRL-1632)

BPHE-1	Zell-Linie aus Hamsterniere, die autonom replizierende BPV-1 Genome enthält
Caski	Humane, epitheliale Zellen einer Cervix Karzinometastase. Enthalten ca. 600 integrierte Kopien des HPV16 Genoms und HPV18 verwandte Sequenzen (ATCC Nummer: CRL-1550)
COS-1	SV40 transformierte Fibroblasten aus Affenniere ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ; ATCC Nummer: CRL-1650). Im Gegensatz zu Cos-7 Zellen besitzen Cos-1 Zellen eine integrierte Kopie der kompletten frühen Region des SV40 Genoms.
COS-7	SV40 transformierte CV1-Zellen (siehe nachfolgend; ATCC Nummer: CRL-1651)
CV-1	Fibroblastenzell-Linie aus Affenniere ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) (ATCC Nummer: CCL-70)
HeLa	Humanes Adenokarzinom aus dem Epithel des Cervix uteri. Diese Zell-Linie enthält Sequenzen des humanpathogenen Papillomavirus Typ 18 (ATCC Nummer: CCL-2)
Sf9	Ovariengewebe (aus Puppenstadium) des „fall armyworm“ ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )(ATCC Nummer: CRL-1711)

## 2.3 Kulturmedien und -lösungen

### 2.3.1 Bakterienkultur

#### Kulturmedien:

LB-Medium:           10     g     Trypton  
                           5     g     Hefeextrakt  
                           5     g     NaCl  
 ad 1l H<sub>2</sub>O, pH-Einstellung mit NaOH auf 7.5 und anschließendes Autoklavieren

LB-Agarplatten:     1,5    %    Bacto-Agar (w/v)  
 Der Bacto-Agar wird LB Medium zugesetzt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C kann das gewünschte Antibiotikum hinzugefügt werden

#### Lösungen und Puffer:

Resuspensionspuffer:       10     mM Hepes  
 ad 1L H<sub>2</sub>O

Ampicillin            Stammlösung (c = 100mg/ml)  
 Kanamycin            Stammlösung (c = 30mg/ml)

### 2.3.2 Kultur eukaryotischer Zellen

#### Zusammensetzung der kompletten Medien:

DMEM:                10     %     FCS (hitzeinaktiviert) (v/v)  
                           2     mM    L-Glutamin  
                           100   U/ml  Penicillin / Streptomycin

Kryokonservierungs- ungslösung:	45	%	komplettes Kulturmedium (v/v)
	45	%	FCS (hitzeinaktiviert) (v/v)
	10	%	DMSO (v/v)

Trypanblaulösung:	50	%	Trypanblau-Stocklösung (v/v)
	50	%	PBS-Puffer (v/v)

DMEM			Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin			Life Technologies, Karlsruhe
0.25% Trypsin-EDTA-Lsg.			Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau-Stocklösung			Fluka, Gaiberg

Das Komplement des FCS wurde durch Inkubation für 30min bei 56°C inaktiviert.

### 2.3.3 Kultur von Insektenzellen

TNM-FH:	10	%	FCS (hitzeinaktiviert) (v/v)
	2	%	L-Glutamin (v/v)
	1	%	Penicillin (v/v)
	1	%	Streptomycin (v/v)

TNM-FH Kulturmedium			Sigma, Deisenhofen
---------------------	--	--	--------------------

## 2.4 Materialien für molekularbiologische und zellbiologische Techniken

### 2.4.1 Plasmidaufarbeitung in kleinen Mengen aus *E. coli* („Miniprep“)

Lösung 1:	50	mM	Glucose
	25	mM	Tris
	10	mM	EDTA

Lösung 2:	0,2	M	NaOH
	1	%	SDS

Lösung 3:	3	M	Natriumacetat
	pH-Einstellung mit Essigsäure auf 5.3		

Weiterhin benötigte Chemikalien:  
Phenol\*, CIA, 2-Propanol, 100% EtOH sowie TE (siehe 2.4.211)

### 2.4.2 Plasmidaufarbeitung in großen Mengen aus *E. coli* („Maxiprep“)

Lösungen 1, 2 und 3 aus „Plasmidaufarbeitung in kleinen Mengen“ (2.4.1)

LiCl-Puffer:	5	M	LiCl in H <sub>2</sub> O
--------------	---	---	--------------------------

Weiterhin benötigte Chemikalien:  
Lysozym (20µg/ml Stocklösung), RNase (20mg/ml Stocklösung), Cäsiumchlorid, Ethidiumbromid (siehe 2.4.211)

### 2.4.3 Präparation von episomaler DNA (nach Hirt)

#### Standardaufreinigung:

Lysepuffer: 10 mM Tris pH 8.0  
 10 mM EDTA pH 8.0  
 0,6 % SDS  
 250 µg Proteinase K/ml  
 in H<sub>2</sub>O lösen

#### Schnellaufarbeitung:

Resuspensions-  
 puffer: 50 mM Tris pH 7.5  
 10 mM EDTA (EDTA muss 100µg/ml RNase A enthalten)  
 in H<sub>2</sub>O lösen

Lysepuffer: 1 % SDS  
 200 mM NaOH  
 in H<sub>2</sub>O lösen

Präzipitationsmix: 3 M CsCl  
 1 M Potassiumacetat  
 0,67 M Essigsäure  
 in H<sub>2</sub>O lösen

Waschpuffer: 80 mM Potassiumacetat  
 10 mM Tris pH 7.5  
 40 µM EDTA  
 60 % Ethanol  
 in H<sub>2</sub>O aufnehmen

### 2.4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

2x BBS: 50 mM BES  
 280 mM NaCl  
 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 in H<sub>2</sub>O gelöst und mit NaOH auf pH 6.95 eingestellt

Sonstiges: 3 M CaCl<sub>2</sub>  
 in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

X-Gal-  
 Färbelösung: 4 mM K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>  
 4 mM K<sub>4</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 5 % 20mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (v/v)  
 ad 1 ml PBS

Transfast Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
Escort Transfection Reagent	Sigma, Deisenhofen
Fugene 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Metafectene	Biontix, München

### 2.4.5 Induktion von Apoptose in eukaryotischen Zellen

Staurosporin-  
stocklösung: 1 mM Staurosporin (*Streptomyces*)  
in 100% DMSO aufnehmen und lichtgeschützt bei 4°C lagern

Staurosporin Sigma, Deisenhofen

### 2.4.6 Extraktion von virus-ähnlichen Partikeln (VLP) aus Säugerzellen

VLP-Extraktions-  
puffer: 1 M NaCl  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
10 mM Hepes  
in PBS lösen, 1 Tablette Proteaseinhibitorenmix/10ml Ansatz  
hinzufügen sowie im Anschluss sterilfiltrieren

Proteaseinhibitorenmix (complete-mini; EDTA free) Roche, Mannheim

### 2.4.7 Elektrophoresepuffer und -lösungen

#### 2.4.7.1 DNA-Agarosegele

Laufpuffer (TAE): 0,04 M Tris  
5,71 % Essigsäure (v/v)  
10 % 0,5 M EDTA pH 8.0 (v/v)

#### 6x DNA

Ladepuffer (BPB): 50 % Saccharose  
0,15 % Bromphenolblau  
0,12 % SDS

#### 2.4.7.2 Polyacrylamidgele zur Proteinauftrennung

TGS-Laufpuffer: 25 mM Tris HCl pH 8.3  
1,45 % Glycin  
0,1 % SDS

#### 2x Protein- Ladepuffer

(2x Laemmli): 12,5 % 1 M Tris HCl pH 6.8 (v/v)  
4 % SDS (w/v)  
20 % Glycerin (v/v)  
0,02 % Bromphenolblau  
0,2 M DTT

Tris-Puffer pH 6.8: 1 M Tris  
pH-Einstellung mit HCl auf pH 6.8

Tris-Puffer pH 8.8: 1 M Tris  
pH-Einstellung mit HCl auf pH 8.8

<b>Sammelgel:</b>		<b>3%</b>	
Acrylamidlösung	1	ml	
1 M Tris-Puffer pH 6,8	1,25	ml	
10% SDS	300	µl	
H <sub>2</sub> O	7,5	ml	
10% APS	100	µl	
TEMED	15	µl	

<b>Trenngel:</b>		<b>10%</b>		<b>12,5%</b>	
Acrylamidlösung	10	ml	12,5	ml	
1 M Tris-Puffer pH 8,8	11,25	ml	11,25	ml	
10 % SDS	300	µl	300	µl	
H <sub>2</sub> O	8,15	ml	5,65	ml	
10% APS	300	µl	300	µl	
TEMED	15	µl	15	µl	

Weiterhin benötigte Chemikalien:

Gebrauchsfertige Acrylamidlösung  
(30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)  
TEMED

Applichem, Darmstadt  
Sigma, Deisenhofen

#### 2.4.8 DNA Längenmarker

*Hind*III-restriktionsverdauter Lambda-DNA-Fragmentgrößenstandard im Bereich von 2027 bis 23130bp  
100bp Leiter DNA-Größenstandard

New England Biolabs, Frankfurt  
MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 2.4.9 Molekulargewichtsmarker für Proteingele

Molekulargewichts-Standardmarker BenchMark  
Vorgefärbter Proteinmarker

Life Technologies, Karlsruhe  
Peqlab, Erlangen

Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in den jeweiligen Grafiken des Ergebnisteils angegeben.

#### 2.4.10 Western Blot

EMBL-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 10.4  
39 mM Glyzin  
1,3 mM SDS  
20 % Methanol (v/v)  
in H<sub>2</sub>O aufgenommen

Blocklösung: 5 % Magermilchpulver  
0,05 % Tween-20 (v/v)  
in PBS gelöst

Luminol-Lösung: 1,25 mM Natriumluminol  
2,7 mM Wasserstoffperoxid  
in 0,1M Tris-Cl pH 8.6 aufgenommen; Lagerung bei 4 °C und lichtgeschützt

Enhancer: 11 mg Para-hydroxy-coumarsäure (trans)  
in 10ml DMSO gelöst; lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert

Strip-Puffer: 1 M Glycin  
ad 1L H<sub>2</sub>O sowie Einstellung auf pH 1.8

Ponceau-S-Färbelösung: 0,5 % Ponceau-S (w/v)  
ad 500ml mit 1% Essigsäure

Chemilumineszenz-Detektions-Kit Applichem, Darmstadt

### 2.4.11 Southern Blot

Depurinisierungspuffer: 0,25 M HCl  
in H<sub>2</sub>O

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH  
1,5 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris pH 8.0  
1,5 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O

Blottingpuffer (10x SSC): 1,5 M NaCl  
0,15 M Na-Citrat  
in H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10N NaOH auf pH 7.0 eingestellt

Farbmarker-Lösung: 0,1 % Bromphenolblau  
0,1 % Dextranblau  
in 2xTE aufnehmen

Hybridisierungslösung: 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,5 M EDTA  
20 % SDS  
10 % BSA  
in H<sub>2</sub>O

Waschpuffer 1: 2 x SSC  
0,1 % SDS  
in H<sub>2</sub>O

Waschpuffer 2: 0,2 x SSC  
0,1 % SDS  
in H<sub>2</sub>O

#### 2.4.12 Infektionsexperimente mit VLPs/PVs

PBS-PV: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O lösen und auf pH 6.8 eingestellt

PBS-PV2: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O lösen und auf pH 6.8 eingestellt

PBS-PV3: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100 µg/ml Bovines Serum Albumin  
in H<sub>2</sub>O lösen, auf pH 6.8 eingestellt und autoklaviert

#### 2.4.13 Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (AAV)

2x HBSS: 50 mM HEPES pH 7.05  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O  
280 mM NaCl  
10 mM KCl  
12 mM D(+)-Glucose  
in H<sub>2</sub>O gelöst und auf pH 7.05 eingestellt. Darauf sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

Sonstiges: 2,5 M CaCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

Lysepuffer: 0,15 M NaCl  
50 mM Tris pH 8.5  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

Iodixanollösungen: 25 % Iodixanol  
40 % Iodixanol  
60 % Iodixanol  
jeweils in PBS-MK ansetzen

15 % Iodixanol  
in PBS-MKN aufnehmen

PBS-MK: 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM KCl  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

PBS-MKN: 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM KCl  
1 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

Weitere Chemikalien:

Flüssiger Stickstoff DKFZ, Heidelberg  
OptiPrep Density Gradient Medium 60% (Iodixanol) Sigma, Deisenhofen

#### 2.4.14 AAV Genomtitration

Proteinase Puffer

(2x): 20 mM Tris pH 8.0  
20 mM EDTA  
1 % SDS  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

Titrierlösung: 0,4 M NaOH  
10 mM EDTA  
in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

#### 2.4.15 Indirekte Immunfluoreszenz

Eindecklösung: 50 % Glycerin  
in H<sub>2</sub>O

#### 2.4.16 ELISA

PBS-Puffer: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O lösen, pH 7.3-7.4 einstellen und autoklavieren

ELISA-Puffer: 100 mM Natriumacetat  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10% Essigsäure auf pH 4.2 eingestellt

Substratlösung 9,5 ml ELISA-Puffer  
0,5 ml 10mg/ml ABTS  
4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %-ige wässrige Lösung)

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenz-thiazolin)-6-Sulfonsäure) Sigma, Deisenhofen

## 2.4.17 Radioaktivität

### 2.4.17.1 Radioaktive Markierung von DNA (Sondenherstellung)

DNA-labeling Kit, „Ready-to-go“-labeling beads	Amersham, München
DNA-labeling Kit, “Random primed labeling”	Roche, Mannheim

### 2.4.17.2 Radiochemikalien

<sup>32</sup> P-dCTP, 250 $\mu$ Ci	Amersham, München
------------------------------------	-------------------

### 2.4.17.3 Aufreinigung radioaktiv markierter Sonden

Laufpuffer (2x):	0,1 %	Bromphenolblau
	0,1 %	Dextranblau
	in 2x TE	

Sephadex G25	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dextranblau	Merck, Darmstadt

## 2.4.18 Elektronenmikroskopie

Fixierlösung:	2,5 %	Glutaraldehyd (v/v)
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	in Cacodylat-Puffer aufnehmen	

Cacodylat-Puffer:	50 mM	Cacodylsäure
	in H <sub>2</sub> O aufnehmen und pH auf 7.2 einstellen	

Osmiumtetroxid-Lösung:	2 %	Osmiumtetroxid (v/v)
	in Cacodylat-Puffer aufnehmen	

## 2.4.19 Chemikalien

Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Sigma Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Riedel de Haen (Seelze, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm) und Gerbu (Gaiberg) bezogen.

## 2.4.20 Enzyme

Benzonase	Sigma, Deisenhofen
DNaseI	Roche, Mannheim
Kälberdarmphosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs, Schwalbach
Ribonukelase A (RNase A)	Roche, Mannheim
T4-Ligase	Life Technologies, Karlsruhe
T4-DNA-Polymerase	Life Technologies, Karlsruhe

### 2.4.21 Standardlösungen

Antikörperlösung: 5 % Bovines Serum Albumin  
0,01 % Thimerosal  
in PBS ansetzen und sterilfiltrieren

Blockmilchlösung: 5 % Magermilch  
in PBS-T ansetzen

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

Entfärbelösung: 45 % Methanol (v/v)  
45 % H<sub>2</sub>O (v/v)  
10 % Essigsäure (v/v)

PBS-Puffer: 140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7.3–7.4

PBS-T: 0,05 % Tween-20 (v/v) in PBS

PBS-T3: 0,3 % Tween-20 (v/v) in PBS

CIA Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1 (v/v)

Phenol\* 50 % Phenol (v/v)  
50 % CIA (v/v)

Strip-Puffer 1 M Glyzin  
pH mit konzentrierter HCl auf 1.8 einstellen und mit H<sub>2</sub>O ad 1L auffüllen

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 7.4  
1 mM EDTA, pH 8.0

1% Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)

100% Ethanol absolut (EtOH)

100% 2-Propanol (Isopropanol)

Roth, Karlsruhe

Riedel de Haen, Seelze

Niederlande

Riedel de Haen, Seelze Niederlande

### 2.4.22 Kits

Random Primed DNA Labeling Kit  
"Ready to go" DNA labeling Beads

Roche, Mannheim

Amersham, München

### 2.4.23 Verbrauchsmaterialien

6-, 12- und 24-Lochplatten zur Bakterien- oder Gewebekultur

500ml Zentrifugenröhrchen

50ml Zentrifugenröhrchen

15-, und 50ml Schraubdeckelröhrchen

15ml Schraubdeckelröhrchen, PP und PS

Bottle-Top-Filter

Dialysefilter, 0,025µm

Deckgläschen (rund), 10mm Durchmesser

Elektroporationsküvetten

ELISA-Platten, Rundboden

Einfrierröhrchen, Kryo-Röhrchen 2ml

Filterpapier, Whatman 3MM-Papier

Geltrocknungsfolie

Gewebekulturschalen und -platten

Impfösen

Konzentratoren, VivaSpin MW 15,000

Küvetten, Halb Mikro

Kupfernetze, „300 mesh“

Nitrozellulose, 0,2µm Porengröße, Protran

Nirozellulose, 0,45µm

Nylon Transfer Membran, Hybond-N<sup>+</sup>, 0,45µm

Objektträger

Parafilm M

Pasteurpipetten, Kunststoff

Pipetten mit 20µl-, 200µl-, 1000µl Gesamt-  
pipettivolumen (Fa. Gilson)

Pipettenspitzen

Polyvinylidendifluorid (PVDF)

Polyvinylidendifluorid (PVDF)

QIAprep

Reagenzreservoir

Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml

Reaktionsgefäße 15ml, 50ml

Röntgenfilme, Kodak BioMax MR-1

Röntgenfilme, Kodak X-Omat, Blue XB-1

Röntgenfilme, Hyperfilm ECL

Röntgenfilmkassetten

Silica-Membran Zentrifugationssäulen

Spritzen und Kanülen

Sterilfilter, Zelluloseacetat 0,2µm

Ultrazentrifugenröhrchen, PA 6ml

Ultrazentrifugenröhrchen, PA 13x51mm

Ultrazentrifugenröhrchen, PA 25x29mm

Ultrazentrifugenröhrchen, PA 25x89mm

Ultrazentrifugenröhrchen, PA 14ml

Untersuchungshandschuhe

Costar, Corning, USA

Greiner, Frickenhausen

Nalgene, Nunc, Wiesbaden

Nalgene, Nunc, Wiesbaden

Greiner, Frickenhausen

Biochrom, Berlin

Costar, Corning, USA

Millipore, Billerica, USA

Roth, Karlsruhe

Peqlab, Erlangen

Becton Dickinson, Franklin

Lakes, USA

Roth, Karlsruhe

Schleicher & Schuell, Dassel

Promega, Madison, USA

Greiner, Frickenhausen

Greiner Frickenhausen

Vivascience, Hannover

Greiner, Frickenhausen

Plano, Wetzlar

Schleicher & Schuell, Dassel

Schleicher & Schuell, Dassel

Amersham, München

Langenbrick, Emmendingen

Amer. National Can, Chicago, USA

Greiner, Frickenhausen

Abimed, Langenfeld

Greiner, Frickenhausen

Boehringer, Mannheim

Amersham, München

Qiagen, Hilden

Costar, Corning, USA

Eppendorf, Hamburg

Greiner, Frickenhausen

Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen

Amersham, München

Kodak, Stuttgart

Qiagen, Hilden

Terumo, Leuven, Belgien

Renner, Dannstadt

Kendro, Newtown, USA

Beckmann, Palo Alto, USA

Beckmann, Palo Alto, USA

Beckmann, Palo Alto, USA

Beckmann, Palo Alto, USA

Meditrade, Kiefersfelden

Zellschaber  
 Zellkulturschalen (Durchmesser: 10cm)  
 Zentrifugationssäule mit Silica-Membran

Costar, Corning, USA  
 Greiner, Frickenhausen  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Qiagen, Hilden

#### 2.4.24 Geräte und Hilfsmittel

Agarosegel-Elektrophoreskammer, Horizon 58  
 Austropfvorrichtung für Saccharosegradienten  
 Bakterieninkubator, Certomat H  
 Bakterienschüttler, Orbitec  
 Elektronenmikroskop, EM 10A  
 Elektroporationsgerät, *E. coli* Pulser  
 Elektrotransfer Blotapparatur, Semy Dry  
 ELISA-Lesegerät, Multiskan MS  
 Entwicklermaschine AgfaCurix 60  
 schine Classic E.O.S.  
 Geltrafo, PS 305  
 GeneAmp PCR System 2400  
 Handmonitor LB 1210 B  
 Inversmikroskop für Zellkultur, Wilorat S  
 Kamera (Elektrophoresegelelablichtung) EASY 429K  
 Konfokales Mikroskop Leica DM IRBE  
 Kühl- und Gefrierschränke  
 Kühlzentrifuge Minifuge T mit Einsatz # 2708  
 Kühlzentrifuge Minifuge 2  
 Kühlzentrifuge Sorvall RC5C  
 Kühlzentrifuge Varifuge RF  
 Laborwaage, MC 1  
 Magnetrührer, RCT basic  
 Mikroliterpipetten, Gilson  
 Mikroskop Axiophot  
 Mikrowellengerät  
 Peristaltische Pumpe P1  
 pH-Meter  
 Photoapparatur  
 Photodrucker, P91  
 Pipettierhilfe „Pipetboy“  
 Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer  
 Reaktionsgefäßrotierer  
 Rotoren: SS34, SA600, GS3, TV-865  
 TI 50.2, VTi 65  
 Rotor: TST 41.14  
 Saccharosegradientenmischer  
 Steuerung für Gelkamera, ICU1  
 Stickstofftank, Chronos Biosafe  
 Tempcold, Kühlblockaggregat  
 Thermomixer 5436  
 Tischmonitor QC 2000  
 Tischkühlzentrifuge IEC Micromax CF  
 Tischkühlzentrifuge 5417 R

Life Technologies, Karlsruhe  
 DKFZ, Heidelberg  
 Braun Melsungen, Melsungen  
 Infors GmbH, Einsbach  
 Zeiss, Jena  
 Bio-Rad, München  
 Bio-Rad, München  
 Labsystems, Frankfurt  
 Agfa, München Entwicklerma-  
 Agfa, München  
 Gibco BRL, Eggenstein  
 Perkin Elmer, Norwalk, USA  
 Berthold, Wildbad  
 Hund, Wetzlar  
 Herolab, Wiesloch  
 Leica, Heidelberg  
 Bosch, Labotect, Göttingen  
 Heraeus, Hanau  
 Heraeus, Hanau  
 DuPont, Bad Nauheim  
 Heraeus, Hanau  
 Sartorius, Göttingen  
 Janke und Kunkel, Staufen  
 AAT, Langenfeld  
 Zeiss, Oberkochen  
 Samsung, Korea  
 Amersham, München  
 Knick, Berlin  
 Polaroid, St. Albans, England  
 Mitsubishi, Kyoto, Japan  
 Integra Bioscience, Fernwald  
 Hoefer, San Francisco, USA  
 Stuart Scientific, Redhill, UK  
 DuPont, Bad Nauheim  
 Kendro, Newtown, USA  
 DKFZ, Heidelberg  
 Herolab, Wiesloch  
 Messer Griesheim, Griesheim  
 Thermo-Dux, Weinheim  
 Eppendorf, Hamburg  
 BioScan, Washington D.C.,  
 USA  
 Thermoquest, Egelsbach  
 Eppendorf, Hamburg

Tischkühlzentrifuge 2019R	Napco, Winchester, USA
Tischschwenkplatte Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (f. Radioaktivität) 5416	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Transilluminatoren 254nm und 366nm	Konrad Bede, Wiesloch
Ultracutter	Leica, Heidelberg
Ultraschalldesintegrator „Sonifier 250“	Branson Danbury, USA
Ultrazentrifuge Centrikon T-2070	Kontron, Newtown, USA
„UV-Crosslinker“	Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad, Julabo UC	Buddelberg, Mannheim
Zellkulturinkubator, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus, Hanau

#### 2.4.25 Computerprogramme

Adobe Acrobat 6.0	Adobe, California, USA
Adobe Photoshop 6.0	Adobe, California, USA
Clone Manager for Windows	Scientific and Educational Software, Pennsylvania, USA
Endnote 7.0	ISI Research Software, Berkeley, USA
Leica TCS NT Version 1.6.582	Leica, Mannheim
Leica Confocal Software Version 2.5	Leica Microsystems, Mannheim
Medline / Pubmed	NIH Software
Microsoft Office 2000 bzw. 2002	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Windows 98 bzw. XP	Microsoft Corp., Redmont, USA

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Bakterienkultivierung

Bakterien werden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten (2.3.1) bei 37°C kultiviert. Durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin werden solche Bakterien selektioniert, die durch eine vorausgegangene Transformation ein Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen enthalten. Flüssigkulturen werden entweder von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder aus einem Glycerinvorrat mit einer sterilen Plastikimpföse beimpft.

#### 3.1.2 Bakterienkonservierung

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterienklonen werden 1000µl einer Übernachtskultur mit 1000µl Glycerin (100%) gemischt und bei -70°C eingefroren. Diese Glycerinvorräte werden bei -70°C aufbewahrt und dienen zum Animpfen von neuen Übernachtskulturen.

#### 3.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Alle Restriktionsenzyme werden bezüglich des Gebrauchs von Inkubationspuffern und der Anwendung von bestimmten Reaktionsbedingungen entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Für die analytische DNA-Spaltung wird ca. 1µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einem Endvolumen von 20µl für 2-3 Stunden inkubiert. In Abhängigkeit von der Anzahl an Schnittstellen in der Substrat-DNA werden zwischen 10 und 20 Einheiten des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt. Im weiteren wird dem Restriktionsansatz zur Beseitigung von RNA-Kontaminationen RNase und zur Stabilisierung von zu Spontandegradation neigenden Enzymen (bei Bedarf) BSA hinzugefügt. Schließlich kann die DNA mittels Zugabe von 1/5 Volumen des 6x BPB-Ladepuffers (2.4.7.1) in der analytischen Agarosegelelektrophorese untersucht werden.

##### Pipettierschema:

- ca. 1µg Plasmid DNA
- 1µl Restriktionsenzym 1 (10-20U)
- 1µl Restriktionsenzym 2 (10-20U; bei „Doppelverdau“)
- 2µl 10x Reaktionspuffer
- 0,3µl 50x BSA (falls vom Hersteller empfohlen)
- 0,5µl RNase (aus 10mg/ml Stocklösung)
- ad 20µl H<sub>2</sub>O

Zur präparativen Aufreinigung von DNA Fragmenten werden zwischen 10 und 30µg Plasmid-DNA über Nacht in einem Endvolumen von 200µl unter den vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen verdaut. Das komplette Reaktionsvolumen wird mit 1/5 Volumen des 6x BPB-Ladepuffer (2.4.7.1) gemischt und auf einem präparativen Agarosegel (je nach gewünschter Trennungseigenschaft zwischen 1 und 1,5%) analysiert.

Pipettierschema:

10-30µg Plasmid DNA  
 2µl Restriktionsenzym 1 (10–20 U)  
 2µl Restriktionsenzym 2 (10–20 U; bei „Doppelverdau“)  
 20µl 10x Reaktionspuffer  
 3µl 100x BSA (falls vom Hersteller empfohlen)  
 5µl RNase (aus 10mg/ml Stocklösung)  
 ad 200µl H<sub>2</sub>O

Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen („Doppelverdau“) wird bezüglich der Reaktionsbedingungen den Vorgaben des Herstellers entsprochen.

3.1.4 Replikationsanalyse mittels *DpnI* / *HindIII* gestützter Restriktion

Das Enzym *DpnI* spaltet DNA an einer bestimmten Sequenz nur dann, wenn diese Sequenz eine Methylierung aufweist, wie sie typischerweise bei der Amplifikation von DNA in Prokaryoten, nicht aber in Eukaryoten auftritt. Damit kann die in Eukaryoten replizierte DNA von der durch Transfektion in die Zelle eingebrachten DNA unterschieden werden. Zur Kontrolle wird die nach dem Hirt-Protokoll extrahierte DNA (3.1.17.2) zusätzlich mit einem das transfizierte Plasmid linearisierendem Enzym (hier: *HindIII*) inkubiert, um im später erfolgenden Nachweis im Southern-Blot (3.1.18) die spezifische Wirkungsweise des *DpnI* nachweisen zu können.

Für die replikationsanalytische DNA-Spaltung werden ca. 20µl Hirt extrahierte Plasmid-DNA (3.1.17.2) mit den Restriktionsenzymen *DpnI* („Einzelverdau“) bzw. *DpnI/HindIII* („Doppelverdau“) in einem Endvolumen von 200µl für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Es werden weiterhin jeweils 20 Einheiten *DpnI* bzw. *HindIII* eingesetzt. Zur Beseitigung von RNA-Kontaminationen wird RNase und zur Stabilisierung der Enzyme BSA hinzugefügt. Schließlich wird die DNA nach Zugabe von 1/5 Volumen des 6x BPB-Ladepuffers (2.4.7.1) auf ein 0,7-1%-iges, analytisches Agarosegel aufgetragen.

Pipettierschema:

20µl Hirt extrahierte DNA  
 3µl *DpnI* (20U)  
 3µl *HindIII* (20U; bei „Doppelverdau“)  
 20µl 10x Reaktionspuffer  
 3µl 50x BSA  
 5µl RNase (aus 10mg/ml Stocklösung)  
 ad 200µl H<sub>2</sub>O

## 3.1.5 Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden

Durch die Verwendung der alkalischen Kälberdarmphosphatase (calf intestine alkaline phosphatase; CIAP) können glatte und überstehende 5'-DNA-Enden nach einem Restriktionsverdau dephosphoryliert werden. Durch diese Verfahrensweise kann einer unerwünschten intramolekularen Ligation effektiv entgegengewirkt werden. Der Gebrauch dieses Enzyms, der sich in der Regel direkt an einen Restriktionsverdau anschließt, erfolgt im Rahmen der vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen.

Dafür werden 3µl CIAP (1U/µl) zum Ansatz des präparativen Restriktionsverdaus hinzugefügt, der daraufhin bei Restriktionsschnittstellen mit 5'-Überhang für insgesamt 15min bei 37°C inkubiert wird. Handelt es sich allerdings um Schnittstellen mit einem 3'-Überhang bzw. glatten DNA Enden, so wird der Reaktionsansatz zunächst für 15min bei 37°C und danach für 15min bei 56°C inkubiert. Um zu verhindern, dass

bei der nachfolgenden Zusammenführung von dephosphorylierter Vektor- und phosphorylierter Insert-DNA weitere Dephosphorylierungsprozesse eine erfolgreiche Ligation verhindern, wird CIAP durch eine Phenol-Extraktion (3.1.12) oder eine präparative Agarosegelelektrophorese entfernt.

### 3.1.6 Auffüllen von 5'-Überhängen

Werden für Klonierungsexperimente glatte Enden eines DNA-Fragments benötigt, so kann man überhängende Einzelstränge mit dNTPs auffüllen. Dazu wird das aufzufüllende DNA-Fragment aus einem Restriktionsansatz gefällt (3.1.13) und anschließend in 40  $\mu$ l T4-DNA-Polymerasepuffer aufgenommen. Weiterhin werden dem Ansatz 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ l dNTPs (je 2,5mM) sowie 3  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase (2.4.20) hinzugegeben und für 30min bei RT inkubiert. Die DNA wird im folgenden erneut gefällt und kann für die Ligation (3.1.7) verwendet werden.

### 3.1.7 Ligation

Mit Hilfe der Ligation werden DNA-Fragmente an ihren Enden kovalent verbunden. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen freien 3'-OH und 5'-Phosphatgruppen. Die Zusammenführung von zwei im Vorfeld einzeln vorliegenden Fragmenten (Insert und Vektor) kann somit vollzogen werden.

#### Pipettierschema:

50ng dephosphorylierte Plasmid-DNA („Vektor“)  
250-500ng nicht dephosphorylierte DNA („Insert“)  
4  $\mu$ l 5x Ligationspuffer  
2  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l)  
ad 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 12–15°C gelagert. Die Menge an „selbstligierter“ Vektor-DNA (ohne Insert) wird durch einen zusätzlichen Reaktionsansatz ohne Verwendung der Insert-DNA ermittelt. Zur Überprüfung des Ligationserfolges werden jeweils 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes mit 1  $\mu$ l 6x BPB-Ladepuffer versetzt und auf einem analytischen Agarosegel (1–1,5%) aufgetrennt. Anschließend werden kompetente Bakterien mit 1-2  $\mu$ l des Ligationsansatzes transformiert (3.1.15).

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

Die PCR wird für die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte eingesetzt. Sie verläuft in mehrfachen Zyklen, wobei zuerst eine Denaturierung der DNA stattfindet. Gefolgt wird dieser Schritt von einer Primer-Hybridisierung, bei der mindestens teilweise komplementäre Oligonukleotide (Primer) an die denaturierte DNA binden und die zwischen Ihnen liegende DNA-Sequenz vermehrt wird. Die 5'-Enden der vermehrten DNA werden von den Primern gebildet und die Länge der DNA wird durch den Abstand der beiden Primer zueinander sowie von der Leistungsfähigkeit der DNA-Polymerase bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind unter 2.1.3 aufgeführt. In den PCR-Ansätzen wurde stets die *Pwo*-DNA-Polymerase (2.4.20) verwendet, die eine besonders geringe Rate zur Mutationsgenerierung besitzt.

Allgemeines Pipetierschema:

1µl Plasmid-DNA (1–10ng/µl)  
 1µl Primer 1 (50-100 pmol/µl)  
 1µl Primer 2 (50-100 pmol/µl)  
 8µl 10x PCR-Puffer mit MgSO<sub>4</sub>  
 8 µl dNTPs (je 2,5mM)  
 0–8µl Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 0,5µl *Pwo*-Polymerase (5U/µl)  
 ad 80µl H<sub>2</sub>O

Die PCR-Ansätze werden bis auf die *Pwo*-Polymerase gemischt und bis zum Start der PCR auf Eis gelagert. In dieser Zeit kann die Programmierung der verschiedenen Zyklen nach folgendem Schema vorgenommen werden:

Prozess	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Denaturierung	94°C	5min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30s	} 30 Zyklen
Hybridisierung	52°-60°C	30-60s	
Polymerisation	72°C	30-60s	
Polymerisation	72°C	10min	1 Zyklus
Lagerung	4°C	10min-16h	1 Zyklus

Um den Erfolg der DNA-Amplifikation zu überprüfen, werden 5µl des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Kann das synthetisierte DNA-Fragment im Agarosegel als scharfe Bande bei der erwarteten Laufweite identifiziert sowie die Existenz von unspezifischen Banden ausgeschlossen werden, so wird das übrige Volumen des PCR-Ansatzes mit Hilfe der präparativen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das DNA-Fragment - wie bereits beschrieben - aufgereinigt (3.1.11).

### 3.1.9 Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration und Reinheit wässriger Nukleinsäurelösungen kann mittels photometrischer Messung bestimmt werden. Dazu wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm ermittelt. Die Nukleinsäurelösung wird 1:400 in TE oder H<sub>2</sub>O verdünnt und die Extinktion bei 260nm ( $A_{260nm}$ ) und 280nm ( $A_{280nm}$ ) Wellenlänge in einer Quarzküvette (d=10mm) bestimmt. Als Referenz dient dabei die Extinktion des Lösungsmittels. Lag der gemessene Wert der  $A_{260nm}$  zwischen den Extinktionswerten 0,05 und 1 gelten für die Bestimmung der Konzentration folgende Berechnungsgrundlagen:

- i) Bei doppelsträngiger DNA:  
 $c = A_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50\mu\text{g/ml}$ ,
- ii) Bei einzelsträngiger DNA:  
 $c = A_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 30\mu\text{g/ml}$
- iii) Bei einzelsträngiger RNA:  
 $c = A_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40\mu\text{g/ml}$ .

Um eine genauere Aussage über die Reinheit der vorliegenden DNA-Lösung treffen zu können wird der Quotient aus den gemessenen Extinktionen ermittelt ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ). Liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 so kann auf eine hohe Reinheit der Nukleinsäure geschlossen werden. Werden Werte unterhalb dieser Spanne bestimmt, so sind diese durch erhöhte Protein- oder RNA-Anteile (Kontamination) zu erklären. Ein Anstieg der Werte über 2,2 kann hingegen auf Rückstände von Phenol in der DNA-Lösung zurückgeführt werden.

### 3.1.10 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt und über die Interkalierung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend präpariert werden.

Zur Herstellung eines 1%-igen Agarosegels werden 1g Agarose in 100ml TAE-Puffer (2.4.7.1) aufgekocht. Das verdampfte Wasser wird darauf ersetzt und die Lösung im Anschluss auf ca. 50°C abgekühlt. Damit die DNA später mit Hilfe des UV-Lichtes identifiziert werden kann, wird der Lösung schließlich noch 1µg/ml Ethidiumbromid zugegeben.

Daraufhin wird die Agaroselösung luftblasenfrei in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach 10min ist das Gel vollständig ausgehärtet und kann in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt und der Kamm zum Probenauftrag entfernt werden. Die aufzutrennende DNA-Lösung wird mit 1/5 Volumen 6x BPB-Ladepuffer (2.4.7.1) gemischt und in die Geltaschen geladen. Um die DNA-Fragmentlängen vergleichen zu können, werden entsprechende DNA-Längenmarker (2.4.8) aufgeladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA bei 80–100V für 40–60min werden analytische Agarosegele unter kurzzeitigem UV-Licht bei 254nm betrachtet und fotografiert. Da diese Wellenlänge in DNA schwerwiegende Mutationen (z.B. Bildung von Basendimeren) verursachen kann, eignet sich bei der Verwendung von DNA in präparativen Agarosegelen nur die Benutzung von langwelligem UV-Licht bei 366nm.

### 3.1.11 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die im präparativen Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente können nun unter langwelligem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten werden. Der das DNA-Fragment enthaltende Agarosegelblock wird in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, das zuvor am Boden mit einer glühenden Kanüle durchstoßen und zu einem Viertel mit silanisierter Glaswolle gefüllt wird. Nachdem der Ansatz für 10min auf -20°C abgekühlt wurde, erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 15min bei 4°C und 9.000upm. Der DNA-Gelblock zerbricht durch das angelegte Schwerfeld an der Glaswolle und die freiwerdende nukleinsäurehaltige Lösung wird in einem 2ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA in der aufgefangenen Lösung wird zur weiteren Verwendung einer Phenol-Extraktion (3.1.12) und DNA-Präzipitation (3.1.13) unterzogen.

### 3.1.12 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion

Im Gegensatz zu DNA können kontaminierende Proteine, die in wässrigen DNA-Lösungen enthalten sind, durch die Behandlung mit Phenol\* (2.4.21) extrahiert werden. Durch Zentrifugation erfolgt eine Separierung der Proteine in die organische Phase sowie in die Grenzschicht zwischen der entstehenden organischen und wässrigen Phase. Die wässrige Phase enthält hingegen die DNA, die nach erfolgter Elimi-

nierung von Phenol\* durch CIA (2.4.21) mittels Isopropanol-Fällung aufkonzentriert werden kann.

Aufzureinigende DNA-Lösungen werden bei Bedarf mit H<sub>2</sub>O auf ein Mindestvolumen von 200µl gebracht, worauf zwischen 200 und 500µl Phenol\* hinzugegeben und die Lösung für 5min bei RT kräftig geschüttelt wird. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13.000upm für 5min wird der DNA-haltige, wässrige Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Analog wird die wässrige Oberphase mit 200 bis 500µl CIA gemischt und abzentrifugiert. Die DNA der wässrigen Oberphase wird daraufhin nach Protokoll (3.1.13) präzipitiert.

### 3.1.13 Aufkonzentrierung von DNA durch Präzipitation

DNA-haltigen Lösungen wird 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5.3) sowie 0,7 bis 2,5 Volumen Isopropanol zugesetzt. Nach zehnmütiger Kühlung bei -70°C erfolgt der Präzipitationsschritt für 20min in der Tischzentrifuge bei 4°C und 13.000upm. Das DNA Sediment wird darauf mit 100% Ethanol gewaschen und erneut - wie zuvor - abzentrifugiert und für 5-10min bei RT an der Luft getrocknet. Im Anschluss wird die DNA in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

### 3.1.14 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

*E. coli* Bakterien können mittels Elektroporation nur dann transformiert werden, wenn die Bakteriensuspension eine geringe Salzkonzentration aufweist. Um elektrokompente Bakterien zu erhalten wird eine Entsalzung durchgeführt, die zu einer Herabsetzung der Leitfähigkeit der Suspension führt.

Zu Beginn der Herstellung von elektrokompenten Bakterien werden Bakterien mittels steriler Impföse auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird eine Kolonie von der Agarplatte entnommen und damit eine aus antibiotikafreien LB-Medium bestehende Vorkultur (20ml Gesamtvolumen) bei 37°C über Nacht gestartet. 5ml dieser Vorkultur werden anschließend in 500ml antibiotikafreies LB-Medium (2.3.1) transferiert. Die Bakterien werden in einem 2L Erlenmeyerkolben bei 200 bis 280upm und 37°C für ca. 3h inkubiert, bis die OD<sub>600nm</sub> der Bakteriensuspension zwischen 0,5 und 1 beträgt. Anschließend werden die Bakterien in vorgekühlte, GS-3-Rotor compatible Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C und 6.000upm (Sorvall RC5C) für 10-15min abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wird in 200ml kaltem Resuspensionspuffer (2.3.1) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Darauf wird das Bakteriensediment in 50ml Reaktionsgefäße transferiert, in 50ml kaltem Resuspensionspuffer gelöst und erneut bei 5.000upm und 4°C für 10min zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wird mindestens vier weitere Male wiederholt. Danach werden die Bakterien in 45ml einer kalten 10% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Nach abermaliger Zentrifugation bei 5.000upm und 4°C für 10min wird das Bakteriensediment in 1-2ml kalter 10% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert. Aliquots von 100µl Bakterienlösung werden bei -70°C eingefroren oder direkt für die Transformation (3.1.15) weiterverwendet.

### 3.1.15 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Elektrokompente Bakterien (3.1.14) werden kurz vor der Transformation aufgetaut und auf Eis gehalten. Zur Transformation von Plasmid-DNA werden 1-2µl DNA eines Ligationsansatzes (3.1.7) oder 1-2ng einer Plasmidaufarbeitung (3.1.17) mit 40µl der elektrokompenten Bakterien gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand) überführt. Im direkten Anschluss daran wird die Küvette in

der Elektroporationsvorrichtung arretiert, an der nachfolgend ein Puls von 2,5kV bei 20 $\mu$ F und 200 $\Omega$  Schutzwiderstand angelegt wird. Die Bakterien/DNA-Suspension wird sofort aus der Vorrichtung entfernt und mit 1ml LB-Medium vermengt. Nach Rückführung in ein frisches 2ml Reaktionsgefäß wird der Ansatz für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, anschließend 50-300 $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.16 Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterien

Der pBlueskriptII KS(+)-Vektor (2.1.1) kodiert für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase. Diese Information ermöglicht es, den Defekt des genomischen  $\beta$ -Galaktosidase Gens des *E. coli* Stamms DH5 $\alpha$  zu komplementieren. Befindet sich innerhalb des  $\alpha$ -Peptidgens (*lacZ*), das in der MKS (multiple Klonierungsstelle) lokalisiert ist, eine längere DNA-Insertion, so kann die Komplementation nicht mehr erfolgen: Transformierte Bakterien können daraufhin nach Induktion durch IPTG kein X-Gal (Substrat) mehr in blaues 5-Brom-4-Chlor-Indigo (Produkt) umsetzen, da ihnen die Fähigkeit zur funktionellen Expression von  $\beta$ -Galaktosidase fehlt. Somit können Bakterien darin unterscheiden werden, ob sie entweder den Vektor mit (weiß) oder ohne Insertion (blau) enthalten. Zur Blau-Weiß-Selektion werden Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten mit 5mmol IPTG und 1mg X-Gal kultiviert.

### 3.1.17 Plasmid-DNA Präparation

#### 3.1.17.1 Präparation aus Bakterien

##### 3.1.17.1.1 DNA Schnellaufarbeitung (nach Birnboim-Doly)

Mit Hilfe der Plasmidschnellaufarbeitung können kleine Mengen (5-10 $\mu$ g) an Plasmid-DNA aus Bakterien gewonnen werden. Die auf diesem Wege gewonnene DNA reicht sowohl qualitativ als auch quantitativ aus, um DNA-Restriktionen oder Bakterien-Transformationen durchzuführen.

Je 1,5ml einer *E. coli* Übernacht-Flüssigkultur werden in einer Tischzentrifuge für 1min bei 13.000upm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird die Bakterien suspension in 100 $\mu$ l Lösung 1 (2.4.1) resuspendiert und für 3min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien werden 200 $\mu$ l der Lösung 2 (2.4.1) hinzugefügt und sanft invertiert. Nach erfolgter Inkubation auf Eis für 5min werden 150 $\mu$ l Lösung 3 (2.4.1) hinzupipettiert und erneut für 5min auf Eis inkubiert. Zur Eliminierung von Proteinen werden anschließend 450 $\mu$ l Phenol<sup>\*</sup> (2.4.21) zum Bakterienlysat zugegeben und für 5min bei RT auf einem Tischschüttler gemischt. Durch Zentrifugation dieser Lösung für 5min und 13000upm bei RT findet eine Trennung der Lösung in eine wässrige und eine organische Phase statt. Der obere, wässrige Überstand wird abgenommen und mit 450 $\mu$ l CIA (2.4.21) extrahiert. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wird danach durch die Zugabe von 350 $\mu$ l Isopropanol in der Kühlzentrifuge für 20min bei 4°C und 13.000upm präzipitiert. Das DNA-Sediment wird anschließend in 500 $\mu$ l 100% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 5min bei RT und 13.000upm an der Luft getrocknet. Die DNA wird schließlich in 50  $\mu$ l TE-Puffer (2.4.21) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der gewonnenen DNA werden 6 $\mu$ l des Ansatzes mittels Restriktionsverdau (3.1.3) analysiert.

### 3.1.17.1.2 DNA Großaufarbeitung mittels CsCl Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der DNA Großaufarbeitung mittels CsCl Dichtegradientenzentrifugation kann reine, superhelikale Plasmid-DNA in sehr großen Mengen (bis zu 5mg) gewonnen werden. Diese DNA ist für Anwendungstechniken mit gehobenen Qualitätsanspruch geeignet. Hierzu zählen beispielsweise Klonierungen, Transfektion eukaryotischer Zellen oder Sequenzanalysen.

