

Prophylaktische und Therapeutische DNA-Immunisierung gegen das Humane Papillomvirus 16

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Christoph Leder
geb. am 31. März 1972
in Lüneburg

2003

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. med. K. Resch

Tag der Promotion: 10. Juli 2003

... Die Erde hält nichts zurück, sie ist freigebig genug,
Ihre Wahrheiten warten allezeit, sie sind auch nicht gar so
verborgen,
Sie sind still und fein, unübertragbar durch Druckerschwärze,
Sie sind in alle Dinge verwoben, sie teilen sich willig mit,
Sie teilen ein Gefühl und eine Aufforderung mit: „Ich rede
und rede,
Nicht mit Worten, wenn du mich aber nicht hörst, was kann
ich dir nützen?
Zu bessern, zu reifen, - wenn jene fehlen, was kann ich
nützen?“

Walt Whitman in „Grashalme“

... Wir bekennen es vielmehr frei: was nach gänzlicher Aufhebung
des Willens übrig bleibt, ist für alle Die, welche noch des Willens
voll sind, allerdings Nichts. Aber auch umgekehrt ist Denen, in
welchen der Wille sich gewendet und verneint hat, diese unsere so
sehr reale Welt mit allen ihren Sonnen und Milchstraßen – Nichts.

Arthur Schopenhauer in „Die Welt als Wille und Vorstellung, 4. Buch“

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
Zusammenfassung	10
1. Einleitung	12
1.1. Papillomviren	12
1.1.1. Lebenszyklus der Papillomviren.....	12
1.1.2. Pathogenese des humanen Papillomvirus 16 (HPV-16).....	14
1.1.3. Regulation der späten Papillomvirusgene	16
1.1.3.1. Regulatorische RNA Sequenzen auf viralen und zellulären mRNAs	17
1.1.3.2. Negativregulatorische Elemente bei den Papillomviren.....	18
1.1.3.3. Steigerung der Expression der späten Gene	19
1.1.3.4. Kodonverwendung als Regulation der Proteinexpression	20
1.1.4. Strukturproteine und Kapsidbildung.....	21
1.1.5. E7: Aufbau, Domänen, Funktionen.....	23
1.2. DNA-Immunisierung.....	24
1.3. Immunisierungen gegen Papillomviren.....	27
1.4. Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Material	31
2.1.1. Zelllinien und Bakterien	31
2.1.1.1. Zelllinien.....	31
2.1.1.2. Bakterien	31
2.1.2. Oligonukleotide	31
2.1.3. Antikörper und Antiseren	32
2.1.3.1. Erstantikörper	32
2.1.3.2. Zweitantikörper	33
2.1.4. DNA- und Proteinmarker	33
2.1.4.1. Proteinmarker	33
2.1.4.2. DNA-Marker	33
2.1.5. Enzyme.....	33
2.1.6. Plasmide	33
2.1.7. Medien und Zusätze	34
2.1.7.1. Zellkultur	34
2.1.7.2. Bakterien (<i>E. coli</i>)-Medienzusätze	34
2.1.8. Kits	34
2.1.9. Peptide.....	34
2.1.10. Radioaktives Material.....	35
2.1.11. Chemikalien.....	35
2.1.11.1. Allgemeine Chemikalien	35
2.1.11.2. Spezielle Chemikalien	35
2.1.12. Geräte	36
2.1.13. Sonstige Materialien.....	37
2.1.14. Spezielle EDV	37
2.1.15. Häufig gebrauchte Puffer und Lösungen	37
2.2. Kultivierung und Transformation von Bakterien.....	39
2.2.1. Kultivierung von Bakterien	39
2.2.2. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	39
2.2.2.1. CaCl ₂ -kompetente Bakterien	39
2.2.2.2. Elektrokompente Bakterien	40
2.3. Zellbiologische Methoden	41
2.3.1. Kultivierung humaner Zellen.....	41
2.3.2. Kryokonservierung humaner Zellen.....	41
2.3.3. Bestimmung der Zellzahl	41
2.3.4. Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode.....	42
2.4. Proteinanalyse	42
2.4.1. Herstellung von Proteinextrakten	42
2.4.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
Laufpuffer.....	43
2.4.3. Silbernitratfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	44
2.4.4. Immunblot-Analyse.....	45
2.4.4.1. Western-Blot-Transfer von Proteinen.....	45

2.4.4.2. Immunologische Detektion transferierter Proteine	46
2.4.5. Indirekte Immunfluoreszenz	47
2.4.6. „capture“-ELISA	47
2.4.7. Elektronenmikroskopie.....	48
2.4.7.1. Fixierung und Einbettung von Kulturzellen	48
2.4.7.2. Nachweis von virusartigen Partikeln in Zuckergradientenfractionen.....	49
2.4.8. Durchflusszytometrie (FACS)	49
2.4.9. Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse	49
2.4.9.1. Herstellung der Zellextrakte	49
2.4.9.2. Sedimentationsgeschwindigkeits-Zentrifugation.....	50
2.4.10. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau	51
2.5. Präparation, Modifikation und Analyse von DNA	51
2.5.1. Präparation von Plasmid aus Bakterien	51
2.5.1.1. Minipräp	51
2.5.1.2. DNA-Präparation („Maxi“-Maßstab)	52
2.5.1.3. DNA-Präparation („Mega“-Maßstab).....	53
2.5.2. Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	53
2.5.3. Restriktionsverdau	53
2.5.4. DNA-Gelelektrophorese.....	53
2.5.5. Reinigung von DNA-Fragmenten mittels GeneClean	54
2.5.6. Ligation	54
2.5.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	54
2.5.8. DNA-Sequenzierung	55
2.5.9. Polymerase-Kettenreaktion	55
2.6. Immunisierung von Versuchsmäusen.....	55
2.6.1. DNA-Immunisierung.....	55
2.6.2. Serumgewinnung aus Mäusen	56
2.6.3. Serumanalyse durch ELISA	56
2.6.4. Analyse der zellulären Immunantwort.....	57
2.6.4.1. Isolierung von Lymphozyten aus der Mausmilz.....	57
2.6.4.2. Zellaktivierung	57
2.6.4.3. Kultivierung und <i>in vitro</i> Restimulierung zytotoxischer T-Zellen	58
2.6.4.4. Zytotoxizitätstest	59
2.6.4.5. ELISPOT-Analyse.....	61
3. Ergebnisse	63
3.1. Kodonoptimierung der HPV-16 L1-Sequenz	63
3.1.1. Herstellung der veränderten Leserahmen	64
3.1.2. Klonierung der Expressionsplasmide	66
3.1.2. L1-Expression nach transienter Transfektion.....	67
3.1.3. Effekte der veränderten Leserahmen	70
3.1.4. DNA-Immunisierung mit dem „humanisierten“ Leserahmen	73
3.2. Prophylaktische und therapeutische Immunisierung gegen HPV-16	77
3.2.1. Konstruktion des L1h/E7-Fusionsgens	78
3.2.2. L1/E7-Expression und Lokalisation nach transienter Transfektion.....	79
3.2.3. Kernlokalisierung des L1/E7-Fusionsproteins.....	81
3.2.4. Expression und Lokalisation	82
3.2.5. Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse der Fusionsproteine.....	85
3.2.5.1. Voruntersuchungen zur Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse.....	86
3.2.5.1.1. Positivkontrollen für virusartige Partikel und Kapsomere.....	86
3.2.5.1.2. Extraktionsbedingungen	87
3.2.5.2. Die Fusionsproteine in der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse	91
3.2.5.3. Einfluss des E7-Anteils auf das Kapsidbildungsverhalten	94
3.2.6. DNA-Immunisierung mit den L1h/E7 Fusionsgenen	97
3.2.6.1. Humorale Immunantwort	97
3.2.6.2. Zelluläre Immunantwort	99
4. Diskussion	103
4.1. Expressionssteigerung durch Kodonoptimierung.....	103
4.2. Intrazelluläre VLP-Bildung	105
4.3. Protektive DNA-Immunisierung	107
4.4. Expression und Kapsidbildung des Fusionsproteins	108
4.5. Prophylaktische und therapeutische Immunisierung	113
4.5.1. Humorale Immunantwort	114

4.5.2. Zelluläre Immunantwort.....	116
4.6. Schlussbetrachtung.....	118
5. Literatur.....	120
6. Anhang.....	132
7. Lebenslauf.....	135
8. Veröffentlichungen.....	136
Danksagung.....	137

Abkürzungen

AAV-2	Adenoassoziiertes Virus Typ 2
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-azinobis(3-Ethylbenzthiazolinsulfonsäure)
Ad5	Adenovirus Typ 5
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	BES-gepuffertes Salz („BES buffered salt“)
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/Nitrobluetetrazolium
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BPV-1	Rinderpapillomvirus-1
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
c	Zenti
cdk	cyclin-abhängige Kinase („cyclin dependent kinase“)
Ci	Curie
CIN	Intraepitheliale Läsion des Zervix (“cervical intraepithelial lesion”)
CMV	Cytomegalievirus
COPV	„canine oral“-Papillomvirus
CRPV	Kaninchen-Papillomvirus (“cottontail rabbit papillomavirus”)
Cy3	fluoreszierender Cyaninfarbstoff (Indocarbocyanin)
°C	Grad Celsius
d	Desoxy-
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ELISPOT	„enzyme-linked immunospot Assay“
ELMI	Elektronenmikroskopie
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
gfp, GFP	„green fluorescent protein“
Gy	Gray
h	Stunde
hnRNA	Primärtranskript (hochmolekulare Kern-RNA)
HIV-1	“human immune deficiency virus type 1”
HSIL	hochgradige squamöse intraepitheliale Läsion
HPV	Humanes Papillomvirus

HTLV-1	„human T-cell leukaemia virus type 1“
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle („internal ribosome entry site“)
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	„Luria broth“-Medium
LSIL	niedriggradige intraepitheliale Läsion
μ (g, l, m)	Mikro- (10^{-6})
m	Milli- (10^{-3})
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	Nano (10^{-9})
NLS	Kernwanderungssignal („nuclear localization signal“)
NRE	negativregulatorisches Element
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
p	Plasmid oder Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
pH	„pons hydrogenium“
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PW(M)	„Pokeweed“-Mitogen
polyA, pA	Polyadenylierungssignal
RB	Retinoblastom-Tumorsuppressor-Genprodukt
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD/SA	Intron („splice-donor/splice-acceptor site“) aus SV40
snRNA	„small nuclear“ RNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SV40	Simian Virus Typ 40
T	Triangulationszahl
T4	Bakteriophage T4
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region der späten Papillomvirus-Gene
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

VLP	virusartiges Partikel („virus like particle“)
vol	Volumenanteil
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine prophylaktische und therapeutische Immunisierung gegen das humane Papillomvirus 16 entwickelt. Dazu wurde zunächst die Expressionsbeschränkung des Hauptstrukturgens L1 aufgehoben, indem die Nukleinsäuresequenz des L1-Leserahmens durch Veränderung der Kodonbenutzung komplett erneuert wurde. Die Veränderung der Kodonbenutzung führte zu einer hohen Proteinexpression von L1 in undifferenzierten Säugerzellen nach transienter Transfektion. Die hohe Expression liess sich vor allem auf die direkte Verbesserung der Translation zurückführen. Zu einem kleinen Teil trägt daneben aber auch die Beeinflussung von posttranskriptionellen Regulationen zur Expressionssteigerung bei.

Es konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte L1 die Fähigkeit hat, sich intrazellulär zu Kapsomeren und virusartigen Partikeln zusammenzulagern. Ausserdem wurden Hinweise gefunden, dass sich Kapsidbildungsnebenprodukte oder –intermediate bilden.

Nach intramuskulärer Injektion des Expressionsplasmides in Versuchsmäuse konnte ein hoher kapsidspezifischer Antikörpertiter gemessen werden.

Zur Entwicklung eines prophylaktischen und therapeutischen Ansatzes wurde der kodonveränderte L1-Leserahmen mit Teilen des Tumorantigens E7 des humanen Papillomvirus 16 kombiniert. Die Untersuchung des Kapsidbildungsverhaltens zeigte, dass dieses Fusionsprotein in humanen Zelllinien zwar Kapsomere, nicht aber virusartige Partikel bildet. Die Kernlokalisierung des Fusionsproteins korreliert mit einer Änderung der Komplexbildungseigenschaften, führt aber auch nicht zur Bildung von virusartigen Partikeln. Die DNA-Immunisierung mit dem Fusionsgen mit und ohne Kernwanderungssignal zeigte schliesslich, dass mit dem Konzept eine zelluläre Immunantwort gegen E7-Epitope erzeugt werden kann und dass die kapsidspezifische Antikörperantwort nach Kernlokalisierung des Fusionsproteins gesteigert werden kann.

Schlagwörter: humanes Papillomvirus 16, DNA Vakzinierung, Kodonbenutzung

Abstract

The thesis presents the development of a prophylactic and therapeutic immunization against the human papillomavirus type 16. First of all, the restricted expression of the major structural gene L1 was overcome by constructing a codon modified L1 open reading frame. It was shown, that the modified L1 open reading frame is highly expressible in undifferentiated human cell lines after transient transfection. Moreover, the high expression leads to the formation of capsomers and virus-like particles intracellularly. Evidence was found, that the codon optimization mainly enhances the translational efficiency directly, whereas translation-independent posttranscriptional events contribute only to a minor degree to the increased expression level.

The codon-adapted L1 gene demonstrates strongly increased capsid-specific immunogenicity *in vivo* compared to that of the original L1 gene.

To develop a prophylactic and therapeutic strategy, the adapted L1 gene was combined with parts of the tumor antigen E7 of human papillomavirus type 16. It was shown, that the fusion protein forms capsomers but not chimeric virus-like particles. After nuclear localization, the fusion protein assembled into higher complexes but still not into virus-like particles.

Finally, DNA immunization demonstrated that a cellular immune response against E7 can be evoked with the developed concept and that nuclear localization of the fusion protein correlates with an increased capsid-specific antibody titer.

Keywords: human Papillomavirus 16, codon usage, DNA vaccination

1. Einleitung

1.1. Papillomviren

1.1.1. Lebenszyklus der Papillomviren

Die Papillomviren gehörten lange zusammen mit den Polyomaviren zur Familie der Papovaviridae. In der geänderten Virustaxonomie werden die Papillomviren nun in einer eigenen Familie zusammengefasst (van Regenmortel *et al.*, 2000). Der Name „Papillomviren“ lässt sich aus der Eigenschaft einiger HPV-Typen herleiten, Hautwarzen, sog. Papillome, zu erzeugen. Die Gruppe der Papillomviren ist sehr heterogen und enthält eine große Zahl von epitheliotropen DNA-Viren.

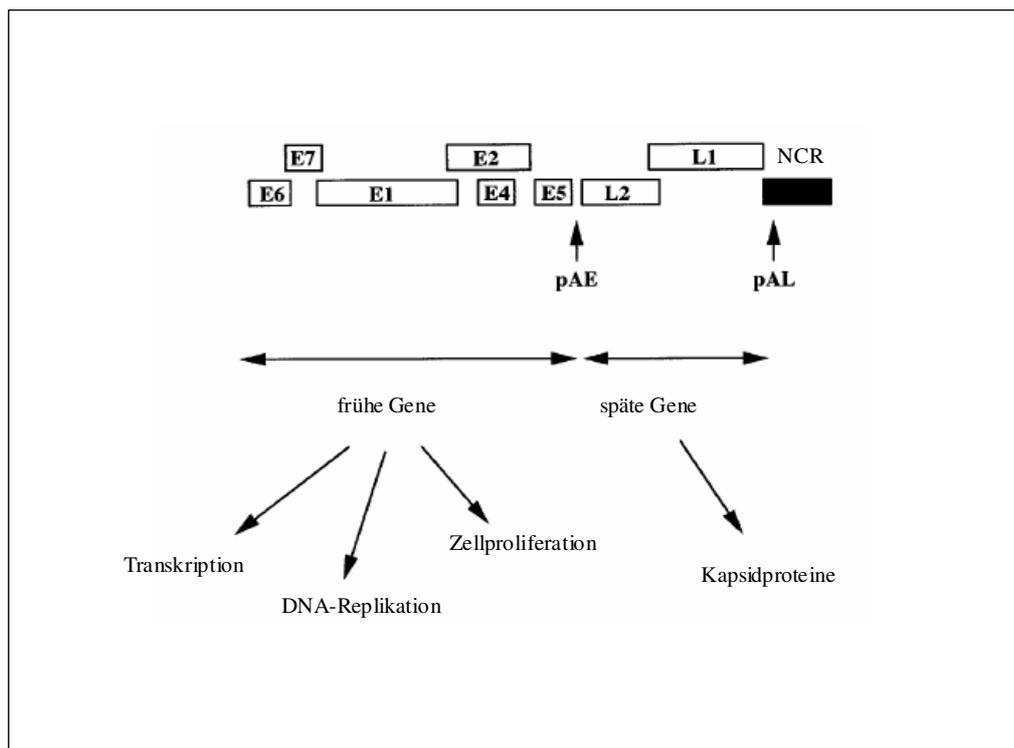


Abb. 1.1: Das Papillomvirus-Genom.

Die 6 frühen Gene (E1-E2 und E4-E7) kodieren Genprodukte, die Funktionen in der Transkription, der DNA-Replikation und der Zellproliferation haben. Die späten Gene (L1 und L2) kodieren für die beiden Strukturproteine. NCR, nichtkodierende Region; pAE, polyA-Signal der frühen Region; pAL, polyA-Signal der späten Region.

Abb. nach Schwartz, 1998.

Gegenwärtig sind ca. 85 HPV-Typen identifiziert und sequenziert (zur Hausen, 2000). Die Papillomviren enthalten ein zirkuläres doppelsträngiges, ca. 8 kB großes DNA Genom, das in infizierten Zellen episomal vorliegt (Lambert, 1991).

Das Genom wird in drei Regionen aufgeteilt und zwar in eine Region der frühen Gene, der späten Gene und in die nichtkodierende Region (Abb. 1.1). Die frühen Gene (E1 – E7) exprimieren Proteine für die Replikation, die transkriptionelle Regulation und die Zelltransformation (Schwarz, 1998). Die späten Gene kodieren für die beiden Strukturproteine L1 und L2. L1 wird als Hauptstrukturprotein und L2 als Nebenstrukturprotein bezeichnet. Die Strukturproteine bilden zusammen mit einer Kopie des zirkulären Genoms die infektiösen Virionen mit ikosaedrischen Kapsiden von ca. 55 nm Durchmesser (Baker *et al.*, 1991).

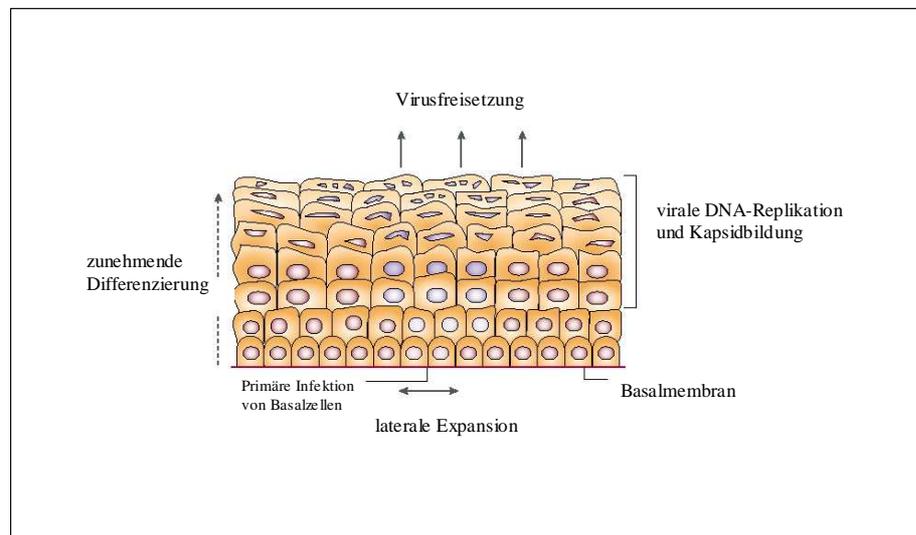


Abb. 1.2: Der Vermehrungszyklus der Papillomviren. Epitheliale Basalzellen werden primär infiziert. Die Expression der frühen Gene führt zu einer verstärkten Proliferation und lateralen Ausbreitung der infizierten Basalzellen. Die Differenzierung der infizierten Epithelzellen bewirkt den Beginn der viralen DNA-Replikation und Kapsidbildung. Komplette Viren werden schließlich aus den distalen Schichten des Epithels freigesetzt. Abb. nach zur Hausen, 2002.

Der Vermehrungszyklus der Papillomviren ist mit der Zelldifferenzierung verbunden. Der Abschluss eines Replikationszyklusses hängt von der terminalen Differenzierung der infizierten Epithelzellen ab (Howley, 1996) (Abb. 1.2). Papillomviren infizieren sowohl kutane als auch mukosale Epithelien. Der Viruseintritt wird höchstwahrscheinlich durch sog. Mikrotraumata der basalen Schichten ermöglicht (Howley, 1996). Während die frühen Gene in allen Schichten des Epithels exprimiert werden, ist die Produktion der späten Proteine L1 und L2 auf die distalen Schichten des Epithels und auf terminal differenzierte Zellen beschränkt (Howley, 1996). Durch die Beschränkung der Virusvermehrung auf distale

epitheliale Schichten gelingt es dem Virus, den Kontakt mit dem Immunsystem zu minimieren (Tindle, 2002).

1.1.2. Pathogenese des humanen Papillomvirus 16 (HPV-16)

Während ein Teil der humanen Papillomvirus-Typen als relativ harmlos betrachtet wird, hat man einige Typen, darunter HPV-16, mit der Entwicklung maligner Tumoren in Verbindung gebracht (zur Hausen, 1977). Besonders gut charakterisiert ist die Beteiligung dieser HPV-Typen an der Entstehung des Gebärmutterhalskarzinoms. Hier spielen nach gegenwärtigem Stand des Wissens einige HPV-Typen eine kausale Rolle in der Ätiologie dieses Tumors. Die genitale Papillomvirusinfektion wird gemeinhin durch sexuellen Kontakt übertragen. Papillomvirusinfektionen des Zervix erscheinen als flache Condylomata oder niedriggradige intraepitheliale Neoplasien (LSIL oder CIN I). Die meisten dieser Läsionen werden innerhalb von 6-12 Monaten vermutlich durch den Eingriff des Immunsystems beseitigt. Ein kleiner Anteil kann jedoch unter Umständen persistieren und hochgradige Neoplasien (HSIL oder CIN II und III), *in situ* Karzinome bis hin zu invasiven Karzinomen entwickeln (zur Hausen, 2002). Weltweit tauchen jährlich ca. 400000 neue Fälle des Zervixkarzinoms auf (Parkin *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass die sog. Hochrisiko-HPV-Typen in über 90 % der Gebärmutterhalskarzinome nachgewiesen werden können (Bosch *et al.*, 1995), bedeutet allerdings nicht, dass alle HPV-infizierten Frauen eine persistierende Infektionsform mit hochgradigen Neoplasien und Karzinomen entwickeln. Das Risiko der Entwicklung einer hochgradigen intraepithelialen Neoplasie innerhalb von 2 Jahren nach der Infektion ist bei infizierten Frauen allerdings ca. elfmal höher (Modrow und Falke, 1997).