Zu Beginn der Aufarbeitung wird eine 250ml Übernacht-Flüssigkultur für 10min bei 5.000upm und 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC5C, GS3 Rotor). Das Bakteriensediment wird darauf in 6ml Lösung 1 (2.4.1) resuspendiert und der gesamte Ansatz in SS34-Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach Zugabe von 50µl Lysozym (2.4.2) wird die Präparation für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 12ml Lösung 2 (2.4.1) hinzugefügt und 15min auf Eis inkubiert (unter gelegentlichem Invertieren zur Erhöhung der Lyseeffizienz). Nach Hinzugabe von 9ml Lösung 3 (2.4.2) und erneuter, 15min andauernder Inkubation auf Eis kann das Lysat durch Zentrifugation für 30min bei 18.000upm und 4°C (Sorvall RC5C, SS34 Rotor) geklärt werden. Der resultierende Überstand wird in ein 50ml Reaktionsröhrchen überführt und mit 20µl RNase A (2mg/ml) versetzt. Nach erfolgter Inkubation für 10min bei 37°C wird dem Überstand das gleiche Volumen an Isopropanol hinzugefügt und die enthaltene DNA durch Zentrifugation für 30min bei 5.000upm und 0°C präzipitiert (Varifuge RF). Nach Entfernung des Überstandes wird das DNA-Sediment an der Luft getrocknet. Die Aufnahme des Sediments erfolgt in 4ml TE-Puffer (2.4.21). Nach Zugabe von 4ml 5M LiCl-Lösung wird der Ansatz für 30min auf Eis inkubiert und danach für 10min bei 5.000upm und 0°C zentrifugiert (Varifuge RF). Der resultierende Überstand wird in ein 50ml Reaktionsgefäß transferiert, mit 2,5-fachem Volumen 100% Ethanol versehen und für mindestens 10min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation dieses Ansatzes für 20min bei 5.000upm und 4°C (Varifuge RF) wird das erzielte DNA-Sediment an der Luft getrocknet. Dieses Sediment wird in 3,5ml TE-Puffer aufgenommen und mit 4,4g Cäsiumchlorid versetzt. Danach werden 300µl Ethidiumbromidlösung (2.4.21) in Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und dann die Cäsiumchlorid/TE-Lösung hinzugegeben. Zur Komplettierung des Reservevolumens wird TE-Puffer verwendet. Zur Ausbildung des CsCl-Dichtegradienten wird 16h lang bei 20°C und 48.000upm zentrifugiert (Ultrazentrifuge, TV-865 oder VTi65 Rotor). Typischerweise konzentriert sich die DNA in einem Bereich des Gradienten, der ihrer Dichte zuzuordnen ist ( $\rho_{DNA}=1,66+0,098$  (Anteil an GC-Basenpaaren/%)). Da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, kann zwischen der entspannten ringförmigen Plasmid- bzw. genomischen Bakterien-DNA (niedrige Dichte) und superhelikaler Plasmid-DNA (hohe Dichte) unterschieden werden. Mit Hilfe von langwelligem UV-Licht kann bei 366nm die superhelikale Plasmid-DNA (in Form einer Bande sichtbar) dem Gradienten entnommen werden. Dazu werden eine Kanüle zur Entlüftung sowie eine Spritze mit Kanüle zur Entnahme der Bande im Gradienten verwendet. Typischerweise beträgt das Abnahmevolumen ca. 2ml des Gradienten, das in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt wird und darauf 5-fach mit TE-Puffer verdünnt wird. Im nächsten Schritt versucht man das Ethidiumbromid rückstandslos zu beseitigen, in dem man den Ansatz mit 3ml von in H<sub>2</sub>O-gesättigtem n-Butanol mischt und 5 Sekunden lang schüttelt. Die das Ethidiumbromid enthaltende obere Phase der Lösung kann nun abgesaugt werden. Dieser Schritt wird so lange wiederholt, bis die obere Phase der Lösung farblich von der unteren nicht mehr zu unterscheiden ist. Nach Entfernung der farblosen oberen Phase wird die Lösung mit 2,5-fachem Volumen 100% Ethanol versetzt, 30min auf Eis vorgekühlt und danach für weitere 30min bei 5.000upm und 4°C abzentrifugiert.

giert. Das DNA-Präzipitat wird an der Luft getrocknet und schließlich in 0,5–1ml TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.1.17.2 Präparation aus eukaryotischen Zellen

#### 3.1.17.2.1 Standardaufarbeitung episomaler DNA (nach Hirt)

Plasmid-DNA, die transient in eukaryotische Zellen transfiziert wurde, liegt in der Regel episomal vor. Mit Hilfe der Hirt-Extraktion kann diese Art DNA gezielt isoliert und in anschließenden Experimenten, wie z.B. der Replikationsanalyse (3.1.4), näher analysiert werden.

Zellen einer konfluent gewachsenen 10cm Zellkulturschale werden in 10ml Wachstumsmedium resuspendiert und in ein 15ml Reaktionsgefäß transferiert. Darauf hin werden die restlichen, in der Zellkulturschale befindlichen Zellen in 5ml PBS aufgenommen und dem Reaktionsgefäß hinzugefügt. Die Zellen werden im Anschluss für 3min bei 2.500upm und 4°C sedimentiert und mit PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 3min bei 2.500upm und 4°C wird der Ansatz in 1ml des Lyse-Puffers (2.4.3) resuspendiert, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß verbracht und für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Danach werden dem Ansatz 250µl 5M NaCl hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wird der Ansatz für 1h bei 15.000upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit gleichem Volumen Phenol\* (2.4.21) versetzt. Nach kurzem Vortexen wird das Gemisch erneut für 5min bei 15.000upm und RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß verbracht und 0,7 Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nachdem dieser Ansatz für 10min bei –20°C vorgekühlt worden ist, kann die DNA durch Zentrifugation für 15min bei 13.000upm und 4°C präzipitiert werden. Das DNA-Pellet wird daraufhin mit 500µl 100% Ethanol gewaschen (5min bei 13.000upm und 4°C). Nach Lufttrocknung wird das DNA-Sediment in 50-100µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 3.1.17.2.2 Schnellaufarbeitung episomaler DNA

Eine Alternative zur Aufarbeitung episomaler DNA besteht in der Anwendung des schnellen Aufarbeitungsprotokolls nach Arad (Arad 1998).

Hier werden zwischen 10<sup>6</sup> und 10<sup>7</sup> Zellen mit 1ml Trypsin für 5min bei 37°C vom Boden einer 10cm Zellkulturschale abgelöst und mit 10ml Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup> freiem PBS aufgenommen. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 3min bei 2.500upm und 4°C pelletiert und erneut in Ca<sup>2+</sup> bzw. Mg<sup>2+</sup> freiem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (gleiche Bedingungen wie zuvor) wird das Zell-Sediment in 250µl Resuspensionspuffer (2.4.3) aufgenommen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 250µl Lysepuffer (2.4.3) hinzugefügt. Das Lysegemisch wird unter gelegentlichem, sanften Invertieren für 5min bei RT inkubiert. Zelldebris sowie chromosomale DNA wird im nächsten Schritt eliminiert, in dem 350µl Präzipitationsmix (2.4.3) zu der Lösung hinzugefügt und der Ansatz sanft gemischt wird. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wird für weitere 15min bei 13.000upm und 4°C zentrifugiert. In dieser Zeit wird eine Zentrifugationssäule vorbereitet (siehe unten). Der Überstand des Präzipitationsansatzes, der nach der Zentrifugation nur noch die episomale DNA enthält, wird auf die Zentrifugationssäule aufgetragen und für 5-10min bei 13.000upm und RT zentrifugiert, wodurch die episomale DNA an die Silicagelmembran bindet. Nach Beseitigung des Durchflusses wird die DNA durch Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer sowie anschließender Zentrifugation für 5-10min bei 13.000upm und RT eluiert. Der Durchfluss kann nun für anschließende Analysen verwendet werden.

### Vorbereitung der Zentrifugationssäule:

Die Zentrifugationssäule, die eine Silicagelmembran enthält und somit DNA binden kann, wird vor der Zugabe des Präzipitationsüberstandes mit 750µl Waschpuffer (2.4.3) gewaschen (5min, 13.000upm, RT) und der Durchfluss anschließend entfernt.

### 3.1.18 Southern Blot

Beim Southern Blot wird DNA aus einem Agarosegel durch Kapillartransfer auf eine Membran übertragen. Nach kovalenter Fixierung der DNA auf der Membran kann sie mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen werden.

#### 3.1.18.1 Kapillartransfer von DNA

DpnI bzw. DpnI/HindIII restringierte, niedermolekulare DNA wird in einem 0,7-1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei werden neben DNA Restriktionslängenmarkern je 16µl (ca. 5-20ng DNA) eines DpnI bzw. DpnI/HindIII Restriktionsansatzes pro Geltasche aufgetragen. Die DNA wird bei 100V so lange aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande  $\frac{3}{4}$  der möglichen Laufstrecke zurückgelegt hat. Die Banden der Restriktionslängenmarker werden danach unter langwelligem UV-Licht bei 366nm mit einem Skalpell markiert. Daraufhin wird das Gel in Depurinisierungspuffer (2.4.11) für 10min bei RT und Schwenken inkubiert. Nachdem die DNA ausreichend depurinisiert ist (erkennbar an der Gelbfärbung des Bromphenolblau), wird das Agarosegel für 10min bei RT und Schwenken in Denaturierungspuffer (2.4.11) inkubiert. Bevor das Gel für 30min bei RT und Schwenken in Blottingpuffer äquilibriert wird, muss das Gel für 10min bei RT in Neutralisationspuffer geschwenkt werden. Während der Äquilibrierungsdauer kann die Blot-Apparatur (Abb. 3-1) vorbereitet werden. Hierfür wird Blottingpuffer in ausreichender Menge (ca. 500ml) in zwei Glaswannen gefüllt, eine Glas- oder Kunststoffplatte als Plattform darüber gelegt und eine Lage Filterpapier (Whatman, Kent, England) als „Brücke“ so über die Glas- oder Kunststoffplatte gelegt, dass die jeweiligen Enden in den Blottingpuffer mit einer Höhe von ca. 2,5cm eintauchen. Das Filterpapier entspricht dabei der selben Breite wie die des Agarosegels. Über der Filterpapier-„Brücke“ werden zudem 3 Lagen in Blottingpuffer getränktem Filterpapier verbracht, die der Größe des Agarosegels entsprechen. Das Gel wird darauf mit der Unterseite nach oben auf die 3-lagige Filterpapierschicht gelegt und die freien Stellen am oberen und unteren Ende des Agarosegels mit Aluminiumfolie abgedeckt. Auf das Gel wird eine der Größe des Agarosegels entsprechende sowie zuvor mit Blottingpuffer getränkte Nylon Transfermembran (2.4.23) gelegt und mit einer erneut mit Blockingpuffer getränkten 3-lagigen Schicht Filterpapier abgedeckt (gleiche Größe wie Agarosegel). Über diese Schicht wird anschließend eine ca. 10 bis 20cm hohe Schicht trockener Papierhandtücher gelegt. Zum Schluss wird eine Glaswanne umgekehrt auf den Papierstapel aufgelegt und zusätzlich mit einem Gewicht von ca. 2kg beschwert. Zum Kapillartransfer der DNA-Moleküle auf die Nylonmembran wird dieser Aufbau für mindestens 12h belassen. Danach wird die Southern Blot Apparatur abgebaut und das Gel zunächst auf der Membran belassen. Die mit dem Skalpell zuvor markierten Banden der DNA-Restriktionslängenmarker werden mit einem Kugelschreiber auf die Membran übertragen. Dementsprechend wird die Lage der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert. Abschließend wird die DNA in einem UV-Crosslinker mit der Nylonmembran durch kovalente Bindung vernetzt. Die Membran kann im Anschluss entweder bei 4°C gelagert oder direkt in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

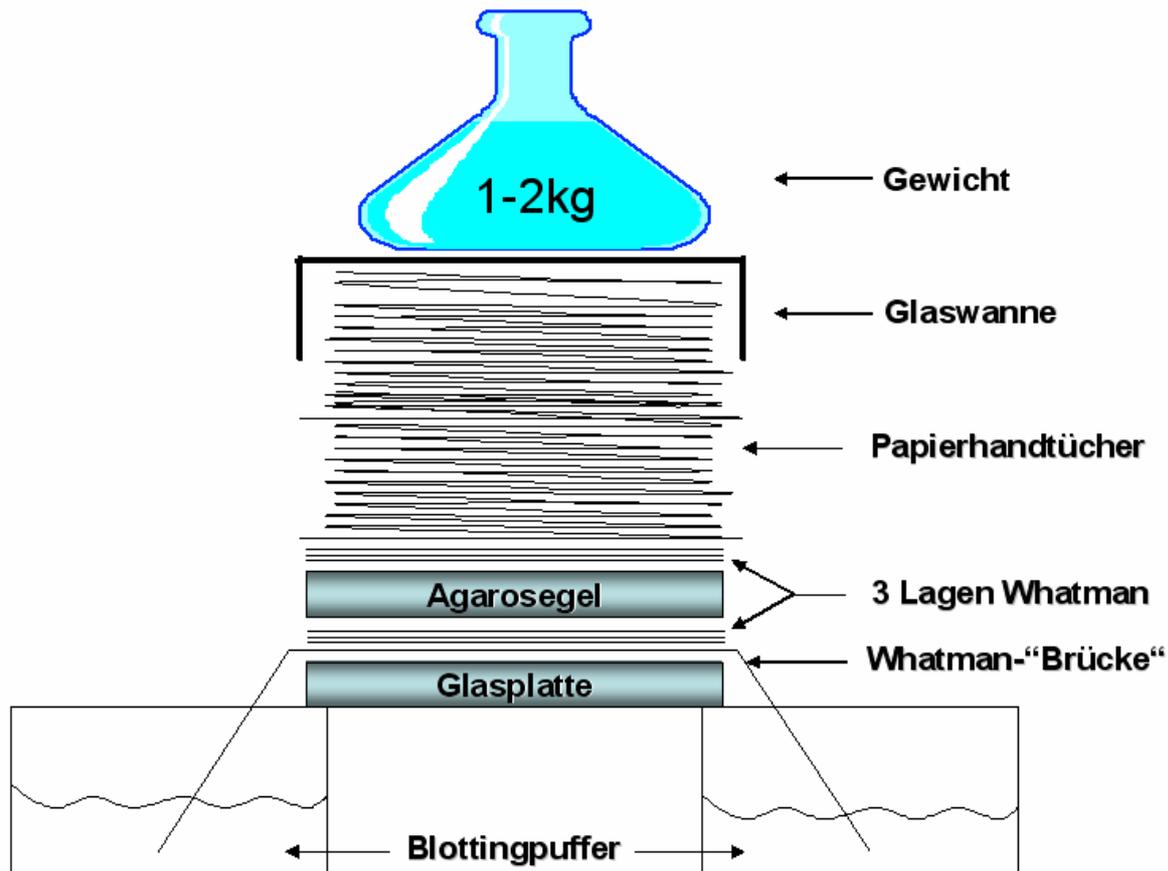


Abb. 3-1: Aufbau Southern-Blot Apparatur

### 3.1.18.2 Radioaktive Markierung von DNA

DNA-Fragmente, die als Sonden zur Detektion immobilisierter DNA-Proben dienen sollen, werden unter Verwendung der "Ready to go" DNA labeling beads (2.4.22) nach den Angaben des Herstellers mit  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP radioaktiv markiert.

25 bis 50ng der zu markierenden, im Idealfall linearisierten, DNA werden in maximal  $45\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und für 2-3min bei  $100^\circ\text{C}$  denaturiert. Nach einer Abkühlung für mindestens 2min auf Eis wird der Ansatz kurz abzentrifugiert. Darauf wird der denaturierten DNA  $5\mu\text{l}$  ( $50\mu\text{Ci}$ )  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP ( $3.000\text{ Ci/mmol}$ ) hinzupipettiert und anschließend (bei Bedarf) mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $50\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Der nun radioaktive Ansatz wird durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 15min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In dieser Zeit kann die spätere Reinigung der radioaktiven DNA-Fragmente vorbereitet werden (3.1.18.3). Da die Einbaureaktion der radioaktiven dCTPs nicht gestoppt werden muss, kann im direkten Anschluss die Aufreinigung der Sonde erfolgen (3.1.18.3). Die gereinigte Sonde kann jetzt entweder bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden oder direkt in Hybridisierungs-Experimenten eingesetzt werden.

### 3.1.18.3 Reinigung markierter DNA-Fragmente über Sephadex-G25-Säulen

Mit Hilfe der Sondenaufreinigung mittels Sephadex-Säulen-Technik können die nicht in DNA-Sonden eingebauten, radioaktiven Nukleotide entfernt werden.

#### Vorbereitung:

Ein 15ml Reaktionsgefäß wird bis zur 1ml-Markierung mit Sephadex-G25 befüllt und anschließend in 4-5ml TE-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wird für 20min

bei RT inkubiert. In dieser Zeit wird eine 1ml-Spritze zu 1/10 Volumen mit steriler Glaswolle gestopft. Im Anschluss wird 1ml der gequollenen Sephadex-Suspension in die 1ml-Spritze überführt, die zum nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 2min bei 1.400upm (Eppendorf 5416) und RT in ein deckellooses 15ml Reaktionsgefäß gestellt wird. Das Eluat wird verworfen und der komprimierten Säule 300 $\mu$ l TE-Puffer hinzugefügt. Nach abermaliger Zentrifugation für 2min bei 1.400upm und RT sowie der anschließenden Eliminierung des Durchflusses ist die Vorbereitung der Säule zur Sondenaufreinigung beendet.

### Durchführung der Reinigung:

Bevor die radioaktiv markierte Sonde auf die Sephadex-Säule aufgetragen werden kann, muss die Sonde mit einem gleichen Volumen der Farbmarkerlösung (2.4.11) vermischt werden. Nachdem die Stärke der Radioaktivität dieses Gemisches in einem Tischmonitor gemessen worden ist, wird die Sonde auf die Sephadex-Säule pipettiert und für 2min bei 1.400upm (Eppendorf 5416) und RT abzentrifugiert. Die freien, nicht inkorporierten Radionukleotide verbleiben in der Säule. Der Durchfluss wird abschließend erneut mit Hilfe des Tischmonitors vermessen und die Einbaueffizienz bestimmt (Prozentuale Bestimmung). Bei einer Einbaueffizienz von mindestens 30% kann die Sonde in Hybridisierungsversuchen eingesetzt werden.

#### 3.1.18.4 Hybridisierung markierter DNA-Sonden mit immobilisierter DNA

Zunächst wird die Nylonmembran mit den immobilisierten DNA-Proben in eine Glasröhre überführt und mit 10ml Hybridisierungslösung (2.4.11) für 3h bei 42°C unter ständiger Rotation im Hybridisierungssofen inkubiert („prähybridisiert“). Nach diesem Inkubationsschritt wird die Hybridisierungslösung verworfen oder für andere „Prähybridisierungen“ zur Wiederverwendung aufgehoben. Die radioaktiv markierte Sonde wird für 5min auf 100°C erhitzt und - nach kurzer Zentrifugation für 10s bei 13.000upm (Eppendorf 5417R) und RT - komplett zu 10-15ml ungebrauchter Hybridisierungslösung hinzupipettiert. Der radioaktive Hybridisierungsmix wird darauf auf die in der Glasröhre befindliche Membran gegeben und über Nacht bei 60°C im Drehofen inkubiert. Am Folgetag wird der radioaktive Hybridisierungsmix entsorgt und die Membran in eine Waschwanne überführt. In den nun folgenden Waschschrritten sollen nicht gebundene Sondenmoleküle entfernt werden. Dazu wird der Membran zunächst Waschpuffer 1 (2.4.11) hinzugefügt und für zweimal 10min bei RT im Schüttelwasserbad gewaschen. Nach Wechsel zu Waschpuffer 2 (2.4.11) wird das Wasserbad auf 60°C hochgeheizt. Nach erneut zweimaligem Pufferwechsel bei einer Inkubationsdauer von jeweils 10min wird die Signalstärke der noch vorhandenen Radioaktivität kontrolliert. Bei Bedarf (sehr starkes Restsignal) können weitere Waschschrritte zur Eliminierung unspezifisch gebundener Sondenmoleküle durchgeführt werden. Anderenfalls kann die Membran aus der Wanne genommen und dicht in Küchenfolie verpackt werden.

#### 3.1.18.5 Detektion hybridisierter DNA-Sonden

Der Nachweis hybridisierter DNA-Moleküle erfolgt mittels Autoradiografie. Die in Küchenfolie verpackte, radioaktive Membran wird dazu in eine Röntgenkassette verbracht und je nach Signalstärke 30min bis 12 Tage bei -70°C mit einem Röntgenfilm inkubiert.

### 3.1.19 Dot Blot (AAV Genom Titration)

Um die Anzahl erfolgreich verpackter AAV Genome zu bestimmen, werden 10µl aufgereinigtes rAAV mit 90µl PBS-Puffer (2.4.21), 100µl DMEM sowie 5U DNaseI gemischt und 1h bei 37°C in einem 1,5ml Reaktionsgefäß inkubiert. Um die Hüllproteine des rAAV zu beseitigen, werden dem Ansatz 200µl 2xProteinase-Puffer (2.4.14) sowie 100µg Proteinase K hinzupipettiert. Nach einer Inkubation für 2h bei 37°C erfolgt die Proteinextraktion durch die Zugabe von 400µl Phenol\* (2.4.21). Der Ansatz wird 2min auf einem Tischschüttler gemischt und danach für 5min bei 13.000upm (Eppendorf 5417R) und RT abzentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und 400µl CIA (2.4.21) hinzugegeben, um Phenolreste zu eliminieren. Im Anschluss wird dem Reaktionsgemisch 0,1Vol. 3M Natriumacetat sowie 2Vol. 100% Ethanol hinzugefügt. Die Präzipitation erfolgt für 30min bei -80°C und anschließender Zentrifugation für 30min bei 13.000upm und 4°C. Die so pelletierte DNA wird mit 100% Ethanol gewaschen (Zugabe von 500µl Ethanol sowie Zentrifugation für 5min bei 13.000upm und RT). Nachdem das DNA-Pellet getrocknet ist, erfolgt eine Resuspension mit 300µl Titrierlösung (2.4.14). Hierauf wird eine 90%-ige, 9%-ige und 0,9%-ige DNA-Lösung in 300µl Titrierlösung hergestellt. Weiterhin wird eine Verdünnungsreihe (5000pg, 1000pg, 200pg, 40pg, 8pg, 1,6pg) eines Mengenstandards in je 300µl Titrierlösung hergestellt. Ein die Gesamtfläche einer Dot-Blot Apparatur abdeckendes Stück Filterpapier (Whatman, Kent, England) wird auf die Grundplatte der Blot-Apparatur und darüber eine gleich große Transfermembran gelegt. Die Beladungsplatte der Dot-Blot Apparatur wird deckungsgleich über die Membran gelegt und mit der Grundplatte fest verschraubt. Daraufhin werden die kompletten Standardansätze im Doppel in einer Reihe (senkrecht) in die Vertiefungen der Beladungsplatte pipettiert. Mit den DNA-Verdünnungen wird in Einfachansätzen genauso verfahren. Daraufhin wird an der Blot-Apparatur für 20min ein Vakuum angelegt, durch welches die in den Ansätzen befindliche DNA auf die Transfermembran übertragen wird. Nachdem keine Flüssigkeitsreste mehr in den Vertiefungen der Beladungsplatte vorhanden sind, kann die Transfermembran aus der Blot-Apparatur ausgebaut werden. Die DNA wird durch 10 minütige Auflage auf einem mit Denaturierungspuffer getränktem Filterpapier bei RT inkubiert. Nach einer weiteren, 10 minütigen Inkubation mit Neutralisierungspuffer bei RT wird die DNA mit einem UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden und kann nun mit Hilfe einer geeigneten, radioaktiv markierten (3.1.18.2 ff.) Sonde durch Hybridisierung (3.1.18.4) nachgewiesen werden.

### 3.1.20 Proteinextraktionsmethoden

Um Virus-ähnliche Partikel bzw. Pseudovirionen aus Säugerzellen unterschiedlichen Ursprungs extrahieren zu können, können die nachfolgend erläuterten Zellaufschlussmethoden verwendet werden.

Alle aufgeführten Präparationsmethoden gehen dabei von einer 100% konfluent gewachsenen Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10cm aus (ca.  $1,2-1,8 \times 10^7$  Zellen). Bevor die Zellen lysiert werden können, löst man sie mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale ab, resuspendiert sie in 10ml Kulturmedium und überführt sie in ein steriles 15ml Reaktionsgefäß. Die restlichen, in der Zellkulturschale verbliebenen Zellen werden in 5ml autoklaviertem PBS-Puffer (2.4.21) aufgenommen und der vorgelegten 10ml Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen werden im Anschluss für 2min bei 2.000upm und 4°C (Napco 2019R) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 15ml sterilem PBS-Puffer aufgenommen und unter denselben Zentrifugationsbedingungen wie zuvor sedimentiert. Abschlie-

ßend werden die Zellen in 600µl VLP-Extraktionspuffer (2.4.6) aufgenommen und können nun dem jeweiligen Lyseverfahren unterzogen werden.

### 3.1.20.1 Zellaufschluss durch Ultraschall

Die in VLP-Extraktionspuffer aufgenommenen Zellen werden auf Eis mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators (2.4.24) im 15ml Reaktionsgefäß für 6s bei Stufe 3 beschallt. Zur Reduktion des durch Ultraschall entstandenen Schaums wird darauf die Zellsuspension für 2min bei 2.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, in dem hohe Mengen von ungewolltem Zelldebris enthalten sind, wird in ein 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert und für 10min bei 10.000upm (5117R Eppendorf- oder Thermoquest Micromax-Zentrifuge) und 4°C geklärt. Der resultierende Überstand wird in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und kann nun für weitere Experimente (ELISA, WB oder Saccharoseaufreinigung) verwendet werden.

### 3.1.20.2 Frier/Tau-Zelllyse

Die in VLP-Extraktionspuffer aufgenommenen Zellen können mittels Frier/Tau-Zyklen lysiert werden. Durch langsames Tieffrieren von in Lösung befindlichen VLPs wird die Bildung von kristallinen Strukturen begünstigt, welche die Integrität bzw. Morphologie von virusähnlichen Partikeln zerstören kann. Deshalb muss das zu lysierende Zellpellet mit flüssigem N<sub>2</sub> innerhalb von 10s bei -196°C schockgefroren werden. Das Zellpellet wird danach in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, wobei dieser Frier/Tau-Zyklus insgesamt dreimal durchgeführt wird. Zur Verringerung der Viskosität kann dem Pellet noch zusätzlich 50U/ml Benzonase (bei anschließender Inkubation für 1h bei 37°C) zugesetzt werden. Die Beseitigung des Zelldebris erfolgt wie unter 3.1.20.1 beschrieben.

### 3.1.20.3 Zellaufschluss mit Glaskugeln („beads“)

Den in VLP-Extraktionspuffer aufgenommenen Zellen werden 2 Spatelspitzen 0,5-1mm große (mit PBS-Puffer gesäuberte und autoklavierte) Glaskugeln hinzugefügt und für 15 bis 30s gevortext. Danach wird der Ansatz für 15min bei 10.000upm (Thermoquest Micromax Zentrifuge) und 4°C abzentrifugiert, wobei sich neben der Glaskugelschicht eine hoch und eine gering viskose Phase bildet. Die gering viskose Phase enthält die Virus-ähnlichen Partikel und kann mit der Pipette abgezogen und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### 3.1.21 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

In der indirekten Immunfluoreszenz (iIF) werden Proteine in Zellen durch den Einsatz von Antikörpern nachgewiesen.

Bei der iIF werden die Zellen auf sterilen Deckgläschen kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von eiskaltem Methanol für 5min fixiert. Nach der Fixierung wird das Methanol abgesaugt und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran werden die Zellen zur Rehydrierung für 10min in PBS-Puffer inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen mit einer Antikörperlösung (2.4.21) für 1-2h bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal in PBS-Puffer (2.4.21) gewaschen und mit den in Blockmilchlösung (2.4.21) verdünnten Zweitantikörpern für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer werden die Zellen auf Objektträgern in 50% Glycerin eingebettet und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

### 3.1.22 „Enzym Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Im ELISA kann mit Hilfe eines konformationsspezifischen Antikörpers die Existenz von HPV16-L1 Proteinen (in Form von Kapsomeren oder assemblierten virusähnlichen Partikeln; (Muller, Zhou et al. 1997)) in gereinigten Zellextrakten bzw. in Fraktionen eines Saccharosegradienten nachgewiesen werden.

Dazu wird der (konformationsspezifische) monoklonale Antikörper 1.3 (2.1.2) mit einer Verdünnung von 1:1000 in 1xPBS-Puffer (2.4.21) angesetzt. Daraufhin werden 96-Lochplatten mit Rundboden pro Loch mit 50µl dieses Antikörper/PBS-Gemisches beschichtet („coaten“) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung des Gemisches werden die 96-Lochplatten zehnmals mit PBS-T (2.4.21) gewaschen und 1h bei RT mit 200µl Blockmilchlösung (2.4.21) pro Loch geblockt. Nachdem die Blockmilch dekantiert worden ist, muss die Platte erneut zehnmals mit PBS-T gewaschen werden. Bei der Analyse von Saccharosefraktionen werden je 50µl unverdünnt pro Loch pipettiert. Bei der Quantifizierung von VLP-Extrakten direkt nach transienter Transfektion werden 100µl der zu untersuchenden Probe unverdünnt in das erste Loch der ersten Spalte der Lochplatte gegeben. Als Positivkontrolle wird Medienüberstand einer Infektionskultur von SF9-Insektzellen (2.2.3) mit rekombinantem L1-Bakulovirus verwendet (3.2.10). Zellextrakt von nicht transfizierten 293T Zellen dient als Negativkontrolle. Von beiden Kontrollen werden ebenfalls 100µl unverdünnt pro Loch pipettiert. Daraufhin werden in alle restlichen Löcher jeweils 50µl Blockmilch vorgelegt. Im Anschluss daran werden jeweils 50µl der ersten Lochspalte in die nächste Spalte überführt und fünfmal mit der vorgelegten Blockmilch gemischt. Dementsprechend wird bis zum Ende der 96-Lochplatte verfahren, so dass eine kontinuierliche 1:2 Verdünnungsreihe von der Ursprungsprobe entsteht. Dieser Ansatz wird zwischen 1 und 2h bei RT inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt werden die Lochplatteninhalte entfernt und erneut zehnmals mit PBS-T gewaschen. Daraufhin werden L1-Proteine durch das L1-spezifische Kaninchenserum 4543 (2.1.2) in einer Verdünnung von 1:4000 in Blockmilchlösung detektiert, von der 50µl pro Loch eingesetzt wird. Die Inkubation erfolgt 1h bei RT. Nach erneutem, zehnmaligen Waschen in PBS-T wird ein gegen Kaninchenantikörper gerichteter sowie Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Ziegenantikörper (2.1.2) 1:4000 in Blockmilch verdünnt. Jeweils 50µl dieses verdünnten Antikörpers werden pro Loch pipettiert und 1h bei RT inkubiert. Nach abermaligem Waschschrift (wie zuvor) wurden pro Loch 100µl der Substratlösung hinzugefügt und für 5-20min bei RT inkubiert.

Sofern L1-enthaltende, konformationsspezifische Strukturen einerseits an die monoklonalen Antikörper binden und andererseits durch das Kaninchenserum erkannt werden, kann der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper zusammen mit der Substratlösung eine grünliche Farbreaktion ermöglichen. Dieser Farbumschlag, der auf der Umsetzung des ABTS durch die Peroxidase beruht, kann über die Extinktion im ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405nm quantifiziert werden.

### 3.1.23 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe dieser Technik können Proteine in Polymergelen aufgetrennt werden. Die aufgetrennten Proteine können durch unterschiedliche Techniken visualisiert werden. Dabei ist es einerseits möglich die Proteine direkt im Gel hinsichtlich Ihrer Quantität bzw. Bestandteile zu beurteilen oder sie andererseits durch den Transfer auf Membranen mit anschließendem immunochemischen Nachweis detaillierter charakterisieren zu können.

Wie schnell bzw. weit ein Protein im Gel läuft, wird prinzipiell durch Faktoren wie Struktur (Primär-, Sekundär-, Tertiärstruktur), Größe und Ladung bestimmt. Während bei nativen Proteinen bzgl. dieser Faktoren im elektrischen Feld kein einfacher Zusammenhang besteht, kann durch Denaturierung mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol, DTT oder SDS eine annähernde Korrelation zwischen Molekulargewicht und Laufweite des Proteins erzielt werden. Das amphipathische SDS lagert sich mit seinem hydrophoben Bereich an Proteine und verleiht ihnen durch die hydrophile Sulfat-Gruppe eine, von der Größe abhängige, negative Ladung (1,4g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen). In Abhängigkeit von der Größe wandern die denaturierten Proteine unterschiedlich schnell in Richtung Anode durch die Gelmatrix.

Man setzt in der SDS-PAGE zweiphasige Gele ein, die zu  $\frac{1}{4}$  aus einem Sammelgel (3% Acrylamid) und zu  $\frac{3}{4}$  aus einem Trenngel (10 bis 12,5% Acrylamid) mit unterschiedlichem pH-Wert bestehen (2.4.7.2). Damit die Auftrennung der Proteine möglichst zeitgleich beginnen kann, werden sie im Sammelgel zur Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel hin gesammelt.

Die Gele werden in Elektrophoresesysteme unter Hinzugabe eines TGS-Laufpuffers (2.4.7.2) eingespannt und anschließend mit Proteinlösungen beladen, die zuvor mit SDS/DTT-Proteinladepuffer (2.4.7.2) versetzt und 10min auf 95°C erhitzt wurden. Um die Laufweiten der einzelnen Proteine einordnen zu können, wird zusätzlich neben einer Positiv- und Negativkontrolle auch ein Molekulargewichtsstandardmarker (2.4.9) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-150V und wird abgestoppt, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

### 3.1.24 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Die Sensitivität der Coomassie-Blau-Färbung in Polyacrylamidgelen reicht zum Nachweis von mindestens 50-110ng Protein pro Laufspur. Zu Beginn der Färbung werden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe von 20-30ml Coomassie-Blau-Färbelösung (2.4.21) pro Gel auf die Gelmatrix gefällt und über Nacht bei RT inkubiert. Das Gel wird anschließend solange in Entfärbelösung (2.4.21) geschwenkt, bis die Gelmatrix, nicht jedoch die Proteinbanden, entfärbt sind. Anschließend kann das Gel mittels Scanner digitalisiert und mit Hilfe von spezieller Geltrocknungsfolie (2.4.23) haltbar gemacht werden.

### 3.1.25 Western Blot und Chemilumineszenz-Nachweis

Mit Hilfe der Western Blot Technik können die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zunächst elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und dann immunochemisch nachgewiesen werden können.

#### 3.1.25.1 Transfer von Proteinen

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran erfolgt in einer „Halbtrocken-Blotkammer“. Dazu werden zunächst 3 Lagen, der Größe des Proteingels entsprechendes, in EMBL-Puffer getränktes Filterpapier (Whatman, Kent, England) auf die Anodenplatte gelegt. Nachfolgend wird eine mit EMBL-Puffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran (2.4.23), dann das Polyacrylamidgel sowie 3 weitere Lagen in EMBL-Puffer getränktem Filterpapier aufgelegt. Die Einhaltung der Reihenfolge von Membran und Gel ist dabei ebenso wichtig wie die Sorgfalt, zwischen den einzelnen Schichten Luftblasen zu vermeiden. Nachdem das System mit der Kathodenplatte geschlossen ist, erfolgt der Elektrotransfer für 1h bei 0,8mA/cm<sup>2</sup> der Gelfläche. Um die Effizienz des Elektrotransfers schon vorab beurteilen zu können, wird die Membran für 2-5min in Ponceau-S-Färbelösung (2.4.10) inkubiert. Nachdem

die Membran kurz in Wasser entfärbt worden ist, können die stark gefärbten Proteinbanden identifiziert werden.

### 3.1.25.2 Detektion von geblotteten Proteinen

Zur Absättigung aller unspezifischen Antikörperbindungsstellen wird die Membran mit Blocklösung (2.4.10) über Nacht bei RT oder 4°C (mit Verdunstungsschutz) inkubiert. Nach Dekantierung der Blocklösung am Folgetag wird die Membran dreimalig mit PBS-T (2.4.21) für je 5min bei RT gewaschen. Daraufhin wird die Membran mit einem in Antikörperlösung (2.4.21) verdünnten Erstantikörper luftblasenfrei in Folie eingeschweißt. Nach Inkubation unter stetigem Schwenken für 2h bei RT wird die Membran erneut dreimalig für je 5min in PBS-T3 (2.4.21) gewaschen. Darauf wird die Membran mit einem in Blockmilch geblockten, gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (Meerettich-Peroxidase gekoppelt) unter stetigem Schwenken für 1h bei RT inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu beseitigen, wird die Membran erneut dreimalig für je 5min gewaschen.

### 3.1.25.3 Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz (ECL)

Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerettich-Peroxidase (HRP) ermöglicht eine indirekte Detektion des Proteins durch Chemilumineszenz. Dazu werden 7ml Luminol-Lösung mit 7µl Enhancer (2.4.10) vermischt und für 1min auf die Membran gegeben. Alternativ wurde ein Chemilumineszenz Detektions Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die HRP katalysierte Oxidation des Luminols führt über einen angeregten Zustand des Substrats zur Chemilumineszenz, die durch Exposition (5s-30min) eines Röntgenfilms abgelichtet wird.

### 3.1.26 Dialyse und Lagerung aufgereinigter Proteine

Zur Beseitigung von - für Folgeexperimente - unerwünschten Substanzen (z.B. Saccharoseanteile bei Gradienteneluat oder Salzanteile vor VLP-Analyse mittels Elektronenmikroskopie) werden die entsprechenden Proben auf Dialysemembranen mit einer Porengröße von 0,45µm in einer 6cm Zellkulturschale verbracht und gegen 5ml PBS-Puffer oder H<sub>2</sub>O für 1-2h und 4°C dialysiert.

### 3.1.27 Aufreinigung von Proteinen im Saccharosegradienten

Zur Aufreinigung von Proteinen werden Saccharosegradienten mit einem kontinuierlichen Prozentigkeitsgefälle von 5-50% sowie von 5-60% verwendet. Die Gradienten werden mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau, DKFZ Heidelberg) in Ultrazentrifugenröhrchen (PA ,14ml) gegossen, wobei jeweils 5,5ml einer 5%-, 50%-, oder 60%-igen Saccharose-Lösung (in PBS,10mM HEPES) verwendet werden. Nachdem die Gradienten für 1h bei 4°C inkubiert worden sind, werden 600µl eines VLP-Extraktes auf die Spitze eines Gradienten pipettiert und mit VLP-Extraktionspuffer (2.4.6) austariert. Die Gradienten werden im Anschluss für 3h bei 36.000upm und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nachfolgend werden die Gradienten von unten beginnend zu je 600µl in 1,5ml Reaktionsgefäße fraktioniert. Die gewonnenen Fraktionen können in weiteren Untersuchungen (Western-Blot, ELISA, Elektronenmikroskopie, Infektionsexperimente) näher untersucht werden.

### 3.1.28 VLP-Blockierungsexperimente mit neutralisierenden Antikörpern

In den Blockierungsexperimenten werden Antikörper (AK) verwendet, die eine Konformationsspezifität für HPV16 VLPs und neutralisierende Wirkung besitzen. Die AK werden bei einer Verdünnung von 1:500 (U4; 2.1.2) bzw. 1:50-1:100 (25C; 2.1.2) mit den VLP-Präparationen (3.1.20) nach Nukleasenbehandlung (3.2.11.1) eingesetzt. Die folgende Inkubation wird für 1-1,5h bei 37°C durchgeführt. Danach wird der Ansatz zu den zu infizierenden Zellen gegeben und dem Infektionsprotokoll entsprechend weiterbehandelt (3.2.11.2).

## 3.2 Kultur und Manipulation eukaryotischer Zellen

Alle Arbeitsschritte mit eukaryotischen Zellen werden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

### 3.2.1 Kultur immortalisierter Zelllinien

Eukaryotische Zellen werden in 20ml Kompletmedium (2.3.2) bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden in belüfteten Gewebekulturflaschen unterschiedlicher Größe (75 bzw. 150cm<sup>2</sup>) verwendet. Die Zelllinien werden entsprechend ihrer Charakteristik (Wachstumsrate, Allgemeinzustand) alle 2–3 Tage subkultiviert. Bei adhärent wachsenden Zellen wird zunächst das Kulturmedium abgenommen und darauf die Zellen mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung vorbehandelt. Die zugegebene Trypsin/EDTA-Lösung wird nach kurzem Schwenken der Gewebekulturflasche wieder entfernt und mit 1-2ml frischer Trypsin/EDTA-Lösung (2.3.2) überschichtet. Nach 3–5min Inkubation bei 37°C werden die Zellen - wenn nötig - durch leichtes Abklopfen vom Gefäßboden gelöst und in 8ml Kompletmedium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen im Verhältnis 1:8 in ein neues Kulturgefäß überführt und unter den oben angegebenen Bedingungen weiterkultiviert.

### 3.2.2 Kultur von Insektenzellen

Insektenzellen (Sf9; 2.2.3) werden in 20ml TNM-FH Medium (2.3.3) bei 27°C in Luftatmosphäre kultiviert. Die Zellen werden in belüfteten Gewebekulturflaschen unterschiedlicher Größe (75 bzw. 150cm<sup>2</sup>) verwendet und etwa im selben Turnus wie Zellkulturen (3.2.1) subkultiviert. Auf die Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen kann verzichtet werden. Anstatt dessen können adhärent wachsende Insektenzellen durch leichtes Klopfen an der Gewebekulturschale abgelöst werden.

### 3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

#### 3.2.3.1 Zellen einfrieren

Für die Kryokonservierung werden ausschließlich exponentiell wachsende Zellen verwendet, die zu Beginn dieses Prozesses in Kompletmedium in Suspension gebracht werden. Bevor die Zellzahl bestimmt werden kann, wird die Suspension abzentrifugiert (5min, 2.000upm, 4°C; Napco 2019R) und in Kryokonservierungslösung (2.3.2) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl (3.2.4) werden  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen in 2ml Einfrierröhrchen überführt und anschließend bei einer Geschwindigkeit von 1°C/min auf -70°C tiefgekühlt. Zur Langzeitlagerung werden die tiefgefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert.

### 3.2.3.2 Zellen auftauen

Kryokonservierte Zellen werden in einem 37°C Wasserbad möglichst zügig (zur Vermeidung von Toxizitätseffekten des DMSO-Anteils im Einfriermedium) aufgetaut und zusammen mit 13-14ml Komplettmedium in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wird das Reaktionsgefäß für 5min bei 2.000upm und 4°C (Napco 2019R) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in frischem Komplettmedium aufgenommen und in eine der Zellzahl angemessen großen Gewebekulturschale überführt.

### 3.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Zelldichte einer Zellsuspension bestimmt werden. Da bei der Zellzählung der Anteil von abgestorbenen Zellen unberücksichtigt bleiben soll, macht man sich die Eigenschaft von Trypanblau zu Nutze, selektiv in abgestorbene Zellen eindringen zu können. Im Lichtmikroskop lässt sich bei toten Zellen demnach eine intensive Blaufärbung beobachten. Um den Anteil an abgestorbenen Zellen bestimmen zu können, werden 50µl der Zellsuspension mit 50µl Trypanblaulösung (2.3.2) vermischt. Darauf werden 10-15µl der Mischsuspension auf die Zählkammer aufgetragen, überschüssiges Volumen verworfen und darauf die Zellzahl über 16 Zählquadranten ausgezählt. Da das Volumen zwischen Deckglas und Zählkammer über den 16 Zählquadranten 0,1µl beträgt, ergibt der gezählte Wert, multipliziert mit dem Faktor  $2 \times 10^4$ , die Zelldichte in Zellen/ml.

### 3.2.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

#### 3.2.5.1 Transfektion mit Kalziumphosphat

Bevor die Transfektion durchgeführt werden kann, müssen 60-80% konfluent gewachsene Zellen in der Zellkulturschale vorhanden sein. Am Vortag der Transfektion wird deshalb eine entsprechend hohe Menge an Zellen ausgesät, denen bei Bedarf (z.B. iIF; 3.1.21) sterile Deckgläschen mit in die Kulturschalen gelegt werden. Die eingesetzten Mengen und Volumina richten sich nach der Größe des Ansatzes.

Kulturschale	10 cm Ø	6-Lochplatte
Ausgesäte Zellzahl:	$1 \times 10^6$	$1-2 \times 10^5$
Volumen Kulturmedium	10ml	2ml
DNA	20µg	2µg
3M CaCl <sub>2</sub>	50µl	5µl
H <sub>2</sub> O	450µl	40µl
2xBBS	500µl	50µl

Zur Herstellung des Transfektionsmixes für eine 10cm Zellkulturschale werden 50µl 3M CaCl<sub>2</sub> in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die zu transfizierende DNA hinzugefügt. Darauf werden 450µl H<sub>2</sub>O und darauf tropfenweise 500µl 2xBBS (2.4.4) hinzupipettiert. Der Ansatz wird für 15min bei RT inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen in Kulturmedium getropft. Die nachfolgende Inkubation der Zellen erfolgt für 14-20h bei 35°C und 3% CO<sub>2</sub> (nach Chen/Okayama). Danach wird das Medium entfernt, durch neues Komplettmedium ersetzt und für 24-48h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> weiterkultiviert.

### 3.2.5.2 Transfektion mit Metafectene

Bevor die Transfektion durchgeführt werden kann, müssen 100% konfluent gewachsene Zellen in der Zellkulturschale vorhanden sein. Dazu wird am Vortag der Transfektion eine entsprechend hohe Menge an Zellen ausgesät. Die eingesetzten Mengen und Volumina richten sich nach der Größe des Ansatzes. Für die Produktion von Virus ähnlichen Partikeln wird standardmäßig eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10cm verwendet.

Kulturschale	10 cm Ø	6-Lochplatte
Ausgesäte Zellzahl:	2-2,2x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>
Volumen Kulturmedium	10ml	2ml
DNA	18µg	3µg
Medium- <sub>SA</sub> zur DNA	700µl	70µl
Metafectene	70µl	10µl
Medium- <sub>SA</sub> zu Metafectene	700µl	100µl

Zu Beginn der Transfektion werden pro Reaktionsansatz 70µl Metafectene mit 630µl DMEM-Medium ohne Serum und Antibiotika (Medium-<sub>SA</sub>) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gemischt. Danach werden in einem zusätzlichen 1,5ml Reaktionsgefäß 700µl Medium-<sub>SA</sub> vorgelegt und die DNA hinzupipettiert. Anschließend wird das Metafectene/Medium-Gemisch langsam dem DNA/Medium-Gemisch hinzugefügt und für 15min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wird darauf auf die Zellen in Kulturmedium pipettiert (=10ml Gesamtvolumen), die im Anschluss für 3-6h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Hierauf wird der gesamte Transfektionsmix abgenommen, die Zellen ein- bis zweimal mit sterilem PBS-Puffer (2.4.21) gewaschen und danach 10ml Kompletmedium (DMEM inkl. Antibiotika und 10% FCS) hinzugefügt. Darauf erfolgte eine Inkubation 24-48h bei 37° und 5%CO<sub>2</sub>.