In den infizierten basalen Epithelzellen ist die virale Genexpression zunächst unterdrückt, allerdings führt die Expression der frühen Gene E5, E6 und E7 dazu, dass die infizierten Zellen verstärkt proliferieren und sich lateral ausbreiten. Erst in suprabasalen Schichten des Epithels wird die Expression der späten Gene gestartet und das Genom repliziert und verpackt. Die kompletten Viren werden aus den distalen Schichten des Epithels freigesetzt (Abb. 1.2).

Gegenwärtig wird angenommen, dass die Genprodukte der drei frühen HPV-16-Gene E5, E6 und E7 für die Wachstumsstimulation und die Transformation der Wirtszelle verantwortlich sind. Im Lebenszyklus sorgt diese virusinduzierte Proliferation auch für eine Erhöhung der Replikation des viralen Genoms. Die induzierten Effekte können jedoch eine maligne Progression des infizierten Gewebes einleiten.

E5 werden vor allem Funktionen in der frühen Phase der Expansion infizierter Zellen zugeschrieben, denn der kodierende Bereich des E5-Gens ist in Karzinomzellen häufig deletiert (Schwarz *et al.*, 1985). Das Genprodukt ist ein hydrophobes Protein, das – für das Rinderpapillomvirus gezeigt – vor allem im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran lokalisiert (Burkhardt *et al.*, 1989). E5 kann mit einigen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wechselwirken (Hwang *et al.*, 1995) und dadurch Einfluss auf das Zellwachstum nehmen. Kürzlich wurde ausserdem gezeigt, dass E5 Apoptose nach DNA-Schädigung verhindern kann (Zhang *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden Hinweise gefunden, dass E5 die ligandenvermittelte Apoptose in humanen Keratinozyten inhibiert (Kabsch und Alonso, 2002).

Eine größere Rolle bei der Zelltransformation spielen dagegen die Genprodukte von E6 und E7. Die beiden Gene werden in bösartigem Gewebe exprimiert und ihre Unterdrückung blockiert den malignen Phänotyp (zur Hausen, 2002). E6 und E7 sind einzeln und kooperativ in der Lage, *in vitro* Zellen des Menschen zu transformieren (Münger *et al.*, 1989).

E6 interagiert mit p53 (Werness *et al.*, 1990) und bewirkt die Degradation dieses Tumorsuppressors. Das führt zu einer Verhinderung von Apoptose und dadurch zu einer erhöhten genomischen Instabilität. Daneben aktiviert E6 die Transkription der Telomerase (Veldman *et al.*, 2001) und inhibiert möglicherweise den Abbau der Tyrosinkinase Blk (Oda *et al.*, 1999). E6 schafft dadurch Bedingungen für unkontrolliertes Zellwachstum.

Auf der anderen Seite dereguliert E7 den Zellzyklus, indem es mit dem RB-Genprodukt interagiert und dessen Abbau bewirkt (Dyson *et al.*, 1989). Daraus ergibt sich die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, was zu einer Aktivierung von S-Phase-Genen, z. B. des Gens der Dihydrofolat-Reduktase, der Thymidinkinase und der DNA-Polymerase α (Münger *et al.*, 2001), führt. Zusätzlich aktiviert E7 die Gene für cyclin A und E (Zerfass *et al.*, 1995) und inhibiert die Funktion der cdk-Inhibitoren p21CIP1 (Jones *et al.*, 1997) und p27KIP1 (Zerfass-Thome *et al.*, 1996). Daneben hat die E7-induzierte abnormale Centrosomen-Amplifikation eine wichtige Rolle bei der malignen Progression durch Erzeugung von Aneuploidie (Duensing *et al.*, 2001).

E6 und E7 wirken bei der Zelltransformation synergistisch. Zum einen verhindert E6 die E7-induzierte Apoptose. Zum anderen werden die Beeinträchtigungen der E6-Funktionen durch den cdk-Inhibitor INK4A mit Hilfe der direkten Aktivierung von cyclin A und E durch E7 umgangen (zur Hausen, 2002).

Während der Entwicklung des malignen Phänotyps wird das episomale virale Genom häufig im E2-Leserahmen geöffnet und in das Genom der Wirtszelle integriert (Schwarz *et al.*, 1985). Die Repression integrierter Sequenzen von E6- und E7 durch E2 (Romanczuk *et al.*,

1990; Bechtold *et al.*, 2003) wird dadurch verhindert. Weil bei der Integration ausserdem häufig Teile des viralen Genoms deletiert werden (Schwarz *et al.*, 1985; Wagatsuma *et al.*, 1990), kann es dazu kommen, dass die E6- und E7-Expression unter die Kontrolle von zellulären Promotoren gestellt wird (zur Hausen, 2002). Durch diese Entwicklungen wird die E6- und E7-Expression im Verlauf der malignen Progression erhöht.

Aber es muss betont werden, dass die E6- und E7-Expression nicht allein zu einem malignen Status führt. Die Erhöhung der genomischen Instabilität, vermehrte Mutationen sowie die Entstehung von Aneuploidie können schließlich zu Veränderungen in Wirtszellgenen führen, die die Differenzierung und die Angiogenese beeinflussen und damit einen invasiven Phänotyp erzeugen.

1.1.3. Regulation der späten Papillomvirusgene

Die Expression der späten Papillomvirusgene ist auf terminal differenzierte Keratinozyten beschränkt (Howley, 1996). Dadurch begründet sich die eingeschränkte Verwendbarkeit der Strukturgene in der genetischen Immunisierung.

Die Expression der späten Papillomvirusgene wird sowohl auf der transkriptionellen als auch auf der posttranskriptionellen Ebene eng reguliert. Auf der transkriptionellen Ebene hat man Hinweise auf differenzierungsabhängige Promotoren gefunden (Baker *et al.*, 1987; Grassmann *et al.*, 1996). Ausserdem wird die Transkription hinter dem polyA-Signal der frühen Region terminiert, bevor die späte Region erreicht ist (Baker und Noe, 1989) (Abb. 1.1). Daneben werden *cis*-operierende DNA Elemente (sog. „enhancer“), die für die differenzierungsabhängige Transkription nötig sein könnten, in der nichtkodierenden Region vermutet (Nuss Parker *et al.*, 1997).

Auf der posttranskriptionellen Ebene sind sog. negativregulatorische RNA-Elemente für die differenzierungsabhängige Expression der späten Gene verantwortlich (Schwartz, 1998; Collier *et al.*, 2002). Ausserdem wird zumindest für das Rinderpapillomvirus (BPV-1) vermutet, dass die Verwendung von speziellen Kodons in den späten Genen und damit verbunden eine differenzierungsabhängige tRNA-Verfügbarkeit zur Regulation der Translation beiträgt (Zhou *et al.*, 1999).

Die Überwindung der Expressionsbeschränkung speziell der späten Papillomvirusgene wird neue Perspektiven zur Immunisierung gegen Papillomviren eröffnen. Denkbar ist einerseits die Verbesserung der Produktion von virusartigen Partikeln und andererseits eine Anwendung

der Strukturgene in der genetischen Vakzinierung. Im folgenden soll daher näher auf die negativregulatorischen RNA-Elemente eingegangen werden.

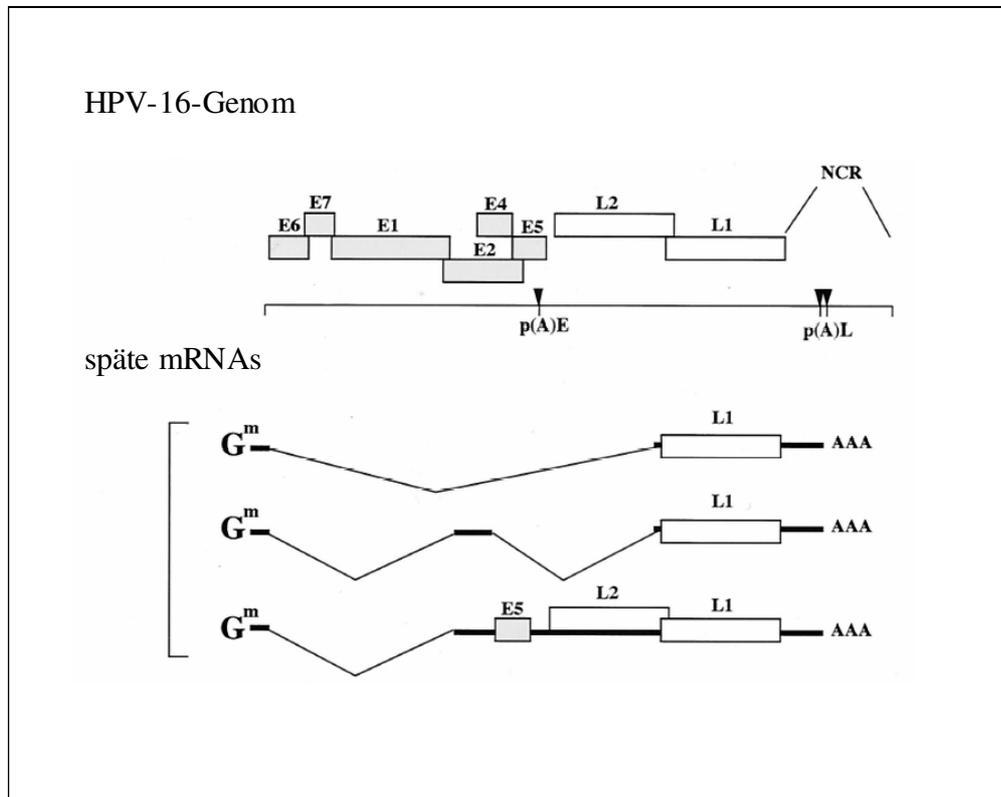


Abb. 1.3: Expression der späten HPV-16-Gene.
p(A)E, frühes polyA-Signal; p(A)L, spätes polyA-Signal; NCR, nichtkodierende Region; G^m, methylierte 5'-cap-Struktur.
Abb. nach Collier *et al.*, 2002.

1.1.3.1. Regulatorische RNA Sequenzen auf viralen und zellulären mRNAs

Die Halbwertszeiten der mRNA und die Translationseffizienzen können nicht als statisch angesehen werden. Sie sind vielmehr fluktuierend in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. So sind z. B. sowohl virale als auch zelluläre expressionsmodulierende RNA-Elemente bekannt. Man nimmt an, dass diese RNA-Elemente mit zellulären *trans*-operierenden Faktoren interagieren und dadurch das „Schicksal“ der mRNA bestimmen. Es ist denkbar, dass die RNA-bindende Aktivität solcher Faktoren abhängig von bestimmten Stimuli oder differenzierungsabhängig reguliert wird.

Eines der am besten charakterisierten zellulären RNA-Elemente ist das eisenabhängige Element in der 5'-untranslatierten Region (UTR) auf der Ferritin-mRNA. Die Interaktion zwischen diesem Element und einem Protein führt bei niedrigen intrazellulären Eisen-

konzentrationen zu einer Blockierung der Translation der mRNA (Klausner *et al.*, 1993). Das 3'-UTR-Element der Transferrinrezeptor-mRNA (Klausner *et al.*, 1993) ist ein anderes Beispiel aus dem Eisenstoffwechsel. Weitere Beispiele für bekannte zelluläre regulatorische RNA-Elemente sind das 3'-UTR-Element der Histon-mRNA (Marzluff und Hanson, 1993) und die sog. AU-reichen RNA-Elemente (Ross, 1995; Sachs, 1993). Auch in der kodierenden Region sind regulatorische RNA-Elemente gefunden worden. Beispiele sind die mRNAs von c-myc und c-fos (Ross, 1995). Interessanterweise hat man festgestellt, dass die Deletion des Instabilitäts-elementes von c-fos zu einer Erhöhung der Onkogenität des Protoonkogens c-fos führt (Raymond *et al.*, 1989). Das unterstreicht die Bedeutung dieser posttranskriptionellen Regulationen.

Auch bei Viren findet man regulatorische RNA-Elemente vor allem auf mRNAs, die die Strukturproteine kodieren (Schwartz, 1998). Diese Regulation schafft möglicherweise Bedingungen für eine virale Persistenz und für ein Entkommen vor der Immunantwort des Wirtes. Beispiele finden sich bei HIV-1 (Felber und Pavlakis, 1993), HTLV-1 (Saiga *et al.*, 1997) und beim Hepatitis-B-Virus (Huang und Liang, 1993).

1.1.3.2. Negativregulatorische Elemente bei den Papillomviren

Die posttranskriptionelle Regulation der späten Papillomvirusgene verdient im Kontext der vorgelegten Arbeit eine genauere Betrachtung.

Man hat sowohl in der 3'-UTR als auch in der kodierenden Region der späten mRNAs regulatorische Elemente gefunden (Schwartz, 1998). Im HPV-1-Genom wurde ein AU-reiches regulatorisches Element in der 3'-UTR der späten mRNAs gefunden (Zhao *et al.*, 1996). Das Element interagiert mit einer Reihe von kernlokalisierten und zytoplasmatischen Proteinen in HeLa-Zellen (Zhao *et al.*, 1996). Es ist auffällig, dass die Interaktionspartner ebenfalls mit dem AU-reichen Element von c-fos wechselwirken (Sokolowski *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die späten Gene von HPV-1 und das Gen von c-fos unter derselben zellulären Regulation stehen (Sokolowski *et al.*, 1997).

Beim Rinderpapillomvirus BPV-1 wurde ein negativregulatorisches RNA-Element in der 3'-UTR „stromaufwärts“ des polyA-Signals identifiziert, das die Konzentration der zytoplasmatischen und polyadenylierten späten mRNAs reduziert (Furth und Baker, 1991). Dieses Element weist ausserdem eine Sequenzhomologie zur 5'-Spleiß-Stelle der späten Gene auf und interagiert mit der snRNA U1 (Furth *et al.*, 1995).

HPV-16 weist sowohl in der 3'-UTR als auch in der kodierenden Region negativ-regulatorische Elemente auf. In der 3'-UTR wurde eine aus 79 Nukleotiden bestehende Region identifiziert (Kennedy *et al.*, 1991), die aus vier zur 5'-Spleiß-Stelle homologen Abschnitten und einem GU-reichen Abschnitt besteht (Furth *et al.*, 1995; Dietrich-Goetz *et al.*, 1997). Schon früh wurde die Region mit einer erhöhten RNA-Degradation in Verbindung gebracht (Kennedy *et al.*, 1991). Mögliche Interaktionspartner sind die an der RNA-Prozessierung beteiligten Proteine U2AF⁶⁵ (Dietrich-Goetz *et al.*, 1997; Koffa *et al.*, 2000), CstF-64 und HuR (Koffa *et al.*, 2000) sowie die snRNA U1 (Furth *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Mengen an U2AF⁶⁵ und CstF-64 differenzierungsabhängig in Keratinozyten verändert werden (Koffa *et al.*, 2000).

In der kodierenden Region von HPV-16-L1 und -L2 sind ebenfalls negativregulatorische RNA-Elemente gefunden wurden (Tan *et al.*, 1995; Sokolowski *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 2002). Die negativregulatorischen Elemente der kodierenden Regionen decken größere Sequenzabschnitte als die 3'-UTR-Elemente ab (Schwartz, 1998). In der kodierenden Region von HPV-16-L2 wurde am 5'- und am 3'-Ende je ein Element identifiziert (Sokolowski *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass das 3'-Element mit den RNA-bindenden Proteinen hnRNP K sowie PCBP-1 und -2 interagiert (Collier *et al.*, 1998). Die kodierende Region von HPV-16-L1 konnte *in cis* die Expression eines Reportergens inhibieren (Tan *et al.*, 1995). Tan *et al.* zeigten ausserdem, dass die Anwesenheit der kodierenden Sequenz von L1 den Gehalt der jeweiligen mRNA reduzierte. Eine genauere Kartierung der inhibitorischen Sequenzen ergab, dass sich am 5'-Ende in den ersten 514 Nukleotiden der kodierenden Region von L1 multiple, unabhängig operierende Elemente befinden (Collier *et al.*, 2002). Collier *et al.* fanden ausserdem Hinweise, dass verschiedene andere Papillomviren vergleichbare Elemente in der kodierenden Region von L1 haben (Collier *et al.*, 2002).

1.1.3.3. Steigerung der Expression der späten Gene

In früheren Arbeiten sind einige Versuche unternommen worden, in die Regulation der späten Papillomvirusgene einzugreifen.

Heino *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von HPV-16-L1 und -L2 mit rekombinantem Semliki-Forest-Virus zu großen Mengen an L1- und L2-Protein führt (Heino *et al.*, 1995). Das Semliki-Forest-Virus gehört zu den Alphaviren, die im Zytoplasma replizieren. Zhou *et al.* hatten zuvor ähnliche Ergebnisse für BPV-1-L1 mit rekombinanten Vaccinia-Viren gezeigt (Zhou *et al.*, 1993). Vaccinia-Viren generieren ihre mRNAs im

Zytosol und umgehen damit ebenfalls den Kernexport. Diese Resultate lieferten im übrigen erste Hinweise, dass die inhibitorischen Sequenzen von L1 und L2 Kernfaktoren benötigen.

Tan *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von HPV-16-L1 mit Hybrid-mRNAs, die zusätzlich Transportelemente von HIV-1 oder SRV-1 („simian retrovirus 1“) enthielten, verbessert werden kann (Tan *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass Kernfaktoren an der Inhibition der späten mRNAs beteiligt sind, die durch die Transportelemente umgangen werden können.

Auch die inhibitorischen Sequenzen in den kodierenden Regionen konnten inaktiviert werden. Zhou *et al.* gelang ein interessanter Ansatz, indem sie die Sequenz BPV-1-L1 so veränderten, dass in Säugergenen seltene Kodons gezielt durch häufige Kodons ersetzt wurden, wobei sie sich dabei zunutze machten, dass der genetische Code degeneriert ist, d. h. dass bestimmte Aminosäuren von verschiedenen Kodons kodiert werden. Die BPV-L1-Proteinexpression konnte durch diesen Ansatz verbessert werden (Zhou *et al.*, 1999). Sie lieferten damit Hinweise, dass möglicherweise limitierende Kodons und damit verbunden bestimmte tRNA-Verfügbarkeiten einen Beitrag zur Regulation der späten Gene leisten. Die Autoren schließen allerdings auch nicht aus, dass durch die Sequenzveränderungen bisher nicht kartierte inhibitorische RNA-Elemente in der kodierenden Region von BPV-1-L1 inaktiviert wurden.

Collier *et al.* zeigten, dass die Einfügung von Punktmutationen in das 5'-Ende der kodierenden Region von HPV-16-L1 zu einer verstärkten Proteinexpression führt (Collier *et al.*, 2002). In diesem Bereich wurden multiple, unabhängig agierende inhibitorische Elemente identifiziert (Collier *et al.*, 2002).

1.1.3.4. Kodonverwendung als Regulation der Proteinexpression

Der genetische Code ist degeneriert, d. h. bestimmte Aminosäuren werden von mehreren Kodons kodiert (Nirenberg, 1965). Die meisten Zellen haben mehrere Gruppen von sog. isoakzeptierenden tRNAs, die Spezifität für dieselbe Aminosäure besitzen. Auf der anderen Seite binden viele tRNAs mehrere Kodons, die für eine bestimmte Aminosäure kodieren. Unterschiede im tRNA-Besatz sind sowohl zwischen verschiedenen Organismen als auch in verschiedenen Geweben bestimmter Organismen beobachtet worden (Smith, 1996). Innerhalb eines Organismus hat man in differenzierten und neoplastischen Zellen Abweichungen im tRNA-Besatz gefunden (Kanduc, 1997). Dies wird als eine mögliche Erklärung angesehen, warum dasselbe Gen in verschiedenen Organismen unterschiedlich stark exprimiert wird (Smith, 1996). Die Kodonverwendung kann also zur Genregulation beitragen. Es existiert

dabei eine Korrelation zwischen der Effizienz der Expression, insbesondere der Elongationsrate, und der Verwendung bestimmter Kodons in einem bestimmten Organismus (Holm, 1986). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Expressionssteigerungen durch Änderungen der Kodonbenutzungen in einigen zurückliegenden Arbeiten, z. B. in der Biotechnologie zur Steigerung der Erythropoietinproduktion (Kim *et al.*, 1997), für das Reporter-gen *gfp* (Zolotukhin *et al.*, 1996) und für das Strukturgen *env* von HIV-1 erfolgreich durchgeführt (Haas *et al.*, 1996).

Virus-Genome haben verglichen mit dem Wirtsgenom häufig einen unterschiedlichen GC-Gehalt (Strauss *et al.*, 1995). Das ist ein Hinweis auf eine unterschiedliche Kodonbenutzung. Eine genauere Betrachtung des BPV-1-Genoms ergab, dass einige Kodons verglichen mit der Verteilung im Wirtsorganismus überrepräsentiert sind (Zhou *et al.*, 1999). Die Untersuchung anderer Papillomvirustypen ergab ähnliche Ergebnisse (Zhou *et al.*, 1999). Durch die gezielte Veränderung dieser seltenen Kodons konnte die BPV-1-L1-Expression in undifferenzierten Säugerkzellen gesteigert werden. Es wird vermutet, dass die seltenen Kodons limitierend auf die tRNA-Verfügbarkeit wirken (Zhou *et al.*, 1999). Obwohl in Betracht gezogen werden muss, dass durch diese Mutationen mögliche regulatorische RNA-Elemente inaktiviert wurden (siehe Kapitel 1.1.3.2.), lieferten diese Ergebnisse erste Hinweise, dass eine selektive Kodonbenutzung zur Regulation der späten Papillomvirusgene beiträgt.

1.1.4. Strukturproteine und Kapsidbildung

Das HPV-Kapsid setzt sich aus dem Hauptstrukturprotein L1 und dem Nebenstrukturprotein L2 zusammen. L1 ist ein 55 kDa großes Protein, das die Fähigkeit hat zu oligomerisieren. Es kann sich zu Homopentameren, sog. Kapsomeren, zusammenlagern. Kapsomere von COPV („canine oral papilloma virus“) haben einen Sedimentationskoeffizienten von 11 – 14 S (Yuan *et al.*, 2001). 72 dieser Kapsomere bilden das virale Kapsid mit einem T = 7 ikosaedrischen Aufbau (Baker *et al.*, 1991). Kapsomere bilden sich im Zytosol und sind in der Lage, die Kernporen zu passieren (Merle *et al.*, 1999).