### 3.2.5.3 Transfektion mit Effectene

Am Vortag der Transfektion werden pro 10cm Zellkulturschale zwischen 5x10<sup>5</sup> und 2,2x10<sup>6</sup> Zellen/ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wird bei einer Konfluenz von 40-80% die Transfektion vorbereitet. Dazu werden insgesamt 2µg DNA in 300µl DNA Kondensationspuffer („Puffer EC“) aufgenommen und zusätzlich mit 16µl Verstärkerlösung versetzt. Nach kurzer Durchmischung (1s) wird der Ansatz für 2 bis 5min bei RT inkubiert und danach kurz abzentrifugiert (Beseitigung von Kondensstropfen). Nachfolgend werden dem Ansatz 60µl Effectene hinzugefügt, durch wiederholtes Pipettieren gemischt und für 5-10min bei RT inkubiert. In dieser Zeit werden die zu transfizierenden Zellen einmal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und danach mit 7ml Kompletmedium inkubiert. Der Transfektionsmix wird in 3ml Kompletmedium aufgenommen und tropfenweise zu den PBS-gewaschenen Zellen hinzugefügt. Die Expression der transfizierten DNA wird durch Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24-48h ermöglicht.

### 3.2.5.4 Transfektion mit Escort

Es werden 1,2x10<sup>6</sup> Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden pro Transfektionsansatz 40µl Escort Reagent mit 620µl Medium-<sub>SA</sub> (3.2.5.2) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Nachdem dieser Lösung 13,5µg DNA hinzugefügt worden sind, erfolgt eine Inkubation von 15min bei RT. In dieser Zeit wird das Kulturmedium der Zellkulturschale durch 5,4ml frisches Kompletmedium ausgetauscht. Hierauf wird den Zellen der gesamte

Transfektionsmix tropfenweise hinzugefügt und für 5-6h bei 37°C sowie 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und durch 10ml DMEM-Komplettmedium (2.3.2) ersetzt. Die Expression der transfizierten DNA wird für weitere 40h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zugelassen.

#### 3.2.5.5 Transfektion mit Fugene 6

Die Zellen werden am Vortag der Transfektion in 10cm Zellkulturschalen bei einer Zellzahl von  $6,7 \times 10^5$ /ml- $2 \times 10^6$ /ml (abhängig von der Wachstumsrate der Zell-Linie bzw. dem Allgemeinzustand der Zellen) ausgesät. Das Gesamtaufnahmevermögen beträgt dabei 10ml Medium<sub>SA</sub> (3.2.5.2) und die Übernachtinkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Sofern die Zellen eine Konfluenz zwischen 50 und 80% erreicht haben, werden am Folgetag 667µl Medium<sub>SA</sub> in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend mit 20µl Fugene 6 vermischt. Darauf werden dem Reaktionsgemisch zwischen 7 und 13µg DNA hinzugefügt. Nach vorsichtigen Mischen wird der Ansatz für 15-45min bei RT inkubiert. Der Transfektionsmix wird daraufhin tropfenweise und gleichmäßig zu den Zellen hinzugefügt. Nach 3-6h wird das Medium abgenommen und durch 10ml DMEM-Komplettmedium (2.3.2) ersetzt. Der Transfektionsansatz wird für 24-48h inkubiert, bevor die Zellen in Folgeexperimenten weiterverwendet werden können.

#### 3.2.5.6 Transfektion mit Transfast

Bevor die Transfektion durchgeführt werden kann, werden  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro 10cm Zellkulturschale in 10ml Komplettmedium ausplattiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Danach wird das Medium abgenommen und durch 2,2ml Komplettmedium ersetzt. Weiterhin werden 7,8ml Komplettmedium mit 18µg DNA sowie 36µl Transfast Reagent vermischt und für 10min bei RT inkubiert. Darauf wird der Transfektionsmix zu den Zellen hinzupipettiert und für 2,5h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgt ein Mediumwechsel und eine Inkubationsdauer von 24-48h, an die sich Folgeexperimente zum Nachweis der transfizierten DNA anschließen können.

#### 3.2.5.7 Bestimmung der Transfektionseffizienz ( $\beta$ -Gal Nachweistest)

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgt durch die Verwendung eines Kontrollplasmids, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) kodiert. Dieses Enzym setzt das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo um. Diese blaue Farbreaktion ist nach wenigen Stunden im Lichtmikroskop sichtbar und der prozentuale Anteil der blaugefärbten Zellen lässt sich durch Auszählen bestimmen.

Zu Beginn dieses  $\beta$ -Gal-Nachweises werden die Zellen 24h nach erfolgter Transfektion einmalig mit PBS-Puffer gewaschen und in 100% Methanol für 5min bei RT fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen und nachfolgend für 10min in frischem PBS-Puffer rehydriert. Nach Zugabe der X-Gal-Färbelösung (2.4.4) werden die Zellen für mindestens 2h bei 37°C inkubiert.

### 3.2.6 Induktion von Apoptose

Zellen können künstlich in den kontrollierten Zelltod (Apoptose) getrieben werden. Die Induktion von Apoptose ist beispielsweise durch Zugabe von 1µM Staurosporin (2.4.5) zum Wachstumsmedium möglich. Staurosporin aktiviert in Zellen eine Reihe von Kaspasen, die der Familie der Proteasen zugeordnet sind. Kaspasen besitzen eine zentrale Bedeutung als Effektormoleküle bei der Induktion von Apoptose im intrazellulären Desintegrationsprozess.

Die Induktion der Apoptose erfolgt in dieser Arbeit einen Tag nach transienter Transfektion der Zellen. Das Wachstumsmedium wird von den Zellen entfernt und durch 5ml frisches DMEM-Komplettmedium (2.3.2) ersetzt, dem darauf 5 $\mu$ l Staurosporin hinzupipettiert werden. Der Ansatz wird zwischen 4 und 18h unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. In Abhängigkeit von der Zeit nimmt die Zahl der apoptotischen Zellen zu, die nach 18h ihr Maximum erreicht hat. Je nach Ansatz können die Zellen danach den Folgeexperimenten entsprechend präpariert werden.

### 3.2.7 Herstellung rekombinanter AAV

#### Transfektion:

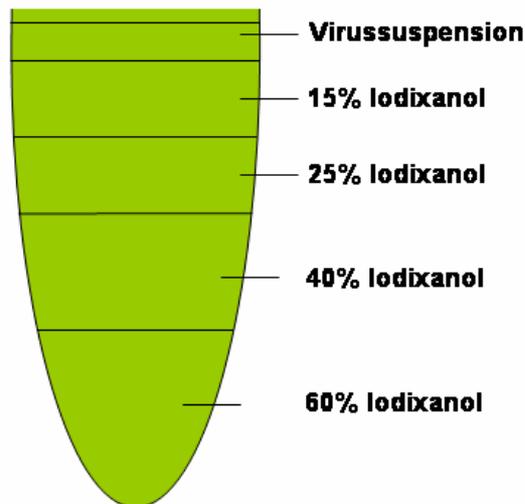
Zur Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren werden 5x10<sup>6</sup> 293T Zellen pro 15cm Zellkulturschale in DMEM-Komplettmedium (2.3.2) ausgesät und über Nacht bei Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Am Folgetag wird die Transfektion des Helfer- und des Verpackungsplasmides wie folgt durchgeführt: Pro Zellkulturschale werden in ein ausreichend großes und steriles Behältnis 18 $\mu$ g Verpackungsplasmid, 70 $\mu$ g Helferplasmid (pDG; 2.1.1), 1,125ml H<sub>2</sub>O sowie 0,125ml 2,3M CaCl<sub>2</sub> vorgelegt und gevortext. Im Anschluss werden einerseits 20ml DMEM-Komplettmedium in ein neues steriles Gefäß vorgelegt und andererseits den Zellkulturschalen das Wachstumsmedium entnommen. Daraufhin werden dem DNA-Ansatz 1,25ml 2xHBSS-Puffer (2.4.13) hinzugefügt und exakt 1min bei RT inkubiert. Die DNA/HBSS-Lösung wird dem vorgelegten Medium hinzugefügt und 22ml des resultierenden Gesamtgemisches auf die Zellen gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgt für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### Ernte:

Die Zellen werden danach mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst, im Wachstumsmedium resuspendiert und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden bei 2.400upm für 10min bei RT zentrifugiert (Heraeus Varifuge RF), das Zellpellet in 50ml PBS-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (2.400upm, 10min., RT; Heraeus Varifuge RF). Daraufhin werden die Zellen in 5ml Lysepuffer (2.4.13) resuspendiert und einer dreimaligen Frier/Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff bzw. im 37°C Wasserbad unterzogen (3.1.20.2). Zur Beseitigung von DNA- und RNA-Resten wird der Ansatz mit 50U/ml Benzonase versetzt, 30min bei 37°C inkubiert und danach mit 5.000upm für 20min und 4°C zentrifugiert. Der Virusüberstand wird abgenommen und im Iodixanol-Stufengradient weiterverwendet.

#### Iodixanol-Stufengradient:

Mit Hilfe des Iodixanolgradienten ist es aufgrund des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens im Schwerfeld möglich, neben der Eliminierung von Zelldebris unverpackte von verpackten AAV-Kapsiden zu trennen. Dazu wird ein Iodixanolgradient in einem Ultrazentrifugenröhrchen (25x29mm) mit je einer Phase von 15% (7ml), 25% (5ml), 40% (4ml) und 60% (4ml) Iodixanol durch Unterschichten (Virussuspension zuerst, 60% Iodixanol zuletzt) hergestellt (Abb. 3-2).



**Abb. 3-2: Auftragsschema Iodixanolgradient**

Danach wird der Gradient in der Ultrazentrifuge (Rotor TI 50.2) bei 50.000upm für 1,5h und 4°C zentrifugiert. Die verpackten AAV-Kapside liegen danach in der 40%-Iodixanolphase vor und können mit einer Spritze abgezogen werden. Das so erhaltene Eluat wird auf 10ml mit PBS-Puffer aufgefüllt und nachfolgend in einem 15ml Konzentrator (2.4.23) durch Zentrifugation bei 3.000upm für 30min und 4°C eingengt. Im Anschluss daran kann die Höhe des genomischen Titers bestimmt werden (3.1.19).

### 3.2.8 Infektion mit rAAV

Zur Infektion von eukaryotischen Zellen mit rekombinanten AAV (rAAV) werden am Vortag der Infektion  $1 \times 10^6$  293T Zellen in einer 10cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion wird im Anschluss, unabhängig ob als Einzelinfektion oder in Kombination mit mehreren rAAVs, mit einem MOI von 0,1, 1 oder 10 (bezogen auf die Anzahl infektiöser AAV Partikel) in 5ml serumfreien DMEM-Medium für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Darauf werden dem Infektionsansatz 5ml DMEM-Medium (inkl. 20% FCS) hinzugegeben und weitere 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die durch AAV Partikel transduzierten Plasmide bzw. deren exprimierte Proteine können über Standardpräparationstechniken nachgewiesen bzw. extrahiert werden (iIF: 3.1.21; VLP-Extraktion: 3.1.20).

### 3.2.9 Superinfektion mit Adenovirus

Die Expression von in rAAV verpackten Plasmiden kann deutlich erhöht werden, in dem man zu einer bereits laufenden rAAV-Infektion (3.2.8) mit Adenovirus Typ 5 (Wildtyp) überinfiziert. Dazu wird zunächst dem rAAV-Infektionsprotokoll entsprechend verfahren. Nach der einstündigen Infektionsinkubation mit rAAV werden dem Ansatz Ad-5 Viren mit einem MOI von 2,5 zugegeben, gefolgt von einer Inkubation von 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wird wieder dem rAAV-Infektionsprotokoll entsprechend verfahren (Zusatz von 5ml DMEM-Medium inkl. 20% FCS etc.).

### 3.2.10 Bakulovirus vermittelte Infektion von Insektenzellen

Die Grundlage für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten VLP-Kontrolle bildet ein für das humanisierte HPV16 L1 (hL1) rekombinantes Bakulovirus. Um VLPs zu generieren, die aus assemblierten L1-Einheiten bestehen, müssen zunächst

$1 \times 10^7$  Sf9-Zellen in einer  $75 \text{cm}^2$  großen Gewebekulturflasche in 10ml TNM-FH Medium (2.3.3) für 1h bei  $27^\circ\text{C}$  vorkultiviert werden. Danach wird das Medium eliminiert und den Zellen 0,5ml eines bereits vorhandenen Bakulovirusstocks (2.2.1) hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 1h bei RT auf einer Wippe werden den Zellen 10ml TNM-FH Medium zugesetzt und bei  $27^\circ\text{C}$  für 5 Tage inkubiert. Das Wachstumsmedium, das ebenfalls L1-VLPs enthält und deswegen hauptsächlich in den Folgeexperimenten dieser Arbeit verwendet wurde, wird abgenommen und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Nach Resuspension der Zellen in 6ml VLP-Extraktionspuffer (2.4.6) erfolgt der Aufschluss der Zellen durch dreimaliges Frieren/Tauen für je 20min bei  $-70^\circ\text{C}$ . Darauf werden die Ansätze á 2ml aliquotiert und für 30s bei Stufe 6 und  $4^\circ\text{C}$  mit Ultraschall behandelt. Abschließend werden die Präparate für 5min bei 13.000upm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die L1-VLPs, die in Analyseexperimenten in geeigneter Verdünnung eingesetzt werden können.

### 3.2.11 VLP- bzw. PV-Infektion von eukaryotischen Zell-Linien

#### 3.2.11.1 Präinkubation von VLPs mit Nukleasen

Für die Infektion von eukaryotischen Zellen mit verpackten VLPs werden vorgeklärter Rohextrakt oder eine gegen PBS dialysierte Fraktion aus dem Saccharosegradienten im Verhältnis 1:1 mit PBS-PV2 (2.4.12) gemischt, mit  $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNaseI sowie  $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNaseA versetzt und für 1-2h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

#### Pipettierschema:

200 $\mu\text{l}$  vorgeklärtes Zellextrakt oder Fraktion eines Saccharose-Gradienten  
200 $\mu\text{l}$  PBS-PV2  
8 $\mu\text{l}$  DNaseI ( $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
10 $\mu\text{l}$  RNase A ( $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

Optional können anstelle der DNaseI bzw. RNase A auch  $0,05 \text{U}/\mu\text{l}$  Benzonase verwendet werden. Die Inkubation erfolgt zu den selben Bedingungen wie zuvor benannt.

#### 3.2.11.2 Infektion

Zur Infektion werden standardmäßig 293T Zellen verwendet, die nach einmaligen Waschen mit sterilem PBS in einer Konzentration von  $8,67 \times 10^5/\text{ml}$  in PBS-PV3 aufgenommen werden. Die mit DNaseI bzw. RNase A präinkubierten Infektionsansätze werden daraufhin mit je  $300 \mu\text{l}$  der vorbereiteten Zellen ( $= 2,6 \times 10^5$  Zellen/ml) gemischt und auf einem Drehrad für 1,5h bei mittlerer Geschwindigkeit und  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach werden die Zellen für 5min bei 3.000upm (Thermoquest Micromax Zentrifuge) und RT sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 1ml DMEM-Komplettmedium (2.3.2) aufgenommen und in die Vertiefung einer 6-Lochplatte überführt. Nach Zugabe von weiteren 2ml DMEM-Komplettmedium kann die Inkubation der Infektion für 48-72h bei  $37^\circ$  und 5%  $\text{CO}_2$  erfolgen. Der Nachweis des Verpackungsplasmids bei erfolgreicher Infektion durch VLPs wird mit Hilfe des  $\beta$ -Gal-Nachweistests durchgeführt (3.2.5.7).

### 3.3 Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM) können VLPs sowohl intrazellulär (z.B. im Nukleus nach transienter Transfektion) als auch nach präparativer Aufbereitung in Lösung (z.B. nach Aufreinigung im Saccharosegradienten) visualisiert werden. Die Arbeiten wurden zum großen Teil von Birgit Hub (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

#### 3.3.1 Nachweis von VLPs in eukaryotischen Zellen

Um einen intrazellulären VLP-Nachweis im EM zu erzielen, müssen Zellen zunächst transient mit Expressions-Plasmiden transfiziert werden, die das L1 tragen. Zusätzlich muss beachtet werden, dass die Zellen dabei auf Glasplättchen ( $\varnothing$  10mm) kultiviert werden. Nach Beendigung der Transfektion werden die Glasplättchen aus der Zellkulturschale entnommen, 1x mit PBS-Puffer (2.4.21) gewaschen und 30min auf Eis in Fixierlösung (2.4.18) inkubiert. Danach werden die Zellen mit Osmiumtetroxid-Lösung (2.4.18) gefärbt, in steigenden Konzentrationen von Ethanol dehydriert und schließlich in Epoxidharz eingebettet. Im weiteren Präparationsverlauf werden ultradünne Schnitte der eingebetteten Zellen angefertigt, mit 0,5% Uranylacetat gefärbt und mittels EM analysiert.

#### 3.3.2 Nachweis von VLPs in Saccharosegradienten-Fractionen

Bevor die Fractionen aus Saccharosegradienten im EM untersucht werden können, müssen 20-50 $\mu$ l pro Fraction für 2h bei 4°C gegen PBS-Puffer oder (besser) H<sub>2</sub>O dialysiert werden. Dazu wird eine Dialysemembran mit einer Porengröße von 0,025 $\mu$ m (2.4.23) verwendet. Während dieser Inkubation werden mit Kohle beschichtete Kupfernetze (2.4.23) beglimmt, damit deren hydrophile Eigenschaft verstärkt wird. Darauf werden je 5 $\mu$ l der dialysierten Saccharosefractionen auf die Netze pipettiert und 2min bei RT inkubiert. Die Proben werden dann mit Filterpapier abgesaugt und die Netze mit 8 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation mit 8 $\mu$ l 2% Uranylacetat für 30-60s bei RT, die danach erneut mit Filterpapier abgesaugt wird. Die Netze werden abschließend getrocknet und dann im EM analysiert.

## 4. Ergebnisse

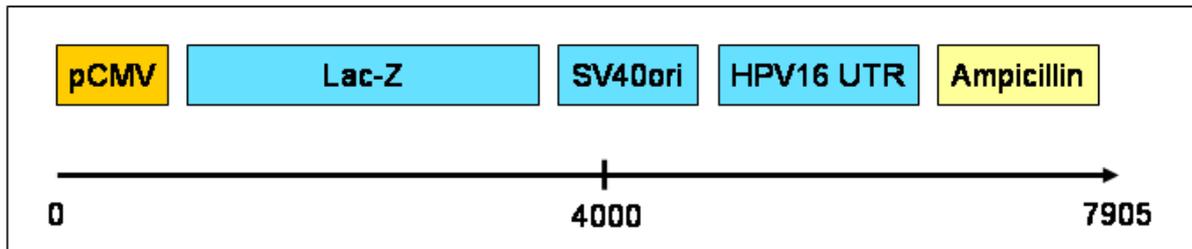
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchen Mengen Virus-ähnliche Partikel (VLPs) in Standardzellkulturen hergestellt werden können. Diese Untersuchungen erfolgten unter Verwendung humanisierter HPV16 L1- und L2-Strukturgene, denen in vorausgegangenen Experimenten hohe Einzel-expressionsraten nachgewiesen werden konnten. Neben der Etablierung eines reproduzierbaren und effizienten Produktionssystems sollte darüber hinaus untersucht werden, in wie fern diese VLPs mit DNA verpackt werden können und ob die verpackte DNA durch eine Infektion spezifisch transduziert werden kann.

Im ersten Kapitel dieses Abschnitts wird beschrieben, aus welchen Bestandteilen das bei den Verpackungsversuchen eingesetzte Plasmid besteht und wie diese zusammengesetzt wurden (Kapitel 4.1). Hinsichtlich der Transfektionseffizienz wurden verschiedene Transfektionsprotokolle in Kombination mit unterschiedlichen Zell-Linien evaluiert, die im zweiten Teil beschrieben sind (Kapitel 4.2). Der dritte Teil dieses Abschnitts beschäftigt sich mit der Darstellung der Ergebnisse, die im Rahmen der Herstellung von VLPs gewonnen werden konnten (Kapitel 4.3). Die Ergebnisse der Sedimentationsanalysen sowie die in diesem Zusammenhang durchgeführten Optimierungsversuche zur Generierung hoher Pseudovirionen-Ausbeuten sind in Kapitel 4.5 beschrieben. Schließlich werden sowohl in Kapitel 4.4 als auch in Kapitel 4.6 die Ergebnisse aller durchgeführten Infektionsversuche beschrieben.

### 4.1 Herstellung des Verpackungsplasmids

Damit die Eigenschaften der humanisierten HPV16-L1- und HPV16-L2-Gene zur Produktion DNA-verpackter VLPs (=Pseudovirionen) in verschiedenen eukaryotischen Zell-Linien näher untersucht werden konnten, wurde ein Verpackungsplasmid („Targetplasmid“) hergestellt, das intrazellulär in die Hüllproteine verpackt werden sollte. Nach Aufreinigung dieser DNA-verpackten Pseudovirionen sollte das Targetplasmid durch Infektion von Zellen transduziert und mit Hilfe eines einfachen Detektionssystems nachgewiesen werden können. Die für den Verpackungsvorgang verantwortlichen Faktoren und Strukturen sind weitgehend ungeklärt (siehe Kapitel 1), wobei der untranslatierten Region (UTR) des HPV16 Genoms eine verpackungsrelevante Rolle zugeschrieben wird. Um der nativen Verpackungssituation gerecht zu werden, sollte das Targetplasmid möglichst der Größe des originalen HPV16 Ge-

noms entsprechen und in hohen Mengen in der Zelle repliziert werden. Aus diesen Anforderungen ergab sich die in Abb. 4-1 angegebene Zusammensetzung des Targetplasmids.



**Abb. 4-1: Bestandteile des Verpackungsplasmids, das die exakte Größe des nativen HPV16 Genoms aufweist (7905bp). pCMV: Promotor des Cytomegalovirus; Lac-Z: Reporteragen; SV40ori: Ursprung der Replikation für alle Zellen, die das große T-Antigen des Simian Virus 40 besitzen; HPV16 UTR: Untranslatierte Region von HPV16; Ampicillin: Resistenzgen**

Die für das Targetplasmid benötigten Basiselemente wie den starken viralen Promotor pCMV („cytomegalovirus immediate-early promotor“), das Resistenzgen Ampicillin und den zur Replikation des Targetplasmids in Säugertierzellen benötigten SV40ori wurden aus dem pcDNA3.1(-) Expressionsvektor (2.1.1) über die Schnittstellen *PciI* und *SmaI* gewonnen (Abb. 4-2). Nach Rezirkularisierung und Verkleinerung des Plasmids mit *NgoMIV* und *PsiI* wurde erneut rezirkularisiert und die Insertionsstelle für das Reporteragen über *NotI* bzw. *EcoRV* geöffnet. Das Reporteragen wurde aus einem eigenen Expressionsvektor (#150; 2.1.1) über *NotI* und *DraI* präpariert, in den vorbereiteten pcDNA-Vektor inkloniert und nachfolgend für den Transfer der HPV16 UTR über *StuI* vorbereitet. Die UTR von HPV16 wurde mittels PCR unter Verwendung des HPV16 Originalgenoms als Matrize amplifiziert, wobei die zur Herstellung der exakten Plasmidgröße (7905bp) noch notwendigen Nukleotide bei der Primerbestimmung berücksichtigt wurden (2.1.3). Darauf wurde das PCR-Produkt über *EcoRV* in den Expressionsvektor pBlueskriptII KS (2.1.1) zwischenkloniert und über *StuI* in das vorbereitete Konstrukt eingesetzt.

Das Targetplasmid wurde zusammen mit den humanisierten HPV16-L1- und L2-Expressionsplasmiden durch Kotransfektion in eukaryotische Zellen eingebracht (4.3 bzw. 3.2.5). Außerdem konnte die Transfektionseffizienz und Funktionalität des Targetplasmids direkt mit Hilfe eines  $\beta$ -Gal Nachweistests (3.2.5.7) bestimmt werden.

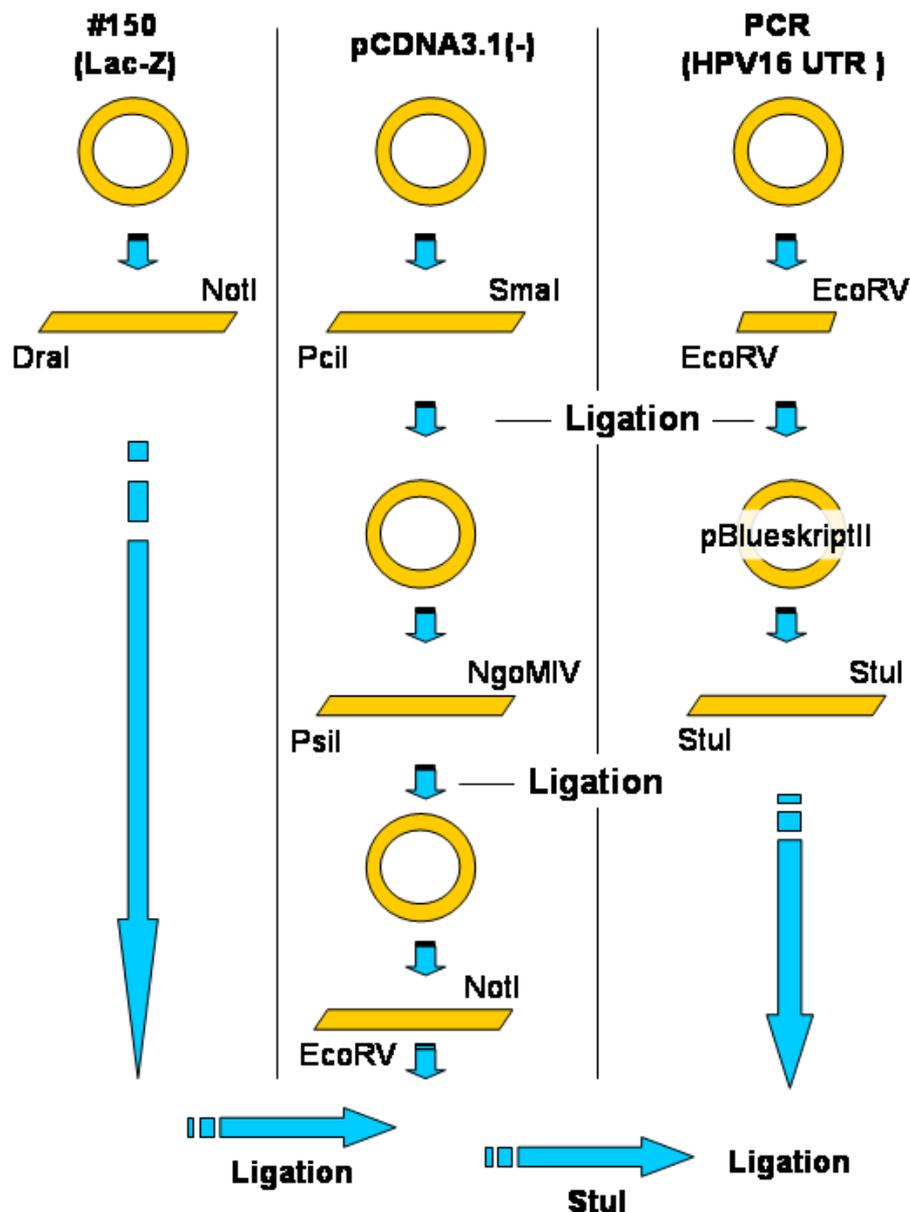


Abb. 4-2: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Targetplasmids für die Verpackung von HPV16 VLPs. Genaue Darstellungen der Plasmidkarten befinden sich im Anhang. Detaillierte Beschreibung der Klonierung siehe Text.

## 4.2 Evaluation verschiedener Transfektionsmethoden

Um die Transfektion verschiedener Zell-Linien zu optimieren, wurden Transfektionsreagenzien verschiedener Hersteller getestet. Zur Vereinfachung wurde dabei ein Standardexpressionsplasmid verwendet, das ein Lac-Z-Gen beinhaltet (#150; 2.1.1). Die Effizienzen wurden mit Hilfe des  $\beta$ -Gal-Nachweistests (3.2.5.7) durch Auszählung positiver Zellen ermittelt. Eine Auflistung der dabei untersuchten Zellen und ermittelten Effizienzen ist Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Zell-Linie	Transfektionseffizienz [%] in Abhängigkeit von der Transfektionsmethode					
	Kalzium-phosphat	Metafectene®	Effectene®	Escort®	Transfast®	Fugene 6®
293	21	37	25	15	n.b.	n.b.
293-T	85	95	68	n.b.	n.b.	n.b.
911	15	51	32	10	0	5
HeLa	1	5	5	2	1	0
Cos-7	5	15	6	2	n.b.	n.b.
CV-1	0	0	0	0	0	0
Caski	0	0	0	0	0	0
BHK-21	7	34	10	5	2	n.b.
BPHE-1	0	5	3	0	1	0

**Tabelle 4-1: Übersicht verschiedener Transfektionsreagenzien hinsichtlich ihrer Effizienzen im Einsatz mit unterschiedlichen Zell-Linien. Die Zellen wurden jeweils mit dem selben Expressionsplasmid transfiziert. n.d.: nicht bestimmt; gelb markierte Felder: die beiden besten Kombinationen bezgl. Transfektionsmethode und Zell-Linie.**

Die Evaluierung der verschiedenen Transfektionsmethoden zeigte, dass sich hinsichtlich ihrer Transfizierbarkeit 293T-Zellen auf der einen Seite und das Transfektionsreagent Metafectene® auf der anderen Seite als am besten für die Durchführung der Expressionsanalysen geeignet waren.

Die in der Tabelle mit „n.b.“ bezeichneten Zuordnungen wurden nicht erhoben, wenn beispielsweise eine sehr gute Transfizierbarkeit des jeweiligen Zelltyps durch eine oder mehrere andere Transfektionsmethode(n) gewährleistet wurde(n).

### 4.3 Herstellung von VLPs bzw. PVs

#### 4.3.1 Prinzip der Herstellung von VLPs bzw. PVs

Die in diesem Kapitel beschriebene Herstellung von VLPs bzw. PVs basierte im wesentlichen auf der Kotransfektion mehrerer, einzeln vorliegender Expressionsplasmide. Dabei kamen die in Tabelle 4-2 genannten Konstrukte zum Einsatz.

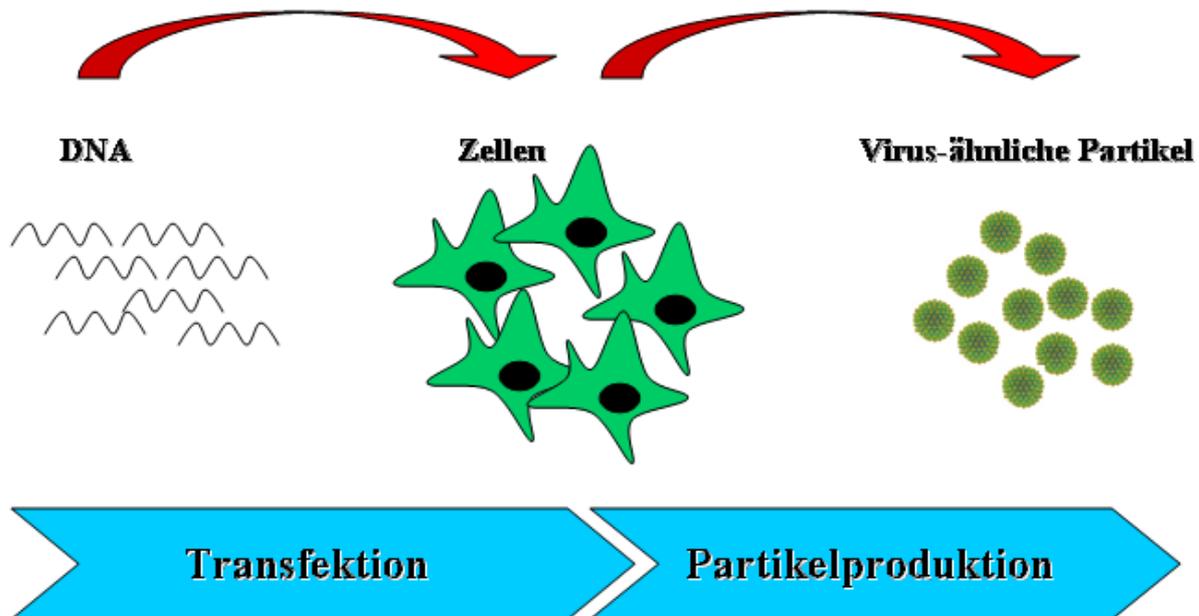
Abkürzung des Plasmids	Plasmidbezeichnung	Zweck
hL1	humanisiertes HPV16 L1	Bildet das Hauptkapsidprotein
hL2	humanisiertes HPV16 L2	Bildet das Nebenkapsidprotein
Target	Verpackungsplasmid	Exprimiert das Lac-Z-Gen, beinhaltet die (verpackungsrelevante) UTR von HPV16 sowie einen SV40ori
T-AG	großes T-Antigen des SV40	T-Antigenexpression
E1	HPV16 E1	Replikation des zu verpackenden Genoms
E2	HPV16 E2	Begünstigung der Replikation und des Verpackungsprozesses

**Tabelle 4-2: Übersicht der zur Herstellung von VLPs kotransfizierten Expressionsplasmide**

Für die Elemente hL1 und hL2 aus Tabelle 4-2 bestand zudem die Möglichkeit der Verwendung verschiedener Plasmidvarianten (Kapitel 9). Das Hauptunterscheidungsmerkmal bestand darin, dass die Plasmidvarianten #955(hL1) und #956(hL1) im Gegensatz zu den Plasmidvarianten #925(hL1) und #893(hL2) einen SV40ori zur autonomen Replikation in Zellen, die das große T-Antigen des SV40 exprimieren, besaßen. Außerdem wurde eine Plasmidvariante verwendet, die die beiden humanisierten Strukturgene – getrennt durch eine IRES („internal ribosome entry site“) – vereint aufwies (#917). Zur Generierung hoher Proteinausbeuten enthielten alle Plasmide einerseits den starken viralen Promotor pCMV und andererseits das Intron aus dem späten Genombereich von SV40 (SD/SA). Die Intronsequenzen erhöhen die Proteinexpression, in dem sie die hnRNA sehr effizient in den Prozessierungsweg leiten (Petitclerc, Attal et al. 1995). Alle diesbezüglichen Plasmidvarianten wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Martin Müller, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

### 4.3.2 Expression der VLP-Komponenten

Zu Beginn der ersten Produktionsexperimente wurden die Hauptelemente hL1, hL2 und Target den Vorgaben der Transfektionsmethoden entsprechend in nicht differenzierte 293T Zellen transient kotransfiziert, wobei die Expressionsplasmide in gleichen Mengenverhältnissen zueinander eingesetzt wurden (Abb. 4-3).



**Abb. 4-3: Prinzip der Produktion Virus-ähnlicher Partikel (VLP).** HPV16 Strukturgene werden transient transfiziert, exprimiert und die partikulären Strukturen aus den Zellen extrahiert. Im Anschluss können die Partikel in unterschiedlichen Test-Verfahren analysiert werden.

Die Expression der kotransfizierten hL1- und hL2-Plasmide wurde mittels Immunfluoreszenz (3.1.21), ELISA (3.1.22) und Western Blot (3.1.25) analysiert. Die Expression des im Targetplasmid enthaltenen Lac-Z Gens wurde anhand eines  $\beta$ -Gal Nachweistests beurteilt.

Die in Abb. 4-4 gezeigten Experimente ergaben, dass die Strukturproteine L1 und L2 nach Transfektion der humanisierten Expressionsplasmide für L1 und L2 im Nukleus nachgewiesen werden können (Abb. 4-4 A/B). Dabei ließ sich beobachten, dass L1-Proteine im Nukleus homogen verteilt sind, währenddessen die L2 Proteine in punktförmigen Unterdomänen des Zellkerns vorzufinden waren (Gornemann, Hofmann et al. 2002).

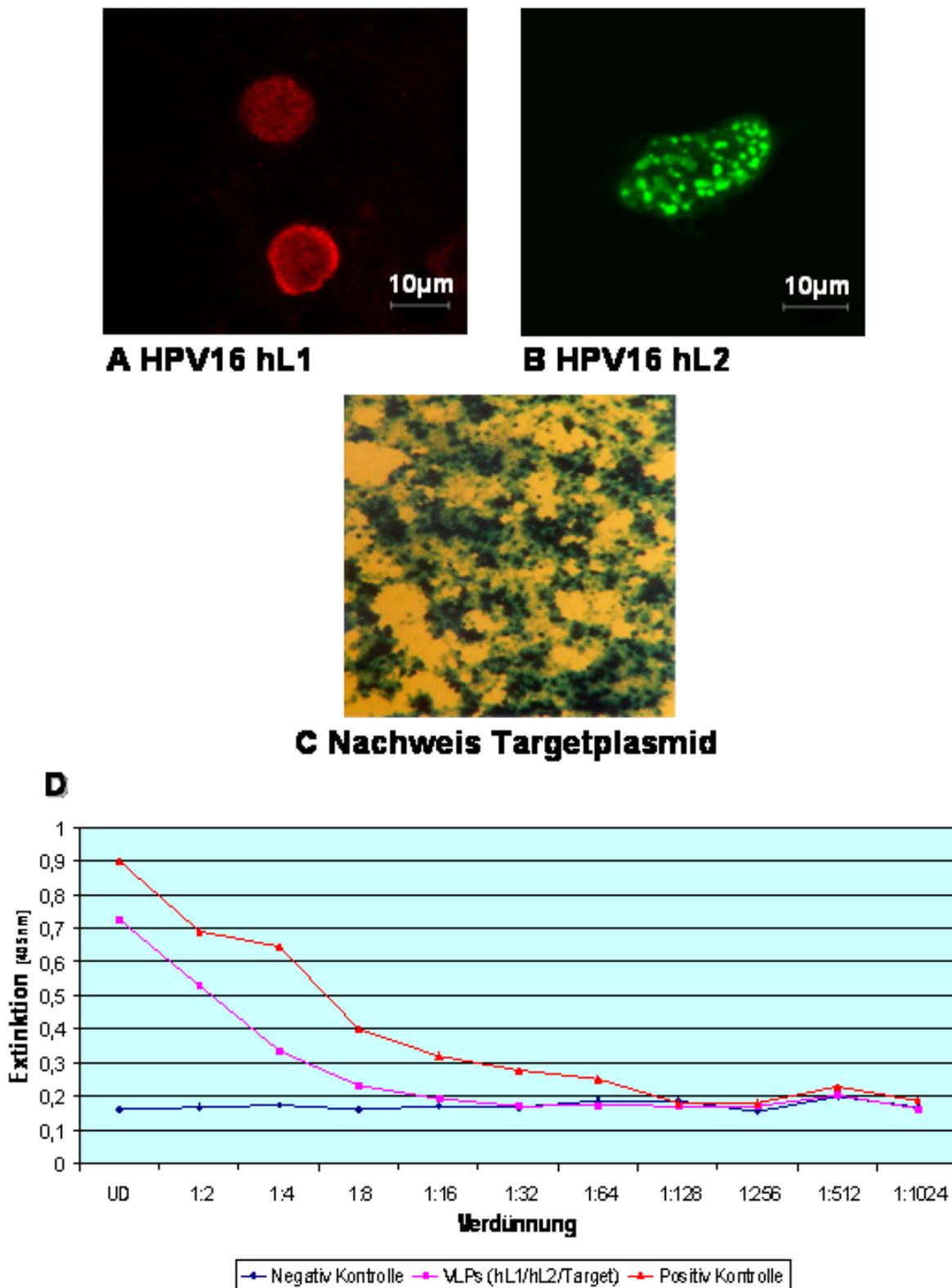


Abb. 4-4: Nachweis von HPV16 L1 und L2 Proteinen nach Kotransfektion von 293T Zellen mit humanisierten L1 und L2 Genen. Lokalisation von L1 durch den L1-spezifischen monoklonalen Antikörper Camvir (A) sowie L2 durch das L2-spezifische polyklonale Kaninchenserum #20 (B). Nachweis des Targetplasmids durch  $\beta$ -Gal Test (Durchlichtmikroskopische Aufnahme) (C). Konformationsspezifische Strukturen aus Überständen von Zellextrakten wurden mit Hilfe eines ELISA durchgeführt (D), in dem der monoklonale Antikörper 1.3 verwendet wird (UD: unverdünnte Probe; Positiv-Kontrolle: L1-VLPs aus Insektenzellen (3.2.10); Negativ-Kontrolle: untransfizierte 293T Zellen).

Die Übertragung des Targetplasmids in über 80% aller Zellen konnte gezeigt werden (Abb. 4-4 C), wobei aber noch keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob es nach der Transfektion des Targetplasmids zu einer Verpackung desselben in VLPs gekommen ist. Die grundsätzliche Frage, ob eine Bildung von konformationsspezifischen (VLP-, oder PV-) Strukturen unter Verwendung von hL1, hL2 und Targetplasmid möglich ist, konnte mit Hilfe des ELISA-Tests beantwortet werden, in dem konformationsspezifische Strukturen detektiert werden können (Abb. 4-4 D).

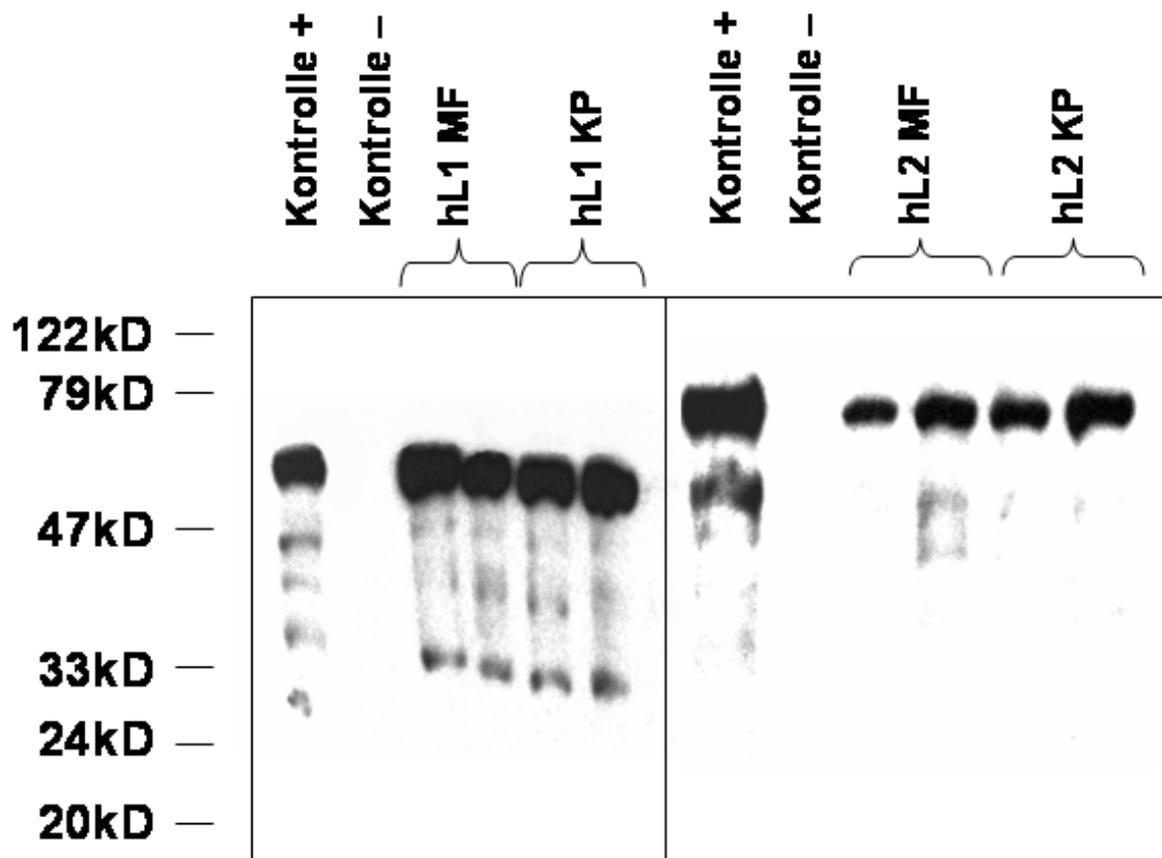
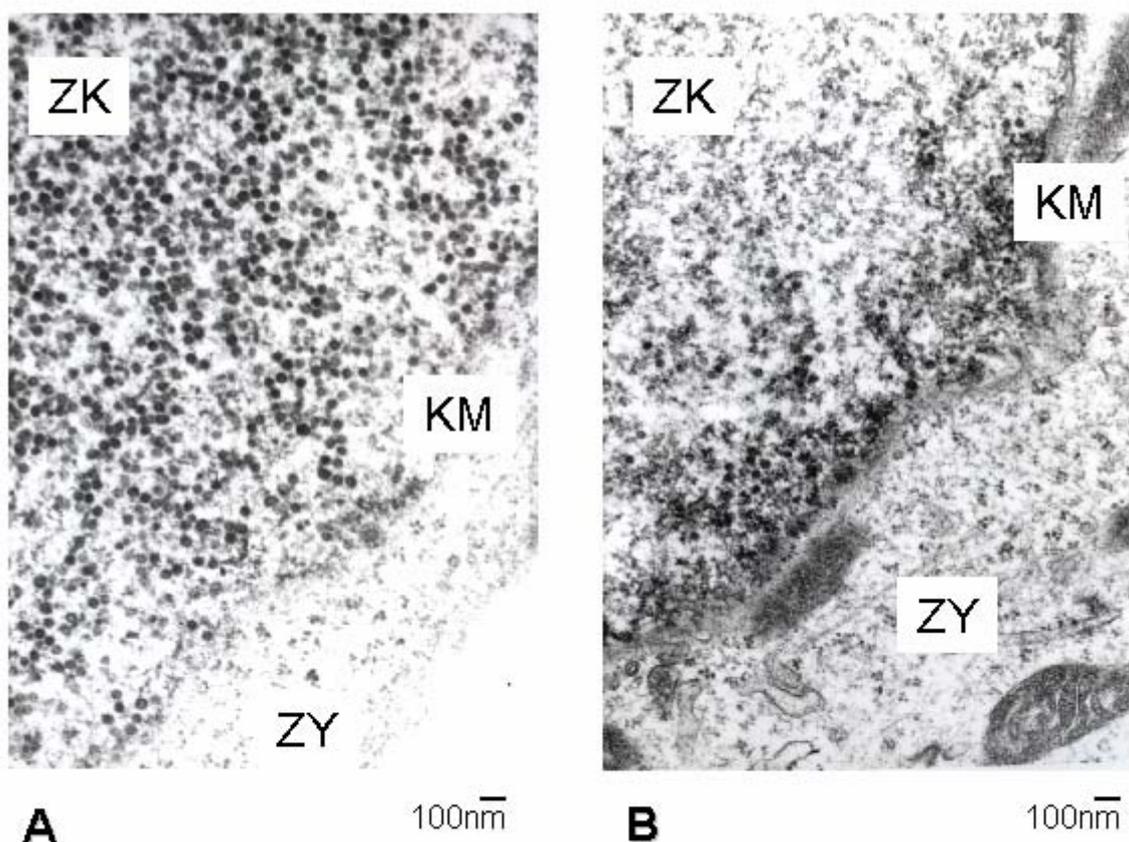


Abb. 4-5: Nachweis von HPV16 L1 und L2 Proteinen: Plasmide mit humanisierten L1- und L2-Genen wurden mit unterschiedlichen Transfektionsverfahren in 293T Zellen transfiziert und deren Zellextrakte anschließend mittels Western Blot analysiert. Kontrolle +: Extrakt von Insekten-Zellen, die mit L1-rekombinantem Bakulovirus infiziert wurden. Kontrolle -: untransfizierte 293T Zellen, MF: Metafectene, KP: Kalziumphosphat.