Es gibt Hinweise, dass der C-Terminus von L1 während der Kapsidbildung Wechselwirkungen mit dem benachbarten Kapsomer schafft (Modis *et al.*, 2002). Interkapsomere Disulfidbrücken sorgen für eine weitere Stabilisierung des Kapsids (Sapp *et al.*, 1998; McCarthy *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Modis *et al.*, 2002) (Abb. 1.4).

L1 ist alleine fähig, nach heterologer Überexpression mit rekombinanten Bakuloviren, rekombinanten Vacciniaviren, rekombinanten Alphaviren und in Hefen kapsidartige Struk-

turen, sog. virusartige Partikel („virus-like particles“, VLP) zu bilden (Zhou *et al.*, 1991a; Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993; Sasagawa *et al.*, 1995; Heino *et al.*, 1995) (Abb. 1.4). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten bei einer Auflösung von 3,5 nm, dass diese virusartigen Partikel nativen Virionen sehr ähnlich sind (Hagensee *et al.*, 1994). Die Sedimentationskoeffizienten papillomvirusartiger Partikel betragen 150 S für HPV-11 (McCarthy *et al.*, 1998) und 140 S für COPV (Yuan *et al.*, 2001).

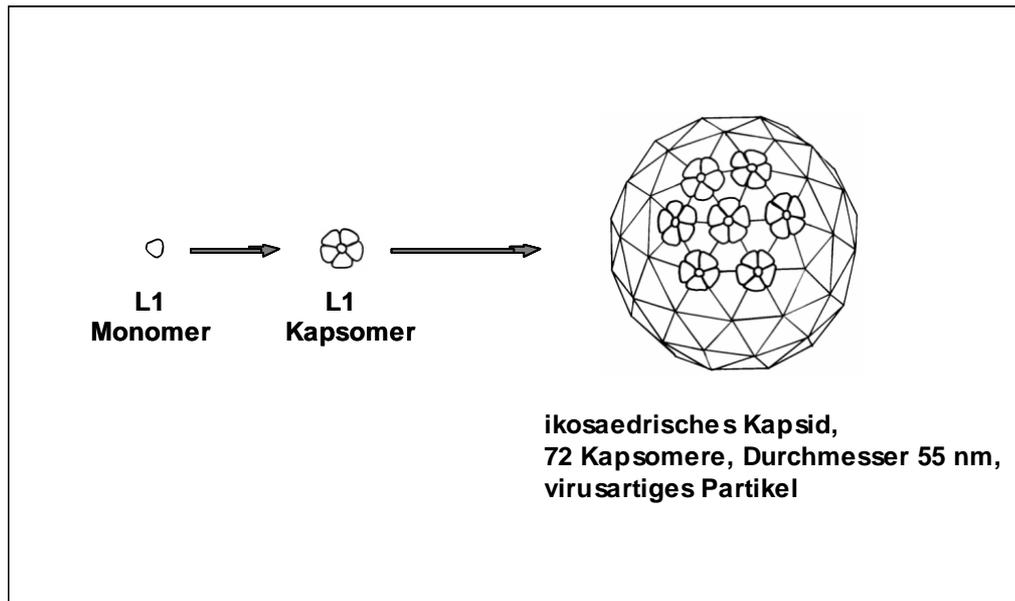


Abb. 1.4: Bildung von virusartigen Partikeln (VLPs). Papillomvirus-L1-Monomere oligomerisieren zu sog. Kapsomeren. 72 hexavalente Kapsomere bilden das ikosaedrische Kapsid. Abb. nach Paintsil, 1998.

L2 ist – basierend auf der Primärsequenz – ein 55 kDa großes Protein, das nur zu einem kleinen Teil – 12 Proteine pro Virion – zur Kapsidstruktur beiträgt (Kirnbauer *et al.*, 1993). Auffällig ist, dass das Laufverhalten von L2 im SDS-Gel nicht dem aus der Primärsequenz errechneten Molmasse entspricht (Tornese Buonamassa *et al.*, 2002). Es gibt Hinweise, dass L2 für die Infektiosität wichtig ist (Kawana *et al.*, 2001; Stauffer *et al.*, 1998; Unckell *et al.*, 1997). Kürzlich sind ausserdem einige zelluläre Interaktionspartner identifiziert wurden (Görnemann *et al.*, 2002). Die exakte Rolle von L2 in der HPV-Morphogenese ist bisher jedoch noch unklar. Es sind ausserdem Hinweise gefunden worden, dass L2 mit Kapsomeren aus L1 im Zytosol Komplexe bilden kann, die in den Kern gelangen können (Florin *et al.*, 2002). Darüber hinaus sind jedoch für Papillomviren im Gegensatz zu den verwandten Polyomaviren (Yuen und Consigli, 1985) bisher keine Kapsidbildungsintermediate beschrieben worden. Dagegen wurden nach Überexpression Hinweise auf Nebenprodukte in

Form von irregulär kleinen Kapsiden (Zhou *et al.*, 1991a; Sasagawa *et al.*, 1995) und von tubulären Strukturen (Kirnbauer *et al.*, 1993; Sasagawa *et al.*, 1995) gefunden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich eine N-terminale Deletionsmutante von HPV-16 L1 zu kleineren ikosaedrischen Kapsiden bestehend aus 12 Kapsomeren zusammenlagert (Chen *et al.*, 2000b).

1.1.5. E7: Aufbau, Domänen, Funktionen

E7 war das erste entdeckte Onkoprotein der Hochrisiko-HPV-Typen. Es ist ein saures, ca. 21 kDa großes Phosphoprotein (Smotkin und Wettstein, 1987), das aus 98 Aminosäuren besteht.

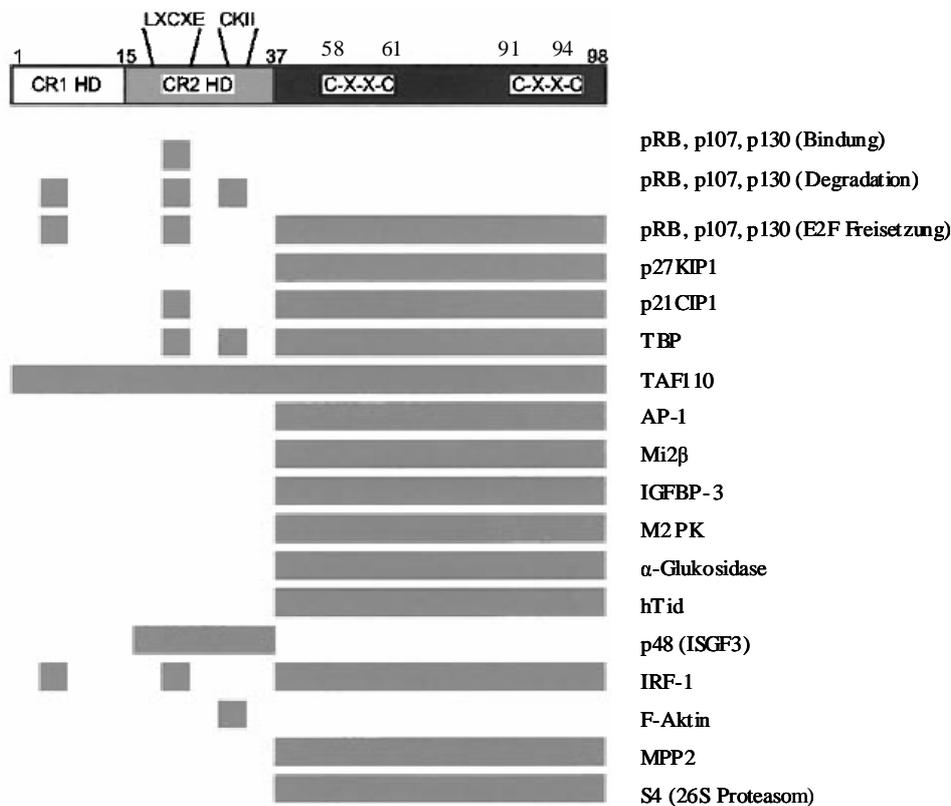


Abb. 1.5: Aufbau und Interaktionspartner von HPV-16-E7.

Die grauen Balken zeigen die jeweiligen Wechselwirkungsbereiche des E7 mit den aufgelisteten Interaktionspartnern. CR1 HD, CR1 homologe Domäne; CR2 HD, CR2 homologe Domäne; LXCXE, RB-Bindungsmotiv; CKII, Phosphorylierungsstelle der Casein-Kinase II; CXXC, Zink-Finger-Motiv

Abb. nach Münger *et al.*, 2001

Der N-Terminus von E7 weist große Homologie zu den Domänen 1 und 2 des E1A-Proteins der Adenoviren (CR1 und CR2) und einer Region im großen T-Antigen von SV40 auf (Abb. 1.5). Über das LXCXE-Motiv dieser Region findet die Interaktion mit dem zellulären Tumor-

suppressor RB statt (Phelps *et al.*, 1992). Im N-terminalen Bereich befindet sich eine Phosphorylierungsstelle der Casein-Kinase II (Barbosa *et al.*, 1990). Der C-Terminus enthält eine Zink-Finger-Domäne mit zwei Kopien eines Cys-X-X-Cys-Motivs im Abstand von 29 Aminosäuren (McIntyre *et al.*, 1993). Diese Domäne fungiert als Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsdomäne (McIntyre *et al.*, 1993; Clements *et al.*, 2000). Mutationen in den Cys-X-X-Cys-Motiven reduzieren die transformierenden Eigenschaften von E7 (McIntyre *et al.*, 1993) und destabilisieren das Protein (Phelps *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1999). Der C-Terminus ist ausserdem an der Interaktion mit zahlreichen zellulären Faktoren beteiligt (Abb. 1.5) (Münger *et al.*, 2001).

E7 lokalisiert überwiegend im Zellkern (Sato *et al.*, 1989), obwohl ein typisches Kernwanderungssignal fehlt. Auf der anderen Seite wurden einige nicht im Kern lokalisierte Wechselwirkungspartner gefunden, z. B. die dimere M2-Pyruvatkinase (M2PK; Abb. 1.5) (Zwerschke und Jansen-Dürr, 2000) und die S4-Untereinheit des 26S-Proteosoms (Münger *et al.*, 2001; Abb. 1.5).

E7 hat niedrige „steady-state levels“, was auf die relativ niedrige Halbwertszeit von ca. 30 min zurückgeführt wird (Smotkin und Wettstein, 1987; Reinstein *et al.*, 2000).

1.2. DNA-Immunisierung

Das Konzept der Vakzinierung wurde erstmals von Edward Jenner vor über 200 Jahren mit einem von der Kuh stammenden Pockenvirus demonstriert. Seitdem wurden mit der Methode der Vakzinierung zahlreiche Triumphe gegen infektiöse Agenzien gefeiert. Es sind jedoch eine Reihe von Herausforderungen geblieben, darunter das humane Immundefizienz-Virus (HIV), das Hepatitis-C-Virus, der Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum* und nicht zuletzt die humanen Papillomviren mit prophylaktischen und therapeutischen Aspekten. Ein Hindernis scheint zu sein, dass ein effektiver Schutz gegen diese Pathogene auch eine zelluläre Immunantwort erfordert. Sämtliche gegenwärtig lizenzierten Impfstoffe stimulieren aber vor allem die Antikörperproduktion. Von den etablierten Impfstoffen induzieren nur die attenuierten Organismen effiziente zelluläre Immunantworten. Der Einsatz von attenuierten Papillomviren oder humanen Immundefizienz-Viren wirft jedoch berechtigte Sicherheitsbedenken auf. In den letzten Jahren ist deshalb an Alternativen gearbeitet worden. Es konnte gezeigt werden, dass sog. DNA-Vakzine die Bedingungen erfüllen, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort zu erzeugen (Gurunathan *et al.*, 2000). Typischerweise besteht ein DNA-Vakzin aus einem bakteriellen Plasmid, das das Gen des Pathogens oder

Tumorantigen enthält. Zur Erhöhung der Expression ist das Gen häufig unter die Kontrolle eines starken viralen Promotors gestellt. DNA-Vakzine werden normalerweise in simplen Salzlösungen administriert und häufig intramuskulär (*i. m.*) injiziert. Alternative Applikationsarten, wie z. B. die „gene gun“-Technik, werden zur Zeit ausprobiert. Bei der „gene gun“-Technik werden Goldpartikel mit der DNA beschichtet und gasgetrieben unter die Haut gedrückt.