Da der ELISA nur eine Aussage über den L1-Gehalt ermöglicht, wurden ferner Zellextrakte im Western Blot auf ihren L1- und L2- Gehalt hin überprüft (Abb. 4-5). Es konnte beobachtet werden, dass bei Proben unterschiedlicher Transfektionsmethodik neben L1-Proteinen auch L2-Proteine nachgewiesen werden konnten. Eine Beurteilung über die erfolgreiche Inkorporation der L2-Moleküle in das hauptsächlich durch L1 gebildete Virus ähnliche Partikel konnte in diesen Experimenten nicht getroffen werden. Des Weiteren konnte in diesen Experimenten die in 4.2 beschriebene, vergleichbare Transfektionseffizienz der Transfektionsmethoden Metafectene® und Kal-

ziumphosphat durch die Präsenz von vergleichbaren Proteinmengen an L1 und L2 bestätigt werden. Um eine Aussage über die Assemblierungsfähigkeit der eingesetzten Kapsid-Proteine unter Kotransfektion des Targetplasmids machen zu können, wurden 293T Zellen mit hL1, hL2 sowie Target transfiziert. Von den Zellen wurden ultradünne Schnitte angefertigt und dann im Elektronenmikroskop analysiert. Da L1 bei alleiniger Expression bereits dazu in der Lage ist, spontan VLPs zu bilden, konnte in diesen Analysen keine Aussage darüber gemacht werden, in wie weit die Kotransfektion des L2 sowie des Targetplasmids zu einer erhöhten VLP-Synthese beigetragen haben.



**Abb. 4-6: VLP-Assemblierung.** 293T Zellen wurden transient mit hL1, hL2 und Target kotransfiziert. Ultradünne Schnitte wurden gefärbt und im EM untersucht. ZY: Zytosol; ZK: Zellkern; KM: Kernmembran

Aus Abb. 4-6 (A) ist ersichtlich, dass nach der Transfektion im Zellkern *in situ* Virusähnliche Partikel nachweisbar sind. Diese sind aufgrund ihrer runden und dunkel gefärbten Struktur bei einer Größe von ca. 55nm zu erkennen.

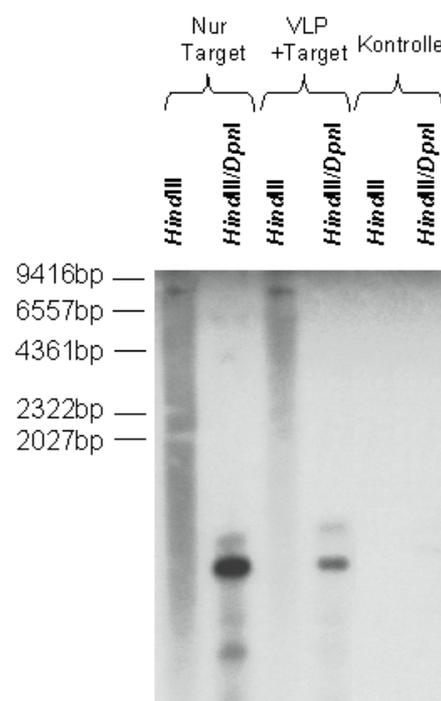
Außerdem konnte bei Präparationen, die kurz nach der Transfektion durchgeführt worden waren, beobachtet werden, dass sich die assemblierten VLPs – nicht wie erwartet – gleichmäßig im Zellkern verteilen, sondern sich möglicherweise zunächst

an der Zellkernmembran ansammeln, und nur in geringen Mengen über die Zellkernmembran hinweg nachweisbar sind (Abb. 4-6 B).

#### 4.3.3 Replikationsnachweis des Targetplasmids

Um eine gute Verpackung von DNA in VLPs zu erzielen, muss die DNA in möglichst großer Menge in der Zelle vorliegen.

Damit das Targetplasmid in 293T Zellen in hohen Mengen repliziert werden konnte, wurde der SV40ori in den Plasmidkontext des Targetplasmids integriert. Es wurde bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen, dass Zellen, die das große T Antigen des SV40 exprimieren (z.B. 293T-Zellen), Plasmide mit SV40ori in sehr hohen Mengen replizieren (Kim, Barbaro et al. 1999). Um die Replikation des Targetplasmids in 293T-Zellen nachzuweisen, wurde die extrachromosomal vorliegende Targetplasmid-DNA nach Hirt (Hirt 1967) präpariert (3.1.17.2.1) und mittels Southern Blot Verfahren (3.1.18) analysiert (Abb. 4-7).



**Abb. 4-7:** Das Targetplasmid wird nicht repliziert. Nur Target oder hL1, hL2 und Target oder pBlueskriptII (Kontrolle) wurde(n) in 293T Zellen transient transfiziert. Nach Präparation episomaler DNA (nach Hirt) und anschließender *HindIII*/*Dpnl* Restriktion erfolgt der Target-DNA Nachweis im Southern Blot Verfahren mittels radioaktiv markierter, SV40-ori spezifischer DNA-Sonde (3.1.18.2).

Um die Replikation des Targetplasmids nachzuweisen, wurden 293T Zellen einerseits nur mit dem Targetplasmid transfiziert (Abb. 4-7 „Nur Target“). Ebenso wurde andererseits mit der Probe verfahren, bei der neben dem Targetplasmid die Struktur-

gene hL1 und hL2 transfiziert wurden (Abb. 4-7 „VLP+Target“). Zur Klärung der Frage, in wie fern es im Southern Blot zu unspezifischen Bindungen kommt, wurde ein Plasmid (pBlueskriptII KS; 2.1.1) verwendet, dessen Sequenz keine SV40ori-Information besitzt und somit durch die eingesetzte, radioaktiv markierte Sonde nicht erkannt werden konnte (Abb. 4-7 „Kontrolle“). Während die episomale DNA durch Linearisierung (*HindIII*) im Größenbereich von etwa 8kb zwar nachgewiesen werden konnte und somit der realen Größe des Targetplasmids entsprach, ließ sich nach *DpnI*-Restriktion nur vollständig restringierte Targetplasmidfragmente im Bereich zwischen 500 und 1000bp nachweisen. Ein Nachweis von nicht-methylierter, in den transfizierten Zellen replizierter Targetplasmid-DNA konnte nicht erbracht werden. Daraus war ersichtlich, dass das Targetplasmid weder unter Einzel- noch unter Kotransfektionsbedingungen autonom repliziert. Dieses Ergebnis schien auf eine Minderfunktion des im Targetplasmid enthaltenen SV40ori bzw. auf eine Fehlfunktion des T-Antigens der verwendeten Zell-Linie hinzuweisen. Die Expression des T-Antigens in den verwendeten Zell-Linien wurde daraufhin näher untersucht (siehe 4.5.2.2.2.3).

#### 4.3.4 Gewinnung von VLPs durch Verwendung von rAAV

Da die Kotransfektion mehrerer Plasmide zu geringeren Transfektionseffizienzen und somit – wie im vorliegenden Ansatz – zu geringen VLP-Ausbeuten führen kann, wurde eine alternative Strategie entwickelt, mit deren Hilfe die VLP-Ausbeute trotz Verwendung vieler Plasmide möglichst hoch ausfallen sollte.

Die Expressionsplasmide für die Hüllproteine (hL1 und hL2) sollten zunächst in Adeno-assoziierte Viren verpackt und diese folgend in eukaryotische Zellen transduziert werden. Zusätzliche Plasmide (E1, E2 und Targetplasmid) sollten außerdem – wie bereits beschrieben – durch Transfektion in die Zelle eingeschleust werden (Abb. 4-8).

Da Adenoviren als Helfervirus die Vermehrung von (r)AAV um ein Vielfaches verstärken können (Lai, Lai et al. 2002), wurden die in den Infektionsexperimenten mit rAAV infizierten Zellen noch zusätzlich mit dem Wildtyp von Ad-5 superinfiziert (3.2.9).

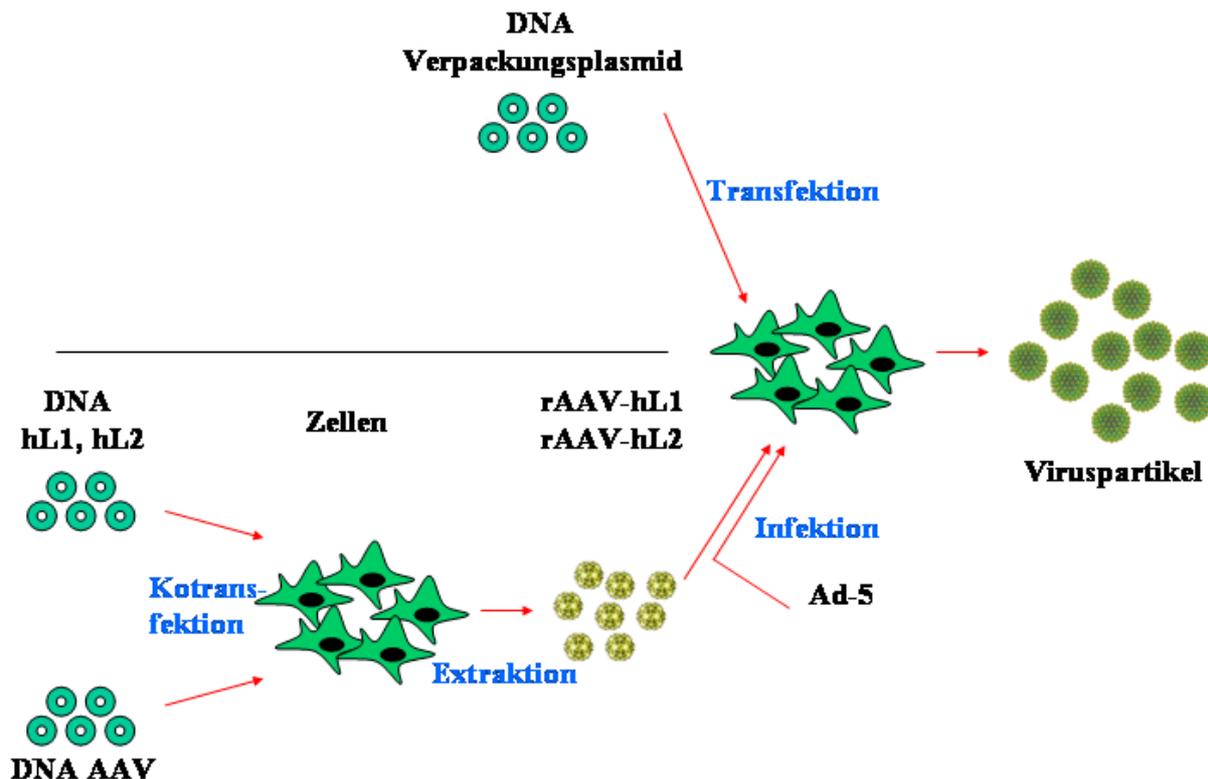
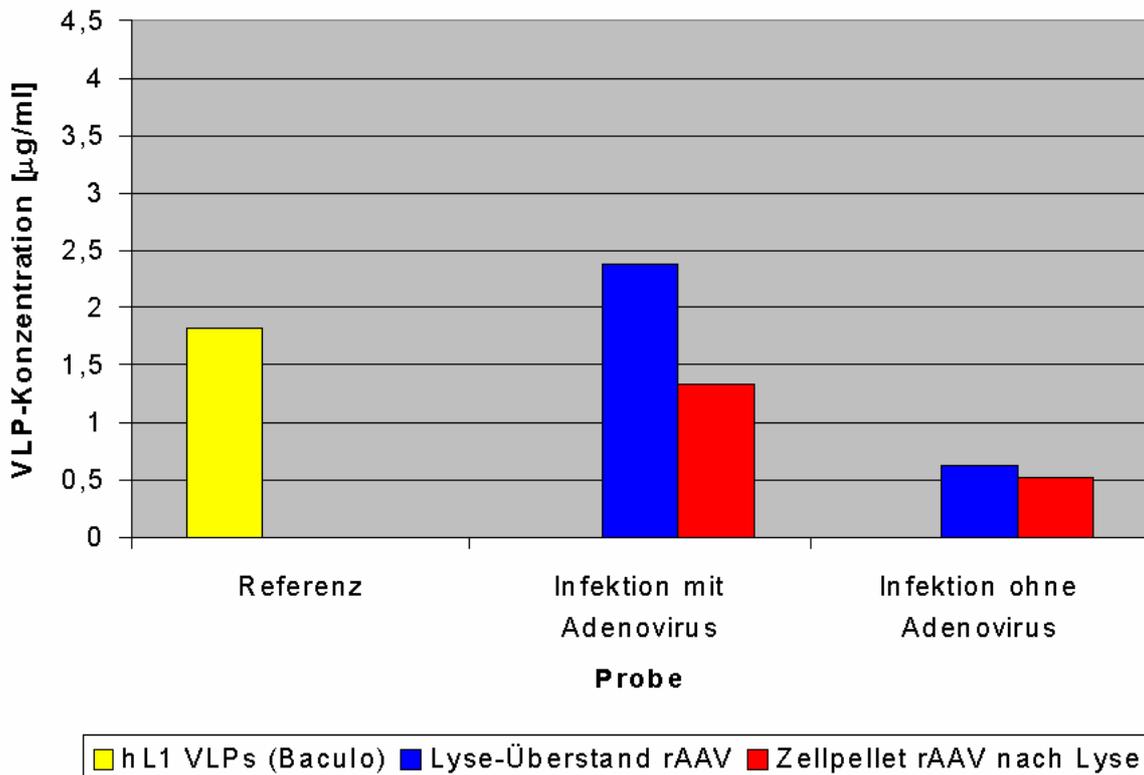


Abb. 4-8: Herstellung von VLPs mittels rAAV und Ad. Die kodonoptimierten L1 und L2-Gene wurden getrennt in AAV-Partikel verpackt (=rAAV). Es folgte eine Transfektion des Targetplasmids (optional zzgl. E1 bzw. E2) bei gleichzeitiger Infektion der Zellen mit rAAV. Zur Verstärkung der AAV-Expression wurde mit Ad-5wt superinfiziert.

Bei der Herstellung der rAAV konnten genomische Titer der verpackten Plasmide von  $1 \cdot 10^{12}$  (hL1) bzw.  $1 \cdot 10^8$  (hL2) generiert werden. Der Titer der infektiösen Partikel lag somit schätzungsweise bei Werten von  $1 \cdot 10^9$  (hL1) bzw.  $1 \cdot 10^5$  (hL2).

293T Zellen wurden mit verschiedenen M.O.I. (0,1; 1; 10) an rAAV infiziert und mit Ad-5wt superinfiziert. Abb. 4-9 zeigt, dass durch diesen Produktionsansatz ebenfalls VLPs generiert werden können. Es war festzustellen, dass der Einsatz von Ad-5wt einerseits zu einer etwa vierfachen Ausbeutensteigerung im Vergleich zur alleinigen Infektion mit rAAV führte. Eine Untersuchung der Extrakte zurück bleibender Zellen ergab die Beobachtung, dass selbst nach erfolgter VLP-Präparation in den zurück bleibenden Zellen noch immer zwischen 36% (Infektion mit Adenovirus) und 45% (Infektion ohne Adenovirus) der VLP-Gesamtmenge vorhanden waren.



**Abb. 4-9:** Vergleich an VLP-Ausbeuten nach rAAV Infektion mit/ohne Superinfektion von Ad-5wt. Als Referenzwert ist die Menge erzielter VLPs aus Insektenzellen (3.2.10) angegeben. Verglichen wird zwischen einer rAAV Infektion +/- Ad-5 Superinfektion sowie zwischen den Ausbeuten im Endpräparat („Lyse-Überstand“) und den zurück bleibenden Zellen („Zellpellet rAAV nach Lyse“).

Die diesbezgl. Verwendung von HeLa-Zellen bei vergleichbarem M.O.I. brachte eine um etwa 65% schlechtere VLP-Ausbeute (Daten nicht gezeigt) als die in 293T Zellen bestimmte.

Zusammenfassend konnte zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden, dass sich die Herstellung von VLPs mit Hilfe von rAAV und Ad zwar eignet (Steigerung der Ausbeute/ml um Faktor 1,3 im Vergleich zur Referenz bzw. um Faktor 1,6 im Vergleich zur bisherigen Ausbeute durch Transfektion), der dazu betriebene, hohe Herstellungsaufwand und die damit verbundenen Kosten aber in keinem realistischen Zusammenhang zu bringen sind.

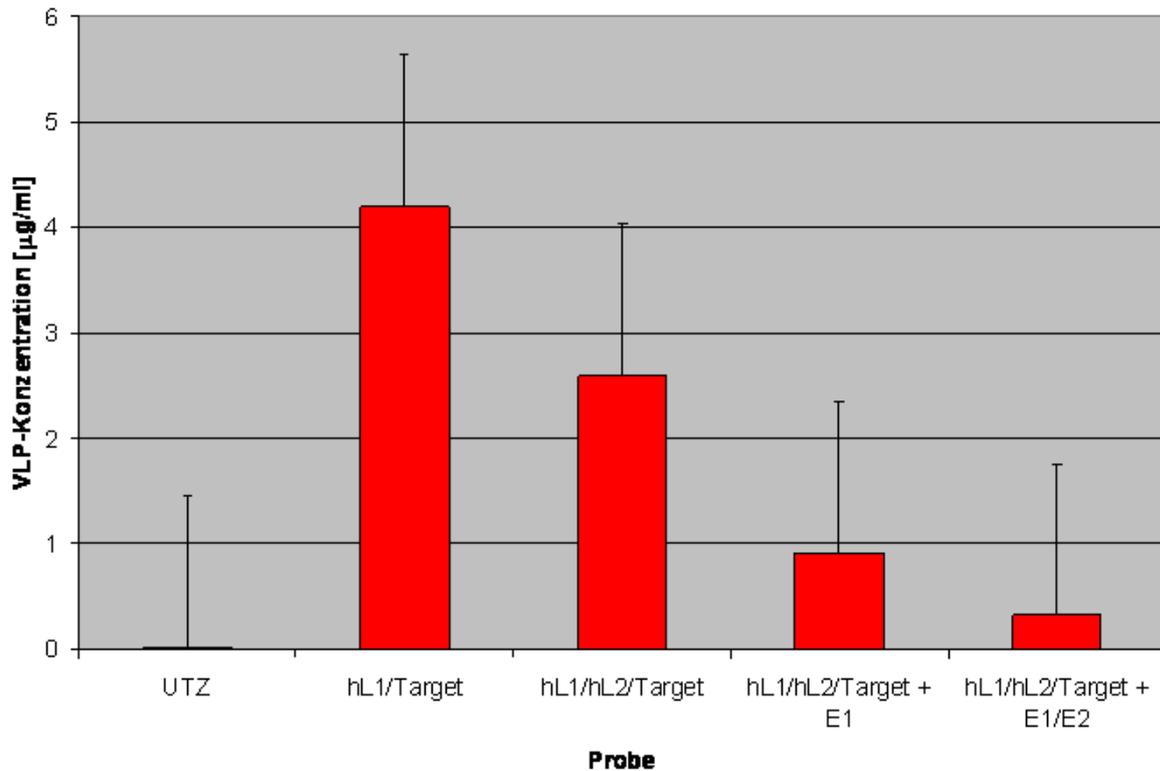
#### 4.3.5 Gewinnung von VLPs durch Verwendung von transienter Transfektion

Da das alternative Produktionssystem für VLPs unter Verwendung von rAAV aus den genannten Gründen (4.3.4) nicht weiterentwickelt wurde, sollte in den folgenden Experimenten analysiert werden, in wie fern eine Steigerung der VLP Ausbeuten durch die Veränderung von bisher unberücksichtigten Transfektionsparametern möglich ist.

#### 4.3.5.1 Effizienzsteigerung durch Transfektion zusätzlicher Komponenten

Die Rolle der frühen Gene HPV16 E1 und E2 bei der Replikation des Virusgenoms sowie bei der Steuerung des Verpackungsprozesses wird kontrovers diskutiert (DiMaio and Settleman 1988; Ustav 1991; Unckell, Streeck et al. 1997; Stauffer, Raj et al. 1998; Angeletti, Kim et al. 2002; Hartley and Alexander 2002; Hubert and Laimins 2002; Kim and Lambert 2002). Es wurde nachgewiesen, dass E2 bei BPV1 zu einer verstärkten Verpackung von etwa 8kb großen DNA-Plasmiden sowie einer darauf folgenden Erhöhung der Pseudovirionen-Ausbeute führt (Zhao, Hengst et al. 2000). Day et al. gehen ferner davon aus, dass E2 durch die Interaktion mit den Kapsidproteinen L1 und L2 in nukleären Domänen zu einer effizienteren Assemblierung und Verpackung beiträgt (Day, Roden et al. 1998). Eine verbesserte Pseudovirionen-Ausbeute bei zusätzlichem Einsatz von E2 ist also denkbar.

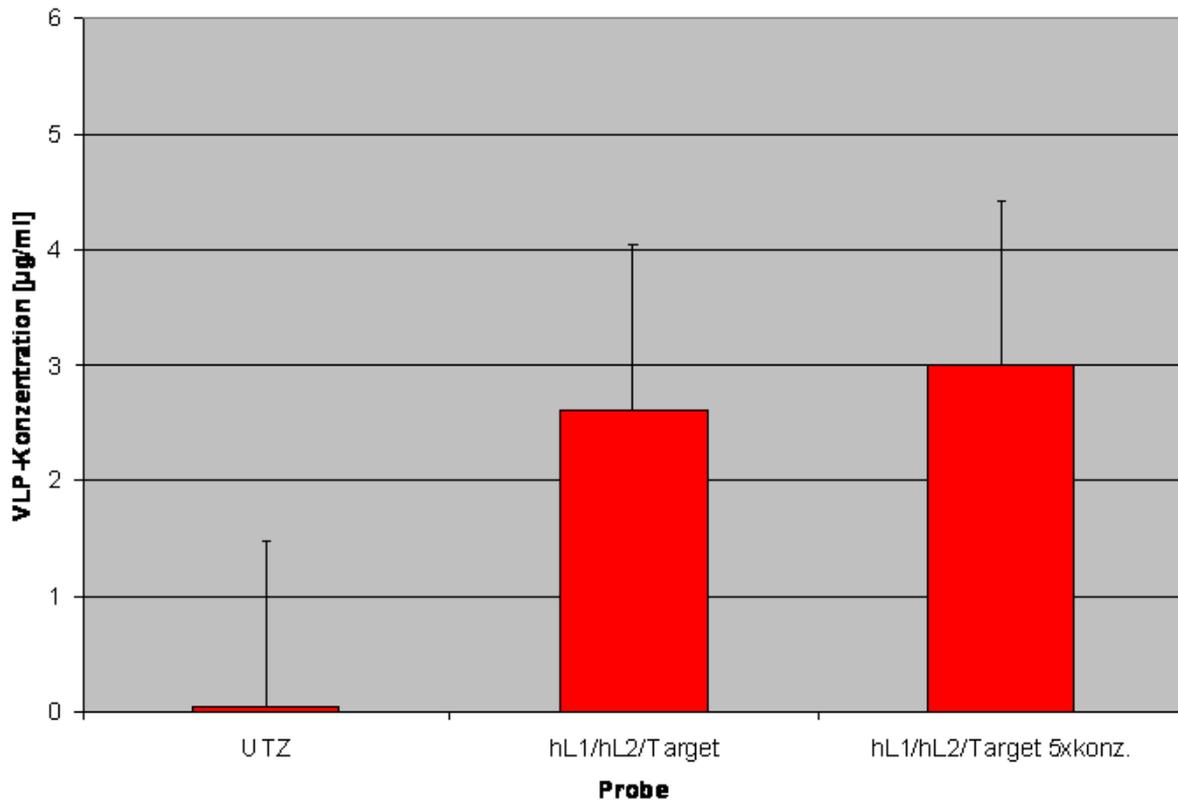
Um mögliche Effekte von E1 und E2 auf die Pseudovirionen-Ausbeute zu messen, wurden in diesem Versuchsansatz zusätzlich zu den Basiskomponenten hL1, hL2 und Target entweder nur E1 alleine oder die Kombination aus E1 und E2 kotransfiziert. Dabei wurden nicht humanisierte E1- und E2-Gene verwendet, die in getrennt voneinander vorliegenden Expressionsplasmiden enthalten waren (#933, #935; siehe Kapitel 9). Mit Hilfe des durchgeführten ELISA konnte jedoch nur eine Aussage darüber getroffen werden, ob die zusätzlichen Plasmide eine Zunahme an L1 konformationsspezifischen Bestandteilen bewirken oder nicht. Eine Differenzierung zwischen leeren VLPs und verpackten Pseudovirionen war nicht möglich. Aus Abb. 4-10 ist zu erkennen, dass der alleinige Zusatz von E1 gegenüber der Kombination von E1 und E2 einen geringen Vorteil hinsichtlich der zu messenden VLP-Ausbeute zu verschaffen scheint. Betrachtet man jedoch diese Ausbeuten im Vergleich zu den VLP-Ausbeuten, die durch Transfektion von hL1 und Target bzw. hL1, hL2 und Target generiert wurden, so ist eine sehr große Reduktion der VLP-Ausbeute festzustellen. Diese Beobachtung ließ es am wahrscheinlichsten erscheinen, dass die VLP-Ausbeute bei zusätzlicher Verwendung von E1 und E2 auf die hohe Zahl der kotransfizierten Plasmide und der damit verbundenen Effizienzsenkung zurückzuführen war. Ein Rückschluss auf eine spezifische Wirkungsweise von E1 gegenüber der Kombination E1/E2 wurde deshalb ausgeschlossen. In den weiteren Experimenten wurde auf die zusätzliche Verwendung von E1 bzw. E2 verzichtet.



**Abb. 4-10: Vergleich von VLP-Ausbeuten nach zusätzlicher Transfektion von HPV16 E1 bzw. E2. Im ELISA wurden VLP-Ausbeuten in Abhängigkeit unterschiedlich kotransfizierter Plasmide (hL1/Target; hL1/hL2/Target; hL1/hL2/Target/E1; hL1/hL2/Target/E1/E2) verglichen. UTZ: untransfizierte Zellen.**

Des Weiteren wurde versucht, hoch konzentrierte VLP-Lösungen durch die Zusammenführung von Zellen mehrerer Transfektionsansätze herzustellen. Das Gesamtvolumen blieb in diesen Untersuchungen unverändert gegenüber den vorigen Ansätzen, in denen die Zellen in insgesamt 600µl VLP-Extraktionspuffer pro Zellkulturschale aufgenommen wurden (3.1.20).

Hierbei musste allerdings festgestellt werden, dass bei der Verwendung einer 5-fachen Zellmenge eine lediglich um 10-20% erhöhte VLP-Ausbeute zu erzielen war (Abb. 4-11).

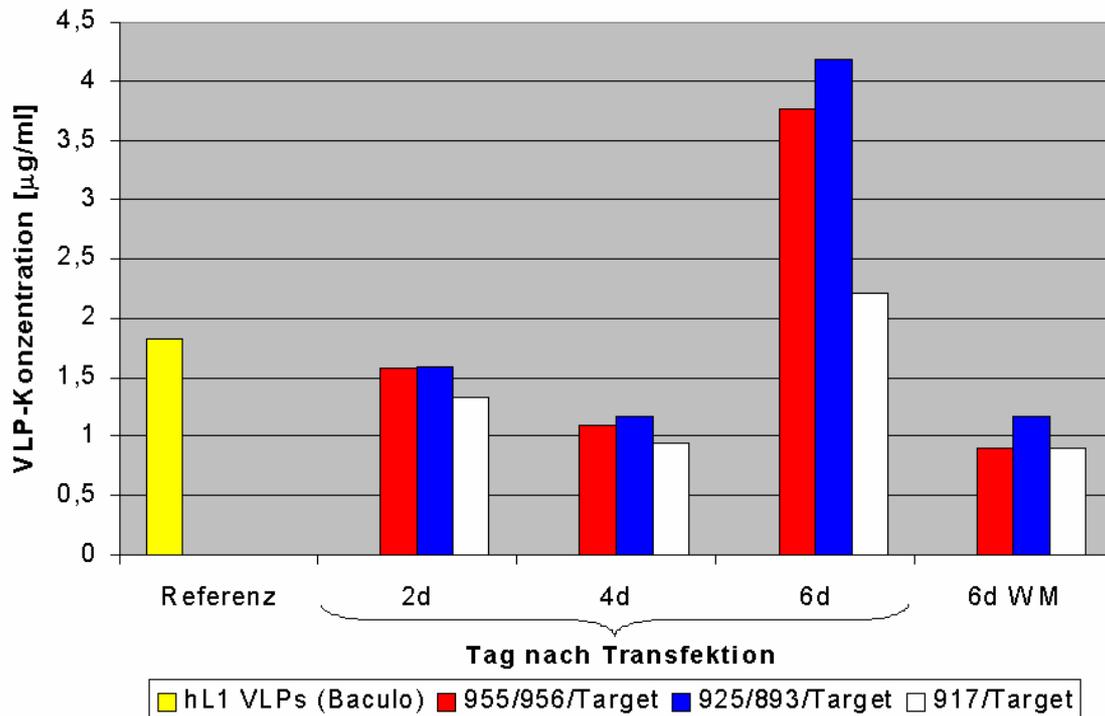


**Abb. 4-11: Vergleich von VLP-Ausbeuten in Abhängigkeit unterschiedlich konzentrierter Präparationsansätze mittels ELISA.** 293T Zellen wurden mit hL1, hL2 und dem Targetplasmid kotransfiziert. Die Präparation von Zellen erfolgte sowohl aus einer Zellkulturschale in 600µl VLP-Extraktionspuffer („hL1/hL2/Target“) als auch aus fünf Zellkulturschalen in 600µl VLP-Extraktionspuffer („hL1/hL2/Target 5xkonz.“).

#### 4.3.5.2 Änderung von Parametern des Transfektionsprotokolls

In den bisherigen Experimenten erfolgte die Beendigung der Transfektion innerhalb von 48h. Da aber nicht klar war, ob dies tatsächlich die optimale Zeitspanne zur Herstellung möglichst vieler VLPs ist, wurde in den folgenden Experimenten die VLP-Ausbeute in Abhängigkeit unterschiedlich langer Zeitspannen nach Transfektion untersucht. Wie bereits geschildert (4.3.2) konnte mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden, dass eine kurzweilige Transfektionsinkubation möglicherweise nur zu geringen intranukleär lokalisierten VLP-Mengen führt, währenddessen eine Inkubation im Zeitrahmen von mehreren Tagen zu verbesserten Konzentrationen an intranukleären VLPs führen könnte (Abb. 4-6).

Daher wurden im folgenden Experimente durchgeführt, durch die Aussagen über die VLP-Ausbeuten nach 2, 4 sowie 6 Tagen nach Transfektion im ELISA getroffen werden sollten (Abb. 4-12). Außerdem wurde bei diesen Experimenten untersucht, ob sich hinsichtlich der VLP-Ausbeuten die Verwendung bestimmter Expressionsvarianten für HPV16 hL1 bzw. hL2 anbieten würde (4.3.1; Kapitel 9).



**Abb. 4-12: Bestimmung des optimalen Präparationszeitpunktes für VLPs nach Transfektion. Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte in Bezug auf die Ausbeute der Referenz sowie in Bezug auf die verschiedenen Expressionsvarianten. In der Legende sind jeweils die verwendeten Expressionsplasmide aufgeführt (Kapitel 9). WM: Wachstumsmedium.**

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, erfolgte an Tag 6 nach Transfektion, unabhängig von der verwendeten Expressionsvariante, ein Ausbeutenmaximum. Außerdem konnte interessanter Weise beobachtet werden, dass VLPs nicht nur in den Zellpräparaten enthalten waren, sondern dass sie ebenfalls im Wachstumsmedium (hier beispielhaft an der „6d-WM“-Probe gezeigt) nachweisbar sind. Während der Vergleich der Expressionsvarianten hinsichtlich ihrer VLP-Ausbeuten an den Tagen 2 und 4 nicht signifikant unterschiedlich war, konnten an Tag 6 deutlich erhöhte Mengen an VLPs bei den Expressionsvarianten #955/#956/Target sowie #925/#893/Target gegenüber der Expressionsvariante #917/Target beobachtet werden. Da der Expressionsvariante #925/#893/Target die größte VLP-Ausbeute zuzuschreiben war, wurde sie in den Folgeexperimenten als Standardvariante eingesetzt.

#### 4.3.6 VLP Präparationsanalytik

Nachdem die Transfektionsbedingungen – wie zuvor beschrieben – festgelegt waren, musste nachfolgend geklärt werden, welche Zellaufschlussmethoden sich als geeignet erweisen, VLPs auf möglichst schonende wie effiziente Weise zu präparieren. Die Erhaltung der Funktionalität der assemblierten Strukturen durch eine schonende Präparation stand dabei im Vordergrund. Folgende Aufschlussmethoden wurden untersucht:

1. Apoptoseinduktion
2. Ultraschall-gestützte Zell-Lyse
3. Frier/Tau-Lyse

#### 4.3.6.1 Induktion von Apoptose in 293T Zellen

Die Apoptose ist ein aktiver Prozess, bei dem die Zelle nach Durchlauf eines „programmierten“ Schemas stirbt. Die Apoptose kann zum Einen durch verschiedene Weise ausgelöst werden und zum Anderen bei den betroffenen Zellen anhand morphologischer Veränderungen identifiziert werden (Lewin 1998). Die Induktion von Apoptose wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Staurosporin durchgeführt, bei dem es sich um ein mikrobielles Alkaloid (Indolcarbazol aus *Streptomyces* spp.) handelt. Es induziert Apoptose, in dem es Proteinkinasen sehr stark inhibiert (Andersson, Sjostrand et al. 2000; Yamasaki, Hama et al. 2003).

Zunächst musste bestimmt werden, ob und wie schnell Staurosporin in den verwendeten Mengen zum Absterben der 293T Zellen führen würde. Dazu wurde Apoptose durch Inkubation von Staurosporin mit 293T Zellen gleicher Anzahl bzw. Wachstumseigenschaften induziert (3.2.6). Daraufhin wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe im Durchlichtmikroskop analysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen bereits nach 4h begannen sich abzurunden, was ein Zeichen für beginnenden Zelltod darstellt (Mehmet 2003). Nach 6h waren bereits zwischen 60 und 70% der Zellen abgerundet und ein geringer Teil (10-20%) vom Boden der Gewebekulturschale abgelöst. Nach Apoptoseinduktion über Nacht befanden sich alle Zellen in einem verkleinerten, abgerundeten Zustand und ein Anteil von über 60% hatte sich vom Boden der Gewebekulturschale gelöst. Die Kontrollgruppe (ohne Staurosporinbehandlung) zeigte selbst nach über Nacht-Inkubation keine nennenswerten morphologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Die Zellpräparate der jeweiligen Zeitintervalle wurden nach Transfektion mit den Strukturgenen L1 und L2 sowie dem Targetplasmid mittels Sedimentationsanalyse im Saccharosegradienten näher charakterisiert (4.5.2.2.3).

#### 4.3.6.2 Ausbeutenvergleich von Kapsidproteinen nach unterschiedlichen Zellaufschlussverfahren

Wie aus Abb. 4-13 zu entnehmen ist, wurde der Anteil der freigesetzten hL1- und hL2-Proteine in Abhängigkeit von der verwendeten Aufschlussmethode bestimmt, in dem der Präparationsüberstand vorgeklärter Zellextrakte sowie die zurückbleibende zelluläre Fraktion im Western Blot-Verfahren untersucht wurden.

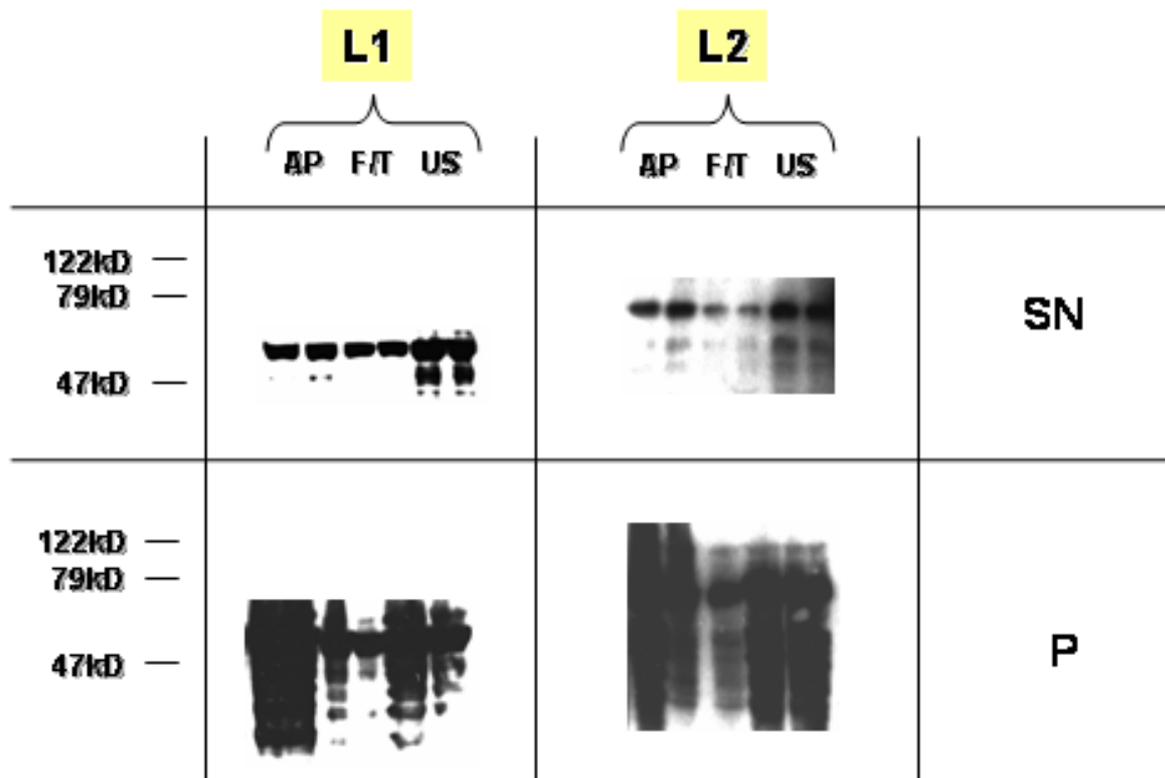


Abb. 4-13: Nachweis von hL1 und hL2 in Überständen und Zellsedimenten nach Durchführung unterschiedlicher Aufschlussmethoden. Verglichen werden die Aufschlussmethoden Apoptose (AP), Frieren/Tauen (F/T) und Ultraschall (US). Die Proteine hL1 und hL2 wurden in Präparationsüberständen (SN) sowie zurückbleibenden Zellsedimenten (P) durch Western Blot nachgewiesen.

Dabei konnte beobachtet werden, dass durch Induktion von Apoptose bzw. des Einsatzes von Frier/Tau-Zyklen und Ultraschall mindestens 50% der Gesamtmenge an Zielproteinen in Lösung gebracht werden können. Die klare Differenzierung zwischen den im Zellsediment und im Präparationsüberstand zurückgebliebenen Proteinen fiel dabei durch sehr starke Signale der zellulären Probe schwer. Es scheint, dass die Verwendung von Frier/Tau-Zyklen die Proteine am effektivsten aus dem Gesamtpräparat in Lösung bringt, wenngleich ein bei der Präparation entstehender viskoser Anteil zu hohen Proteinverlusten des Gesamtextraktes führt. Der Einsatz der Apoptoseinduktion sowie des Ultraschallaufschlusses ist hinsichtlich seiner Effektivität, Proteine in Lösung zu bringen, als nahezu gleichwertig einzustufen.

#### 4.4 Infektionsexperimente mit vorgeklärten Zellextrakten

293T Zellen wurden mit hL1, hL2 und dem Targetplasmid kotransfiziert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die daraus gewonnenen, vorgeklärten Zellextrakte wurden im Anschluss in Infektionsexperimenten bei verschiedenen Zell-Linien eingesetzt (293, 293T, Cos, 911, HeLa, CV-1, BHK-21). Dabei stellte sich durch den positiven Nachweis des im Targetplasmid enthaltenen Lac-Z-Gens heraus, dass es scheinbar zu einer Transduktion des Targetplasmids durch VLPs gekommen ist. Selbst nachdem die Zellextrakte mit unterschiedlich hohen Nukleasekonzentrationen präinkubiert worden waren, konnten blaue, Lac-Z positive Zellen nach Infektion beobachtet werden (Abb. 4-14 A).

Danach wurden Spezifitätskontrollen durchgeführt, bei denen einerseits nur das Targetplasmid und andererseits eine Kombination aus hL2 und Targetplasmid transfiziert wurde. Beide dieser Kombinationen sind nicht in der Lage, spezifische Infektionen zu vermitteln. Da es aber, wie aus Abb. 4-14 B/C zu erkennen ist, trotzdem zu einer Blaufärbung der Zellen kam, wurde geschlossen, dass es sich bei der Übertragung des Targetplasmids nur um einen unspezifisch ablaufenden Prozess handelte.

Da die Funktionstüchtigkeit der DNase sichergestellt werden konnte, musste zur Erklärung dieser Beobachtung davon ausgegangen werden, dass freie Targetplasmid-DNA entweder durch partikuläre Aggregatbildung oder durch Einschluss in Zelldebrisreste dem Zugriff der Nukleasen entzogen wurde und später aber in die zu infizierenden Zellen aufgenommen und exprimiert werden konnte.

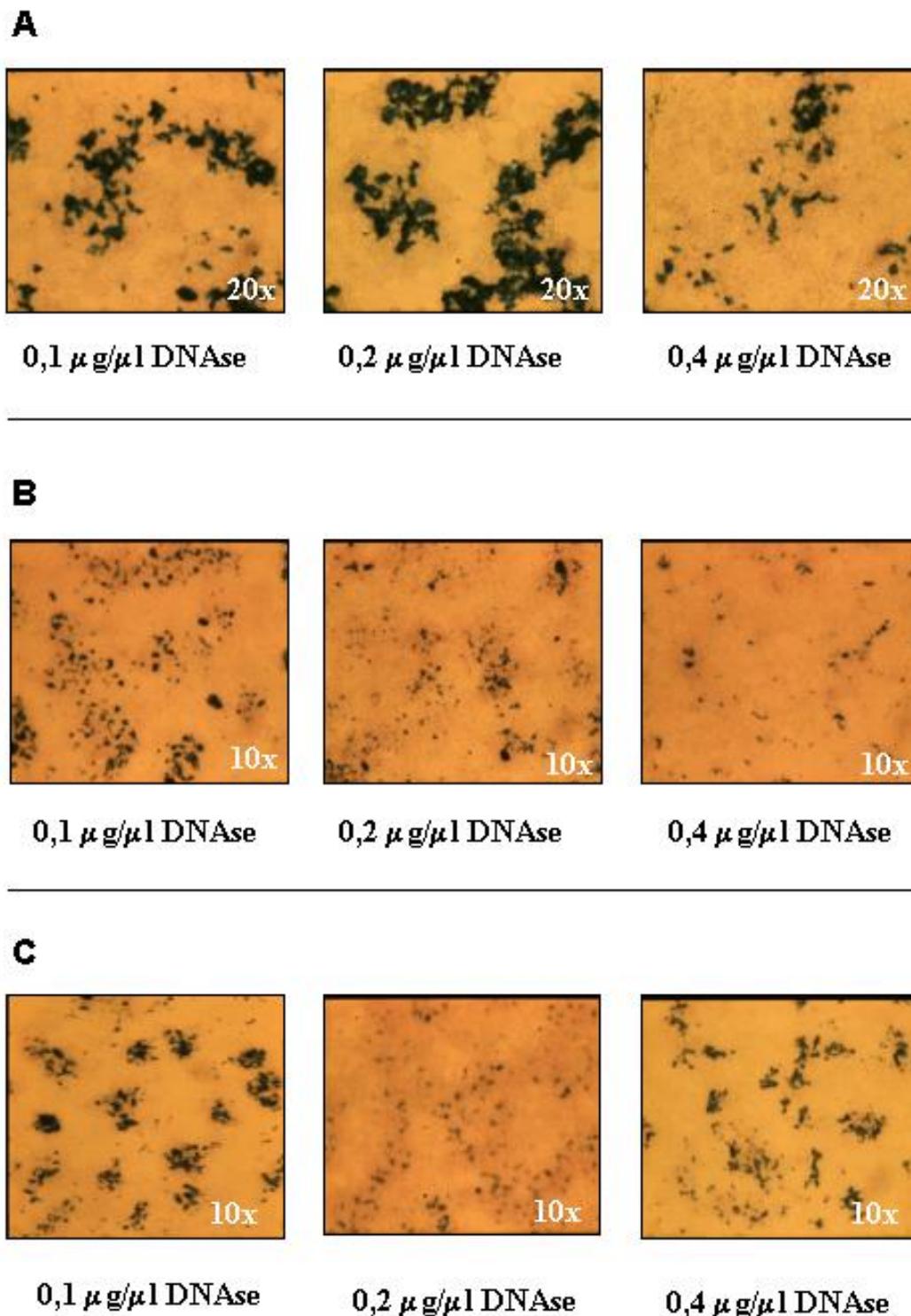


Abb. 4-14: Infektion von 293T Zellen mit vorgeklärten Zellextrakten. Nach transienter Transfektion von 293T Zellen mit hL1, hL2 und Target (A), nur Target (B) oder hL2 und Target (C) wurden Rohextrakte hergestellt, die durch Zentrifugation geklärt wurden. Nach erfolgter Nukleasenbehandlung unterschiedlicher Konzentration wurden die zu infizierenden Zellen mit den vorgeklärten Zellextrakten inkubiert. Der Nachweis des (durch Infektion übertragenen) Reportergens erfolgte mittels  $\beta$ -Gal Nachweistest. 10x: 10fache Vergrößerung; 20x: 20fache Vergrößerung.

#### 4.4.1 Blockierung unspezifischer Infektionen durch Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern.

Die unter 4.3.6.2 geäußerte Spekulation über die mögliche Beteiligung von VLPs, die Verpackungs-DNA an der Außenhülle gebunden haben könnten und diese durch Zusammenlagerung mehrerer VLPs für die Nukleasen unzugänglich machen, warf die Idee auf, die Nukleasen behandelten VLPs vor der Zugabe zu den Zellen mit neutralisierenden Antikörpern vorzuinkubieren. Für den Fall, dass die unspezifisch übertragene DNA tatsächlich durch diesen Mechanismus in die Zellen gelangt, würden die Infektionen durch diese Behandlungsweise keine unspezifischen Transduktionen mehr erzielen können (Neutralisation durch Antikörper).

Die Blockierungsexperimente wurden wie beschrieben (3.1.28) erledigt, führten allerdings zu keiner Beeinflussung der Targetplasmidtransduktion.