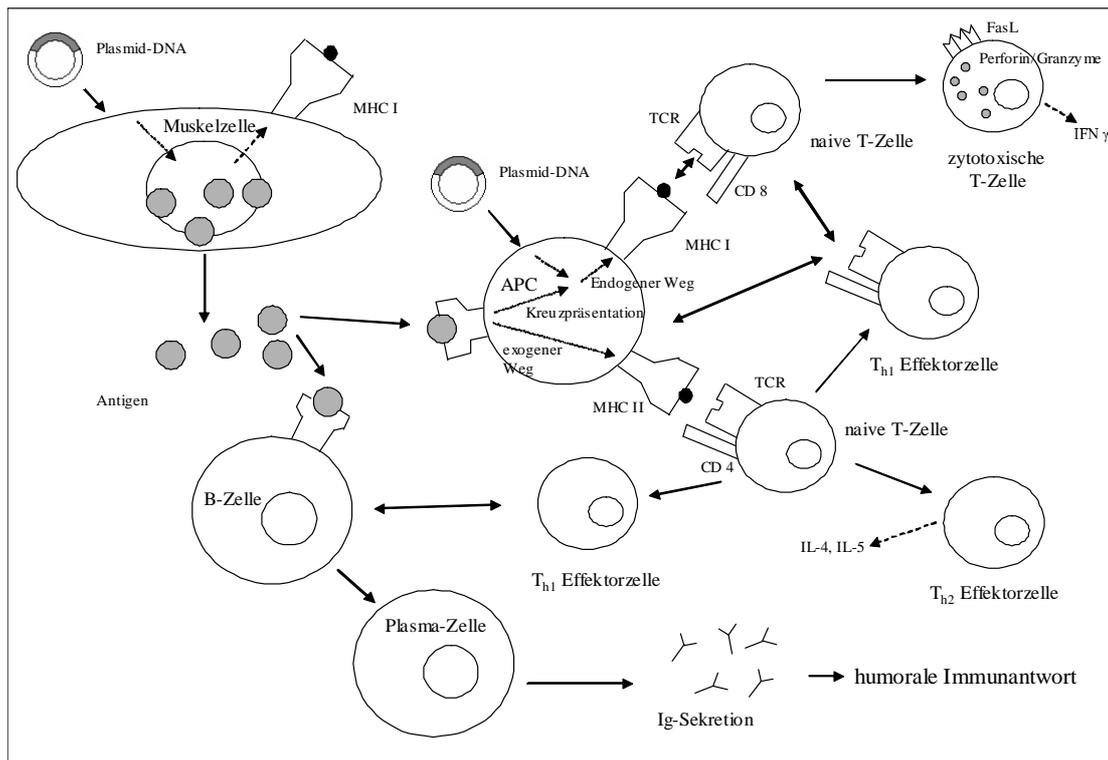


Abb. 1.6: Immunantworten nach DNA-Immunisierung.

Somatische Zellen nehmen die applizierte Plasmid-DNA auf und produzieren das Antigen. Freigesetztes Antigen kann einerseits von B-Zellen erkannt werden und zur Antikörperproduktion führen oder von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und auf MHC I und II Komplexen präsentiert werden. Ausserdem kann antigenkodierende Plasmid-DNA von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden. Auf diesem Wege wird das Antigen über den sog. endogenen Weg auf MHC I Komplexen präsentiert. Die Präsentation auf MHC I und II Komplexen führt zur T-Zellantwort mit zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen.

APC, antigenpräsentierende Zelle; CD 4 und 8, Differenzierungscluster; FasL, Fas-Ligand; Ig, Immunglobulin; IL, Interleukin; TCR, T-Zellrezeptor; MHC I und II, Haupthistokompatibilitätskomplexe.

Nach der Injektion in den Organismus tritt das Plasmid in die Wirtszelle ein und liegt im Zellkern episomal vor (Seder und Gurunathan, 1999). Das Antigen wird dann synthetisiert, da der Metabolismus der Wirtszelle die episomale DNA mit einbezieht. Aus dieser Tatsache ergeben sich einige potentielle Vorteile gegenüber der Immunisierung mit rekombinantem Protein oder getöteten Organismen: Ein intrazellulär produziertes Protein wird höchst-

wahrscheinlich mit der nativen Konformation gefaltet, mit den spezifischen post-translationalen Modifikationen der Wirtszelle versehen und oligomerisiert möglicherweise geeignet. Nach postnekrotischer und postapoptotischer Freisetzung könnte dadurch die Produktion von neutralisierenden Antikörpern ermöglicht werden. Ausserdem enthält bakterielle Plasmid-DNA unmethylierte Cytidinphosphatguanosin-Motive (CpG), die zelluläre Immunantworten verstärken können (Roman *et al.*, 1997).

Darüber hinaus wird die Herstellung eines DNA-Vakzins als relativ einfach und kosteneffektiv betrachtet (Gurunathan *et al.*, 2000). Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass Bedenken zur Sicherheit von DNA-Vakzinen aufgekommen sind. Es ist möglich, dass die Plasmid-DNA in das Wirtsgenom integriert und dadurch eine maligne Entartung der Zelle erzeugen könnte (Seder und Gurunathan, 1999). Bislang sind dafür jedoch keine klaren Hinweise gefunden worden (Gurunathan *et al.*, 2000).

Die Antigenpräsentation nach Immunisierung mit antigenkodierender DNA läuft im wesentlichen über drei Mechanismen (Gurunathan *et al.*, 2000) (Abb. 1.6):

Erstens werden Epitope auf MHC-I-Komplexen transfizierter somatischer Zellen präsentiert (sog. „direct priming“). Die antigenexprimierenden somatischen Zellen sind aber wahrscheinlich nicht direkt an der Induktion der Immunantwort beteiligt (Gurunathan *et al.*, 2000). Es wird vielmehr angenommen, dass sie als „Antigenreservoir“ zur Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort beitragen (Gurunathan *et al.*, 2000).

Zweitens können ebenfalls professionelle antigenpräsentierende Zellen direkt mit der antigenkodierenden DNA transfiziert werden, was zu einer Antigenpräsentation über den sog. endogenen Weg auf MHC-I-Komplexen und dadurch zu einer Induktion von mit dem Fas-Liganden (CD 178) und mit Perforin/Granzymen bewaffneten zytotoxischen T-Zellen führt, die nach ihrer Aktivierung $\text{IFN}\gamma$ sezernieren und antigenexprimierende Zielzellen abtöten können (Zusammengefasst in Barry und Bleackley, 2002).

Drittens produzieren transfizierte somatische Zellen das Antigen in großen Mengen, so dass es zu post-apoptotischem oder post-nekrotischem Transfer des Antigens in professionelle antigenpräsentierende Zellen kommen kann (sog. „cross priming“). Es konnte gezeigt werden, dass das Antigen auf diese Weise nicht nur über den sog. exogenen Weg auf MHC-II-Komplexen präsentiert wird, sondern dass es zur sog. Kreuzpräsentation auf MHC-I-Komplexen kommen kann (Heath und Carbone, 2001). Die Präsentation auf MHC-II-Komplexen von antigenpräsentierenden Zellen führt zur Induktion der T-Helferzellen (Th1 und Th2), die akzessorische Funktionen bei der Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen übernehmen. Die T-Helferzellen sezernieren dafür eine Reihe von Zytokinen, darunter

Interleukin-4 und -5. Die Helferantwort nimmt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von Immunreaktionen insbesondere gegen Tumore ein (Toes *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 1998).

Freigesetztes Antigen kann ausserdem B-Zellen aktivieren und somit zur Antikörperproduktion, also zur humoralen Immunantwort führen.

Nach der ersten erfolgreichen Verwendung, um Immunantworten gegen Influenzaviren zu erzeugen (Ulmer *et al.*, 1993), hat sich die Immunisierung mit antigenkodierender Plasmid-DNA in der letzten Dekade als effizienter Ansatz zur Erzeugung von Immunantworten gegen virale (Chen *et al.*, 1999), parasitäre (Nielsen *et al.*, 1999) und bakterielle (Fensterle *et al.*, 1999) Pathogene erwiesen.

1.3. Immunisierungen gegen Papillomviren

Man geht davon aus, dass ein Impfstoff gegen HPV-16 eine persistierende Infektion verhindern und dadurch die Häufigkeit des Gebärmutterhalskrebses senken könnte (Koutsky *et al.*, 2002). Daneben würde ein effektives Vakzin ausserdem die Ausgaben für etablierte Behandlungen von HPV-Infektionen und assoziierten Erkrankungen reduzieren (Hughes *et al.*, 2002).

Im wesentlichen werden zur Zeit drei Strategien zur Entwicklung von Impfstoffen gegen Papillomviren verfolgt:

Die erste Strategie ist ein prophylaktischer Ansatz mit dem Ziel, neutralisierende Antikörper gegen die Strukturproteine zu erzeugen, um den Viruseintritt in die basalen epithelialen Keratinozyten zu verhindern. Hier ist die Entwicklung von virusartigen Partikeln (VLP) bestehend aus L1 oder L1 und L2 sehr vielversprechend (Schiller, 1999). Virusartige Partikel (Abb. 1.7) können durch Expression der Strukturproteine mit verschiedenen Expressionssystemen hergestellt werden (Zhou *et al.*, 1991a; Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993; Sasagawa *et al.*, 1995; Heino *et al.*, 1995). Virusartige Partikel verschiedener HPV-Typen sind produzierbar (Schiller, 1999). VLPs ähneln morphologisch den nativen Virionen (Hagensee *et al.*, 1994), präsentieren konformative Epitope und können neutralisierende Antikörper induzieren (Roden *et al.*, 1996). Zusätzlich zu den virusartigen Partikeln sind einige andere prophylaktische Immunisierungsverfahren untersucht worden. So ist auch das Nebenstrukturprotein L2 als Antigen getestet worden. Die Immunisierung mit L2 als Antigen bietet den Vorteil, dass ein Epitop von L2 eine Kreuzprotektion gegen verschiedene HPV-Typen induzieren kann (Kawana *et al.*, 1999).

Die Immunisierung mit Plasmid-DNA basierend auf dem L1-Gen lieferten für HPV-16 nur enttäuschende Ergebnisse (Dupuy *et al.*, 1999; Rocha-Zavaleta *et al.*, 2002). Für bestimmte andere Papillomvirustypen und bestimmte Administrationswege konnten jedoch auch durch DNA-Immunisierungen stärkere L1-spezifische Antikörperantworten induziert werden (Sundaram *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2000). Ausserdem ist es ähnlich wie in der vorgestellten Arbeit für HPV-6b gelungen, die Antikörperantwort gegen L1 nach DNA-Immunisierung durch Kodonveränderung des L1-Leserahmens zu verbessern (Liu *et al.*, 2002a).