### 4.5 VLP Sedimentationsanalyse mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Beobachtungen vorangegangener Infektionsexperimente zeigten, dass die vorliegenden VLP-Präparate noch zu viele Kontaminanten enthielten, die nur unspezifische Transduktionen des Verpackungsplasmids hervorriefen. Dabei konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der unspezifisch transduzierten DNA um freie, evtl. in Zelldebris eingeschlossene, DNA handelte oder ob es sich um an Partikel gebundene DNA handelte, die etwa durch Aggregation der Partikel für die Nukleasen unzugänglich war, und somit dennoch von der Zelle aufgenommen und exprimiert werden konnte.

Um diese unspezifischen Übertragungsvorgänge zu eliminieren, wurde daher eine weitere Aufreinigung der geklärten Rohextrakte angestrebt. In früheren Arbeiten konnte bereits anhand der Sedimentationsanalyse im Saccharosegradienten eine erfolgreiche Aufreinigung von VLPs gezeigt werden (Biemelt, Sonnewald et al. 2003). Andere Experimente, in denen assemblierte HPV16 hL1/E7-Fusionsproteine aufgereinigt wurden, zeigten, dass mit dieser Methode zudem eine Unterscheidung verschiedener Assemblierungsstufen der Strukturproteine möglich ist (Leder 2003).

Die Auftrennung der Proteine in der Sedimentationsanalyse (3.1.27) hängt von deren Größe, Masse und Form ab. Sie ergeben einen bestimmten Sedimentationskoeffizienten, der die Lokalisation der jeweiligen Proteine nach einer bestimmten Zeit im linearen Saccharosegradienten festlegt. Nach Durchführung der Sedimentationsana-

lyse wird der Gradient in mehreren Fraktionen gesammelt, die dann verschiedenen Analysen unterzogen werden können (iIF 3.1.21, ELISA 3.1.22, WB 3.1.25, RI 4.5.2.2, EM 3.3.2 ).

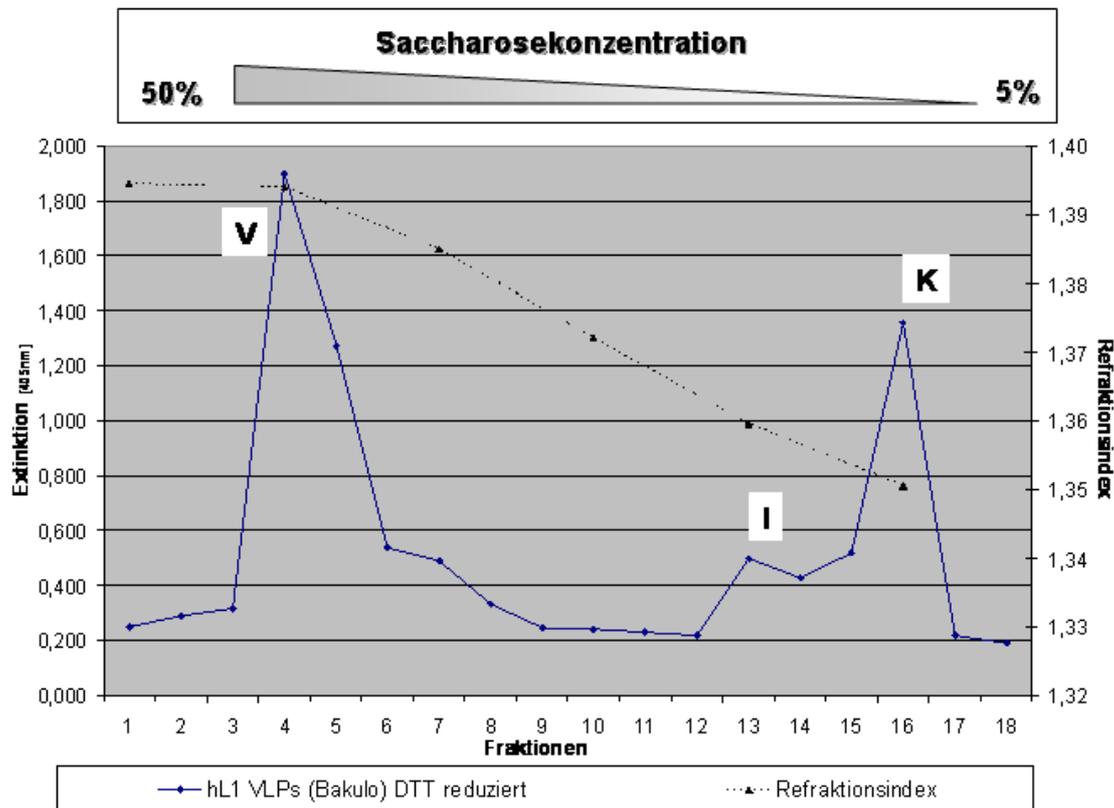
### 4.5.1 Vorversuche zur Analyse von VLPs mittels Dichtegradientenzentrifugation

#### 4.5.1.1 Sedimentationsanalyse von VLPs aus Bakulovirus-infizierten Insektenzellen

Um eine Vorstellung über die Verteilung L1-konformationsspezifischer Strukturen im Saccharose-Dichtegradienten zu bekommen, wurden VLP-Präparationen aus Bakulovirus-infizierten Insektenzellen auf Saccharosegradienten aufgetragen, einem Schwerefeld unterzogen und alle Fraktionen im ELISA auf deren L1-Gehalt hin untersucht.

Zu Beginn dieser Experimente wurden zwischen 30 und 40 $\mu$ g der VLPs für 2h bei 4°C gegen PBS-Puffer dialysiert und darauf mit 10mM DTT sowie 1mM EDTA über Nacht bei 4°C inkubiert. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich DTT reduzierend auf interkapsomere Disulfidbrücken auswirkt (Sapp, Volpers et al. 1995; Paintsil, Muller et al. 1998) und somit einen Zerfall der partikulären Strukturen in einzelne Kapsomere bewirkt. Die Konzentration des DTT wurde in diesen Experimenten so gewählt, dass die Reduktion der Partikel nicht vollständig erfolgte und somit neben intakten Partikeln auch Kapsomere nachgewiesen werden konnten.

Abb. 4-15 kann entnommen werden, dass sich das Sedimentationsprofil in 3 Gruppen einteilen ließ. Sie waren in den Bereichen zwischen Fraktion 4 und 5, 13 sowie 16 mit einer Maximalverschiebung von einer Fraktion reproduzierbar und wurden im Elektronenmikroskop hinsichtlich der Existenz von partikulären Strukturen analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte, dass den Fraktionen 4 und 5 VLP-Strukturen, der Fraktion 16 Kapsomere und der Fraktion 13 eine zwischenstufenartige Gruppe, so genannte Intermediate, zuzuordnen waren.



**Abb. 4-15: Sedimentationsprofil von L1 in der Dichtezentrifugationsanalyse im Saccharosegradienten. Die Bestimmung des Sedimentationsprofils erfolgte mittels ELISA. V: VLP-haltige Fraktionen; I: Intermediate; K: Kapsomer-haltige Fraktionen.**

#### 4.5.1.2 Analyse von Sedimentationsmarkern

Damit eine Einschätzung über den für HPV16 VLPs geltenden Sedimentationskoeffizienten getroffen werden konnte, wurden entsprechende Sedimentationsanalysen mit Proteinen durchgeführt, bei denen der Koeffizient schon bekannt war. Als Sedimentationsmarker wurden Katalase (11S), Thyroglobulin (20S) sowie leere Kapside des AAV Typ 2 (60S) verwendet. Die Lage der Katalase sowie des Thyroglobulins im Gradienten konnte bestimmt werden, indem die einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten auf einem SDS-Polyacrylamid Gel (3.1.24) elektrophoretisch getrennt und nach Coomassie Färbung analysiert wurden. Die diesbezügliche Einordnung der leeren AAV-Kapside erfolgte mittels Western Blot (beispielhaft in Abb. 4-16 gezeigt). In diesen Experimenten, bei denen Gradienten mit 5-50% Saccharose zum Einsatz kamen, wurde festgestellt, dass die Katalase im Bereich der Fraktionen 15-17, das Thyroglobulin zwischen den Fraktionen 13-14 und die leeren AAV-Kapside in den Fraktionen 7-9 sedimentieren. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich der Kapsomerpeak einem Sedimentationskoeffizienten zwischen 10 und 20S und der

Intermediatenpeak zwischen 20 und 30S zuordnen ließ. Der Sedimentationskoeffizient für den VLP-Peak kann schätzungsweise bei 120-140S eingeordnet werden. Die Literaturrecherche vergleichbarer Experimente ergab Sedimentationskoeffizienten von 150S für HPV11 VLPs (McCarthy, White et al. 1998), 140S für COPV (Yuan, Estes et al. 2001), 120-140S für aus hL1/E7 bestehende HPV16 VLPs (Leder, Kleinschmidt et al. 2001) sowie 11-14S für COPV-Kapsomere (Yuan, Estes et al. 2001), die diese Interpretation untermauerten.

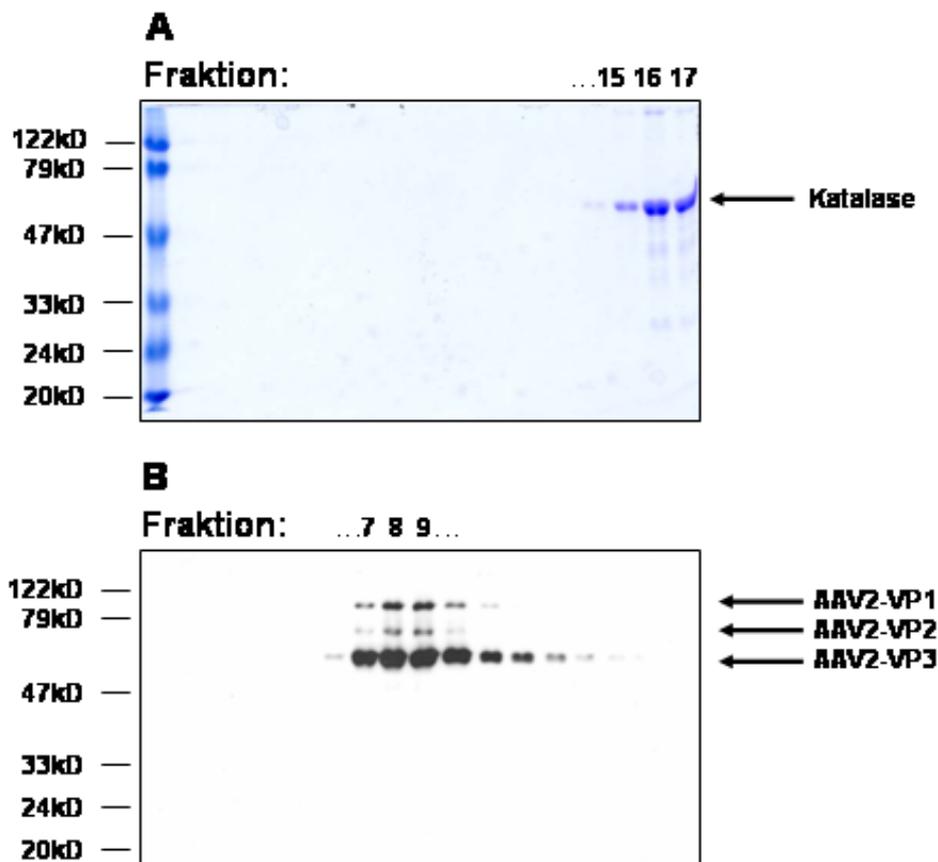


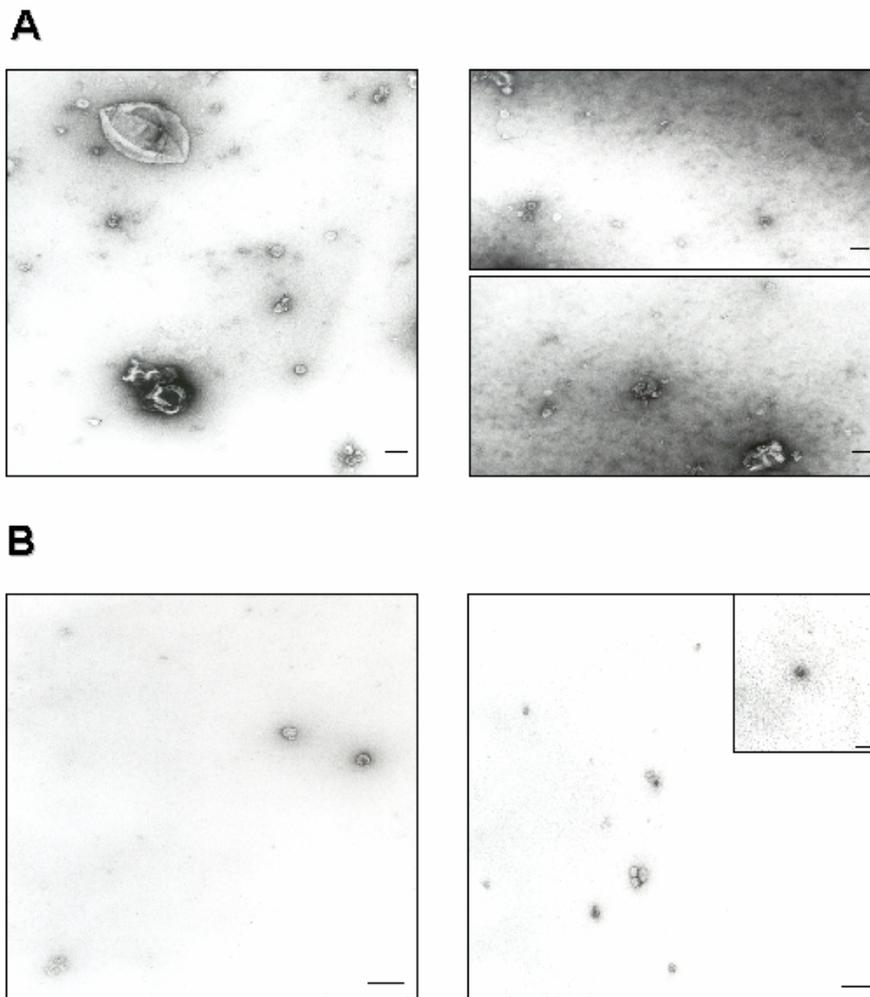
Abb. 4-16: SDS-PAGE zur Analyse von Sedimentationsmarkern. Katalase sedimentiert in den Fraktionen 15-17 (A) und leere Kapside des AAV Typ 2 in den Fraktionen 7-9 (B). Die Detektion der AAV Hüllproteine erfolgte durch einen für die Hüllproteine (VP1, VP2 und VP3) spezifischen Antikörper B1 (2.1.2).

#### 4.5.1.3 Analyse von Fraktionen aus Saccharosegradienten im Elektronenmikroskop

Zu Beginn der Sedimentationsanalyse war nicht klar, in wie fern sie zur Reinigung des eingesetzten Zellextraktes beitragen und somit vorhandenes (zelluläres) Material, das möglicherweise unspezifische Transduktionen des Targetplasmids hervorruft, eliminieren würde.

Deshalb wurden die Überstände der Zellpräparationen vor und nach den Saccharosegradienten mittels EM charakterisiert (Abb. 4-17). Dabei konnte beobachtet wer-

den, dass in den vorgeklärten Zellextrakten neben erwartungsgemäß großen VLPs (ca. 55nm) kleinere und größere, VLP-ähnliche Aggregate vorhanden waren (Abb. 4-17 A). Außerdem ließen sich trotz Vorklärung immer noch Reste von Zelldebris beobachten. Nach erfolgter Saccharoseaufreinigung konnten die aggregierten Zustände kaum noch und die Zelldebrisreste gar nicht mehr in den VLP-Fractionen nachgewiesen werden (Abb. 4-17 B).



**Abb. 4-17: Nachweis von VLPs in vorgeklärten und saccharosegereinigten Zellextrakten.** 293T Zellen wurden transient mit hL1, hL2 und Target transfiziert, darauf präpariert und das Zellextrakt vorgeklärt. Der daraus resultierende Überstand wurde nach Negativfärbung mittels EM untersucht (A) oder auf einen Saccharosegradienten verbracht. Aus den VLP-Fractionen nach Sedimentation wurden Aliquots entnommen, dialysiert und im EM mittels Negativfärbung analysiert (B). Größenmarker = 100nm.

Dass in den vorgeklärten Zellextrakten immer noch Zelldebris nachweisbar war, bekräftigte die zuvor getroffene Annahme über möglicherweise existentes, nicht-partikuläres oder partikel-assoziiertes Material, das eine Rolle bei unspezifischen Transduktionen spielen könnte. Die Untersuchung der VLP-haltigen Fraktionen zeigt

te, dass Zelldebris nach erfolgter Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten von den VLP-Sedimentationsbereichen getrennt werden kann.

### 4.5.2 Hauptversuche zur Analyse von VLPs mittels Dichtegradientenzentrifugation

#### 4.5.2.1 Sedimentationsanalyse von VLPs aus 293T Zellen

##### 4.5.2.1.1 Produktion von VLPs unter Verwendung von hL1, hL2 und Target

Zu Beginn der folgenden Versuchsreihe wurden VLPs analysiert, die in 293T Zellen generiert und mittels Ultraschall extrahiert wurden. Sie bestanden aus den Basiselementen hL1, hL2 und Target, was durch ELISA, WB und  $\beta$ -Gal-Test bestätigt werden konnte. Es wurde neben den bereits in den Vorversuchen erzielten Zuordnungsgruppen (VLP, Intermediate, Kapsomere) ein zusätzlicher Peak im Bereich der Fraktionen 2-3 beobachtet (Abb. 4-18). Sedimentationsversuche mit VLPs, die in 293T Zellen durch alleinige Transfektion von hL1 und hL2 (ohne Targetplasmid) durchgeführt wurden, zeigten keine derartig dem VLP-Peak vorgelagerte Proteingruppe (persönliche Mitteilung Dr.Leder, DKFZ Heidelberg).

Es wurde vermutet, dass es sich bei diesem Peak, der in seiner Signalstärke stets 10-30% unterhalb des VLP-Peaks lag, um VLPs handelte, die verpackte DNA enthielten. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um den Bereich handeln könnte, in dem Pseudovirionen (PV) im Saccharosegradienten sedimentieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Unterscheidung der ersten beiden Peakgruppen (PV versus VLP) führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen (4.5.1.3). Eine den Peaks überwiegend entsprechende Verteilung von hL1 und hL2 konnte im Western Blot bestätigt werden (Abb. 4-18 B).

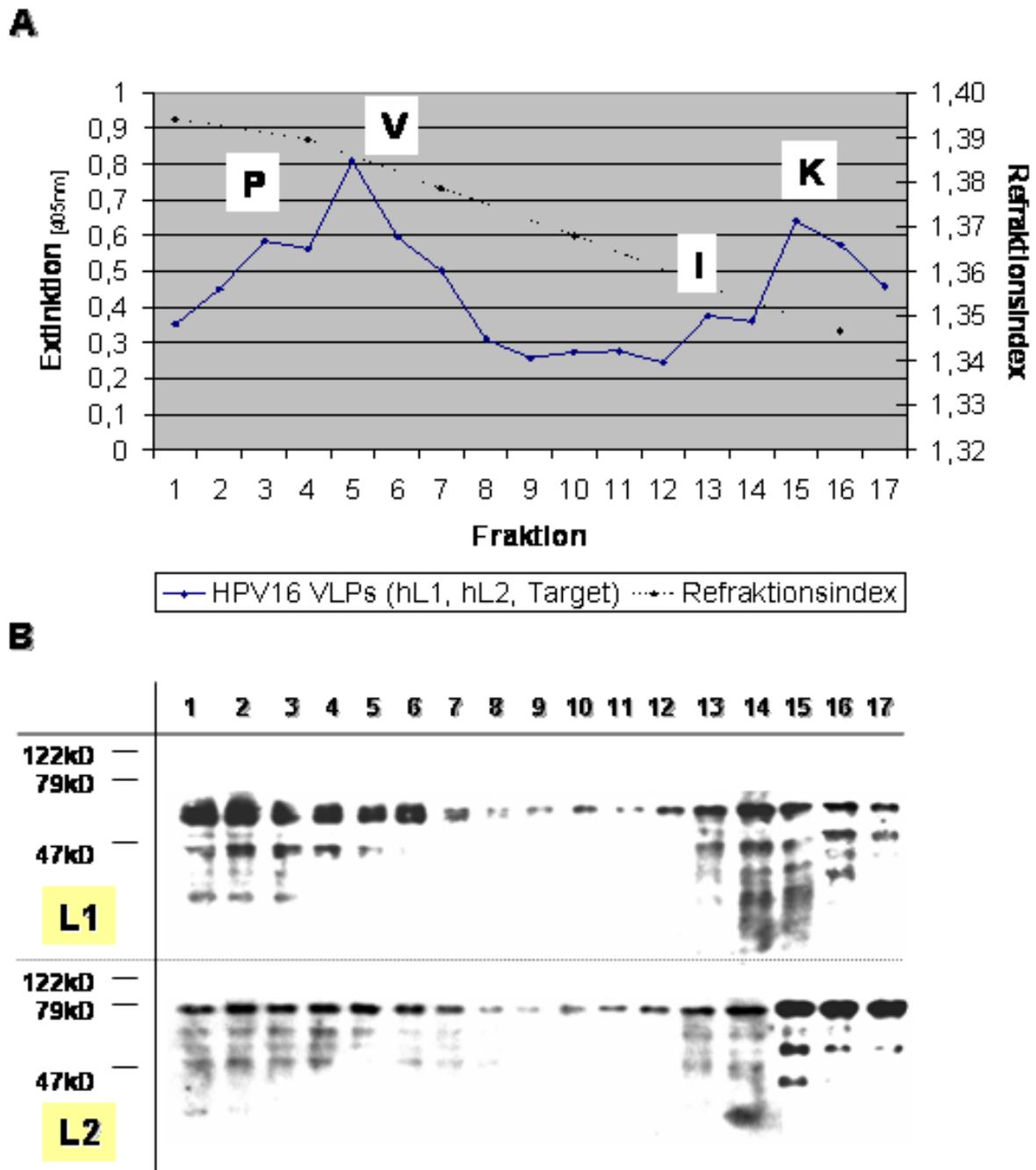
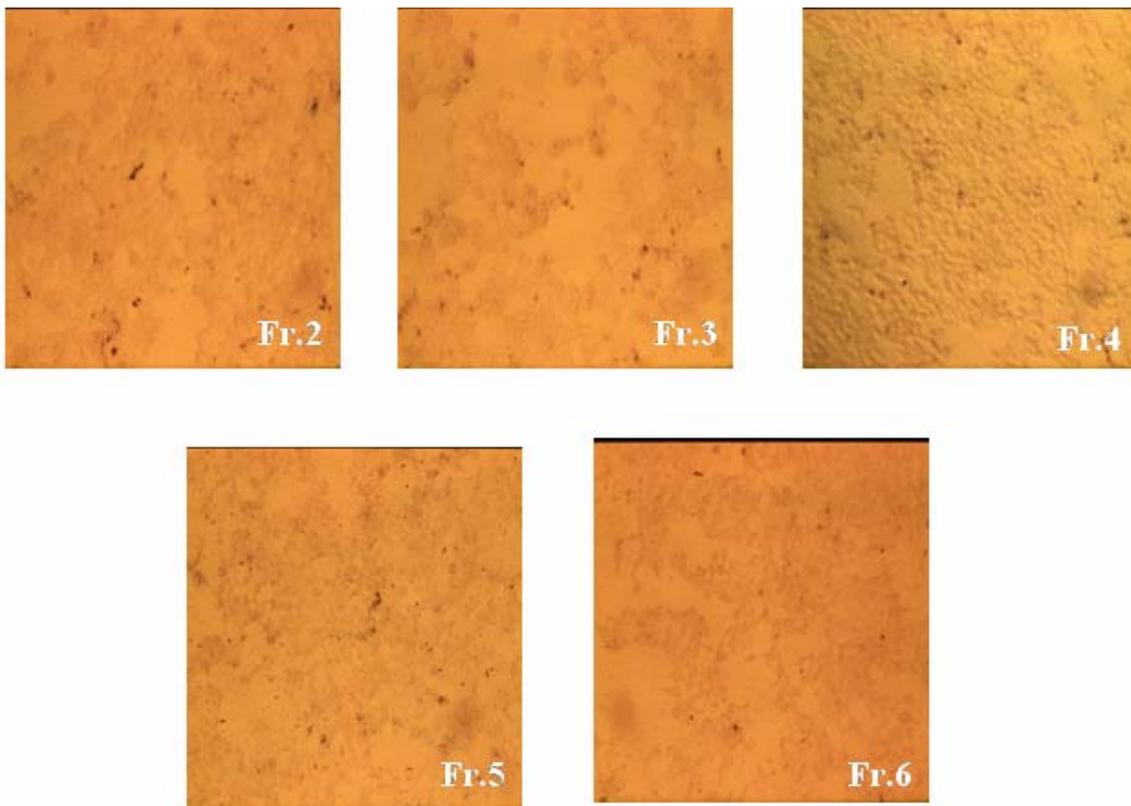


Abb. 4-18: HPV16 Sedimentationsanalyse mit Basiselementen hL1, hL2 und Target. (A) Auftrennung in Fraktionsgruppen 2-3 (PV), 4-6 (VLP), 13-14 (Intermediate) und 15-16 (Kapsomere). Analyse erfolgte mittels ELISA. P: PV, V: VLP, I: Intermediate, K: Kapsomere. (B) Nachweis der Strukturproteine L1 und L2 durch Western Blot Analyse.

#### 4.5.2.1.2 Infektionsexperimente mit Saccharosegradienten-Fractionen

Fractionen von Saccharosegradienten wurden wie beschrieben (3.2.11) dialysiert und nach Nukleasenbehandlung mit eukaryotischen Zellen zur Infektion inkubiert. Wie beispielhaft aus Abb. 4-19 zu ersehen ist, konnte mit den bisher generierten Saccharosegradienten-Fractionen keine erfolgreiche Übertragung und messbare Expression des Verpackungsplasmids erzielt werden.



**Abb. 4-19:** Infektion von 293T Zellen mit Fraktionen von Saccharosegradienten. Dem Infektionsprotokoll entsprechend (3.2.11) wurden die Fraktionen 2-6 aus Abb. 4-18 hinsichtlich Ihrer Infektionseigenschaft analysiert. Der Nachweis des Verpackungsplasmides erfolgte über einen  $\beta$ -Gal Nachweistest, der jedoch negativ ausfiel.

#### 4.5.2.2 Optimierung von Sedimentationsprofilen (Veränderung von Versuchsparametern)

##### 4.5.2.2.1 Sedimentationsparameter

Wie bereits gezeigt, war in den ersten Experimenten der VLP-Sedimentationsanalyse im Saccharosegradienten zu beobachten, dass die VLP- bzw. PV-Fraktionen direkt hintereinander sowie gleich zu Beginn des Gradienten eluierten. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Peaks vor diesen beiden Fraktionsgruppen eluieren könnten. Diese, theoretisch noch schwereren Partikel, hätten aber aufgrund der bisher verwendeten Prozentigkeitsspanne bzw. der Zentrifugationsdauer von 3h nicht nachgewiesen werden können. So hätten die tatsächlich infektiösen Partikel in dem bisher verwendeten Zeitfenster bereits bis auf den Boden des Gradienten sedimentieren können. Daher wurden in Folgeexperimenten sowohl der Prozentigkeitsbereich als auch die Zeitspanne der Zentrifugation der Saccharosegradienten variiert (Abb. 4-20).

Das Ergebnis dieser Experimente war, dass die Gradienten nach 0,5h etwa 40% der Gesamtlaufstrecke zurückgelegt hatten, wobei die entstandenen Peaks im Bereich der Fraktionen 9-14 nur schwach differenzierbar waren. Die Lage der unterschiedlichen Peaks (PV, VLP, I, K) wurde schätzungsweise zugeordnet (Abb. 4-20 A). Die Verlängerung der Zentrifugationsperiode auf 1h führte zu einer um 2 Fraktionen in Richtung Gradientenboden verschobenen Sedimentationskurve, in der sich nun der hypothetische PV- vom angenommenen VLP-Peak zu unterscheiden begann. Ein dem PV-Peak vorgelagerter Peak konnte nicht identifiziert werden (Abb. 4-20 B). Eine Differenzierung der beiden hinteren Peaks war zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Nach 1,5-stündiger Zentrifugation konnten alle 4 Peaks identifiziert werden, wobei jeder Peak für sich in relativ gleichmäßigen Abstand zueinander lag (Abb. 4-20 C). Nach einer Gesamtzentrifugationsperiode von 3h war zu beobachten, dass sich der VLP-Peak dem PV-Peak noch um 2 Fraktionen angenähert hat, währenddessen die Lage der restlichen Proteingruppen überwiegend unverändert blieb (Abb. 4-20 D).

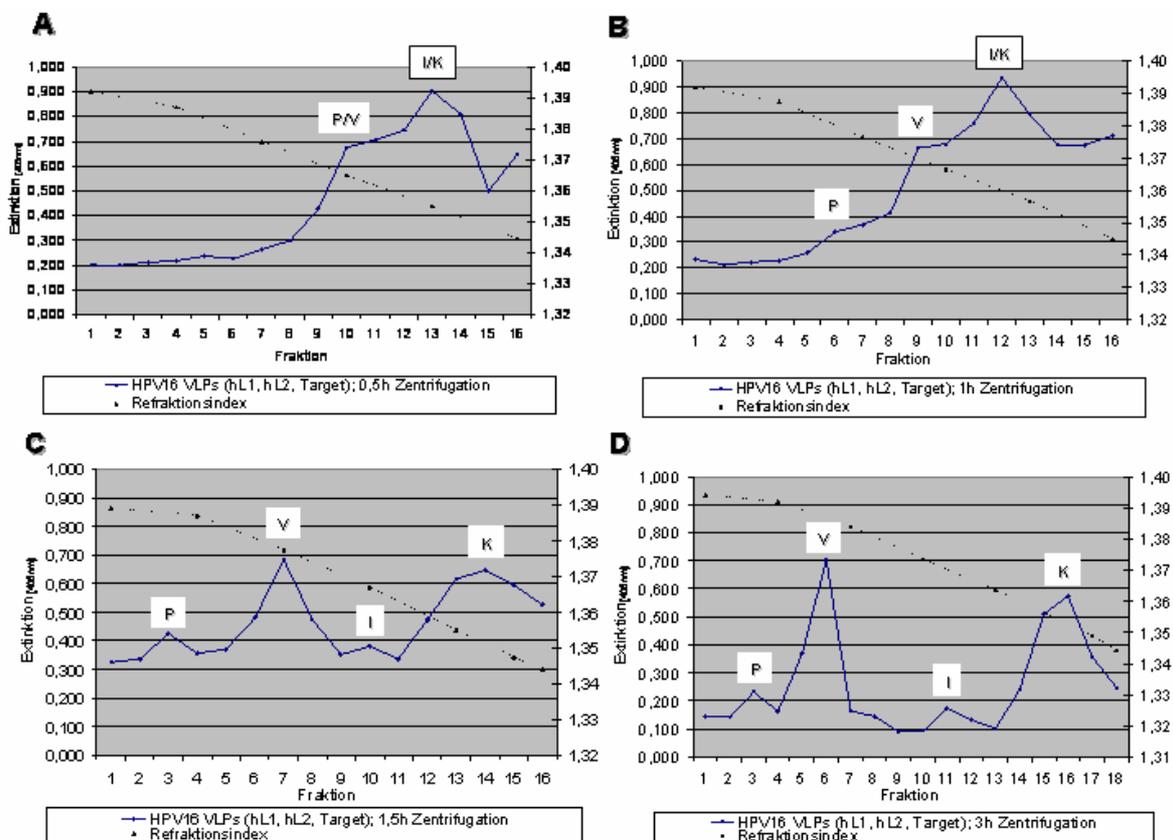


Abb. 4-20: Einfluss der Zentrifugationsdauer und des Prozentigkeitsbereiches auf Sedimentationsprofile von Strukturproteinen im Saccharosegradienten. Die mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellpräparationen wurden auf einen Saccharosegradienten (5-60%) überführt und für 0,5h, 1, 1,5h und 3h bei 230.000g zentrifugiert. Die Bestimmung der Sedimentationsprofile erfolgte mittels ELISA. P: Pseudovirionen, V: Virus-ähnliche Partikel, I: Intermediate, K: Kapsomere.

Insgesamt war bei Verwendung eines um 10% konzentrierteren Saccharosegradienten eine durchschnittliche Stauchung der Proteinpositionen im Gradient von 1-2 Fraktionen zu beobachten.

#### 4.5.2.2.2 Transfektionsparameter

Nachdem die Existenz weiterer Assemblierungs-Gruppen durch die bisherigen Änderungen der Sedimentationsparameter ausgeschlossen werden konnte, wurde versucht, durch weitere Feinabstimmungen der Transfektionsparameter eine Erhöhung der VLP- bzw. hypothetischen PV-Ausbeute herbei zu führen.

##### 4.5.2.2.2.1 Änderung des Transfektionsmengen-Verhältnisses zwischen Targetplasmid und Strukturplasmiden

Grund dieses Änderungsansatzes war die Vermutung, dass ein Überschuss an transfizierten Targetplasmid evtl. die Verpackungs- bzw. Assemblierungseffizienz der humanisierten Strukturproteine negativ beeinflussen könnte. Daher wurden im Folgenden Experimente durchgeführt, in denen verschiedene Verhältnisse transfizierter hL1-, hL2- und Targetplasmidmengen im Hinblick auf messbare Effekte im Sedimentationsprofil nach Saccharosegradientenzentrifugation verglichen wurden. Die verwendeten Verhältnisse können Tabelle 4-3 entnommen werden.

Lfd.-Nr.	Mengen-Verhältnisse (hL1:hL2:Targetplasmid)	Tatsächlich transfizierte Plasmidmengen [µg] (hL1:hL2:Targetplasmid)
1.	1:1:1	6:6:6
2.	1:1:0,5	6:6:3
3.	1:1:0,25	6:6:1,5
4.	1:1:0,13	6:6:0,78
5.	1:1:0,07	6:6:0,42

**Tabelle 4-3: Plasmid-Verhältnisse bei Transfektionen.**

Die neu angefertigten Sedimentationsprofile zeigten, dass die Verwendung des unter Punkt 2 in Tabelle 4-3 genannten Plasmidverhältnisses zu einer verbesserten PV-Ausbeute führten (Daten nicht gezeigt).

##### 4.5.2.2.2.2 Verringerung des Verhältnisses von hL1 zu hL2

Wie in Kapitel 1.2.5 (S.16) bereits beschrieben, führte die Humanisierung zu einer Überwindung der posttranskriptionellen Regulierung. Bei der Expression nicht-optimierter HPV Strukturgene kann aber beobachtet werden, dass L2 im Gegensatz

zu L1 von mehreren posttranskriptionell regulatorischen Bereichen beeinflusst wird (Schwartz 2000). Daraus resultiert eine Minderexpression und somit -produktion von L2, die in Anbetracht der Tatsache, dass L2 in Bezug auf L1 nur zu 1/30 in das Viruskapsid inkorporiert wird, sinnvoll erscheint. Da die transfizierten Plasmide jedoch keiner solchen posttranskriptionellen Kontrolle unterliegen, könnte es zu inhibitorischen Effekten des L2 bei der Kapsidassemblierung bzw. DNA-Verpackung kommen. Die Beobachtung, dass die Gesamtproteinausbeute nach zusätzlicher Transfektion von hL2 stets erheblich sank, verstärkte die Annahme dieser Hypothese. Um dieser Möglichkeit auf den Grund zu gehen, wurden in Folgeexperimenten die transfizierten Plasmidmengenverhältnisse der humanisierten Strukturgene variiert.

Dabei wurden zwischen 25-50% der bisher eingesetzten Plasmidmenge an hL2 verwendet. Die Auswirkungen dieser Veränderungen wurden durch ELISA-Messung der resultierenden Saccharosegradienten-Fractionen bestimmt (Abb. 4-21). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Amplitude des Sedimentationsprofils bei vergleichbarer Inkubationsdauer im ELISA grundsätzlich sehr viel stärker ausfällt als zuvor (vgl. Extinktionswerte der vorherigen Sedimentationsprofile). Während eine deutliche Erhöhung der VLP-Extinktionswerte bei einer 50%-igen Reduktion der transfizierten hL2-Ausgangsmenge messbar ist, kann keine weitere Verbesserung mehr durch eine weitere Reduktion von 25% des hL2 Materials beobachtet werden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass es neben der Ausbildung der bisher beobachteten Proteingruppen (PV-, VLP-, I- und K-Peaks) zu einer nur geringfügig verminderten Signalstärke des hypothetischen PV-Peaks gegenüber dem VLP-Peak kam. Die Western Blot Analyse bestätigte, dass das hL2 zum überwiegenden Teil in den vorderen Fraktionen lokalisiert ist.

Zusammengenommen könnten diese Beobachtungen ein Beleg der Vermutung sein, dass es bei vermindertem Einsatz von hL2, durch den Wegfall inhibitorischen Potentials, zu einer höheren Ausbeute von VLPs kommt. Eine exakte Quantifizierung könnte in der Weiterentwicklung dieser Hypothese näheren Aufschluss bringen.

Die so gewonnen PV- und VLP-Fractionen konnten in den anschließenden Infektionsexperimenten jedoch keine Übertragung des Verpackungsplasmides bewirken.

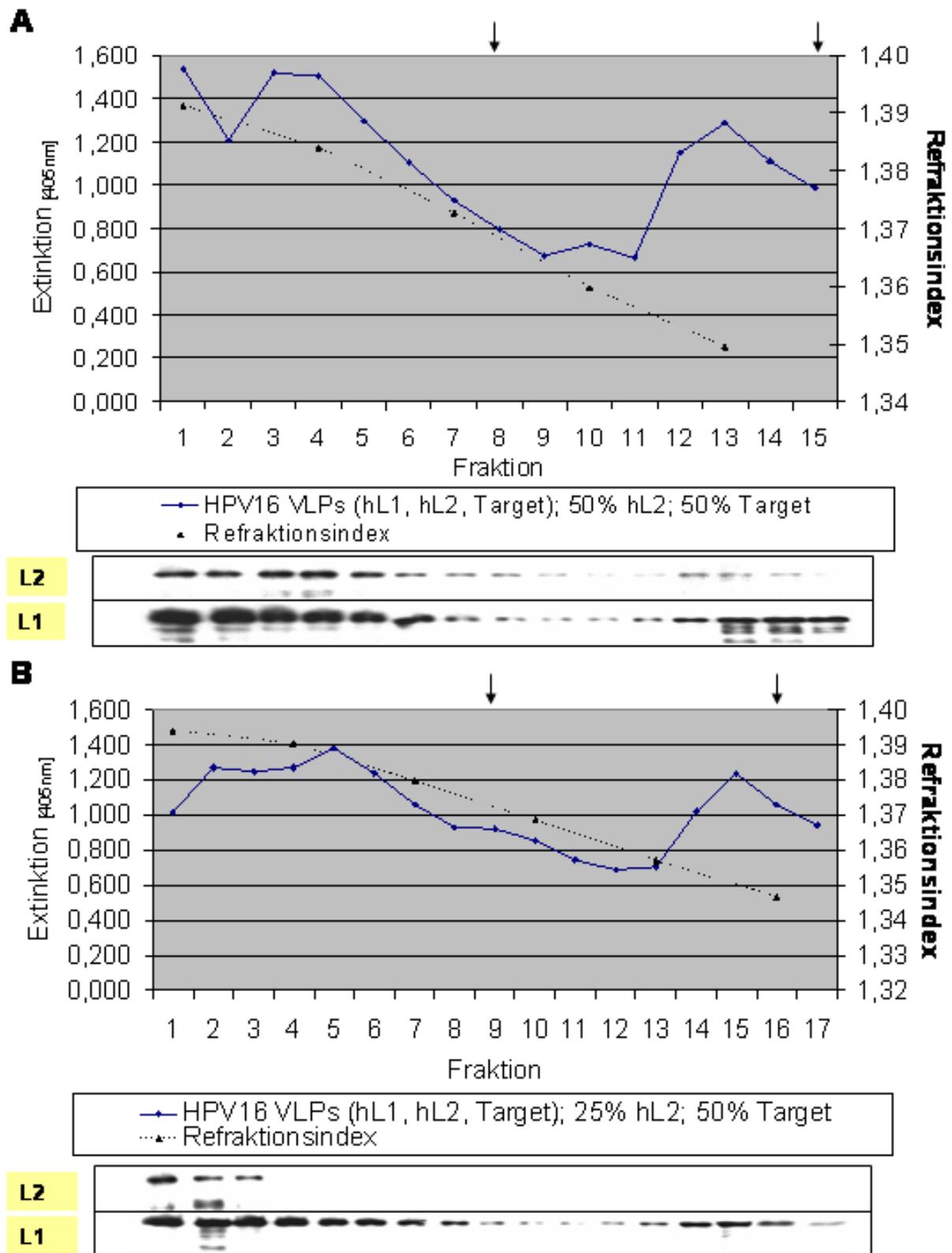


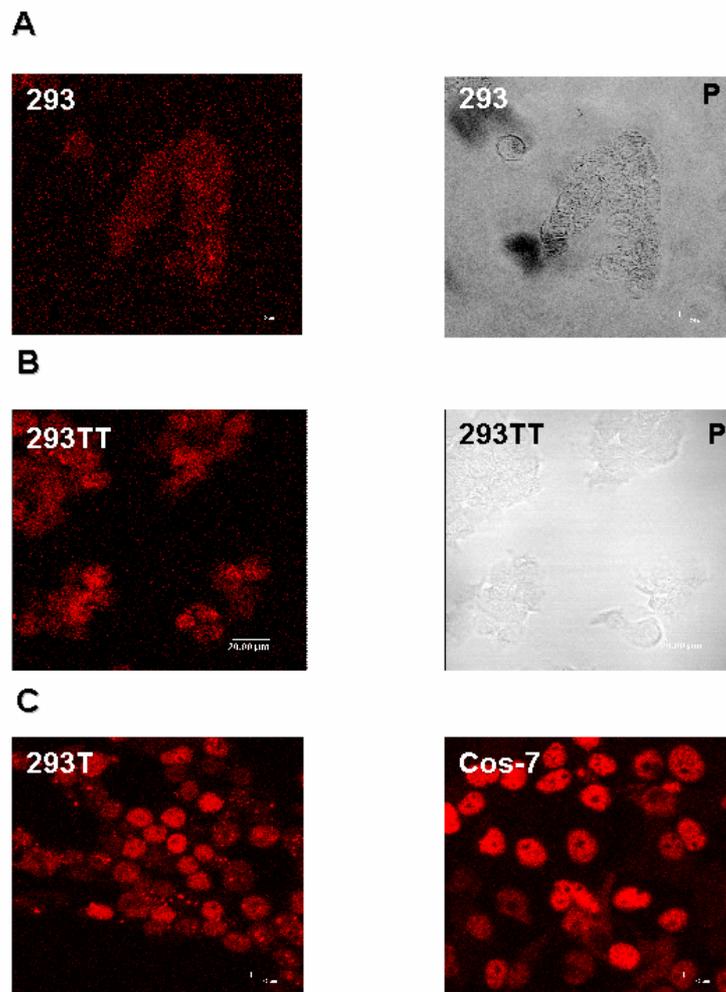
Abb. 4-21: Einfluss von unterschiedlichen hL2-Mengen auf Assemblierungsverhalten von Strukturproteinen. Unterschiedliche Mengen an hL2 wurden mit gleich bleibenden Mengen an hL1 und Target transfiziert, präpariert und im Saccharosegradienten analysiert. Der Nachweis der Strukturproteine erfolgte mittels ELISA. Nachweis der hL1 und hL2 Proteine via Western Blot Analyse. Verwendung von 50% (A) bzw. 25% (B) der standardmäßigen hL2-Menge. Pfeile indizieren die Lage der Sedimentationsmarker (4.5.1.2).

#### 4.5.2.2.2.3 Zusätzliche Transfektion des großen SV-40 T-Ag

Erfahrungen von Kooperationspartnern hatten in früheren Experimenten gezeigt, dass das intrazelluläre T-Antigen von 293T Zellen eine begrenzte Funktionstüchtigkeit aufweisen kann (Buck, Pastrana et al. 2004). Ein weiterer Hinweis für ein nicht funktionstüchtiges T-AG ergab die unter 4.3.3 beschriebene Beobachtung, dass das transfizierte Targetplasmid in 293T-Zellen nicht repliziert wird. Unter der Voraussetzung, dass die Existenz von spezifischen Verpackungsplasmiden zu einer erhöhten Kapsidbildung und DNA-Verpackung führen kann (Zhao, Hengst et al. 2000), entwickelte sich die Theorie, dass eine Erhöhung des hypothetischen PV-Anteils im Saccharosegradienten möglicherweise durch eine verstärkte T-AG-Expression erzielt werden könnte.

##### 4.5.2.2.2.3.1 Nachweis von intrazellulärem T-Antigen (T-Ag)

Zunächst wurde untersucht, in wie fern das T-Ag in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Zell-Linien exprimiert wurde. Der Nachweis erfolgte dabei mittels Immunfluoreszenz, in der ein für das große T-Ag spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet wurde (2.1.2). Die in Abb. 4-22 dargestellten, indirekten Immunfluoreszenzen zeigten, dass das T-Ag in den Zell-Linien 293T, Cos-7 und 293TT in weitgehend vergleichbarer Weise exprimiert wird (Abb. 4-22 B/C). Im Gegensatz dazu konnte bei 293 Zellen, die das T-Ag nicht exprimieren, kein Fluoreszenz-Signal beobachtet werden (Abb. 4-22 A). Ausgehend von dieser Versuchsreihe musste festgestellt werden, dass die nicht nachweisbare Replikation des Targetplasmids nicht durch fehlende T-Antigen-Expression begründet ist.

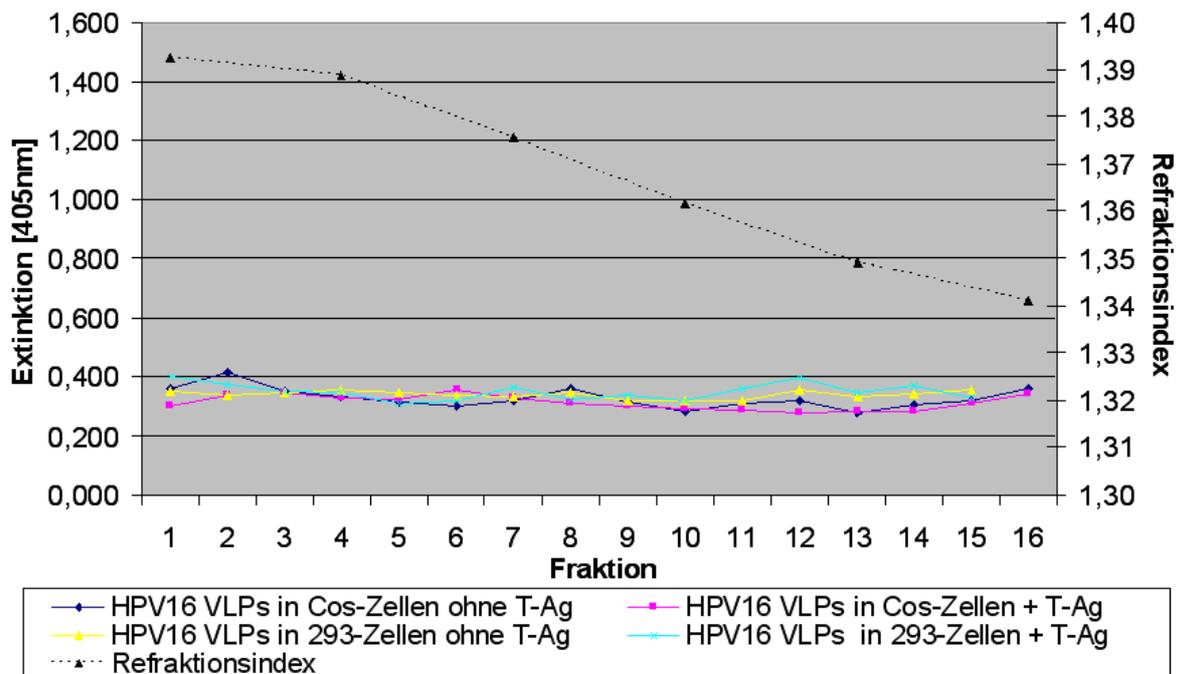


**Abb. 4-22: Nachweis von intrazellulärem T-Antigen (T-Ag) durch indirekte Immunfluoreszenz. 293-, 293T-, Cos-7 sowie 293TT-Zellen wurden mit einem Cy-3-markierten monoklonalen Mausantikörper inkubiert, der gegen das T-Ag gerichtet ist. Der Nachweis erfolgte im konfokalen Laserscan-Mikroskop (A, B, C). P: Phasenkontrastaufnahme**

#### 4.5.2.2.2.3.2 Einfluss von zusätzlichem T-AG auf das Sedimentationsprofil von VLPs/PVs nach Saccharosegradient

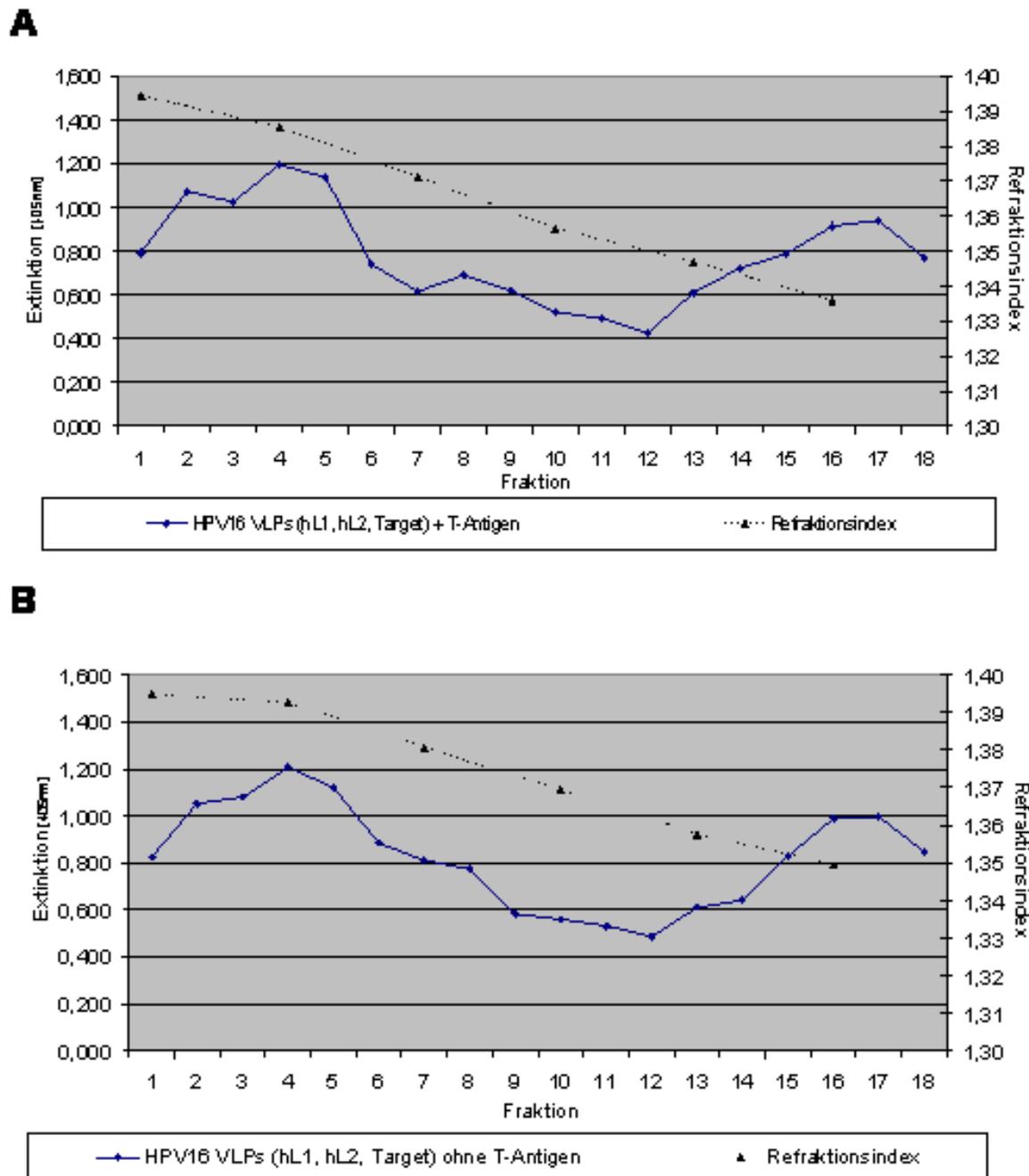
Zwar konnte beobachtet werden, dass in 293T bzw. Cos-7 Zellen intrazelluläres T-Ag exprimiert wird, es konnte jedoch keine Aussage über dessen Funktionalität getroffen werden. Außerdem war nicht bekannt, in wie fern zusätzlich transfiziertes T-Ag zu einer Erhöhung von Targetplasmidmaterial in der Zelle führen und sich dadurch auf die Partikelgruppen-Charakteristik der Sedimentationsprofile im Saccharosegradienten indirekt auswirken könnte. Daher wurden im Folgenden Experimente durchgeführt, bei denen ein für das T-Ag kodierendes Expressionsplasmid (Kapitel 9) zu den bestehenden Basiselementen hinzutransfiziert wurde. Diesbezügliche Transfektionsexperimente wurden in 293-, 293T- sowie Cos-7-Zellen durchgeführt und die weitere Analyse erfolgte im ELISA aus Fraktionen von Saccharosegradienten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten einerseits, dass eine Produktion der hypothetischen PVs bzw. VLPs in Kombination mit der Anwendung der Sedimentationsanalyse mittels Saccharosegradienten in Cos-7 bzw. 293 Zellen nicht oder nur schlecht möglich ist (Abb. 4-23).



**Abb. 4-23: Nachweis von Partikelgruppierungen nach Saccharosegradienten-Sedimentation in 293 und Cos-7 Zellen nicht möglich. 293 bzw. Cos-7 Zellen wurden mit hL1, hL2 und Target transfiziert und der vorgeklärte Zellextrakt im Saccharosegradienten aufgereinigt. Bei beiden Zell-Linien entstehen unabhängig von der Verwendung von zusätzlich transfiziertem T-Antigen keine L1-konformationsspezifischen Strukturen.**

Andererseits führte die Verwendung von zusätzlich transfiziertem T-Ag in 293T Zellen zu keinen verbesserten Signalen im Sedimentationsprofil der Gradienten (Abb. 4-24).

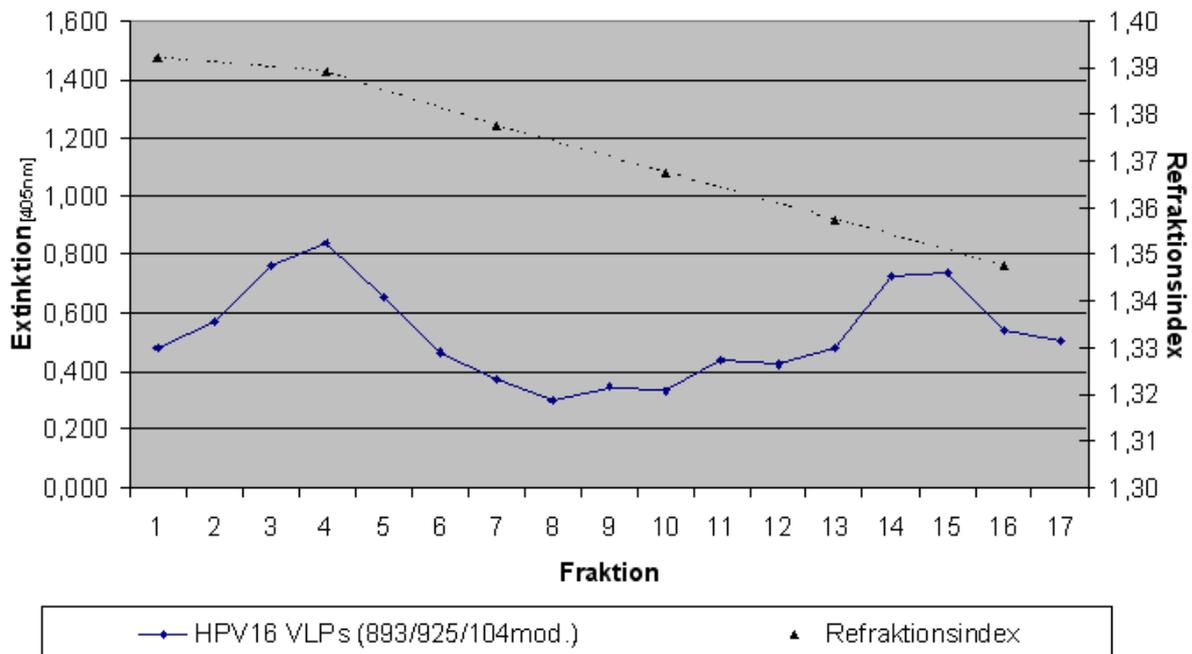


**Abb. 4-24:** Kein Effekt durch zusätzlich transfiziertes T-Antigen (T-Ag) auf Partikelgruppierungen nach Saccharosegradienten-Sedimentation. 293T Zellen wurden mit hL1, hL2 und Targetplasmid transfiziert und der vorgeklärte Zellextrakt im Saccharosegradienten aufgereinigt. (A): Zusätzliche Transfektion von T-Ag; (B): keine zusätzliche Transfektion von T-Ag. Der Nachweis von L1 konformationspezifischen Material erfolgte mittels ELISA.

In diesem Zusammenhang kann es dennoch sein, dass sich der Effekt, der durch die Transfektion des T-Ag ergibt, nicht im Assemblierungsverhalten der humanisierten Proteine niederschlägt und somit im ELISA nicht bestimmbar ist.

#### 4.5.2.2.4 Verwendung eines alternativen Verpackungsplasmids

Da nicht genau bekannt war, in wie fern sich die Größe des zu verpackenden Plasmids auf die Effizienz der Verpackung bzw. die Ausbeute infektiöser Partikel auswirken kann, wurden Parallelexperimente mit einem Plasmid durchgeführt, dessen Größe um 1kb verkleinert war (Gewinnung durch *Pst*I-Restriktion und anschließende Rezirkularisierung des Targetplasmids; Abb. 4-25).



**Abb. 4-25: Einfluss von verkleinertem Targetplasmid auf Partikelgruppierung nach Saccharosegradienten-Sedimentation.** 293T Zellen wurden mit hL1, hL2 und einem modifizierten Targetplasmid transfiziert und der vorgeklärte Zellextrakt im Saccharosegradienten aufgereinigt. Der Nachweis von L1 konformationsspezifischen Material erfolgte mittels ELISA. 104mod: 6,9kb großes Targetplasmid (siehe Text).

Zum Einen konnte aufgrund der vorgenommenen Verkleinerung des Targetplasmids der hypothetische PV-Peak fast nicht mehr vom VLP-Peak unterschieden werden und zum Anderen konnten keine Auswirkungen hinsichtlich der Gesamtproteinausbeute im Sedimentationsprofil festgestellt werden.

#### 4.5.2.2.3 VLP-Ausbeutenabhängigkeit von Präparationstechniken

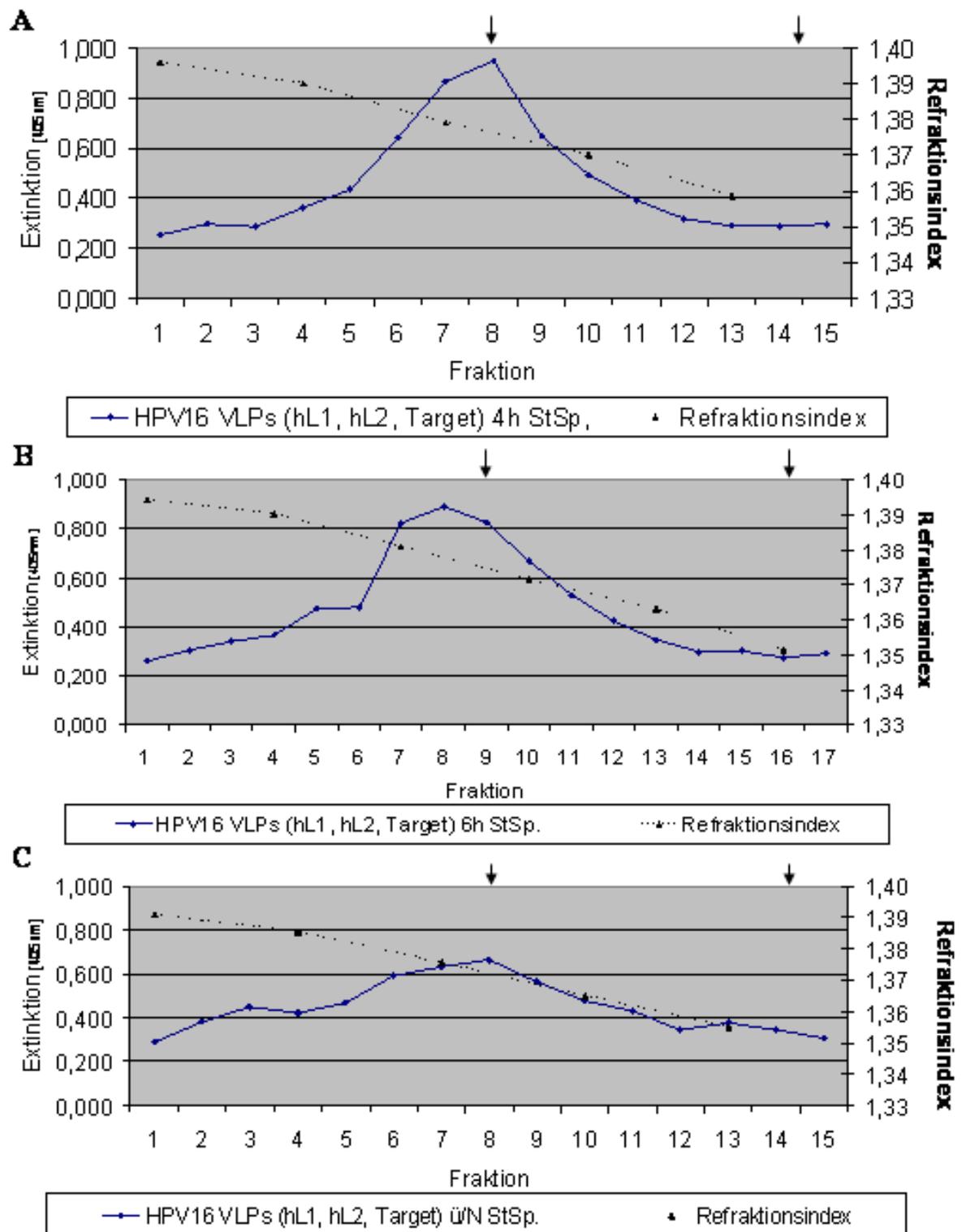
Im Folgenden wurde untersucht, in wie fern sich die Durchführung alternativer Aufschlussmethoden auf die VLP- bzw. PV-Gesamtausbeute nach Sedimentationsanalyse auswirkt. Dabei sollte geklärt werden, welches Aufschlussverfahren im Vergleich zum Ultraschall gestützten Zellaufschluss am besten zur Herstellung Saccharose gereinigter VLPs bzw. PVs geeignet ist. Die diesbezügliche Beurteilung erfolgte mit Hilfe der ELISA-Technik (3.1.22).

### 4.5.2.2.3.1 Herstellung von Pseudovirionen: Einfluss der Apoptoseinduktion auf das Sedimentationsprofil von VLPs/PVs nach Saccharosegradient

Wie in 4.3.6.1 geschildert, wurden Zellpräparationen hergestellt, die mit Staurosporin für unterschiedlich lange Zeit inkubiert worden waren. Essentieller Bestandteil des apoptotischen Niedergangs der Zelle ist der Einschluss von Zellmaterial in so genannte „apoptotic bodies“ (AB). Um die vermutlich in AB eingeschlossenen VLPs bzw. hypothetischen PVs freizusetzen, wurden die apoptotischen Zellen während der Präparation 2s mit Ultraschall (Intensitäts-Stufe 3) beschallt, vorgeklärt (3.1.20.1) und danach wie gewohnt auf den Saccharosegradienten verbracht (3.1.27) .

Die Zellpräparate, die die in Abb. 4-26 abgebildeten Sedimentationsprofile ergaben, wurden beim Aufschluss nach 4h-, 6h-, und ü/N-Inkubation mit Staurosporin aus je einer Gewebekulturschale im Doppelansatz hergestellt und dem Protokoll entsprechend im Saccharosegradienten analysiert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass bei 4-stündiger Apoptoseinduktion anstelle der erwarteten 4 nur 1 Peak mit einer deutlichen Verschiebung (Maximum in Fraktionsbereich 6-9) zur Gradientenmitte hin nachweisbar war („Mittelpeak“). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eine verlängerte Apoptoseinduktion von 4h auf 6h neben einer geringfügigen Herausbildung der VLP- und hypothetischen PV-Signalen zu einer leichten Verringerung des „Mittelpeaks“ führte. Bei den Induktionen über 6h bzw. ü/N konnte neben dem „Mittelpeak“ in den Fraktionsbereichen 6-9 ein kleinerer Peak in den Fraktionen 5 (6h) bzw. 3 (ü/N) beobachtet werden. Unter der Annahme, dass sich die (hypothetisch) schwerere PV-Fraktion vor der leichteren VLP-Fraktion vom „Mittelpeak“ lösen kann, wurde angenommen, dass es sich hierbei möglicherweise um die Zielpeaks mit den PVs handelte. Weiterhin ließ sich beim Sedimentationsprofil der Apoptoseinduktion ü/N gegenüber dem der 6-stündigen Induktion eine deutliche Verringerung des „Mittelpeaks“ beobachten.

Es wurde darüber spekuliert, dass es sich bei dem großen Mittelpeak um nicht voneinander getrenntes – evtl. noch in AB vorliegendes – Material handelte.



**Abb. 4-26:** Veränderung des Sedimentationsprofils von Zellextrakten im Saccharosegradienten (5-60%) in Abhängigkeit von unterschiedlich langer Apoptoseinduktion. Zellen einer 10cm Gewebekulturschale wurden nach Apoptoseinduktion von 4h (A), 6h (B) oder nach ü/N (C) präpariert, 2s mit Ultraschall beschallt und nach Vorklärung des Zellextraktes auf einen Saccharosegradienten aufgetragen. Die Fraktionen wurden im ELISA vermessen. Pfeile indizieren die Lage der Sedimentationsmarker (4.5.1.2).

Daher wurden in Wiederholungsexperimenten die unterschiedlich lang apoptoseinduzierten Zellpräparate einer Beschallung von 4s anstelle 2s unterzogen (Abb. 4-27).

Aus diesen Experimenten ging hervor, dass es nach entsprechend langer Beschallung zur Ausbildung der bereits zuvor beobachteten 4 Peakgruppen (Fr. 2, 6-8, 13, 15-17) kam.

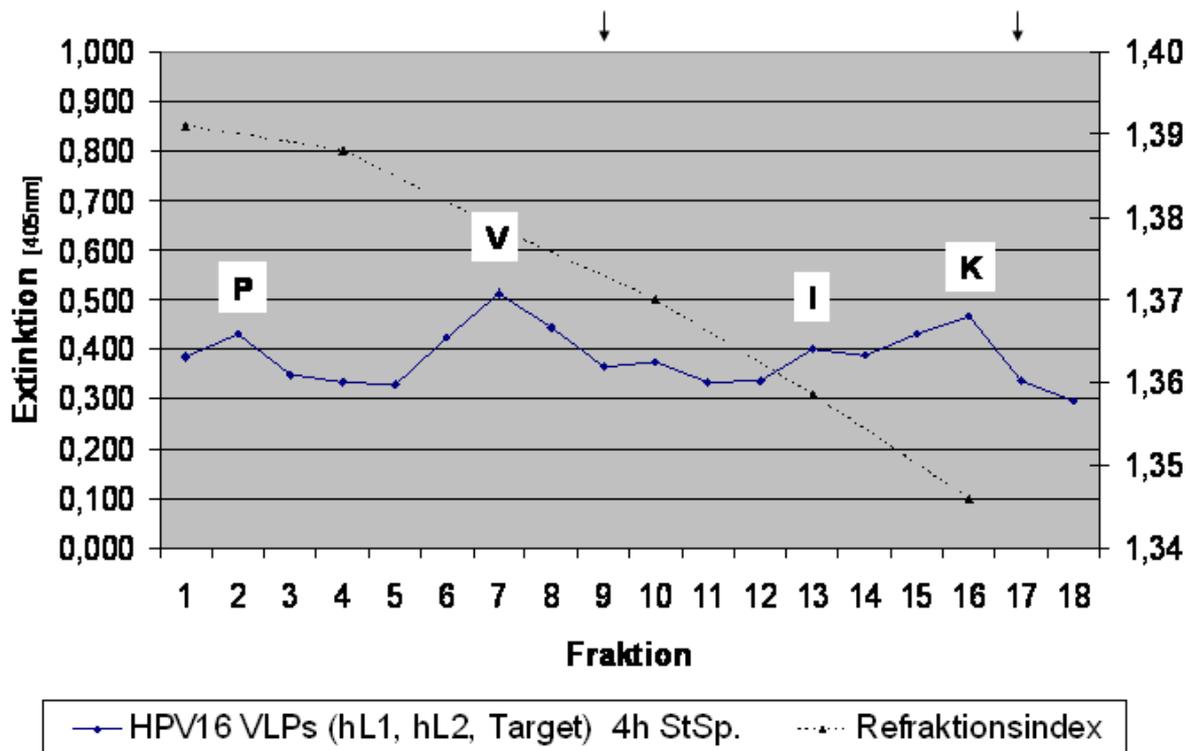


Abb. 4-27: Auswirkung verlängerter Ultraschall-Behandlung bei der Präparation apoptoseinduzierter Zellen. Zellen einer 10cm Gewebekulturschale wurden nach 6h StSp.-Inkubation präpariert, 4s mit Ultraschall beschallt und nach Vorklärung des Zellextraktes auf einen Saccharosegradienten aufgetragen (5-60%). Pfeile indizieren die Lage der Sedimentationsmarker (4.5.1.2).

Infektionsexperimente mit den in diesem Saccharosegradient gewonnenen Fraktionen 1-3, 6-8 und 13-17 führten zu keinen positiven Transduktionen des Verpackungsplasmids. Dies war ein Hinweis darauf, dass in den vorliegenden Gradienten keine funktionalen Strukturen enthalten waren, die für die Übertragung des Targetplasmids notwendig sind.

#### 4.5.2.2.3.2 Einfluss von Frieren/Tauen auf das Sedimentationsprofil von VLPs/PVs nach Saccharosegradient

Eine weitere Methode, Zellen zu lysieren, ist die Durchführung von Frier/Tau-Zyklen. Die Zellen wurden wie beschrieben (3.1.20.2) mit Hilfe dieser Technik präpariert und nach Vorklärung des Zellextraktes auf den Saccharosegradienten verbracht. Das im ELISA bestimmte Sedimentationsprofil zeigte (Abb. 4-28), dass durch diese Methode ein sehr hoher Kapsomeranteil und daraus folglich nur sehr geringe bis nicht differenzierbare Mengen an VLPs oder PVs nachzuweisen waren. Diese Beobachtung

wurde durch Western Blot Analysen bestätigt, in denen nur geringfügig positive Signale für beide Strukturproteine nachgewiesen werden konnten. Infektionsexperimente der Fraktionen 1-8 führten zu keinen positiven Transduktionen des Verpackungsplasmids.

Gesamt betrachtet wurde nach diesen Experimenten geschlossen, dass sich die Frier/Tau-Lyse für die vorliegende Art von VLPs (hL1, hL2, Target), die im Saccharosegradienten aufgereinigt werden, nicht eignet.

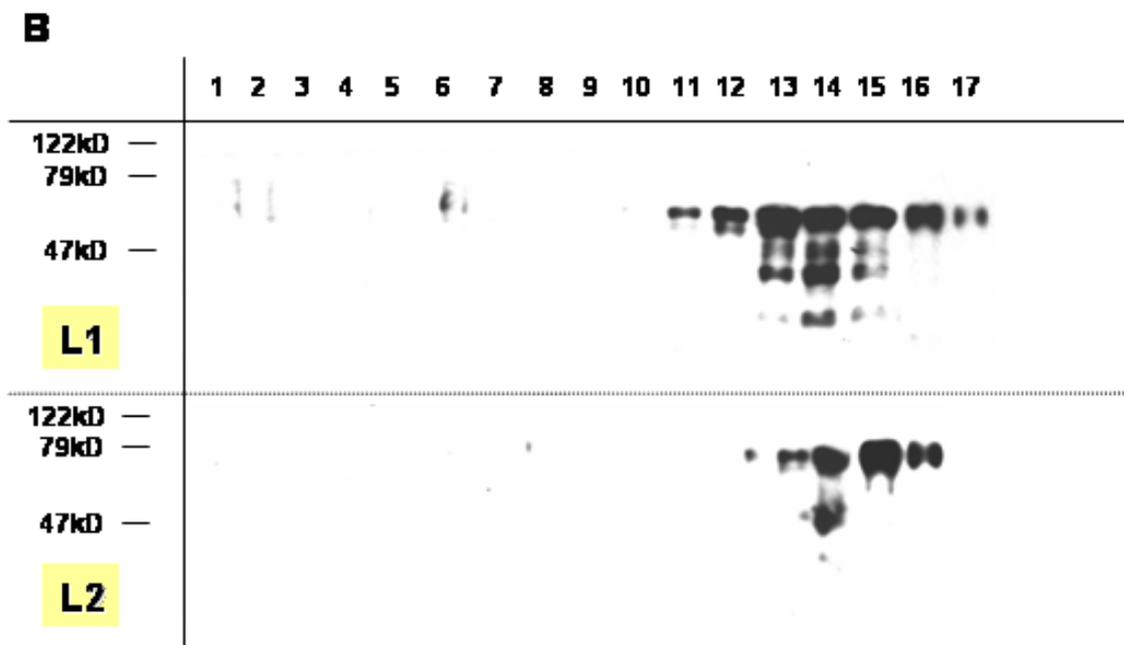
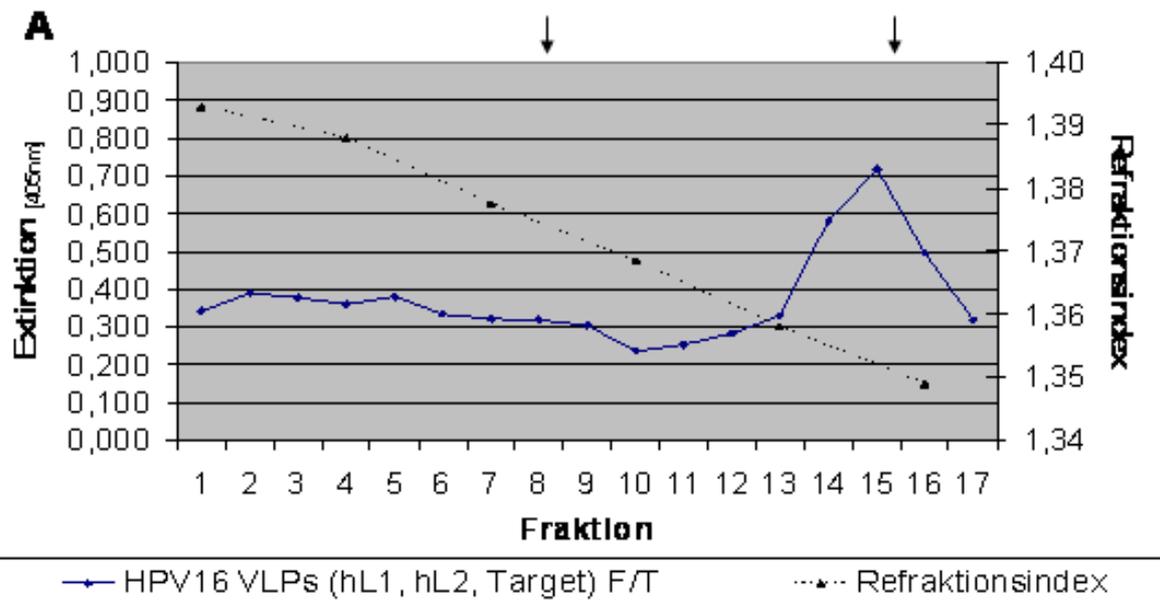


Abb. 4-28: Auswirkung der Frier/Tau-Lyse- während Präparation VLP bzw. PV produzierender Zellen. (A) Nach transienter Transfektion wurden Zellen einer 10cm Gewebekulturschale präpariert, durch Frier/Tau Zyklen aufgeschlossen und nach Vorklärung des Zellextraktes auf einen Saccharosegradienten aufgetragen (5-60%). Die Analyse erfolgte mittels ELISA. Nachweis der Strukturproteine L1 und L2 durch Western Blot Analyse (B) Pfeile indizieren die Lage der Sedimentationsmarker (4.5.1.2).

### 4.5.2.2.3.3 Sonstige Zellaufschlussmethoden und deren Einfluss auf das Sedimentationsprofil nach Saccharosegradient

Eine letzte Aufschlussmethode, die im VLP-Produktionssystem näher untersucht wurde, war der Zellaufschluss mittels Glas-Kugeln („beads“). Die Zellen wurden nach Protokoll (3.1.20.3) lysiert, vorgeklärt und auf den Saccharosegradienten geladen. Im Anschluss wurde das Sedimentationsprofil des Gradienten im ELISA analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass weder VLP-, PV- noch Kapsomergruppierungen beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung dieser Technik erwies sich daher im vorliegenden Versuchsansatz als unbrauchbar.

## 4.6 Sonstige Infektionsexperimente mit Saccharose-Fractionen

### 4.6.1 Infektion mit kompletten Saccharosegradienten-Fractionen

Da beobachtet werden konnte, dass die Fähigkeit der Partikelpräparationen zur un-spezifischen Transduktion des Targetplasmids im Schritt der Sedimentationsanalyse verloren gegangen war, wurde untersucht, ob die für den Verlust verantwortlichen Strukturen in einer bisher unberücksichtigten, und im Sedimentationsprofil unauffälligen Fraktion zu finden waren. Daher wurden Infektionsexperimente mit allen im Saccharosegradienten anfallenden Fraktionen mit 293T Zellen inkubiert und mittels  $\beta$ -Gal Nachweistest analysiert. Ergebnis dieser Untersuchungen war allerdings, dass es zu keiner positiven Transduktion des Targetplasmids irgendeiner Fraktion kam.

## 5. Diskussion

Papillomaviren sind außergewöhnlich epitheliotrope Viren, die eine sehr spezifische Replikations- und Vermehrungs-Strategie entwickelt haben. Die enge Kopplung dieser Strategien an das Differenzierungsprogramm von Keratinozyten (Howley 2001) ist für den viralen Lebenszyklus – ebenso wie bei Cytomegaloviren (Weinshenker, Wilton et al. 1988), Friend-Leukämie Viren (Johnson, Chung et al. 1993) oder HI Viren (Cullen and Greene 1989) – von hoher Bedeutung. Diese Kopplung hatte in der Vergangenheit zur Folge, dass der Lebenszyklus der Papillomaviren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht zufrieden stellend simuliert werden konnte. Unter Verwendung modifizierter HPV16 Strukturgene sollte daher in der vorliegenden Arbeit versucht werden, ein einfaches und – hinsichtlich der Ausbeute an infektiösen Virus-Partikeln – effizientes Produktionssystem für HPV16-Pseudovirionen in Standardzellkulturen zu etablieren.

### 5.1 Die Expressionsregulation von HPV16 L1 und L2 kann durch Kodonoptimierung überwunden werden

Die in den vorliegenden Studien verwendeten Strukturproteine basierten auf HPV16 L1 und L2 Genen, die im Vorfeld dieser Arbeit „humanisiert“ wurden (Leder et al. 2001). Unter „Humanisierung“ versteht man die Anpassung der Kodonverwendung z.B. viraler Gene an die des Menschen. Wie bereits unter 1.2.5 näher erläutert, kommt es in verschiedenen Organismen bei der Kodierung von Aminosäuren zu einer unterschiedlich häufigen Verwendung bestimmter Kodons. Seit der Entdeckung, dass ein Zusammenhang zwischen der Kodonverwendung und der Expressionsregulation von Genen besteht (Holm 1986; Smith 1996), beschäftigte sich eine Vielzahl an Arbeiten mit der Frage, wie stark sich eine Anpassung der Kodonverwendung an den Menschen auf die Steigerung der Expression von Genen auswirken kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ko-Expression der humanisierten HPV16 L1- und L2-Gene nach Kotransfektion in 293T Zellen möglich ist. Dass sich die Humanisierung zur Expressionssteigerung von Genen einsetzen lässt, konnte bereits in verschiedenen Ansätzen gezeigt werden (Zolotukhin, Potter et al. 1996; Kim, Oh et al. 1997). Im viralen Kontext wurde die Humanisierung erstmals bei HI-Viren beschrieben (Haas, Park et al. 1996; Deml, Bojak et al. 2001). Spätere Untersuchungen bei BPV1 L1 und L2 zeigten, dass der Austausch einzelner – beim Menschen sehr selten vorkommender – Kodons zu einer gesteigerten Expression führt (Zhou, Liu et al. 1999). Bei diesen Analysen unterschieden sich die Kodonoptimierten Sequenzen von der Originalsequenz zu ca.14% (L1) bzw. 22% (L2).

Neuere Publikationen ergaben, dass die in dieser Arbeit verwendeten, humanisierten HPV16 L1 und L2 Gene im Vergleich zu den nicht-humanisierten Kontroll-Genen ebenfalls eine sehr hohe Expression aufweisen (Leder, Kleinschmidt et al. 2001). In den in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzversuchen (4.3.2) konnte gezeigt werden, dass L1 im Zellkern auf homogen verteilte Weise vorzufinden ist. Dies bestätigte Beobachtungen, die bei Lokalisationsstudien mit einzeln transfizierten HPV16 L1 (Leder, Kleinschmidt et al. 2001), mit fusionierten HPV16 L1-Varianten (z.B. humanisiertes L1-E7; (Leder 2003)) oder bei der Verwendung von L1-Amplicons im herpesviralen Verpackungssystem gemacht wurden (Schenck 2004). Das von Day, Roden et al. beschriebene, teils homogen, teils punktiert beobachtete nukleäre Distributionsmuster von BPV1 L1 (Day, Roden et al. 1998) konnte selbst bei alleiniger Expression des humanisierten HPV16 L1 Gens in keinem der durchgeführten Versuche identifiziert werden. Da aber zwischen BPV und HPV kein hoher Homologiegrad besteht, kann die beobachtete Abweichung des nukleären L1-Verteilungsmusters möglicherweise auch Typus-abhängig sein. Es kann allerdings auch darüber spekuliert werden, dass eine solch geringfügig erscheinende Abweichung des intranukleären Verteilungsmusters schon durch die Verwendung von L1 rekombinanten SF-Viren und den damit einhergehenden zellphysiologischen Auswirkungen zu erklären ist. Im Gegensatz zu der homogenen Verteilung der L1 Moleküle erfolgte der Nachweis der L2-Moleküle in einem punktiertigen Muster, was die zuvor gemachten Beobachtungen in den Arbeiten von Gornemann et al. (2002) und Day et al. (1998) bestätigte.

## **5.2 Assemblierungs- und Verpackungsverhalten von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) unter Verwendung Kodon-optimierter Expressionsplasmide**

Die Expression der Papillomavirus-Strukturgene L1 und L2 kann in eukaryotischen Zellen zur Bildung von VLPs führen. Bisherige Forschungsarbeiten zeigten, dass Papillomavirus Kapsidproteine prinzipiell in menschlichen Epithelzellen (Leder et al. 2001; Zhou, Sun et al. 1991a), Insektenzellen (Kirnbauer, Booy et al. 1992), *E.Coli* (Kelsall and Kulski 1995; Li, Cripe et al. 1997), *S. pombe* (Sasagawa, Pushko et al. 1995), *S.cerevisiae* (Angeletti, Kim et al. 2002; Zhao and Frazer 2002) und sogar in Pflanzen (Biemelt, Sonnewald et al. 2003; Varsani, Williamson et al. 2003; Warzecha, Mason et al. 2003) exprimiert werden können. Diesen Systemen stehen so genannte „Raft-Culture-Systeme“ (siehe 1.2.5; S.15) gegenüber, die neben der *differenzierungsabhängigen* viralen Vermehrung die Expression der späten Gene sowie

die Assemblierung von intakten Papillomaviren *in vitro* ermöglichen (Frattini, Lim et al. 1996; McBride, Dlugosz et al. 2000; Meyers, Bromberg-White et al. 2002). Ein gemeinsames Problem dieser Ansätze stellt aber – unabhängig vom verwendeten Expressionssystem – die geringe Virionenausbeute dar (Neeper, Hofmann et al. 1996; Touze, Dupuy et al. 1998a; Zhao and Frazer 2002). Außerdem lassen viele dieser Ansätze den Nachweis über die Infektiosität der generierten Virionen vermissen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten klären, in wie weit sich eine verbesserte Partikelassemblierung durch die Verwendung humanisierter Kapsidgene erzielen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von HPV16-Partikeln in nicht differenzierenden Zell-Linien möglich ist (4.3.2 bzw. 4.3.5.) Daneben konnte beobachtet werden, dass die VLP-Ausbeuten im Vergleich zu den in Insektenzellen generierten geringer ausfielen und dass die hypothetischen Pseudovirionen-Anteile der Zellextrakte nicht infektiös sind (4.4).

Eine Lösung der systemübergreifenden Problematik ausbleibender Infektiosität und geringer Partikel-Ausbeuten wurde in der Vergangenheit durch die Entwicklung viraler Überexpressionssysteme angestrebt: Neben retroviralen Systemen, die bei der Analyse einzelner papillomaviraler Proteine zum Einsatz kamen (Blanton, Coltrera et al. 1992; Halbert, Demers et al. 1992; Woodworth, Cheng et al. 1992; Cheng, Schmidt-Grimminger et al. 1995), wurden rekombinante Vaccinia Viren (VV), Semliki Forest Viren (SFV) oder Bakuloviren (BV) zur Partikelherstellung verwendet (Hagensee, Yaegashi et al. 1993; Rose, Bonnez et al. 1993; Zhou, Stenzel et al. 1993; Roden, Greenstone et al. 1996; Zhao, Sun et al. 1998; Zhao, Hengst et al. 2000). Gegen die Verwendung dieser viralen Systeme spricht die Tatsache, dass sie größtenteils die Fragmentierung von zellulärer DNA induzieren können und es somit zu erheblichen physiologischen Einschnitten in der Zelle kommen kann, deren Auswirkungen nicht bestimmbar sind. Daneben konnten diese Systeme mehrheitlich auch andere Anforderungen an ein einfaches und effizientes Produktionssystem (siehe 1.3) nicht oder nur teilweise erfüllen: So führten manche VLPs lediglich zu einer Aufnahme, nicht aber zu einer produktiven Vermehrung des Virus oder verhinderten die Verpackung von vollständigem, nativem Virusmaterial. Bei Vaccinia-viralen Systemen konnte die Assemblierung von VLPs mit einer vom Virus abweichenden Größe von 35-40nm beobachtet werden (Zhou, Sun et al. 1991a). Ein prinzipielles Problem der SFV- bzw. VV-Systeme liegt darin, dass sie durch die Umgehung des nativen Weges der Partikelassemblierung keine Kenntnisse über die tatsächlich stattfindenden Interaktionen (zwischen Kapsid und zellulärem Apparat) beim Transport in den Zellkern und die sich dort anschließenden Abläufe liefern können.

Obwohl die Tatsache der Umgehung der nativen Situation bei einem *reinem* Partikel-Produktionssystem keine übergeordnete Rolle spielt, sollte sich ein *ideales* Partikel-Produktionssystem möglichst an den realen Bedingungen des viralen Lebenszyklus orientieren. Hierdurch können dann Untersuchungen bezüglich Verpackung und Assemblierung durchgeführt werden, die frei von Fremdeinflüssen mit unbekanntem Wirkungsgrad sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Assemblierung der HPV16 VLPs am besten in 293T Zellen geeignet ist, währenddessen eine Synthese in CV-1-, Caski- oder BPHE-1-Zellen nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung könnte in Bezug auf CV1- und BPHE-1-Zellen darin liegen, dass es sich hierbei um nicht humane Zell-Linien handelt, die evtl. aufgrund ihrer differenzierten Kodonverwendung eine nicht messbare Expression der humanisierten Strukturgene zur Folge haben. Bei Caski-Zellen handelt es sich zwar um menschliche Epithelzellen einer Cervix Karzinommetastase, jedoch erwiesen sich diese Zellen bereits in den unter 4.2 beschriebenen Vorversuchen als nicht-transfizierbar. Die ausbleibende Fähigkeit zur Partikelassemblierung ist daher in diesem Fall auf mangelnde Strukturgenexpression zurück zu führen. Die Entdeckung, dass es in BPHE-1-Zellen zu keiner Partikelassemblierung kam, steht im Kontrast zu Untersuchungen von Roden, Greenstone et al. (1996). Unter Verwendung nicht-humanisierter Strukturgene konnte in diesen Experimenten in BPHE-1-Zellen, die ein autonom replizierendes BPV1-Genom enthalten, sowohl die Verpackung von BPV1- als auch von HPV16-Kapsiden erreicht werden. Außerdem konnte beobachtet werden, dass es nach Ko-Expression von L1, L2 und dem Targetplasmid, nicht aber nach Koexpression von L1 und dem Targetplasmid zu einer deutlichen Minderung der VLP-Ausbeute kam. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung stehen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass L2 zu einer 4-fachen Erhöhung der VLP-Produktion in Insektenzellen und sogar zu einer 100-fachen Erhöhung in Säugetierzellen führen kann (Hagensee, Yaegashi et al. 1993; Kirnbauer, Taub et al. 1993; Zhou, Stenzel et al. 1993).

Die gewonnenen VLPs wurden in Folgeversuchen mittels Elektronenmikroskopie *in situ* untersucht (4.3.2). Diese Analysen bestätigten, dass es nach Transfektion der humanisierten L1- und L2-Gene sowie des Targetplasmids zur Bildung von VLPs kommt. Es konnte beobachtet werden, dass VLPs ausschließlich innerhalb des Zellkerns nachweisbar sind. Daneben konnten VLPs auch im Medium-Überstand aus Monolayer-Zellkulturen nachgewiesen werden (4.3.5.2). Bezüglich des intranukleären Vorkommens von VLPs konnten ähnliche Beobachtungen beispielsweise in Arbeiten mit humanisiertem HPV16 L1 in undifferenzierten 911 Zellen (Leder 2003), mit HPV18 L1 und L2 in differenzierenden Keratinozyten (Meyers, Mayer et al. 1997)

sowie mit L1/L2 rekombinanten VV in undifferenzierten CV-1 Zellen (Zhou, Sun et al. 1991a; Zhou, Stenzel et al. 1993) gemacht werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen nach unterschiedlich langer Transfektionsdauer könnten darauf hinweisen, dass es möglicherweise zu Beginn der Partikelproduktion zu einer Partikelanreicherung an inneren Seite der Kernmembran kommen könnte. Es ist auffällig, dass sich die VLPs nach Assemblierung nur im Kern, nicht aber im Zytoplasma ansammeln, von wo aus sie nach dem Untergang der Zelle effektiv weitergegeben werden könnten. Merle, Rose et al. zeigten bereits, dass HPV11 VLPs die Kernmembran nicht passieren können, sofern sie in einem vollständig assemblierten Status vorliegen (Merle, Rose et al. 1999). Daraus ergibt sich, dass die im Kern generierten VLPs entweder im Zuge der Auflösung der Kernmembran bei der Zellteilung freigesetzt werden oder dass ein speziell bei differenzierenden Zellen vorliegender Mechanismus für die aktive Ausschleusung der Partikel verantwortlich ist.

Eine Aussage darüber, in welchem Maß es bei den beobachteten VLP-Synthesen zu einer Inkorporation des L2 in die hauptsächlich durch L1 gebildeten Partikel gekommen ist, konnte in dem beschriebenen (ELISA-) Analyseverfahren (3.1.22) mangels spezifischer Antikörper nicht getroffen werden. In den elektronenmikroskopisch analysierten Gewebsschnitten konnte zudem nicht festgestellt werden, ob das kotransfizierte Targetplasmid in die assemblierten Partikel verpackt wurde. Elektronenmikroskopische Negativkontrast-Untersuchungen mit Lysatüberständen transfizierter Zellen schienen dagegen einen Hinweis auf die Existenz verpackter VLPs zu zeigen (4.5.1.3): Es konnten VLPs identifiziert werden, die eine von leeren VLPs abweichende – dunkel gefärbte – Kontrastierung des „VLP-Zentrums“ aufwiesen. Eine derartige Kontrastierung kann auf verpacktes Material hinweisen (persönliche Mitteilung Dr.Zentgraf, DKFZ Heidelberg) und wurde bereits in anderen Analysen verpackter VLPs beschrieben (Zhou, Stenzel et al. 1993). Es muss allerdings auch in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem scheinbar verpackten Material nicht um das zur Verpackung beabsichtigte Targetplasmid, sondern um zelluläre DNA-Fragmente handelt (siehe 5.2.1).

Um festzustellen, ob es zu einer Expression des transfizierten L2 gekommen ist, wurden Western-Blot Analysen der Zellextrakte nach Transfektion angefertigt, die dessen Expression genauso bestätigten, wie die unter 5.1 bereits beschriebenen Immunfluoreszenz-Versuche. Die Analyse von Saccharosegradienten-Fractionen mittels L2-spezifischer Antikörper zeigte im Western-Blot, dass L2-Proteine in den selben Fractionen nachweisbar sind wie L1-Proteine (4.5.2.1). Bei nicht gezeigten Ergebnissen konnte beobachtet werden, dass bei alleiniger Expression von humani-

siertem L2 und nachfolgender Aufreinigung im Saccharosegradienten die Sedimentation des Proteins ausschließlich direkt zu Beginn des Gradienten erfolgte. Nach Ko-Transfektion der restlichen Komponenten (Targetplasmid und L1) konnte L2 aber hauptsächlich im vorderen und hinteren Drittel des Saccharosegradienten nachgewiesen werden, was eine Interaktion mit dem dort befindlichen L1-Material indiziert. Daraus kann geschlossen werden, dass höchstwahrscheinlich eine Inkorporation des L2 in L1-assemblierte Partikel stattgefunden hat. Weiterhin weist diese Beobachtung darauf hin, dass L1-Kapsomere für die Bindung von L2-Molekülen ausreichen und sich nicht erst zu einem vollständigen Partikel zusammenlagern müssen.