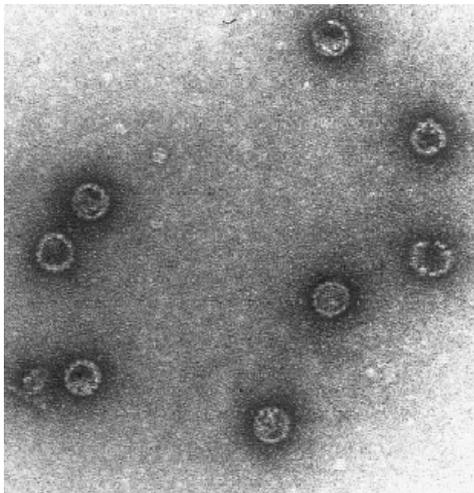


Abb. 1.7:
Elektronenmikroskopische Aufnahme
von virusartigen Partikeln aus HPV-16-L1.
Abb. aus Müller *et al.*, 1997

Alternativ zur DNA-Immunisierung wurde das L1-Gen durch bestimmte rekombinante Viren transportiert, die ihre mRNAs im Zytosol generieren und somit die Regulation der L1-Expression (Kapitel 1.1.3.) umgehen. Auf diese Weise wurden virusartige Partikel in undifferenzierten Zellen erzeugt (Heino *et al.*, 1995; Hagensee *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1991a) und papillomvirusspezifische humorale Immunantworten induziert (Reuter *et al.*, 2002). Ausserdem wurden attenuierte Bakterien als Vektoren erfolgreich zur L1-Antigenexpression verwendet (Nardelli-Haefliger *et al.*, 1997).

Die zweite Strategie verfolgt das Ziel, eine zelluläre Immunantwort gegen Nichtstrukturproteine zu erzeugen, um infizierte Zellen zu eliminieren und eine Tumorregression zu bewirken. Für die frühe Infektionsphase würden sich die Genprodukte der frühen Gene E1 und E2 wegen ihrer Funktionen bei der Replikation des viralen Genoms und der Transkription der frühen viralen Gene eignen. E1 und E2 werden jedoch nur schwach exprimiert und ausserdem werden die beiden Gene bei der Integration des viralen Genoms häufig deletiert

(Schwarz *et al.*, 1985) und gehen somit häufig schon in der Anfangsphase der malignen Progression verloren. Die Onkoproteine E6 und E7 werden dagegen in allen Phasen der malignen Progression exprimiert. Sie werden deshalb als geeignetes Ziel einer therapeutischen Immunisierung betrachtet (Chen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992).

Es wurden synthetische Peptide mit E7- und E6-Epitopen (Feltkamp *et al.*, 1993; van Driel *et al.*, 1999; Rensing *et al.*, 1999) und rekombinantes E7-Protein (Fernando *et al.*, 1999; Hariharan *et al.*, 1998) als therapeutische Vakzine entwickelt. Ausserdem wurden rekombinante Viren (Meneguzzi *et al.*, 1991; Borysiewicz *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001; He *et al.*, 2000; Daemen *et al.*, 2002) und attenuierte Bakterien (Krul *et al.*, 1999) als Vektoren zur Immunisierung gegen E6 und E7 verwendet. Daneben wurde versucht, autologe dendritische Zellen mit den Onkoproteinen zu beladen (Murakami *et al.*, 1999) oder spezifische zytotoxische T-Zellen zu transferieren (Gariglio *et al.*, 1998). Auch DNA-Immunisierungen sind als therapeutische Vakzine gegen Papillomviren erprobt worden. Das unmodifizierte E7-Gen hat sich in diesem Ansatz als ungeeignet erwiesen, weil einerseits die zelluläre Immunantwort schwach ausfällt (Shi *et al.*, 1999; Smahel *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 2002a) und andererseits die Gefahr onkogener Transformationen nach Applikation des unmodifizierten E7-Gens besteht. Konsequenterweise wurden eine Reihe von Modifikationen des E7 in der DNA-Immunisierung ausprobiert, um die Immunogenität zu erhöhen und das Transformationspotential zu senken. E7-Anteile wurden mit verschiedenen Proteinimport und -exportsignalen (Hung *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2002a), mit dem Hitze-Schock-Protein HSP70 (Chen *et al.*, 2000a) oder mit einem Signal zur Steuerung des E7-Proteins in lysosomale/endosomale Kompartimente (Ji *et al.*, 1999) fusioniert. Daneben sind Mutationen in das E7 eingefügt worden, um das Transformationspotential von E7 zu senken (Shi *et al.*, 1999; Smahel *et al.*, 2001). Interessant ist, dass diese Mutationen auch die Immunogenität erhöhten. Ausserdem wurde die Primärsequenz des E7 so rearrangiert, dass das Transformationspotential von E7 verloren ging, gleichzeitig aber bekannte ZTL-Epitope erhalten blieben (Osen *et al.*, 2001). Auch die Kodonbenutzung von E7 wurde verändert, was ebenfalls die Immunogenität von E7 in einer DNA-Immunisierung erhöhte (Liu *et al.*, 2002b). Allerdings muss bei dieser Arbeit beachtet werden, dass die Veränderung der E7-Sequenz zu zwei Punktmutationen der Primärsequenz führte.

Als dritte Strategie wird gegenwärtig die Kombination der prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung diskutiert. Es ist gelungen, das Hauptstrukturprotein L1 mit Teilen des viralen Tumorantigens E7 zu verbinden und dadurch sog. chimäre virusartige Partikel

(cVLP) zu erzeugen (Müller *et al.*, 1997). Immunisierungen mit diesen cVLPs induzierten E7-spezifische zelluläre Immunantworten (Greenstone *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1999). Es wurde auch versucht, das Kombinationskonzept der chimären Genprodukte auf die DNA-Immunisierung zu übertragen. Die DNA-Immunisierung mit einem L1/E7-Fusionsgen von HPV-16 hat sich allerdings als uneffizient erwiesen (Smahel *et al.*, 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Immunisierung mit einem kodonveränderten HPV-6b-L1, fusioniert mit Anteilen von HPV-16-E7 und alternativ von HPV-6b-E7, VLP-spezifische Antikörper und nach Konjugation mit Ubiquitin auch zytotoxische T-Zellen induziert (Liu *et al.*, 2002a).

1.4. Zielsetzung

Entwicklung einer prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung gegen das humane Papillomvirus 16 zur Erzeugung von kapsidspezifischen Antikörpern und E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen auf Basis einer DNA-Immunisierung.

Das Ziel war zunächst, die Proteinexpression des Hauptstrukturgens durch Veränderung der Kodonverwendung in undifferenzierten Zellen zu erhöhen, um dann das veränderte Hauptstrukturgen und Teile des viralen Tumorantigens E7 für die Kombinationsstrategie zu fusionieren und als DNA-Vakzin zu testen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Bakterien

2.1.1.1. Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Referenz
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie, HPV18 E6/E7-transformiert	ATCC-Nr. CCL-2
293T	Embryonale Nieren-Zelllinie, Ad5 E1A/B-transformiert, enthält das große T-Antigen von SV40	Pear <i>et al.</i> , 1993
911	Embryonale Retinoblasten-Zelllinie, transformiert mit Ad5 E1A/B	Fallaux <i>et al.</i> , 1996
RMA	C57Bl/6-Thymom-Zelllinie	Ljunggren und Kärre, 1985
RMA-E7	RMA-Zelllinie, stabil transfiziert mit HPV-16 E7	Speidel <i>et al.</i> , 1997

2.1.1.2. Bakterien

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	Amplifikation von Plasmiden	Laborbestand
<i>E. coli</i> SURE	Amplifikation von AAV-Vektorplasmiden	Stratagene
<i>E. coli</i> HB101	Amplifikation von Plasmiden	Stratagene

2.1.2. Oligonukleotide

In der Tabelle sind die Oligonukleotide für die Herstellung des „humanisierten“ L1-Leserahmens aufgelistet. Die Oligonukleotide 24NsiI und 25NsiI wurden zur Einfügung einer NsiI-Schnittstelle eingesetzt. Diese Modifikation diente zur Vorbereitung des L1h/E7-Fusionsgens (Kapitel 3.2.1.). Die Oligonukleotide wurden von der Serviceeinheit für Oligonukleotidsynthese des Deutschen Krebsforschungszentrums hergestellt. Der für Pflanzen optimierte L1-Leserahmen wurde zu Beginn der Arbeit von Herrn Dr. Martin Müller (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Nr.	Sequenz 5'-3'
1	AAAAAATCTAGAGCCACCATGAGCCTGTGGCTGCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGAGCAAGGTG
2	CCTGCTGGTGCCGGCGTGGTAGTAGATGTTGGTCTGGCCACGTACTCGTCGGTGCTCACCACCTTGCTACGGGCACGGG
3	TACCACGCCGGCACCAGCAGGCTGTGGCCGTGGGCCACCCCTACTTCCCCATCAAGAAGCCCAACAACAAGATCCTG
4	GTTGGGGTCGGGCAGGTGGATCCTGAACACCCTGTACTGCAGGCCGCTACCTTGGGCACCAGGATCTGTGTGTTGTTGGG
5	ATCCACCTGCCCGACCCCAACAAGTTCGGCTTCCCCGACACCAGCTTCTACAACCCCGACACCCAGAGGCTGGTGTGGCC
6	GGGGTGGCCGCTGATGCCACGCCAGGGGCTGGCCCTGCCACCTCCACGCCACGCAGGCCACACCAGCCTCTGGGT
7	GTGGGCATCAGCGGCCACCCCTGTGTAACAAGCTGGACGACACCGAGAACGCCAGCGCCTACGCCGCCAACGCCGGCGT
8	GCAGCCGATCAGGCACAGCTGGGTCTGCTTGTAGTCCATGCTGATGCACTCCCTGTTGTCCACGCCGGCGTGGCGCGTA
9	CAGCTGTGCCTGATCGGCTGCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCTGCACCAACGTGGCCGTGAAC
10	CACCATGTCGCCGCTCTGGATCAGGTTGTGATCAGCTCCAGGGGGGGCAGTCGCCGGGTTACGGCCACGTTGGTGCA
11	ATCCAGGACGGCGACATGGTGGACACCGGCTTCGGCGCCATGGACTTACCACCCTGCAGGCCAACAAGAGCGAGGTGCC
12	GGGCTCGCTCACCATCTGTATGTAGTCGGGGTACTTGCAGATGCTGGTGCAGATGTCAGGGGCACCTCGCTCTGTGGC
13	ATCAAGATGGTGAGCGAGCCCTACGGCGACAGCTGTTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGAGGCACCTGTT
14	GCCGCTGCCCTGATGTACAGGTCTCGGGCAGTTCGCCCCACGGCGCCGGCCCTGTTGAACAGGTGCCCTACGAAAT
15	CTGTACATCAAGGGCAGCGGCAGCACCGCCAACCTGGCCAGCAGCAACTTCCCCACCCCGAGCGCAGCATGGTGACC
16	GTTGTTGTGGCCCTGGGCCCTCTGCAGCCAGTAGGGCTTGTGAAGATCTGGGCGTCGCTGGTCACCATGCTGCCGCTGGG
17	AGGGCCAGGGCCACAACAACGGCATCTGCTGGGCAACCAGCTTTCGTGACCGTGGTGGACACCACAGGAGCACCAAC
18	CTTGAAGTTGGTGTCTTGTAGGTGGTCTCGCTGGTGTGATGGCGGCGCACAGGCTCATGTTGGTGCTCCTGGTGGTGC
19	TACAAGAACACCAACTTCAAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGAGTACGACCTGCAGTTTATCTTCCAGCTGTGCAAGATC
20	GTCCTCCAGGATGGTGTGTTTATGCTGTGGATGTAGGTCATCACGTCGCGGTCAGGGTATCTTGACAGCTGGAAGAT
21	AACAGCACCATCTGGAGGACTGGAACCTCGGCCTGCAGCCCCCGGGCGCACCTGGAGGACACCTACAGGTTCTGTG
22	CAGGGGTCCTCCTTGGGGCGGGGGGGTGTGCTTCTGGCAGCGATGGCCTGGCTGGTCACGAACCTGTAGGTGTCTC
23	GCCCCAAGGAGGACCCCTGAAGAAGTACACCTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCGACTGGACCAG
24	GGCCTTCAAGCCGGCTGCAGCAGGAACCTCTGCCAGGGGAACCTGTCCAGGTTCGGCGCTGAA
25	CTGCAGCCGGCCTGAAGGCCAAGCCCAAGTTCACCTGGGCAAGAGGAAGGCCACCCACCACCAGCAGCACCAGC
26	AAAAAAAAGCTTTCACAGTTCCTCTTCTCTTCTTGGCGGTGGTGTGCTGGTGTGCTGGTGGTGGG
24NsiI	GGCATGATGCCGGCCTGCAGCAGGAACCTCTGCCAGGGGAACCTGGTCCAGGTTCGGCGCTGAA
25NsiI	CTGCAGCCGGCATGCATGCCAAGCCCAAGTTCACCTGGGCAAGAGGAAGGCCACCCACCACCAGCAGCACCAGC