Zur Detektion des L1 und L2 wurden sowohl in Immunfluoreszenz- als auch in Western-Blot-Analysen zwei verschiedene Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität verwendet (monoklonaler Antikörper CamVir-1 für die Detektion des L1 und polyklonales Kaninchen-Serum #20 für die Detektion des L2). Eine Feststellung darüber, in welchem realen Mengenverhältnis die zu gleichen Teilen transfizierten Plasmide in der Zelle exprimiert werden, konnte somit nicht getroffen werden. Ein diesbezgl. Vergleich könnte erreicht werden, wenn den Strukturgenen in zukünftigen Versuchen z.B. ein identisches Protein-Tag angefügt würde. Bei einer darauf folgenden Analyse von Zellextrakten mit einem Tag-spezifischen Antikörper könnten die Proteinmengen im Western-Blot verglichen werden. Somit könnten wichtige Hinweise auf die unterschiedlich starke Regulation der späten Gene (Schwartz 2000) erzielt werden. Die Beantwortung der Frage nach dem Grund der unterschiedlich starken Regulation der späten Gene ist nach wie vor von hohem Interesse, da nicht genau geklärt ist, in wie weit vielleicht nur einzelne Positionen im Leserahmen zur Beeinflussung der Proteintranslation beitragen. So konnten Collier, Oberg et al. spezifische negativ regulatorische Elemente im 5'-Ende der kodierenden Region von HPV16 L1 identifizieren, deren Inaktivierung zu einer signifikanten Erhöhung der L1-Expression führte (Collier, Oberg et al. 2002). Die Entdeckung weiterer regulatorischer Bereiche wäre auch für die Expressionssteigerung von Genomen anderer Papillomavirus-Typen von besonderem Interesse. Vom jetzigen Standpunkt kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass bisher unbekannte negativ regulatorische Sequenzen durch die Humanisierung eliminiert wurden, die die Translation unabhängig von der tRNA-Verfügbarkeit direkt beeinflussen. Möglich sind in diesem Zusammenhang z.B. Sequenzen, die durch die Bindung inhibitorischer Proteine zu einer vorzeitigen Termination der Translation führen.

### 5.2.1 Modulation der Verpackungseffizienz

Währenddessen momentan wenig über die zu einer erfolgreichen Verpackung benötigten L1- und L2-Konzentrationen bekannt ist, häufen sich Hinweise über eine wichtige Rolle der Größe der zu verpackenden DNA im Hinblick auf eine Ausbeutensteigerung von Viruspartikeln (s.u.).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Kotransfektionen wurde zur Verpackung von VLPs standardmäßig ein der Größe des nativen HPV16-Genoms entsprechendes Targetplasmid (ca. 8kb) verwendet. In den dazugehörigen Sedimentationsanalysen konnte ein bisher nicht nachgewiesener, hypothetischer Pseudovirionen-Peak identifiziert werden (5.5). Um zu untersuchen, in wie weit dieser Peak auch unter Verwendung eines kleineren Plasmids nachweisbar ist, wurde in anderen Analysen ein etwa 7kb großes Targetplasmid kotransfiziert. Dabei konnte beobachtet werden, dass der hypothetische PV-Peak im Sedimentationsprofil nach Dichtezentrifugation nicht mehr nachgewiesen werden konnte (4.5.2.2.4). Zusammengenommen könnte dies bedeuten, dass Plasmide, die kleiner als das native Genom sind, über einen selektiven Vorgang nicht bzw. ineffizient verpackt werden oder zur Bildung von Pseudovirionen führen, die eine verringerte Dichte besitzen und somit im Sedimentationsprofil nicht mehr als gesonderte Gruppierung nachweisbar sind. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Auswirkung der Verpackungsplasmidgröße auf die Verpackungseffizienz von Pseudovirionen sind vielfältig: In manchen viralen Produktionssystemen konnte gezeigt werden, dass Targetplasmide bei der Verpackung bevorzugt werden, die kleiner als das native virale Genom sind (Yoshiike 1968; Tai, Smith et al. 1972; Zhao, Sun et al. 1998). Die Kotransfektion kleiner Targetplasmide von ca. 5,6kb Größe zeigte in Verbindung mit BPV1 L1- und L2-Expressionsvektoren eine 10-fach erhöhte Virionenausbeute als Targetplasmide mit einer Größe von etwa 7,9kb (Buck, Pastrana et al. 2004). Targetplasmide mit einer Größe zwischen 8 und 10kb Größe führten in diesen Versuchen zu sehr ineffizienten Virionenausbeuten. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurde von Buck, Pastrana et al. über ein Verpackungsmodell spekuliert, bei dem die Strukturproteine die nukleäre Umgebung nach kleinerem DNA-Material „durchsuchen“. Die Bindung von zellulärer DNA ist in diesem Modell mutmaßlich reversibel und könnte zu teilweise assemblierten Partikeln führen. Ausgehend von diesem Modell kann in Erwägung gezogen werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit im Saccharosegradienten beobachteten, als Intermediate bezeichneten, Strukturen um solche teilassemblierten Partikel handelt (siehe auch 5.5).

Ob tatsächlich eine Kausalität zwischen dem Auftreten des hypothetischen PV-Peaks und der Verwendung des in dieser Arbeit verwendeten Targetplasmids mit einer Größe von 7,9kb vorliegt, ist noch nicht gesichert und muss in Zukunft durch folgen-

de Versuche näher untersucht werden: Einerseits müsste das Sedimentationsprofil von VLPs bestimmt werden, bei denen außer den beiden humanisierten Strukturgenen kein Targetplasmid kotransfiziert wird. Erste Versuche hinsichtlich dieses Ansatzes wurden bereits von anderen Experimentatoren mit dem Ergebnis durchgeführt, dass neben den VLP-, Intermediaten-, und Kapsomer-Gruppierungen keine zusätzlichen Peaks zu beobachten sind (persönliche Mitteilung Dr. Leder, DKFZ Heidelberg). Die Bestätigung dieser Beobachtung durch Wiederholungsversuche steht allerdings noch aus. Außerdem müssten Versuche durchgeführt werden, in denen neben den humanisierten Strukturgenen ein Targetplasmid kotransfiziert wird, dass (i) genau der Größe des bisher verwendeten Targetplasmids entspricht und (ii) keine Ähnlichkeiten zum HPV-Genom besitzen darf.

### 5.3 VLP-Produktions- und Präparationstechniken

Wie bereits unter 1.2.5 und 5.2 näher erläutert, wurden in der Vergangenheit verschiedene Systeme zur Expression viraler Papillomavirus-DNA in Zellen verwendet. Da in dieser Arbeit ein möglichst einfaches und biotechnologisch sicheres Produktionssystem für infektiöse HPV16 VLPs (=Pseudovirionen; PV) etabliert werden sollte, wurde zunächst davon abgesehen, die viralen Strukturinformationen über rekombinante Viren wie VV, BV oder SFV in die Zellen einzuschleusen. Da sich die Methode der Transfektion in Vorversuchen als adäquates Mittel zur leichten Einbringung einzelner Gene in Zellen herausgestellt hatte, wurde zu Beginn dieser Arbeit evaluiert, in welchen Zell-Linien eine möglichst hohe Plasmid-Expression erreicht werden kann. Dementsprechend wurden zahlreiche Transfektionen nach unterschiedlichen Protokollen in Kombination mit unterschiedlichen Zell-Linien durchgeführt (4.2). Dabei stellte sich heraus, dass die Transfektionsmethode mittels Metafectene®, das zu einer Liposomen-vermittelten Endozytose von DNA führt, bzw. Kalziumphosphat in 293T Zellen am besten für die geplante Vorgehensweise geeignet war.

Eine anschließende Frage beschäftigte sich damit, in welcher „Form“ die Strukturgene in die Zellen transfiziert werden sollten. Die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionselemente lagen alle auf einzelnen Expressionsplasmiden vor, die unter der Kontrolle des CMV-Promotors standen. Wie unter 4.3.1 bzw. 4.3.5.2 beschrieben, wurden verschiedene Plasmidvarianten für die Expression von L1 und L2 untersucht. Die Ko-Transfektion der humanisierten HPV16 L1 und L2-Gene sowie des Targetplasmids führte zur Bildung von VLPs, die anhand eines konformationsspezifischen Antikörpers im ELISA detektiert und quantifiziert werden konnten. Neben den einzeln vorliegenden Expressionsplasmiden wurde ein Kombinationsplasmid untersucht, bei dem die L1- und L2-Gene durch eine „interne Ribosomen-Eintrittsstelle“

(IRES) getrennt waren. Diese IRES sollte zur Erhöhung einer effektiven L2-Translation dienen, die in der Folge zu einer hohen Partikelausbeute führen sollte. Außerdem sollte die Verwendung dieses Kombinationsplasmids einer Minderung der Transfektionseffizienz entgegenwirken, die durch eine hohe Anzahl kotransfizierter Plasmide zustande kommen könnte. In den in dieser Arbeit vorgestellten Vergleichsversuchen wiesen jedoch die einzeln transfizierten Expressionsplasmide eine höhere Expression der Strukturgene als das Kombinationsplasmid auf. Daraus ließ sich ableiten, dass die Verwendung einer IRES im Rahmen der L2-Expression zwar möglich ist, aber im vorliegenden Fall im Vergleich zu einzeln transfizierten Expressionsplasmiden nicht zu einer erhöhten Translationseffizienz führt. Eine Minderung der Transfektionseffizienz aufgrund der Kotransfektion von drei Plasmiden (L1, L2, Targetplasmid) konnte zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden.

Damit in den geplanten Infektionsversuchen mit möglichst viel VLP-Material gearbeitet werden konnte, mussten unterschiedliche Präparationsmethoden hinsichtlich ihrer Effektivität untersucht werden. Bei diesen Versuchen stand das Ziel im Vordergrund, eine Präparationsmethode zu finden, mit der möglichst viele Partikel möglichst schonend aus dem zellulären Lysat herausgelöst werden können. Eine chemisch oder mechanisch zu intensive Behandlung der Partikel könnte dabei zu Einbußen der Infektiosität führen. Die Präparation von VLPs wurde in dieser Arbeit mittels Ultraschall, Frier-Tau-Zyklen und der Induktion von Apoptose näher untersucht (4.3.6.2). Die Verwendung der zuletzt genannten Methode wurde im Zusammenhang mit der Präparation von VLPs noch nicht beschrieben und in dieser Arbeit neu entwickelt. Die Induktion der Apoptose erfolgte in den vorliegenden Versuchen mit Hilfe von Staurosporin, bei dem es sich um ein mikrobielles Alkaloid (Indolcarbazol aus *Streptomyces* spp.) handelt. Es induziert Apoptose, in dem es Proteinkinasen sehr stark inhibiert (Andersson, Sjostrand et al. 2000; Yamasaki, Hama et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose bei der Präparation von VLPs aus Zellen in Kombination mit Ultraschall eine gute Alternative darstellt. Zwar konnte in Western-Blot-Experimenten beobachtet werden, dass die nachgewiesenen L1- und L2-Proteine im Vergleich zur Frier-Tau-Lyse schlechter in Lösung gebracht wurden, jedoch konnte insgesamt mehr Zellextraktüberstand zurück gewonnen werden. Dies war v.a. darauf zurück zu führen, dass im Zellextraktüberstand nach Frier-Tau-Lyse (trotz zusätzlicher Nukleasenbehandlung) vermehrt hochviskose Flüssigkeitsanteile vorzufinden waren, die in anderen Analyseverfahren nicht eingesetzt werden konnten. Außerdem konnte in Dichtezentrifugations-Analysen beobachtet werden, dass nach erfolgter Frier-Tau-Lyse sehr hohe Kapsomeranteile nachgewiesen werden können (4.5.2.2.3.2). Da eine spezifische Infektion mit diesem Material nicht möglich

ist (keine vollständige Verpackung von DNA), wurde die Frier-Tau-Lyse zur Präparation von VLPs in weiteren Experimenten nicht verwendet. Die Alternative stellte daher die Anwendung von Ultraschall (US) dar, durch den vergleichbar viele L1- und L2-Proteine in Lösung gebracht werden konnten wie durch das Apoptoseprotokoll. Der Nachteil der US-Behandlung von VLP-haltigen Zellsedimenten ist allerdings, dass es bei höheren Intensitätsstufen zur Desintegration des Kapsidmaterials und somit zur Einbuße der Infektiosität von potentiell transduzierenden Virionen kommen kann. Bei geringeren Intensitätsstufen und kurzen Beschallungszeiten (max. 10sek.) konnten keine morphologischen Veränderungen oder Auswirkungen mehr auf das Sedimentationsprofil der Assemblierungsgruppen nach Dichtezentrifugation – wie bei Leder (2003) beschrieben – gemessen werden.

Dennoch wurde die Entwicklung der Zellpräparation mittels Apoptose verfolgt. Es wurde darüber spekuliert, dass die Degradation der VLPs bei entsprechend kurzfristiger Induktion von Apoptose keine morphologische Beeinträchtigung der Partikel zur Folge hätte. Wie in den entsprechenden Dichtezentrifugations-Analysen dargestellt (4.5.2.2.3.1), verhinderte eine zu kurze Beschallung des durch Apoptose erzielten Zell-Lysats möglicherweise die adäquate Herauslösung der verschiedenen Assemblierungsgruppen. Dies war vor allem durch das Auftreten eines einzigen konformationsspezifischen Partikel-Peaks gekennzeichnet, der in der Mitte des Dichtegradienten lokalisiert war. Es konnte beobachtet werden, dass dieser Peak durch verlängerte Beschallung verschwand und an dessen Stelle die 4 – bereits zuvor identifizierten – Partikelgruppen nachgewiesen werden konnten. Davon ausgehend kann darüber spekuliert werden, dass die Partikel nach direkter Präparation noch z.B. mit zu großen Zelldebris-Fragmenten assoziiert sind. Eine weitere Möglichkeit, warum ein derartig differenziertes Sedimentationsprofil gemessen wurde, könnte darin begründet liegen, dass die Partikel noch größtenteils in den so genannten „apoptotic bodies“ (Mehmet 2003) eingeschlossen waren und somit nur in Verbindung mit anderem zellulären Material nachgewiesen werden konnten. Bei einer verlängerten Beschallung könnte es somit zur Auflösung dieser Komplexe gekommen sein, die eine bessere Freisetzung der einzelnen Assemblierungsgruppen zur Folge hatte. In wie weit die Infektiosität der Partikel durch die Kombination aus Apoptoseinduktion und Ultraschallbehandlung beeinflusst wurde, konnte nicht beurteilt werden. Morphologische Veränderungen konnten in entsprechenden Analysen im Elektronenmikroskop nicht nachgewiesen werden.

### 5.3.1 Herstellung von VLPs mittels rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV)

Wie unter 4.3.5.1 dargestellt und unter 5.6 näher erläutert, führte die Kotransfektion von bis zu fünf verschiedenen Expressionsplasmiden wahrscheinlich zu einer signifikanten Verminderung der Transfektionseffizienz und in der Folge zu einer geringen VLP-Ausbeute.

In der Vergangenheit konnten verschiedene virale Systeme zur Produktion von Papillomavirus VLPs entwickelt werden. Neben den bereits genannten BV, SFV und VV wurden auch Adenoviren (Berkner 1992; Kozarsky and Wilson 1993; Kremer and Perricaudet 1995), Adeno-assoziierte Viren (AAV; Kotin 1994; Kremer and Perricaudet 1995; Fisher, Jooss et al. 1997) Epstein-Barr Viren (Banerjee, Livanos et al. 1995) und Retroviren (Danos and Mulligan 1988; Miller 1992; Naldini, Blomer et al. 1996) als Transportmittel für Expressionsplasmide aller Art verwendet. In Bezug auf eine hohe und konstante Proteinexpression haben sich in der Vergangenheit vor allem Adeno- und Adeno-assoziierte Vektorsysteme als besonders geeignet herausgestellt (Lai, Lai et al. 2002).

Um den eingangs beschriebenen Effekt der Effizienzsenkung durch eine zu hohe Anzahl kotransfizierter Einzelplasmide zu umgehen, wurde die Idee entwickelt, die L1- und L2-Proteine durch rekombinante AAV-Partikel in die Zelle zu schleusen. Dabei war beabsichtigt, die Strukturgene zunächst einzeln in rAAVs zu verpacken und diese danach in 293T- oder HeLa Zellen zu infizieren. Die Einbringung des Targetplasmids (optional zzgl. E1 oder/und E2) erfolgte danach über das übliche Transfektionsprotokoll. Die Verstärkung der rAAV-Expression sollte durch eine parallele Superinfektion mit dem Wildtyp des Adenovirus Typ 5 (Ad5wt) erfolgen. Es konnte beobachtet werden, dass die Verpackung der einzelnen Strukturgene in AAV in 293T Zellen besser möglich ist als in HeLa-Zellen (4.3.4). In beiden Zell-Linien konnte außerdem der in der Literatur beschriebene „Helfer-Effekt“ durch Ad5wt bestätigt werden (Lai, Lai et al. 2002), indem jeweils höhere VLP-Ausbeuten als in Ansätzen ohne Ad5wt bestimmt werden konnten. Da sich die Ausbeuten mit Hilfe dieses Systems nur knapp über den im zuvor beschriebenen Zellkultursystem bewegten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Es muss weiterhin festgehalten werden, dass die Herstellung von rAAV ein technisch sehr aufwendiger Prozess ist und daher für ein *ideales* Partikel-Produktionssystem eher ungeeignet ist. Bei der Arbeit mit Ad5wt müssen zudem besondere Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden, die zu einer weiteren Verkomplizierung bei der Produktion infektiöser VLPs führen.

## 5.4 Die Infektion mit ungereinigten Zellextrakten führt zu unspezifischen Transduktionen

Zur Beurteilung, ob die durch Standard-Transfektionen hergestellten VLPs in der Lage sind, Zellen zu infizieren, wurden Rohextrakte mittels Zentrifugation vorgeklärt und deren Überstände in Infektionsversuchen mit Lac-Z-negativen Zell-Linien untersucht (4.4). Dabei konnte beobachtet werden, dass  $\beta$ -Gal positive Zellen nicht nur mit der Versuchs-Kombination L1, L2 und Targetplasmid, sondern auch mit der Kombination aus L2 und Targetplasmid nachweisbar waren. Da die zuletzt genannte Kombination aber nicht in der Lage sein sollte, infektiöse Partikel zu assemblieren und somit zu spezifischen Transduktionen zu führen, musste von einer unspezifischen Übertragung des Targetplasmids ausgegangen werden. Eine interessante Beobachtung war dabei, dass die Transduktion des Targetplasmids selbst bei hohen Nuklease-Konzentrationen von bis zu  $0,8\mu\text{g}/\mu\text{l}$  noch stattfinden konnte. Die Funktionstüchtigkeit der verwendeten Nukleasen konnte jedoch in anderen Experimenten bestätigt werden. Der Vergleich zu bisherigen Publikationen, die sich ebenfalls mit Produktions- und Infektionsanalysen im papillomaviralen Kontext beschäftigten, ergab, dass zum Infektions-spezifischen Nachweis Nukleasenbehandlungen mit niedrigerer Konzentration durchgeführt wurden (Unckell, Streeck et al. 1997; Zhao, Sun et al. 1998; Buck, Pastrana et al. 2004). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Nukleasen-resistente Targetplasmid-DNA möglicherweise von Zelldebris oder VLP-Aggregaten umgeben ist, die den Zugriff der Nukleasen verhindern und gleichzeitig die Transduktion der Targetplasmid-DNA ermöglichen. Es wurde versucht, die Transduktion des Targetplasmids durch eine Präinkubation mit neutralisierenden Antikörpern zu beeinflussen. Da aber bei diesbezüglichen Experimenten mit unterschiedlichen Antikörpern und Antikörperverdünnungen keine Beeinflussung der Transduktionsrate beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die unspezifischen Transduktionen eher durch eine Interaktion zwischen dem Targetplasmid und HPV16-unspezifischen Strukturen (z.B. Zelldebris) als durch eine Bindung an (teil-) assembliertes HPV16-Material (Kapsomere, Intermediate, VLPs) erfolgt.

## 5.5 Sedimentationsverhalten von VLPs im Saccharosegradienten

Die Vermutung, dass es sich bei den für die unspezifischen Transduktionen verantwortlichen Strukturen möglicherweise um in Zelldebris oder VLP-Aggregate inkorporierte Targetplasmid-DNA handelte, führte zu der Frage, in wie fern eine Eliminierung bzw. Separation dieser Kontaminanten möglich ist. Die diesbezügliche Methoden-

analyse früherer Arbeiten ergab, dass für einen solchen Versuchsansatz vermehrt auf die Dichtezentrifugation zurückgegriffen wurde. Die verwendete Zentrifugationsmatrix erstreckte sich dabei von ionischem Cäsiumchlorid (CsCl) über nicht-ionische Saccharose bis hin zur Verwendung von Iodixanol (Kirnbauer, Taub et al. 1993; Müller, Zhou et al. 1997; McCarthy, White et al. 1998; Christensen, Cladel et al. 2001; Biemelt, Sonnewald et al. 2003; Buck, Pastrana et al. 2004). Bei Iodixanol handelt es sich um eine iodierte Dihexanol-Verbindung, die ursprünglich für die Applikation injizierbarer Röntgen-Kontrastmittel entwickelt wurde. Es ist eine nicht-ionische Substanz, die einerseits wenige osmotisch wirksame Anteile besitzt und andererseits bei einer Konzentration von unter 30% keine toxischen Effekte auf Zellen ausübt (Andersen, Vik et al. 1995).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Sedimentationsanalyse von VLPs wurde von der Verwendung von CsCl abgesehen, weil bekannt war, dass CsCl (vermutlich aufgrund seiner starken ionischen Eigenschaften) zur Einbuße der Infektiosität von VLPs führen kann (Buck, Pastrana et al. 2004). Bei anderen Arbeiten konnte beobachtet werden, dass die Aufreinigung von HPV16 VLPs – im Gegensatz zu BPV1 VLPs – mittels Iodixanolgradienten zu einem über 97%-igen Verlust des eingesetzten Virusmaterials führt (Mitteilung Dr. Buck, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, U.S.A.). Da Saccharosegradienten neben ihrem nicht-ionischen Charakter die Möglichkeit zur Separation aller Assemblierungsstufen von HPV16 VLPs bieten (Leder 2003), wurde diese Technik in dieser Arbeit verwendet. Die Analyse der Saccharosefraktionen erfolgte in einem ELISA, mit dem verschiedene konformationsspezifische Assemblierungsstufen identifiziert und quantifiziert werden konnten: Während die Aufreinigung von partikulärem Material aus 293T Zellen in der Dichtezentrifugation möglich war, führte der Einsatz der in geringen Mengen vorliegenden Kapsidproteine aus 293- oder Cos-Zellen zu einem totalen Verlust dieser Proteine (4.5.2.2.3.2).

In Abhängigkeit der verwendeten Saccharosekonzentrationsspanne und der Anzahl an Fraktionen wurde ein unter der Verwendung der Basiskomponenten (HPV16 L1, L2 und Targetplasmid; 293T-Zellen) reproduzierbarer Peak in den Fraktionen 1-3 identifiziert (hypothetische PV), der dem folgenden VLP-Peak (Fraktionen 4-6) direkt vorgelagert war (4.5.2). Des Weiteren wurden freie Kapsomere am Ende des Sedimentationsprofils identifiziert (Fraktionen 14-16). Außerdem ließ sich eine weitere, dem Kapsomer- und VLP-Peak zwischengelagerte Gruppierung identifizieren (Fraktionen 11-13), die L1 konformationsspezifische Epitope aufwies. Die Position der in den Sedimentationsprofilen nachgewiesenen Gruppierungen variierte in Abhängig-

keit des Refraktionsindex um 1-2 Fraktionen und entspricht damit Beobachtungen aus vergleichbaren Untersuchungen (Buck, Pastrana et al. 2004).

Die Gruppierungen der hypothetischen PVs, VLPs, Intermediate und Kapsomere wurden im Elektronenmikroskop näher untersucht. Diese Analysen ergaben, dass sowohl der VLP-Peak als auch der hypothetische PV-Peak intakte Kapsidstrukturen beinhaltet. Der Peak, in dem Intermediate enthalten waren, zeigte keine partikulären Strukturen, sondern im Vergleich zu VLPs etwa halb so große Aggregate. Noch kleinere Bestandteile wurden bei der elektronenmikroskopischen Analyse des Kapsomerpeaks identifiziert, die zusätzlich auch mit mutmaßlichem Zelldebris angereichert waren.

VLP-Aufreinigungsarbeiten mittels CsCl-Gradienten zeigten, dass leere VLPs gegenüber verpackten Pseudovirionen eine geringere Dichte aufwiesen (Zhou, Stenzel et al. 1993). Daraus folgernd kann darüber spekuliert werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit beobachteten Peaks in den Saccharosefraktionen 1-3 um Pseudovirionen handelt, in denen – im Gegensatz zu den Bestandteilen des VLP-Peaks – Targetplasmide verpackt sind. Des Weiteren kann von den oben beschriebenen Beobachtungen davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Intermediatenpeak um Assemblierungs-Zwischenstufen vom Status der Kapsomere zum vollständig assemblierten VLP oder um Aggregate aus Kapsomeren handeln könnte. Erstmalige Hinweise zu solchen Intermediaten nach Dichtezentrifugation wurden erst kürzlich bei anderen Assemblierungsstudien von HPV16 L1-VLPs (Leder 2003) beschrieben. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Entstehung dieses Peaks unabhängig von der Koexpression des L2 möglich ist. Für Papillomaviren sind solche Intermediate aber ansonsten noch nicht beschrieben worden. Für Polyomaviren indes gilt die Existenz solcher Zwischenstufen als sicher (Yuen and Consigli 1985). Sonstige, verkleinerte VLP-Strukturen wurden im Zusammenhang bestimmter HPV16 L1 Mutanten beschrieben. Diese als „small VLPs“ bezeichneten Partikel besitzen eine andere Symmetrie ( $T=1$ ), bestehen aus 12 Kapsomeren und haben einen Durchmesser von ca. 30nm (Chen, Garcea et al. 2000).

Denkbar ist außerdem, dass es sich bei diesem zwischengelagerten Peak um Nebenprodukte artifizierlicher Art handelt, die während der Kapsidbildung entstehen könnten. Dass die Kapsidproteine nicht nur theoretisch zur Bildung solcher Nebenprodukten führen könnten, zeigten Arbeiten mit L1-Mutanten (Florin, Sapp et al. 2002), in denen beobachtet werden konnte, dass eine zytosolisch lokalisierte L1 Mutante (die keine Kapside bildet) mit L2 im Zytoplasma komplexiert und in den Nukleus wandern kann. Im Kontext des HPV16 L1 und L2 konnten Kapsidbildungsnebenprodukte als irregulär kleine Kapside beschrieben werden (Zhou, Sun et al. 1991a; Sasagawa,

Pushko et al. 1995). Elektronenmikroskopische Untersuchungen *in situ* konnten die Existenz solcher Nebenprodukte nicht bestätigen.

Die hypothetischen Pseudovirionen-Fractionen aus den Saccharosegradienten wurden vor den Infektionsversuchen zur Vermeidung osmotischer Effekte gegenüber den Zellen gegen physiologische Puffer dialysiert. Danach wurde versucht, eine Transduktion des Targetplasmids in Zellen zu erreichen. Es musste allerdings festgestellt werden, dass eine Übertragung des Targetplasmids unter Verwendung dieser Fractionen nicht möglich war (4.5.2.1.2). Die ausbleibende Infektion der Zellen sowie die ausbleibende Expression des Targetplasmids ist evtl. darauf zurück zu führen, dass das Reaktionsvolumen während des Infektionsvorgangs zu groß und die Partikelausbeuten nach der Dichtezentrifugation zu gering waren. Da die Erhöhung der Partikelausbeuten im Vordergrund stand, wurde versucht, die Ausbeute des hypothetischen PV-Peaks durch verschiedene Modifikationen des Herstellungsprotokolls zu erhöhen. So wurde die Ausbeute der PV- und VLP-Gruppierungen in Abhängigkeit von verschiedenen Zellaufschlussmethoden untersucht (4.5.2.2.3). In diesbezüglichen Sedimentationsanalysen konnte beobachtet werden, dass Frier-Tau-Zyklen zur Aufreinigung des hypothetischen PV- und VLP-Materials mittels Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten nicht geeignet sind. Als gleichwertig stellten sich dagegen die Aufschlussmethoden mit Ultraschall bzw. Apoptose heraus. Eine Erhöhung der Ausbeuten schien jedoch unter den vorliegenden Bedingungen nicht weiter realisierbar.

Daher wurde untersucht, in wie weit Modifikationen des Transfektionsprotokolls zu einer Erhöhung der Partikelausbeuten nach Saccharoseaufreinigung führen könnten. Wie bereits unter 5.2.1 erläutert, konnten viele Studien dem zu verpackenden Genom eine wichtige Rolle beim Kapsidbildungsprozess nachweisen. Daher wurde untersucht, in wie weit die Menge des transfizierten Targetplasmids Auswirkungen auf die Ausbeute an partikulärem Material besitzen würde. Unter Verwendung des in dieser Arbeit verwendeten 8kb-Targetplasmids konnte beobachtet werden, dass der Einsatz von verschiedenen Targetplasmidmengen zu unterschiedlichen Partikelausbeuten führt (4.5.2.2.2.1).

Da L2 im vollständig assemblierten Viruskapsid nicht in gleichen Mengen wie L1 vorliegt (Modrow 2003), scheint ein Kontrollmechanismus zur beabsichtigten, quantitativ differenzierten Expression des L2 wahrscheinlich. Daher wurde untersucht, in wie fern sich eine Änderung des Mengen-Verhältnisses der transfizierten HPV16 L1- und L2-Gene auf die Ausbeute partikulärer Strukturen auswirken würde (4.5.2.2.2.2). Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Reduktion der transfizierten L2-Expressionsplasmidmenge um 25-50% eine signifikant erhöhte Ausbeute der VLP-

und PV-Fractionen nach Dichtezentrifugation zur Folge hatte. Davon ausgehend kann nicht ausgeschlossen werden, dass zu hohe Mengen an L2 die Assemblierung von Partikeln inhibieren.

Die durch diese Optimierungen erzielte Erhöhung der partikulären Ausbeuten führte allerdings nach wie vor zu keinen erfolgreichen Infektionen. Daher kann es sein, dass der Grund für die ausbleibende Transduktion entweder darin begründet ist, dass Saccharose – ebenso wie CsCl – zur Eliminierung der Infektiosität von Virionen beitragen kann oder dass durch andere Vorgänge der Anteil der potentiell infektiösen Partikel soweit reduziert wurde, dass eine Infektion nicht mehr nachweisbar ist. Unbeantwortet blieb dabei die Frage, warum selbst mit allen im Saccharosegradienten erzielten Fraktionen keine Transduktionen mehr durchführbar waren. Um sicherzustellen, dass die in den vorgeklärten Zellextrakten enthaltene Targetplasmid-DNA auch nach Dichtezentrifugation noch vorhanden ist, müsste zukünftig ein Nachweis spezifischer Nukleinsäuren mittels PCR erfolgen.

Warum keine Infektion nach Dichtezentrifugation beobachtet werden konnte ist vielleicht auch darin begründet, dass es im Gegensatz zu einer erfolgreichen Internalisierung nur zu einer Bindung der VLPs bzw. PVs an die Rezeptoren der Zelle gekommen ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, in denen Gewebsschnitte nach unterschiedlich langer Infektionsdauer angefertigt würden, könnten zur Klärung dieser Möglichkeit beitragen.

### **5.6 Einfluss von E1 und E2 auf die Replikation des Targetplasmids und die Verpackung von VLPs**

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Verpackung des Targetplasmids in VLPs mittels Kotransfektion von E1 und/oder E2 zu erreichen (4.3.5.1). Die in der UTR des Targetplasmids enthaltenen Bindungsstellen für E1 und E2 sollten sich dabei begünstigend auf die Replikation des Plasmids und die Wechselwirkung mit den Strukturproteinen auswirken. Eine messbare Erhöhung der Menge an konformationsspezifischen Partikeln konnte jedoch bei Kotransfektion von E1 und/oder E2 nicht festgestellt werden. Auch andere Untersuchungen ergaben, dass E2 nicht unbedingt für die Assemblierung und Verpackung von Papillomaviren benötigt wird. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise BPV1, HPV33 und HPV18 unabhängig von E2 generiert werden können (Unckell, Streeck et al. 1997; Stauffer, Raj et al. 1998; Buck, Pastrana et al. 2004). Obwohl die Versuche von Stauffer et al. den Effekt von E2 nicht direkt untersuchten, konnte in der Arbeit von Unckell et al. das mittels VV überexprimierte E2 zu keiner erhöhten Pseudovirionen-Ausbeute führen. Untersuchungen mit isogenetischen Zell-Linien ergaben, dass HPV16 E2 keinen Effekt auf

die Transkription episomaler Virus-DNA ausübt und dass Chromatin-Strukturen die Sensitivität von Promotoren gegenüber E2 bestimmen (Bechtold, Beard et al. 2003). Diesen Untersuchungen stehen jedoch andere Analysen gegenüber, die auf die Notwendigkeit von E2 bei der Assemblierung und Verpackung von Papillomaviren hinweisen: Studien in VV- bzw. Bakulo-Überexpressions-Systemen ergaben, dass die Produktion von BPV1 durch die Ko-Expression von E2 verstärkt werden kann (Zhao, Hengst et al. 2000). Weiter zurück liegende Untersuchungen zeigten, dass E2 einerseits mehrere Stellen des viralen Genoms sehr stark binden und somit zu einer verbesserten Verpackung beitragen kann (Androphy, Lowy et al. 1987; Li, Knight et al. 1989; Hegde 2002) und andererseits in Abhängigkeit von L2 in PODs angereichert wird (Day, Roden et al. 1998). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass weder einzelne Strukturproteine noch assemblierte VLPs das virale Genom sequenzspezifisch binden können (Mallon, Wojciechowicz et al. 1987; Zhou, Sun et al. 1994), wird vermutet, dass E2 durch nukleäre Interaktionen die effektive Zusammenführung von L1, L2 sowie dem zu verpackendem Genom zu einem infektiösem Virion katalysiert. Beobachtungen, dass infektiöse Virionen aus Rinderwarzen kein E2 beinhalten, untermauern die Theorie eines indirekt wirkenden, aber für den Verpackungs- und Assemblierungsprozess essentiellen E2 (Day, Roden et al. 1998).

Die in den vorliegenden Ergebnissen tatsächlich gemessene Verringerung der VLP-Ausbeute könnte nicht durch E1- oder E2-spezifische Effekte, sondern durch die erhöhte Anzahl der in diesem Fall kotransfizierten Plasmide zu erklären sein, die zu einer verminderten Transfektionseffizienz und somit zu einer verringerten VLP-Ausbeute geführt haben könnte. Eine weitere Erklärung für die nicht messbaren Auswirkungen des E2 könnte aber auch darin begründet liegen, dass bereits die Expression des großen T-Antigens des SV40 die Funktion des E2 übernimmt (siehe auch 5.7, S.120). Auch für E1 konnte eine hohe sequenzielle und funktionelle Homologie zum großen T-Antigen (T-Ag) des SV40 nachgewiesen werden (Clertant and Seif 1984; Mansky, Batiza et al. 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse schließen die Verpackungs- und Assemblierungs-relevante Funktion von E2 in terminal differenzierten Zellen nicht aus, könnten aber auf einen E2 unabhängigen *in vitro* (und vielleicht auch *in vivo*) Assemblierungsmechanismus hinweisen.

## **5.7 Verbesserung der Kapsidbildung durch Verwendung des Replikationsursprungs und T-Antigens von SV40**

Manche der bisher im Rahmen der Synthese und DNA-Verpackung von Papillomavirus-Pseudovirionen durchgeführten Untersuchungen verwendeten einerseits Verpa-

ckungsplasmide, die den Replikationsursprung des SV40 beinhalten, und andererseits Zellen, die das große T-Ag des SV40 exprimieren (Unckell, Streeck et al. 1997). Durch diese Vorgehensweise sollte sichergestellt werden, dass es auf der einen Seite zu einer hohen *Replikationsrate* des Verpackungsplasmids und auf der anderen Seite zu einer möglichst hohen *Verpackungsrate* der überschüssigen Plasmid-DNA in Pseudovirionen kommt. Wie bereits erwähnt, wurde daher im vorliegenden System der „SV40-Ori“ in das Targetplasmid eingesetzt. Im Zusammenhang mit VLP-Assemblierungs- und Verpackungsanalysen in 293T Zellen, die das T-Ag des SV40 nachweislich exprimierten (4.5.2.2.3.1), konnte jedoch keine Replikation des Targetplasmids beobachtet werden (4.3.3). Da die Verpackung von bakteriell hergestellter Plasmid DNA jedoch unabhängig von der Replikation erfolgen kann (Stauffer, Raj et al. 1998; Buck, Pastrana et al. 2004), wurden die Kapsidbildungs- und Verpackungsanalysen fortgesetzt. Der Nachweis, ob es tatsächlich zu einer Interaktion zwischen dem nicht-replizierten Targetplasmid und den überexprimierten Kapsidproteinen kommt, könnte in zukünftigen Versuchen mittels Southwestern-Blot-Analytik (Moreland, Montross et al. 1991; Li, Cripe et al. 1997; Touze, Mahe et al. 2000) festgestellt werden.

In Experimenten zur Funktionsweise des T-Ag wurde entdeckt, dass es in 293T Zellen aufgrund von Spleißvorgängen, die die mRNA Synthese des *kleinen* t-Antigens begünstigen, nur in geringen Mengen exprimiert wird (Fu and Manley 1987; Cole 2001). Diese Theorie würde die Beobachtung in dieser Arbeit erklären, warum keine Replikation des Targetplasmids gemessen werden konnte. Im Widerspruch dazu stehen allerdings Immunfluoreszenz-Untersuchungen, in denen sowohl bei 293T als auch bei T-Ag-überexprimierenden 293TT Zellen (Buck, Pastrana et al. 2004) eine hohe Expression des T-Ag nachgewiesen werden konnte. Außerdem führte die zusätzliche Transfektion eines separaten T-Ag Expressionsplasmides nicht zu einer indirekten Erhöhung der VLP-Ausbeute. Ausgehend von diesen Beobachtungen könnte es aber auch sein, dass erst bestimmte Mengen an T-Ag exprimiert werden müssen, bevor es zu einer funktionellen Replikation des Targetplasmids kommt.

Eine interessante Hypothese besteht darin, dass das nicht-strukturelle, große Antigen des SV40 in Bezug auf dessen Rolle beim Verpackungs- und Assemblierungsprozess funktionelle Analogien gegenüber E2 besitzt (Day, Roden et al. 1998; Stauffer, Raj et al. 1998): Das T-Antigen ist ein Transkriptions- bzw. Replikationsfaktor, der einerseits das virale Genom binden und andererseits mit PODs assoziieren kann (Jiang, Szekely et al. 1996). Ein für die DNA-Verpackung notwendiges Signal, das auf dem Genom des SV40 lokalisiert ist, konnte auch im Kontext papillomaviraler DNA identifiziert werden; dieser DNA-Abschnitt enthält die T-Antigen bindenden Stel-

len (Oppenheim, Sandalon et al. 1992). Der in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linie 293T konnte die stabile Expression des T-Ag mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (4.5.2.2.3.1). Zusammen genommen mit den zuvor beschriebenen Entdeckungen könnte somit erklärt werden, warum in der vorliegenden Arbeit kein E2-Effekt bezüglich der VLP-Ausbeute gemessen werden konnte (siehe 5.6).

Es kann weiterhin darüber spekuliert werden, dass es im SV40 Ori des verwendeten Targetplasmids zu einer Mutation gekommen ist, die die Funktionstüchtigkeit des Ori einschränkt und dazu führt, dass das Targetplasmid nicht repliziert wird. Diesbezüglich könnten Sequenzanalysen der entsprechenden Region auf dem Targetplasmid einen wichtigen Beitrag zur Beantwortung dieser Hypothese leisten.

### **5.8 Verlust von VLPs während den Präparations- und Aufreinigungszyklen**

Ein generelles Problem bei der Bearbeitung der vorliegenden Arbeit war die kurzfristige Haltbarkeit der Virus-ähnlichen Partikel. Dieses Problem tauchte auch bei anderen Projekten auf, die sich mit anderen Analysen von Virus-ähnlichen Materialien beschäftigten (persönliche Mitteilungen Dr. Leder, B. Aengeneyndt, T. Peiler, Dr.Schenck, DKFZ-Heidelberg). Damit bei allen anfallenden Untersuchungen im Rahmen der Assemblierungs- und Verpackungsanalysen von VLPs mit dem selben Ausgangsmaterial gearbeitet werden konnte, musste die Lösung, in der die VLPs extrahiert bzw. gelagert werden, chemisch möglichst optimal zusammengesetzt sein. Da aber schätzungsweise mehr als 70% der ursprünglich im Western-Blot oder ELISA nachgewiesenen L1 und L2 Proteine nach bereits 3 Wochen Lagerung nicht mehr nachgewiesen werden konnten, musste vom Zeitpunkt der Zellernte nach Transfektion an eine möglichst ununterbrochene Durchführung aller notwendigen Testverfahren erfolgen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es bereits nach wenigen Tagen zu Verlusten des konformationsspezifischen viralen Materials kommt. Ein besonders hoher Verlust von partikulärem Material war nach Durchführung der Dichtezentrifugation im Saccharosegradienten zu verzeichnen. In den resultierenden Sedimentationsprofilen konnten unerwartet hohe Anteile an Kapsomeren Strukturen bestimmt werden, währenddessen die Ausbeuten an VLP- und den hypothetischen PV-Fractionen relativ gering ausfielen. Versuche, die im ELISA nachgewiesenen Fractionen in speziell dafür vorgesehenen Konzentratoren aufzukonzentrieren, führten außerdem zu der Beobachtung, dass nach erfolgter Zentrifugation der zu konzentrierenden Lösung keine L1 konformationsspezifischen Strukturen mehr nachweisbar waren. Dies legte die Vermutung nahe, dass die partikulären Strukturen entweder in einem die Degeneration von konformationsspezifischen Material för-

dernden Puffer gelöst waren oder dass es zu unspezifischen Bindungen des partikulären Materials an die Oberflächen der verwendeten Reaktionsgefäße gekommen sein musste.

Frühere Studien, die sich mit der Assemblierung und Disassemblierung von BPV Virionen beschäftigt haben, wiesen auf eine Rolle von Kalzium zur Stabilisierung von VLPs hin (Paintsil, Muller et al. 1998). Ein wichtiges Ergebnis dieser Studien bestand allerdings auch darin, dass Virionen, die durch Kalzium induzierte Reassemblierung von Kapsomeren entstanden sind, eine um 500-fach geringere Infektiosität aufweisen als die Kontrollgruppe. Ebenso ist bekannt, dass VLPs bei geringer ionischer Stringenz bis zu dem Punkt aggregieren, an dem sie in der Lösung präzipitieren (Volkin 2002). Dass hoch aggregierte HPV11 VLPs eine sehr schlechte in vitro Antigenität besitzen, ist im Rückschluss ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der richtigen Pufferzusammensetzung. Studien zur intermolekularen Wechselwirkung zwischen HPV33 L1 und L2 zeigten, dass sich das Assoziationsverhalten von L2 in Abhängigkeit von NaCl-Konzentrationen verändern kann (Sapp, Volpers et al. 1995). In der Literatur werden zur Vermeidung von VLP-Aggregaten außer der Verwendung von NaCl-Konzentrationen im Bereich zwischen 150mM und 1M keine besonderen Bedingungen zur längeren Haltbarkeit von VLPs propagiert (Sasagawa, Pushko et al. 1995; Meyers, Mayer et al. 1997; McCarthy, White et al. 1998; Finnen, Erickson et al. 2003).

Bei der Aufarbeitung von VLPs aus Zellsedimenten nach Transfektion wurde der in dieser Arbeit verwendete VLP-Extraktionspuffer mit einmolarer NaCl-Konzentration (2.4.6) sowohl für die Extraktion der VLPs aus Zellen als auch zur Langzeitlagerung verwendet.

Publizierte Protokolle zur Aufreinigung von VLPs mittels Dichtezentrifugation verwendeten Cäsiumchlorid (CsCl), Iodixanol oder Saccharose als Zentrifugationsmatrix (Kirnbauer, Taub et al. 1993; Muller, Zhou et al. 1997; Christensen, Cladel et al. 2001; Biemelt, Sonnewald et al. 2003; Buck, Pastrana et al. 2004). Aus den bereits unter 5.5 erwähnten Gründen wurden in dieser Arbeit Dichtezentrifugations-Analysen mittels Saccharosegradienten durchgeführt. Die aus den Saccharosegradienten erzielten Partikelfractionen wurden in den jeweiligen Fraktionsgefäßen bei 4°C gelagert, so dass die in anderen Arbeiten bereits bei Raumtemperatur gemessene Degeneration von VLPs ausgeschlossen werden konnte. Daher wurde darüber spekuliert, dass der Verlust der VLPs möglicherweise durch die Verwendung des in der Präparation verwendeten (polypropylenhaltigen) Gefäß-Materials zustande kam. Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde dieser Hypothese aber nicht weiter nachgegangen. Eine äußerst interessante Studie zum Verlust von VLPs in Abhän-

gigkeit der verwendeten Puffer und Gefäßmaterialien wurde erst kürzlich öffentlich (Volkin 2002). In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Extraktion und Lagerung von VLPs in polypropylenhaltigen Reaktionsgefäßen nur in Ammoniumsulfatpuffern in Kombination mit bestimmten, nicht-ionischen Tensiden (50mM MOPS, pH7.0, 0,4M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Tween80) zu sehr geringen Verlusten von VLPs führt. Der Verlust von VLPs unter der Verwendung von NaCl-Puffern, die der Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten sehr nahe kommen, konnte von Volkin et al. nur durch den Einsatz von Polystyrol-haltigen Materialien vermindert werden. Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeiten ist, dass die Verwendung von Standard-Dialysemembranen zu einem 50-60%-igen Verlust von HPV11 VLPs führten. Unter der Voraussetzung, dass das Oberflächenbindungsverhalten von HPV16 VLPs dem der HPV11 VLPs gleicht, kann folgender Zusammenhang von großer Bedeutung sein: Bevor die in dieser Arbeit verwendeten Fraktionen der Saccharosegradienten bei Infektionsversuchen mit Lac-Z negativen Zellen eingesetzt wurden, erfolgte zur Vermeidung osmotischer Effekte eine Dialyse gegen PBS. Unter der auf den ELISA Ergebnissen basierenden Annahme einer geringen Anzahl an infektiösem Material in den jeweiligen Fraktionen, könnte es durch unspezifische Bindungen von VLPs an die Dialysemembran zu einem hohen Verlust des viralen Materials gekommen sein. Damit könnte die Beobachtung erklärt werden, warum im Fortgang dieser Versuche keine erfolgreichen Transduktionen des Targetplasmids erreicht werden konnten.

Außerdem konnte in den von Volkin et al. durchgeführten Untersuchungen neben der Konzentration der VLPs in Lösung ein Flächen/Volumen-Verhältnis des VLP-Lösungsbehältnisses als kritischer Faktor beim Titerverlust von VLPs bestimmt werden. Unter der Einhaltung der in diesen Untersuchungen getroffenen Erkenntnisse beschreiben die Autoren eine VLP-Haltbarkeit von bis zu 2 Jahren.

Zusammen betrachtet ist es wahrscheinlich, dass viel höhere VLP- und vielleicht auch hypothetische PV-Anteile nach Dichtezentrifugation unter Verwendung der oben genannten Puffer und Materialien bestimmt werden können. Die Gefahr des Verlustes von VLPs durch den Dialyseprozess kann möglicherweise durch die drei folgenden Verbesserungen reduziert werden:

1. Verwendung von Dialyseschläuchen geeigneten Materials (s.o.)
2. Einsatz von Polystyrol-haltigen Reaktionsgefäßen
3. Verwendung von Polystyrol-haltigen Konzentratoren, in denen die VLP-Lösung nur kleinen Dialysemembranflächen ausgesetzt sind

Der Ansatz einer möglichst zellphysiologisch orientierten, chemischen Nachbehandlung der Dialysemembranen könnte zudem evtl. noch adsorbierte VLPs wieder in Lösung bringen.

## 5.9 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Herstellung von infektiösen HPV16 VLPs auf Basis humanisierter L1-, L2-Gene sowie eines Verpackungsplasmids werfen zahlreiche neue Fragen auf. Im Rahmen der Entwicklung eines effizienten Produktionssystems für HPV16 Pseudovirionen stellt sich insbesondere die Frage, in wie fern eine Erhöhung der Produktionseffizienz sowie die Minimierung von Präparations-bedingten Verlusten an Virusmaterial zu spezifischen Infektionsereignissen führen kann.

Die Fähigkeit zur Infektion könnte die unter einfachen Zellkulturbedingungen hergestellten Pseudovirionen zu einem äußerst nützlichen Mittel bei der Analyse von Virusaufnahme- bzw. Virusprozessierungs-Vorgängen sein. Hochtitrige Pseudovirionen-Stocks könnten beispielsweise dazu benutzt werden, neutralisierende Antikörper gegen Papillomaviren zu identifizieren und zu charakterisieren. Außerdem könnte erforscht werden, in wie fern geringe Modifikationen am genetischen viralen Material zu Änderungen im Infektionsverhalten der HPV16 führen können. Große Mengen infektiöser Pseudovirionen könnten zudem ein Screening nach potentiellen Rezeptormolekülen des zellulären Apparates ermöglichen, die bei der Bindungs- und Internalisierungsphase der Viren durch die Zelle beteiligt sind. Aber auch im Bezug auf die Entwicklung prophylaktischer Therapieansätze könnten hochtitrige Pseudovirionen einen wichtigen Beitrag leisten: So wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass Immunantworten durch die Wechselwirkung von L1-Kapsiden mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Dendritischen Zellen) beeinflusst werden können (Lenz, Day et al. 2001; Rudolf 2001). Außerdem wurde bei Pseudovirionen beobachtet, dass sie potente Induktoren von Schleimhautbezogener und systemischer Immunität sind (Shi, Liu et al. 2001). Aktuelle klinische Studien, die sich mit der Immunisierung von HPV16 VLPs beschäftigen, scheinen zu einem Durchbruch in der prophylaktischen Immunisierung zu führen (Koutsky, Ault et al. 2002). In der Weiterentwicklung dieser viel versprechenden Ansätze wäre die Etablierung von Kombinationsimpfstoffen interessant, in denen infektiöse Pseudovirionen als Transportmittel für bereits entwickelte Vakzinen, Schlüssel-Proteine anderer Krankheitserreger oder sonstiger Stoffklassen dienen könnten. Die Beantwortung daraus resultierender Fragen wie die nach der Kapazitätsgrenze solcher Kombinationsvakzinen oder nach der Verpackungs-modulierenden DNA-Größe von Plasmiden machen die Weiterverfol-

gung dieses Themas spannend und können zur Machbarkeit dieser Ansätze beitragen.

Der in dieser Arbeit unter standardisierten Zellkulturbedingungen entwickelte Ansatz zur Produktion von VLPs durch kodon-optimierte Strukturgene ist viel versprechend und kann einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Partikelassemblierungsprozesses leisten. Die Weiterverfolgung dieses Ansatzes, insbesondere die Gewinnung funktioneller Pseudovirionen durch weitere methodische Verbesserungen, könnte neben der Klärung von Prozessen bei und nach Virusaufnahme in die Zelle zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der Entwicklung von prophylaktischen Impfstoffvarianten führen.

## **6. Zusammenfassung**

Die weltweit verbreiteten Papillomaviren sind kleine unbehüllte DNA-Viren, die eine ausgeprägte Wirts- bzw. Gewebsspezifität besitzen und sich ausschließlich in den oberen Schichten von Haut- und Schleimhautepithelien vermehren. Die Infektion dieser Viren verläuft beim Menschen in der Regel inapparent, kann aber in Abhängigkeit vom Virustyp auch zur Entstehung der zweithäufigsten Krebsart bei Frauen – dem Zervixkarzinom – führen.

Das Virusgenom wird von mehreren Kopien der zwei Strukturproteine L1 und L2 eingeschlossen und bildet somit die infektiöse Einheit. Die genauen Abläufe beim Kapsidassemblierungs- und Verpackungsprozess sowie die Vorgänge bei der Aufnahme und Prozessierung der Viren sind noch weitgehend ungeklärt. Die Möglichkeit zur künstlichen Herstellung dieser Viren ist eine wichtige Voraussetzung zur Erforschung der zuvor genannten Prozesse, bei denen große Mengen an infektiösem Virusmaterial benötigt werden. Die Herstellung dieser Viren im Labor hat sich aber als kompliziert erwiesen, da die Expression der Strukturproteine sehr stark reguliert und eng mit dem Differenzierungsprogramm der Zelle verknüpft ist. Bis heute wurde eine Vielzahl an Produktionssystemen entwickelt, deren Nachteile v.a. durch geringe Ausbeuten, hohen technischen Aufwand oder durch unkontrollierbare Beeinflussungen des zellulären Programms gekennzeichnet sind. Die Modifikation bestimmter Kodons der späten Gene erwies sich im Vorfeld dieser Arbeit als ein entscheidendes Werkzeug zur Durchbrechung der strikten Expressionsregulation.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, in wie fern und in welchen Mengen die Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln in einfachen Zellkultursystemen unter Verwendung der kodon-optimierten Strukturgene möglich ist. Ein einfaches und zügig durchführbares Verfahren zur Herstellung von humanisierten VLPs in Säugetierzellen konnte im Folgenden entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die VLPs am besten in 293T Zellen durch Kotransfektion herzustellen sind und dass die Menge der transfizierten Einzelkomponenten (hL1, hL2 und Verpackungsplasmid) zueinander entscheidende Auswirkungen auf die zu erwartende Gesamtmenge an VLPs besitzen. Die zusätzliche Transfektion von E1 oder E2, die bezgl. ihrer Beteiligung am Assemblierungs- und Verpackungsprozess für Papillomaviren zur Diskussion stehen, konnte unter den verwendeten Bedingungen keinen Beitrag zur Effizienzsteigerung des Produktionssystems leisten.

Die reproduzierbaren VLP-Ausbeuten konnten mit Hilfe eines bereits entwickelten ELISA-Systems („capture-ELISA“) quantifiziert und mit Standardproduktionstechniken verglichen werden. Daneben stellte sich heraus, dass im Rahmen von Sedimentationsanalysen im Saccharosegradienten insgesamt betrachtet Apoptose oder/und Ultraschall die am besten geeigneten Zellaufschlussmethoden sind, wenngleich Frier/Tau-Zyklen die effektivste Herauslösung von Strukturproteinen aus Zellen bewirken konnten. Weiterhin wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Verwendung von vorgeklärtem Zell-Lysat in Infektionsexperimenten unter der Beachtung korrekter Kontrollen lediglich zu unspezifischen Transduktionen des verpackten Plasmids führt. Schließlich konnte auch die Inkubation von virusneutralisierenden Antikörpern die unspezifische Transduktion der verpackten (Reporter-) DNA nicht beeinflussen, wodurch eine Beteiligung von kapsidartigen Strukturen beim beobachteten Transduktionsprozess ausgeschlossen werden konnte.

Im zweiten Teil wurde verfolgt, in wie fern eine weitere Aufreinigung der Zell-Lysate von Nöten ist, um die möglicherweise für die unspezifische Transduktion verantwortliche – DNase bzw. RNase resistente – DNA zu eliminieren. Durch den Einsatz von Sedimentationsanalysen konnten somit voneinander unterscheidbare, morphologische Assemblierungsgruppen identifiziert und quantifiziert werden. Es konnten Kapsomer-, Intermediaten- und VLP-Fraktionen identifiziert und visualisiert werden. Außerdem konnte eine zusätzliche, bisher unbeobachtete Fraktion ermittelt werden, die der VLP-Fraktion stets vorgelagert war. Dabei könnte es sich möglicherweise um Fraktionen handeln, in denen VLPs enthalten sind, in die das eingesetzte Targetplasmid verpackt ist (PVs). Der Nachweis von konformationsspezifischen Eigenschaften dieser Fraktion(en) konnte mittels ELISA bestätigt werden. Weder die Aufkonzentrierung dieser hypothetischen PVs noch die erfolgreiche Transduktion von Zellen mit diesen Fraktionen konnte bisher erzielt werden.

Der in dieser Arbeit unter standardisierten Zellkulturbedingungen entwickelte Ansatz zur Produktion von VLPs durch kodon-optimierte Strukturgene ist viel versprechend und könnte einen wichtigen Beitrag bei der Erforschung des Partikelassemblierungsprozesses leisten. Auch die bisher noch nicht gelungene Herstellung funktioneller Pseudovirionen könnte sich durch weitere methodische Verbesserungen zu einem wichtigen Mittel zur Klärung der Prozesse bei und nach Virusaufnahme in die Zelle entwickeln.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### A

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AB	„ <i>apoptotic bodies</i> “
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-di-(3 ethylbenzthiazolinsulfatige Säure)
Ad	Adenovirus
AIN	anale intraepitheliale Neoplasie
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATTC	American Type Culture Collection
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)

### B

BPV	Bovines Papillomavirus
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bp (Bp)	Basenpaare
BV	Bakulovirus
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise

### C

cDNA	komplementäre DNA zur mRNA
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie ( <i>cervical intraepithelial neoplasia</i> )
CIP	<i>Calf Intestine alkaline Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
COPV	<i>Canine oral papillomavirus</i>
CRPV	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>
Cy3	Indocarbocyanin
CX	Karzinom(e)

### D

d	Durchmesser
dIF	direkte Immunfluoreszenz
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxribonuklease

### E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskop(ie)
EtBr	Ethidiumbromid
<b>F</b>	
FCS	Serum fötaler Kälber ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fr.	Fraktion
<b>G</b>	
GC-Gehalt	Gehalt an Guanin und Cytosin
GU-Häufigkeit	Häufigkeit an Guanin und Uracil
<b>H</b>	
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	HPLC gereinigtes bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
HPV	humanpathogenes Papillomvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HSV	Herpes-simplex-Virus
<b>I</b>	
iIF	indirekte Immunfluoreszenz
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
<b>K</b>	
<i>kan</i>	Gen für Kanamycinresistenz
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<b>L</b>	
LB	<i>Luria Broth</i>
lsg.	Lösung
<b>M</b>	
m	Milli
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
<b>O</b>	
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
Ori	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )

**P**

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PML	<i>promonocytic leukemia protein</i>
POD	PML onkogene Domäne
PV	Pseudovirion
PVs	Pseudovirionen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>

**R**

rAAV	rekombiniertes Adeno-assoziiertes Virus
RI	Reinfektions(experiment)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RV	Retroviren

**S**

<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SB	Southern Blot
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
SFV	Semliki Forest Virus
snRNP	kleine nukleäre Ribonukleoproteinpartikel ( <i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i> )
SRV	Simian Retrovirus
StSp.	Staurosporin
SV40	Simian Virus Typ 40
SV40ori	Sequenz über Ursprung der Replikation ( <i>origin of replication</i> ) des SV40

**T**

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-Ag	SV40 T-Antigen
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin
Tris	Trios(hydroxymethyl)-aminomethan

**U**

ü/N	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
U	internationale Enzymeinheit der Aktivität ( <i>units</i> )

### V

v/v	Volumenprozent
VV	Vaccinia Virus
VIN	intraepitheliale Neoplasie der vulva
VLP	Virus ähnliches Partikel ( <i>virus like particle</i> )
VLPs	Virus ähnliche Partikel ( <i>virus like particles</i> )
vol.	Volumen

### W

WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/w	Gewichtsprozent

### X

X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
-------	---

## 8. Literaturverzeichnis

- Andersen, K. J., H. Vik, et al. (1995). "Effects of contrast media on renal epithelial cells in culture." *Acta Radiol Suppl* 399: 213-8.
- Andersson, M., J. Sjostrand, et al. (2000). "Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(9): 2623-32.
- Androphy, E. J., D. R. Lowy, et al. (1987). "Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA." *Nature* 325(6099): 70-3.
- Angeletti, P. C., K. Kim, et al. (2002). "Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Virol* 76(7): 3350-8.
- Arad, U. (1998). "Modified Hirt procedure for rapid purification of extrachromosomal DNA from mammalian cells." *Biotechniques* 24(5): 760-2.
- Baker, C. C. and P. M. Howley (1987). "Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues." *Embo J* 6(4): 1027-35.
- Baker, C. C. and J. S. Noe (1989). "Transcriptional termination between bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) early and late polyadenylation sites blocks late transcription in BPV-1-transformed cells." *J Virol* 63(8): 3529-34.
- Baker, T. S., W. W. Newcomb, et al. (1991). "Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction." *Biophys J* 60(6): 1445-56.
- Banerjee, S., E. Livanos, et al. (1995). "Therapeutic gene delivery in human B-lymphoblastoid cells by engineered non-transforming infectious Epstein-Barr virus." *Nat Med* 1(12): 1303-8.
- Bechtold, V., P. Beard, et al. (2003). "Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA." *J Virol* 77(3): 2021-8.
- Berkner, K. L. (1992). "Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors." *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 39-66.
- Biemelt, S., U. Sonnewald, et al. (2003). "Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants." *J Virol* 77(17): 9211-20.
- Blanton, R. A., M. D. Coltrera, et al. (1992). "Expression of the HPV16 E7 gene generates proliferation in stratified squamous cell cultures which is independent of endogenous p53 levels." *Cell Growth Differ* 3(11): 791-802.
- Bosch, F. X., M. M. Manos, et al. (1995). "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group." *J Natl Cancer Inst* 87(11): 796-802.
- Breitburd, F., R. Kirnbauer, et al. (1995). "Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection." *J Virol* 69(6): 3959-63.
- Buck, C. B., D. V. Pastrana, et al. (2004). "Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors." *J Virol* 78(2): 751-7.
- Burkhardt, A., Schlegel, R. (1989). "The oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes." *Virology* 170: 334-339.
- Chen, E. Y., P. M. Howley, et al. (1982). "The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome." *Nature* 299(5883): 529-34.
- 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.
- Cheng, S., D. C. Schmidt-Grimminger, et al. (1995). "Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes." *Genes Dev* 9(19): 2335-49.
- Chow, L. T. and T. R. Broker (1994). "Papillomavirus DNA replication." *Intervirol* 37(3-4): 150-8.
- 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., 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., 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.
- Clertant, P. and I. Seif (1984). "A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins?" *Nature* 311(5983): 276-9.

- Cohen, B. D., D. J. Goldstein, et al. (1993). "Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain." *J Virol* 67(9): 5303-11.
- Cole, C. N., and S.N. Conzen (2001). *Polymaviridae: the viruses and their replication. Fields virology, 4th ed.* D. M. K. P. M. Howley. Philadelphia, Pa., Lippincott Williams & Wilkins. 2: 2141-2174.
- Collier, B., D. Oberg, et al. (2002). "Specific inactivation of inhibitory sequences in the 5' end of the human papillomavirus type 16 L1 open reading frame results in production of high levels of L1 protein in human epithelial cells." *J Virol* 76(6): 2739-52.
- Cossart, Y. E., Thompson, C., Rose, B. (1995). *Genital warts. Human papillomavirus infections.* London, Boston, Melbourne, Auckland, Mindel, A.
- Cullen, B. R. and W. C. Greene (1989). "Regulatory pathways governing HIV-1 replication." *Cell* 58(3): 423-6.
- Da Silva, D. M., G. L. Eiben, et al. (2001). "Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments." *J Cell Physiol* 186(2): 169-82.
- Da Silva, D. M., M. P. Velders, et al. (2001a). "Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells." *Int Immunol* 13(5): 633-41.
- Danos, O. and R. C. Mulligan (1988). "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(17): 6460-4.
- 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 Villiers, E. (1994). *Human pathogenic papillomavirus types: an update.* 86 ed (H. zur Hausen, Ed.), pp. 1-12. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.
- Deml, L., A. Bojak, et al. (2001). "Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein." *J Virol* 75(22): 10991-1001.
- Desaintes, C., C. Demeret, et al. (1997). "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis." *Embo J* 16(3): 504-14.
- Desaintes, C., S. Goyat, et al. (1999). "Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells." *Oncogene* 18(32): 4538-45.
- DiMaio, D. and J. Settleman (1988). "Bovine papillomavirus mutant temperature sensitive for transformation, replication and transactivation." *Embo J* 7(4): 1197-204.
- 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.
- Duensing, S., Munger, K. (2001). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype." *Cancer Res.* 61: 2356-2360.
- Dyson, N., P. M. Howley, et al. (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* 243(4893): 934-7.
- Eiben, G. L., M. P. Velders, et al. (2002). "The cell-mediated immune response to human papillomavirus-induced cervical cancer: implications for immunotherapy." *Adv Cancer Res* 86: 113-48.
- 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.
- Fantini, J., D. G. Cook, et al. (1993). "Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2700-4.
- Favre, M., F. Breitburd, et al. (1977). "Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses." *J Virol* 21(3): 1205-9.
- Finnen, R. L., K. D. Erickson, et al. (2003). "Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins." *J Virol* 77(8): 4818-26.
- Fisher, K. J., K. Jooss, et al. (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." *Nat Med* 3(3): 306-12.
- Fligge, C., T. Giroglou, et al. (2001). "Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33." *Virology* 283(2): 353-7.
- Florin, L., C. Sapp, et al. (2002). "Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins." *J Virol* 76(19): 10009-14.
- Frattini, M. G., H. B. Lim, et al. (1997). "Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates." *J Virol* 71(9): 7068-72.
- 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.
- Fu, X. Y. and J. L. Manley (1987). "Factors influencing alternative splice site utilization in vivo." Mol Cell Biol 7(2): 738-48.
- Gillison, M. L., Shah, K. (2001). "Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers." Curr. Opin. Oncol. 13: 183-188.
- Gissmann, L. (1992). "Human papillomaviruses and genital cancer." Semin Cancer Biol 3(5): 253-61.
- Gissmann, L. (2001). "[Possibilities of vaccination against HPV infections in cervix carcinoma]." Zentralbl Gynakol 123(5): 299-301.
- 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.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K.U., Iftner, T. (1996). "Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA." J Virol 70: 2339-2349.
- Grimm, D., A. Kern, et al. (1998). "Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors." Hum Gene Ther 9(18): 2745-60.
- Haas, J., E. C. Park, et al. (1996). "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein." Curr Biol 6(3): 315-24.
- Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, et al. (2003). "The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation." J Virol 77(9): 5253-65.
- Hagensee, M. E., N. H. Olson, et al. (1994). "Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids." J Virol 68(7): 4503-5.
- 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.
- Halbert, C. L., G. W. Demers, et al. (1992). "The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells." J Virol 66(4): 2125-34.
- Hartley, K. A. and K. A. Alexander (2002). "Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication." J Virol 76(10): 5014-23.
- Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, et al. (1989). "HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes." Embo J 8(12): 3905-10.
- Hegde, R. S. (2002). "The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology." Annu Rev Biophys Biomol Struct 31: 343-60.
- Heino, P., J. Dillner, et al. (1995). "Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki Forest virus assemble into virus-like particles." Virology 214(2): 349-59.
- 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.
- Hirt, B. (1967). "Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures." J Mol Biol 26(2): 365-9.
- Ho, G. Y., Burk, R.D. (1998). "Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women." N Engl J Med 338(7): 423-8.
- Holm, L. (1986). "Codon usage and gene expression." Nucleic Acids Res 14(7): 3075-87.
- Howley, P. M. (1996). "Papillomavirinae: The viruses and their replication." Third ed. Fundamental Virology (B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Eds.): 947-978.
- Howley, P. M., and D.R. Lowy (2001). "Papillomavirus and their replication, p.2197-2232 *In* D.M.Knipe and P.M.Howley (ed.), *Virology V2*, Lippincott/The Williams Wilkins Co., Philadelphia, Pa."
- Hubert, W. G. and L. A. Laimins (2002). "Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression." J Virol 76(5): 2263-73.
- Hwang, E. S., T. Nottoli, et al. (1995). "The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells." Virology 211(1): 227-33.
- IARC (1995). IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Humans: Human papillomaviruses. Lyon, IARC.
- Jackson, S., Harwood, C, Thomas, M., Storey, A. (2000). "Role of BAK in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins." Genes Dev 14: 3065-3073.
- Jiang, W. Q., L. Szekely, et al. (1996). "Intranuclear redistribution of SV40T, p53, and PML in a conditionally SV40T-immortalized cell line." Exp Cell Res 229(2): 289-300.

- Johnson, P., S. Chung, et al. (1993). "Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin." *Mol Cell Biol* 13(3): 1456-63.
- 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.
- Kabsch, K. and A. Alonso (2002). "The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms." *J Virol* 76(23): 12162-72.
- Kanduc, D. (1997). "Changes of tRNA population during compensatory cell proliferation: differential expression of methionine-tRNA species." *Biochem. Biophys.* 342: 1-6.
- Kawana, K., H. Yoshikawa, et al. (1998). "In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids." *J Virol* 72(12): 10298-300.
- Kawana, Y., K. Kawana, et al. (2001). "Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm." *J Virol* 75(5): 2331-6.
- Kelsall, S. R. and J. K. Kulski (1995). "Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in Escherichia coli." *J Virol Methods* 53(1): 75-90.
- Kennedy, I. M., J. K. Haddow, et al. (1991). "A negative regulatory element in the human papillomavirus type 16 genome acts at the level of late mRNA stability." *J Virol* 65(4): 2093-7.
- Kim, C. H., Y. Oh, et al. (1997). "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells." *Gene* 199(1-2): 293-301.
- Kim, H. Y., B. A. Barbaro, et al. (1999). "Sequence requirements for the assembly of simian virus 40 T antigen and the T-antigen origin binding domain on the viral core origin of replication." *J Virol* 73(9): 7543-55.
- Kim, K. and P. F. Lambert (2002). "E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication." *Virology* 293(1): 10-4.
- Kirnbauer, R., F. Booy, et al. (1992). "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 12180-4.
- 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.
- Kiyono, T. e. a. (1998). "Both RB/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells." *Nature* 396: 84-88.
- Kotin, R. M. (1994). "Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy." *Hum Gene Ther* 5(7): 793-801.
- Koutsky, L. A., K. A. Ault, et al. (2002). "A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine." *N Engl J Med* 347(21): 1645-51.
- Kozarsky, K. F. and J. M. Wilson (1993). "Gene therapy: adenovirus vectors." *Curr Opin Genet Dev* 3(3): 499-503.
- Kremer, E. J. and M. Perricaudet (1995). "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer." *Br Med Bull* 51(1): 31-44.
- Kulski, J. K., J. W. Sadleir, et al. (1998). "Type specific and genotype cross reactive B epitopes of the L1 protein of HPV16 defined by a panel of monoclonal antibodies." *Virology* 243(2): 275-82.
- Lai, C. M., Y. K. Lai, et al. (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." *DNA Cell Biol* 21(12): 895-913.
- Laimins, L. A. (1993). "The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer." *Infect Agents Dis* 2(2): 74-86.
- Lambert, P. F. (1991). "Papillomavirus DNA replication." *J Virol* 65(7): 3417-20.
- Leder, C. (2003). "Prophylaktische und therapeutische DNA-Immunisierung gegen das humane Papillomavirus 16." Ph.D. Thesis, DKFZ Heidelberg, Germany.
- Leder, C., J. A. Kleinschmidt, et al. (2001). "Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes." *J Virol* 75(19): 9201-9.
- Lenz, P., P. M. Day, et al. (2001). "Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells." *J Immunol* 166(9): 5346-55.
- Lewin, B. (1998). *Molekularbiologie der Gene*. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Li, M., P. Beard, et al. (1998). "Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly." *J Virol* 72(3): 2160-7.

- Li, M., T. P. Cripe, et al. (1997). "Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly." *J Virol* 71(4): 2988-95.
- Li, R., J. Knight, et al. (1989). "Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome." *Genes Dev* 3(4): 510-26.
- Liu, W. J., F. Gao, et al. (2002). "Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity." *Virology* 301(1): 43-52.
- Liu, W. J., L. Gissmann, et al. (1997). "Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions." *Virology* 227(2): 474-83.
- Liu, W. J., Y. M. Qi, et al. (2001). "Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules." *Virology* 282(2): 237-44.
- Lusky, M. and M. R. Botchan (1985). "Genetic analysis of bovine papillomavirus type 1 trans-acting replication factors." *J Virol* 53(3): 955-65.
- MacArthur, H. and G. Walter (1984). "Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen." *J Virol* 52(2): 483-91.
- Mallon, R. G., D. Wojciechowicz, et al. (1987). "DNA-binding activity of papillomavirus proteins." *J Virol* 61(5): 1655-60.
- Mansky, K. C., A. Batiza, et al. (1997). "Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions." *J Virol* 71(10): 7600-8.
- Mc Dougall, J. K. (1994). "Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus." *Curr Top Microbiol Immunol* 186: 101-119.
- McBride, A. A., A. Dlugosz, et al. (2000). "Production of infectious bovine papillomavirus from cloned viral DNA by using an organotypic raft/xenograft technique." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5534-9.
- McCarthy, M. P., W. I. White, et al. (1998). "Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro." *J Virol* 72(1): 32-41.
- Mehmet, D. H. a. H. (2003). *Cell Proliferation & Apoptosis. Advanced Methods*. Oxford, UK, BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Merle, E., R. C. Rose, et al. (1999). "Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha2beta1 heterodimers." *J Cell Biochem* 74(4): 628-37.
- Meyers, C., J. L. Bromberg-White, et al. (2002). "Infectious virions produced from a human papillomavirus type 18/16 genomic DNA chimera." *J Virol* 76(10): 4723-33.
- Meyers, C., M. G. Frattini, et al. (1992). "Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation." *Science* 257(5072): 971-3.
- Meyers, C., T. J. Mayer, et al. (1997). "Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA." *J Virol* 71(10): 7381-6.
- Miller, A. D. (1992). "Retroviral vectors." *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 1-24.
- Modis, Y., B. L. Trus, et al. (2002). "Atomic model of the papillomavirus capsid." *Embo J* 21(18): 4754-62.
- Modrow, S., Falke, D. (2003). *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Moreland, R. B., L. Montross, et al. (1991). "Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1." *J Virol* 65(3): 1168-76.
- Muller, M., J. Zhou, et al. (1997). "Chimeric papillomavirus-like particles." *Virology* 234(1): 93-111.
- Munger, K. and P. M. Howley (2002). "Human papillomavirus immortalization and transformation functions." *Virus Res* 89(2): 213-28.
- Munger, K. and W. C. Phelps (1993). "The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor." *Biochim Biophys Acta* 1155(1): 111-23.
- Munger, K., Phelps, W.C., Schlegel, R. (1989). "The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes." *J Virol* 63: 4417-4423.
- Munoz, N. a. B., F.X. (1996). "The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer." *Bull.Pan.Am.Health Organ*. 30(4): 362-377.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11382-8.
- Neeper, M. P., K. J. Hofmann, et al. (1996). "Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Gene* 180(1-2): 1-6.
- Nierenberg, M. (1965). "The genetic code: II." *Sci. Am.* 208: 80-94.
- O'Brien, P. M. a. S. C., M. (2002). "Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins." *Virus Res* 88(1-2): 103-117.

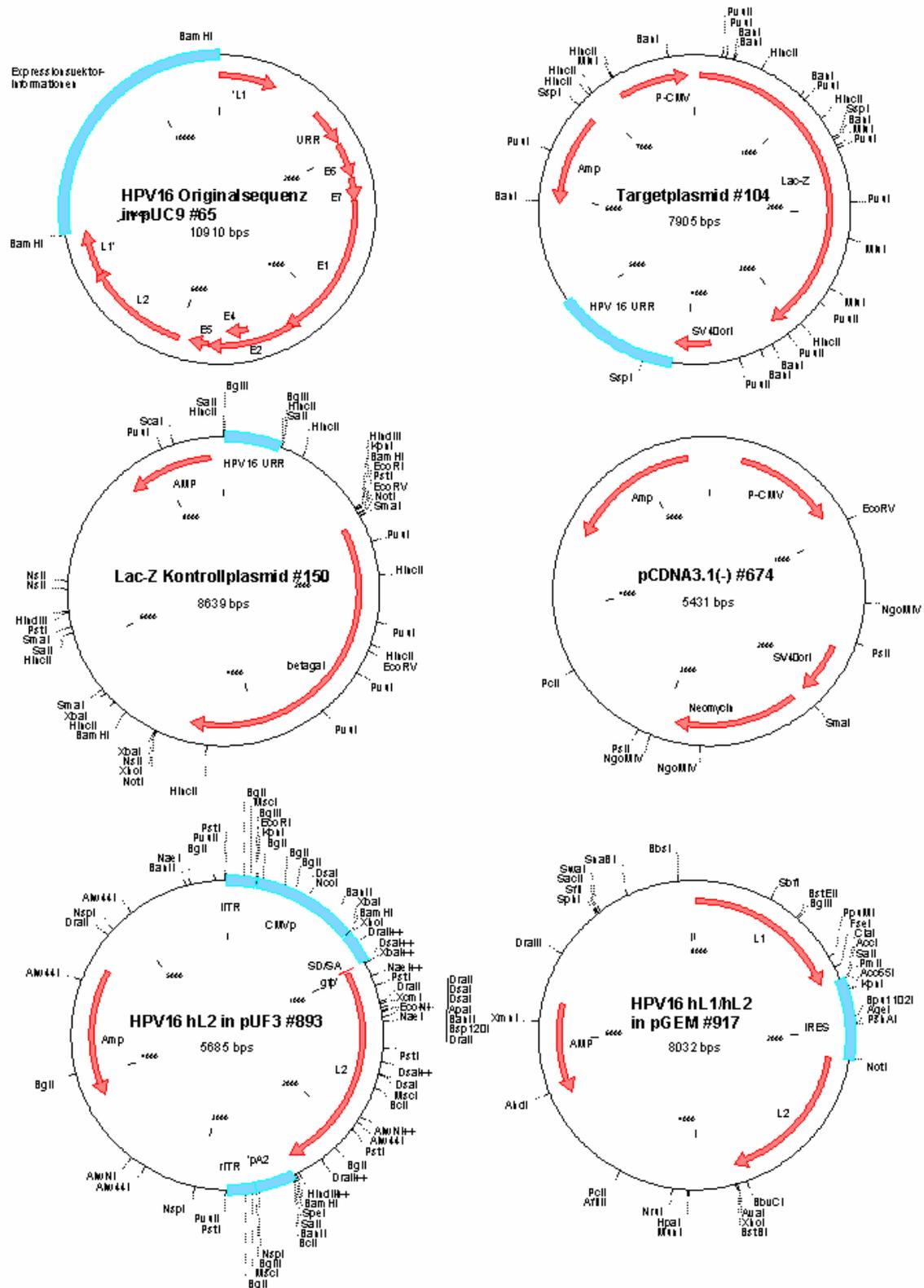
- Oda, H., Kumar, S., Howley, P.M. (1999). "Regulation of the SRC family tyrosine kinase BLK through E6AP-mediated ubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9957-9562.
- Okun, M. M., P. M. Day, et al. (2001). "L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation." J Virol 75(9): 4332-42.
- Oppenheim, A., Z. Sandalon, et al. (1992). "A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40." J Virol 66(9): 5320-8.
- Paintsil, J., M. Muller, et al. (1998). "Calcium is required in reassembly of bovine papillomavirus in vitro." J Gen Virol 79 ( Pt 5): 1133-41.
- Parker, J. N., W. Zhao, et al. (1997). "Mutational analyses of differentiation-dependent human papillomavirus type 18 enhancer elements in epithelial raft cultures of neonatal foreskin keratinocytes." Cell Growth Differ 8(7): 751-62.
- Parkin, D. M., P. Pisani, et al. (1999). "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990." Int J Cancer 80(6): 827-41.
- Peh, W. L., J. L. Brandsma, et al. (2004). "The Viral E4 Protein Is Required for the Completion of the Cottontail Rabbit Papillomavirus Productive Cycle In Vivo." J Virol 78(4): 2142-2151.
- Petitclerc, D., J. Attal, et al. (1995). "The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice." J Biotechnol 40(3): 169-78.
- Phelps, W. C. and P. M. Howley (1987). "Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product." J Virol 61(5): 1630-8.
- Pisani, P., Bray, F., Parkin, D.M. (2002). "Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population." Int J Cancer 97: 72-81.
- 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.
- Romanczuk, H., F. Thierry, et al. (1990). "Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters." J Virol 64(6): 2849-59.
- Rose, R. C., W. Bonne, 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.
- Rudolf, M. P., Kast, W.M. (2001). "Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro." J Immunol 166(10): 5917-24.
- 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., C. Volpers, et al. (1995). "Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles." J Gen Virol 76 ( Pt 9): 2407-12.
- 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.
- Sattentau, Q. J. and R. A. Weiss (1988). "The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor." Cell 52(5): 631-3.
- Schafer, K., M. Muller, et al. (1999). "Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection." Int J Cancer 81(6): 881-8.
- Scheffner, M. and N. J. Whitaker (2003). "Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system." Semin Cancer Biol 13(1): 59-67.
- Schenck, S. (2004). "Vergleichende Analyse verschiedener Verpackungssysteme für herpesvirale Amplicon-Vektoren am Beispiel von Antigenen des Humanen Papillomvirus-16." Dr.-Arbeit, DKFZ Heidelberg, Germany.
- Schiller, J. T. (1999). "Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer." Mol Med Today 5(5): 209-15.
- Schwartz, S. (1998). "Cis-acting negative RNA elements on papillomavirus late mRNAs." Semin. Virol. 8: 291-300.
- Schwartz, S. (2000). "Regulation of human papillomavirus late gene expression." Ups J Med Sci 105(3): 171-92.
- Schwarz, E., U. K. Freese, et al. (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." Nature 314(6006): 111-4.

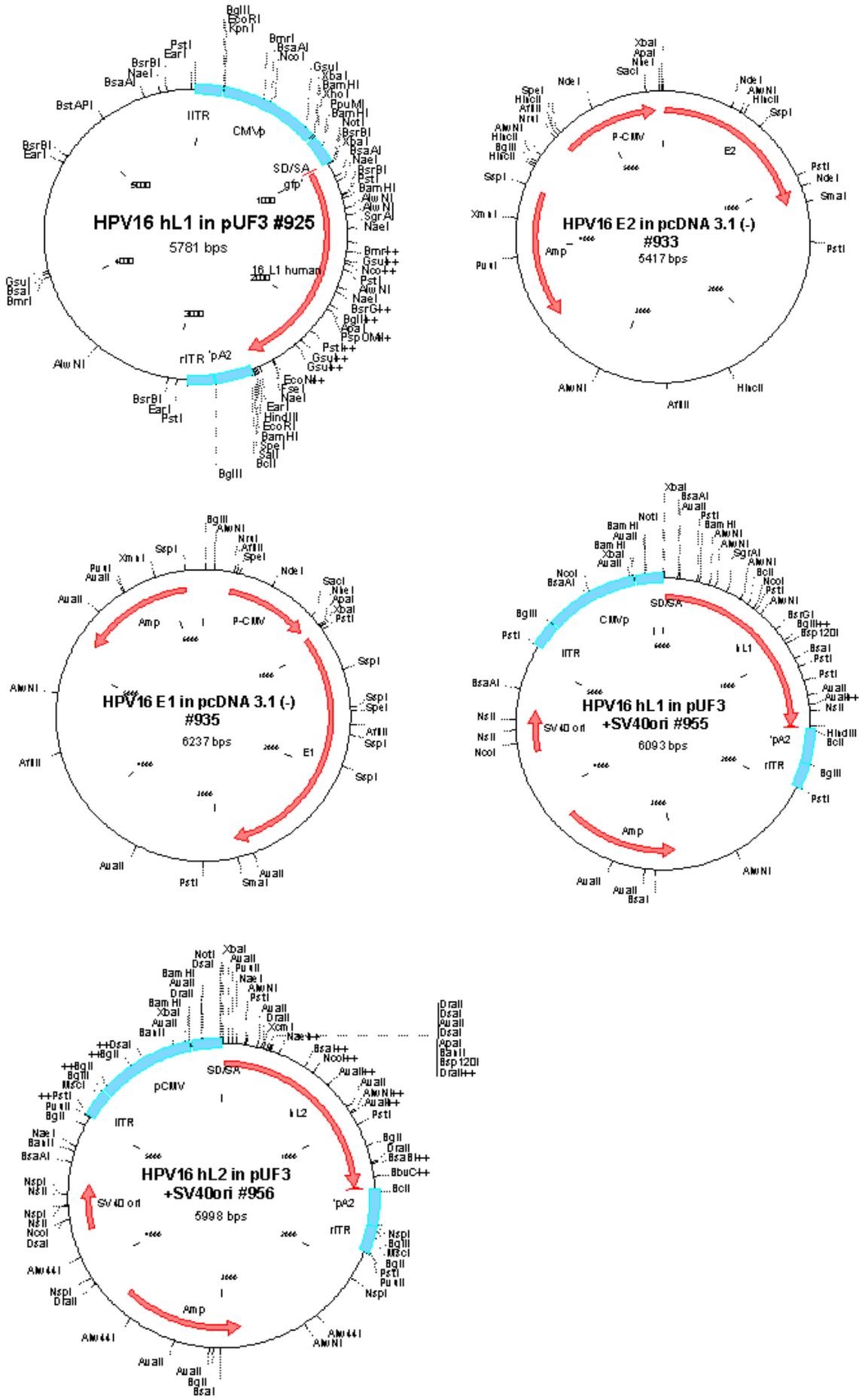
- Seo, Y. S., F. Muller, et al. (1993a). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin." Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): 2865-9.
- Shi, W., J. Liu, et al. (2001). "Papillomavirus pseudovirus: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses." J Virol 75(21): 10139-48.
- 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.
- Smith, D. W. (1996). "Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA." Biotechnol Prog 12(4): 417-22.
- Smotkin, D. and F. O. Wettstein (1986). "Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein." Proc Natl Acad Sci U S A 83(13): 4680-4.
- Sokolowski, M., C. Zhao, et al. (1997). "AU-rich mRNA instability elements on human papillomavirus type 1 late mRNAs and c-fos mRNAs interact with the same cellular factors." Oncogene 15(19): 2303-19.
- Spear, P. G. (1993). "Entry of Alphaherpesviruses into cells." Semin. Virol. 4: 167-180.
- Stanley, M. A., R. A. Moore, et al. (2001). "Intra-epithelial vaccination with COPV L1 DNA by particle-mediated DNA delivery protects against mucosal challenge with infectious COPV in beagle dogs." Vaccine 19(20-22): 2783-92.
- Stauffer, Y., K. Raj, et al. (1998). "Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions." J Mol Biol 283(3): 529-36.
- Stern, P. L., Moore, J.V. (2000). "Natural HPV immunity and vaccination strategies." J Clin Virol 19(1-2): 57-66.
- Strauss, E. G., Dtrauss, J.H., Levine, A.J. (1996). Virus evolution. Fields, Knipe and Howley (ed.), Fundamental Virology. Philadelphia, Lippincott-Raven: 149-159.
- Tai, H. T., C. A. Smith, et al. (1972). "Sequence heterogeneity in closed simian virus 40 deoxyribonucleic acid." J Virol 9(2): 317-25.
- Tan, W., B. K. Felber, et al. (1995). "Efficient expression of the human papillomavirus type 16 L1 protein in epithelial cells by using Rev and the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus or the cis-acting transactivation element of simian retrovirus type 1." J Virol 69(9): 5607-20.
- Thomsen, P., B. van Deurs, et al. (2000). "The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking." Oncogene 19(52): 6023-32.
- Tindle, R. W. (2002). "Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer." Nat Rev Cancer 2(1): 59-65.
- Touze, A., C. Dupuy, et al. (1998a). "Production of recombinant virus-like particles from human papillomavirus types 6 and 11, and study of serological reactivities between HPV 6, 11, 16 and 45 by ELISA: implications for papillomavirus prevention and detection." FEMS Microbiol Lett 160(1): 111-8.
- Touze, A., D. Mahe, et al. (2000). "The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity." FEMS Microbiol Lett 189(1): 121-7.
- Unckell, F., R. E. Streeck, et al. (1997). "Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33." J Virol 71(4): 2934-9.
- Ustav, M., E. Ustav, P. Szymanski und A. Stenlund (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." Embo J 10(13): 4321-9.
- Van Regenmortel, M. H. V., Gauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Wickner, R.B. (2000). Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The Seventh Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic Press.
- Varsani, A., A. L. Williamson, et al. (2003). "Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi." Arch Virol 148(9): 1771-86.
- Veldman, T., I. Horikawa, et al. (2001). "Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein." J Virol 75(9): 4467-72.
- Volkin, D. B., Shi, L., Sanyal, G (2002). Stabilized human papillomavirus formulations. U.S.
- Wagatsuma, M., Matsukura, T. (1990). "Analysis of Integrated Human Papillomavirus 16 DNA in Cervical Cancers: Amplification of viral Sequences Together with Cellular Flanking Sequences." J Virol 64(2): 813-821.
- 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.
- Warzecha, H., H. S. Mason, et al. (2003). "Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato." J Virol 77(16): 8702-11.

- Weinshenker, B. G., S. Wilton, et al. (1988). "Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line." *J Immunol* 140(5): 1625-31.
- Wells, S. I., D. A. Francis, et al. (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." *Embo J* 19(21): 5762-71.
- Werness, B. A., A. J. Levine, et al. (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." *Science* 248(4951): 76-9.
- Wickham, T. J., P. Mathias, et al. (1993). "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment." *Cell* 73(2): 309-19.
- Wobus (2000). "Monoclonal Antibody against the AAV Type 2 capsid." *J Virol* 74(19).
- Woodworth, C. D., S. Cheng, et al. (1992). "Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection." *Oncogene* 7(4): 619-26.
- Yamasaki, F., S. Hama, et al. (2003). "Staurosporine-induced apoptosis is independent of p16 and p21 and achieved via arrest at G2/M and at G1 in U251MG human glioma cell line." *Cancer Chemother Pharmacol* 51(4): 271-83.
- Yoshiike, K. (1968). "Studies on DNA from low-density particles of SV40. I. Heterogeneous defective virions produced by successive undiluted passages." *Virology* 34(3): 391-401.
- Yuan, H., P. A. Estes, et al. (2001). "Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection." *J Virol* 75(17): 7848-53.
- Yuen, L. K. and R. A. Consigli (1985). "Identification and protein analysis of polyomavirus assembly intermediates from infected primary mouse embryo cells." *Virology* 144(1): 127-38.
- Zerfass, K. e. a. (1995). "Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation." *J Virol* 69: 6389-6399.
- Zhang, B., Roman, A.S. (2002). "E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis." *J Virol* 76: 220-231.
- Zhao, K. N. and I. H. Frazer (2002). "Saccharomyces cerevisiae is permissive for replication of bovine papillomavirus type 1." *J Virol* 76(23): 12265-73.
- 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.
- Zhao, K. N., X. Y. Sun, et al. (1998). "DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1." *Virology* 243(2): 482-91.
- 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., W. J. Liu, et al. (1999). "Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability." *J Virol* 73(6): 4972-82.
- Zhou, J., D. J. Stenzel, et al. (1993). "Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro." *J Gen Virol* 74 ( Pt 4): 763-8.
- Zhou, J., X. Y. Sun, et al. (1992). "Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles." *Virology* 189(2): 592-9.
- 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. (1991a). "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.
- Zolotukhin, S., M. Potter, et al. (1996). "A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells." *J Virol* 70(7): 4646-54.
- zur Hausen, H. (1977). "Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas." *Curr Top Microbiol Immunol* 78: 1-30.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." *Biochim Biophys Acta* 1288(2): F55-78.
- zur Hausen, H. (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." *J Natl Cancer Inst* 92(9): 690-8.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-50.
- Zwerschke, W. a. J.-D., P. (2000). "Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins." *Adv Cancer Res* 78: 1-29.

## 9. Anhang

### Restriktionskarten häufig verwendeter Plasmide





## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

---

Name: Marcel-Alexander Jung  
Geburtsdatum: 03.03.1975  
Geburtsort: Darmstadt

### **Akademischer Bildungsweg:**

---

#### ***Dissertation:***

Zeitraum: 01/2001 – 03/2004  
Titel: „Entwicklung eines Produktions- und Verpackungs-Systems für Virus-ähnliche Partikel des humanpathogenen Papillomavirus Typ 16“  
Ort der Durchführung: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg  
Forschungsschwerpunkt: Angewandte Tumorstudiologie  
Abteilung: Genomveränderung und Karzinogenese

#### ***Diplomarbeit:***

Zeitraum: 11/1999 – 08/2000  
Titel: „Identifizierung und Charakterisierung des zellulären Rezeptors für das Borna-Disease-Virus“  
Ort der Durchführung: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen

#### ***Studium der Biologie:***

Zeitraum: 10/1995 – 08/2000  
Ort der Durchführung: Eberhardt-Karls Universität Tübingen  
Abschluss: Diplom-Biologe

#### ***Zivildienst:***

Zeitraum: 08/1994 – 10/1995  
Ort der Durchführung: Rettungsdienst und bodengebundener Rückholdienst beim Arbeiter-Samariter-Bund, Darmstadt  
Abschluss: Rettungssanitäter / Rettungshelfer

#### ***Schulbildung:***

Zeitraum: 08/1981 – 06/1994  
Ort der Durchführung: Eiche-Grundschule, Ober-Ramstadt,  
Pfaffenberg-Schule (Förderstufe), Nieder-Ramstadt  
Georg-Büchner-Gymnasium, Darmstadt  
Abschluss: Abitur (allgemeine Hochschulreife)

## **11. Impressum**

**Im Selbstverlag herausgegeben von:**

**Name, Vorname: Jung, Marcel-Alexander**

**Anschrift: Schwalbenweg 64**

**69123 Heidelberg**