2.1.3. Antikörper und Antiseren

2.1.3.1. Erstantikörper

Bezeichnung	Spezifität	Referenz/Hersteller
1.3	Maus monoklonal gegen assembliertes HPV-16-L1 (Kapside und Kapsomere)	Martin Müller (DKFZ), Müller <i>et al.</i> , 1997
25/C	Maus monoklonal gegen assembliertes HPV-16-L1 (Kapside und Kapsomere)	Martin Müller (DKFZ)
4543	Polyklonales Antiserum (Kaninchen) gegen HPV16-L1	Martin Müller (DKFZ)
Anti-E7 (Hybridom II)	Maus monoklonal gegen HPV-16-E7 (1-60), Hybridom-Überstand	Martin Müller (DKFZ)
Anti-IFN γ (1. Antikörper)	gegen Maus-IFN γ (Ratte), für ELISPOT-Analysen, Stock: 0,5 mg / ml	Pharmigen (# 554431)
Anti-IFN γ (2. Antikörper)	gegen Maus-IFN γ (Ratte), biotinyliert, für ELISPOT-Analysen, Stock: 1 mg / ml	Pharmigen (# 554410)
Anti-GFP	Gemisch aus zwei monoklonalen Antikörpern (Maus) anti-GFP, Stock: 0,4 mg/ml	Roche, Mannheim (# 1814460)
B1	Maus monoklonal, gegen die VP-Proteine von AAV-2, Hybridom-Überstand	Laborbestand J. Kleinschmidt
CamVir-1	Maus monoklonal, gegen HPV16-L1	McLean <i>et al.</i> , 1990; Martin Müller (DKFZ)

2.1.3.2. Zweitantikörper

Bezeichnung	Hersteller
Ziege-anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt	Jackson Immunotech

2.1.4. DNA- und Proteinmarker

2.1.4.1. Proteinmarker

Der Proteinmarker enthielt die Referenzproteine Phosphorylase B (94 kDa), Carboanhydrase (66 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Albumin (30 kDa) und wurde auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.1.4.2. DNA-Marker

Bezeichnung	Referenz
Marker VII	Roche
Smart-Ladder	Eurogentec

2.1.5. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Enzypuffer wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Stratagene und United States Biochemical (Cleveland, USA) bezogen.

2.1.6. Plasmide

Ausführliche Restriktionskarten der klonierten Plasmide befinden sich im Anhang.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pBS	Klonierungsplasmid pBluescript II SK+	Stratagene
pBKcmv	Klonierungs- und Expressionsplasmid	Martin Müller (DKFZ)
pGEM-IRES-GFP	Bicistronisches Konstrukt mit einer IRES und eGFP als Reportergen	C. Wieth, GBF (Braunschweig)
pUF3	AAV-2 Vektorplasmid, <i>gfp</i> als Transgen	Zolotukhin <i>et al.</i> , 1996

2.1.7. Medien und Zusätze

2.1.7.1. Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
α MEM Zellkultur-Medium	Sigma
DMEM Zellkultur-Medium	Sigma
G418	Sigma
FKS	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL
RPMI-1640	Sigma
Trypsin (0,25 %) / EDTA (1 mM)	Gibco BRL

2.1.7.2. Bakterien (*E. coli*)-Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Sigma
Agar	Difco
Hefeextrakt	Difco
Trypton	Difco
Ampicillin	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Kanamycin	Sigma

2.1.8. Kits

Bezeichnung	Hersteller
ECL TM Chemilumineszenz-Kit	Amersham, Frankfurt
Renaissance [®] Enhanced Luminol Chemiluminescence Reagent Plus	NEN (jetzt Perkin Elmer)
GeneCleanII [®] -Kit	BIO101, LaJolla (USA)
Maxi-Präp-Kit	Qiagen, Hilden
Endofree-Maxi-Präp-Kit	Qiagen, Hilden
Endofree-Mega-Präp-Kit	Qiagen, Hilden
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
Mega-Präp-Kit	Qiagen, Hilden

2.1.9. Peptide

Das HPV-16-E7-Peptid (AS 49-57), Sequenz RAHYNIVTF (Feltkamp *et al.*, 1993), wurde freundlicherweise von Nico Michel (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

2.1.10. Radioaktives Material

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (NEN Life Science Products; Perkin Elmer Life Science GmbH)

2.1.11. Chemikalien

2.1.11.1. Allgemeine Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firma Biomol Feinchemikalien (Ilvesheim), BioRAD (Richmond, USA), Roche (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma Chemical Co. (Deisenhofen) in der jeweils höchsten Reinheitsstufe bezogen.

2.1.11.2. Spezielle Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Benzonase (Endonuklease)	Sigma Chemical Co. (Deisenhofen)
Cardiotoxin	Latoxan (Valence, Frankreich)
Chloroform	J. T. Baker (Deventer, NL)
BCIP/NBT-Substrat # B-1911	Sigma (Deisenhofen)
Isofluran	CuraMed Pharma GmbH (Karlsruhe)
Ketavet	Pharmacia Upjohn
Magermilchpulver	Fluka Biochemika (Neu-Ulm)
Metofane	Janssen-Cilag (Neuss)
Complete-Mini Protease-Inhibitor	Roche (Mannheim)
Rompun	Bayer
Thimerosal	Sigma (Deisenhofen)
TMB-Substrat	Devitron (Castrop-Rauxel)

2.1.12. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Beglimmgerät Balzers SCD 004	Bal-Tec, Lichtenstein
Blotkammer (Western Blot) SD1	CTI
Einfrierbox	BRL
Elektronenmikroskop Zeiss EM A10	Zeiss
Elektrophorese-Kammern (DNA/Proteine)	CTI
Elektroporationsgerät <i>E. coli</i> Pulser	BioRad
ELISA-Reader Emax	MWG Biotech
ELISA Reader Titertek Multiscan Plus MK II	Titertek
ELISPOT-Zähler AID Elispot transtec 1300	AID
FACS-Apparatur FACSort	BectonDickinson
Fluoreszenzmikroskop Dialux	Leitz
Fluoreszenzmikroskop Fotomikroskop	Zeiss
Folienschweißgerät C 220	Joisten&Kettenbaum
Konfokales Mikroskop Leica DM IRBE	Leica
Image Master [®] VDS (Geldokumentationssystem)	Pharmacia
Inkubator B5061	Heräus
Lichtmikroskop CK2	Olympus
Mikrowellengerät	Bosch
Multikanal-Pipette Finnpipette	Labsystems
PCR-Gerät Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
PH-Meter Calimatic 761	Knick
PH-Meter Sentron	Neolab
Pipettierhilfe R301	Tecnomara
Polaroid-Kamera MPK	Polaroid
Röntgenfilmkassetten	Kodak
Rotoren SLA3000, SLA 1500, SS34 (für Sorvall RC-5C / RC-5C Plus)	Sorvall
Rotoren für die Ultrazentrifuge TFT 41.14	Kontron
SW 41	Beckman
Schneidegerät Reichert Ultracut	Leica
Sonifier 250	Branson
Sorvall-Zentrifugen RC-5C, RC-5C Plus	Sorvall
Spannungsgeräte EPS 500/400 und 600	Pharmacia
„Speed-Vac“ Vakuum-Konzentriergerät	Bachofer
Spektrophotometer Ultrospec III	Pharmacia
Szintillationszähler 1450 Microbeta Plus	Wallac
Ultrazentrifuge Sorvall Combi Plus	Sorvall
„UV-Crosslinker“ Stratalinker	Stratagene
UV-Transilluminatoren N90 LW 254 nm oder 366 nm	Konrad Benda
Zentrifuge 5415	Eppendorf
Zentrifuge 2K15	Sigma
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heräus
Zentrifuge VarifugeF	Heräus
Zentrifuge Varifuge RF	Heräus
Zentrifuge ZK 380	Hermle

2.1.13. Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Diafilme Ektachrom 400	Kodak
Elektroporationsküvetten 0,1 cm	Invitrogen
ELISA-Platten # 3911	Becton Dickinson
Eppendorfgefäße 1,5 / 2 ml	Eppendorf
Falcon-Röhrchen 14 und 50 ml	Becton Dickinson
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Gel-Blotting Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Geltrockenfolien # V7131	Promega (Madison, USA)
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Kupfernetze für die Elektronenmikroskopie 300 mesh	Plano, Wetzlar
Mikrotiterplatten für die ELISPOT-Analyse # MAHAS4510	Millipore
Neubauer-Zählkammer HBG	Neubauer
Polaroidfilme 667	Siemens
Permafluor	Immunotech (Marseille, Fr)
Petrischalen	Greiner
Protran [®] BA 85 Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell
Quarzküvetten 1 ml/ 0,1 ml	Pharmacia
Röntgenfilme X-Omat AR	Siemens
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Szintillationsplatten LumaPlate # 6005164	Canberra Packard, Dreieich
Zellkulturschalen (6 / 10 / 15 cm)	Greiner / Nunc
Zellkulturflaschen (75 / 175 cm ²)	Greiner / Nunc
Zellschaber	Costar

2.1.14. Spezielle EDV

Clone Manager 5 für Windows 95 V5.20

Microsoft Office 2000 und XP

Sigma Plot 2001 V7.0 für Windows

2.1.15. Häufig gebrauchte Puffer und Lösungen

2 x Proteinpuffer

100 mM Tris/HCl pH 8,0

2 mM EDTA

4 % SDS

10 % β-Merkaptoäthanol

20 % Glycerin; 0,02 % Bromphenolblau

PBS

18,4 mM Na₂HPO₄

10,9 mM KH₂PO₄

125 mM NaCl

pH 7,5

PBST

PBS mit 0,05% Tween-20

SOC-Medium

2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

1 x TAE

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA pH 8,0

DNA-Ladepuffer (10 x)

50 mM EDTA pH 8,0

30 % Ficoll

2 % SDS

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

2.2. Kultivierung und Transformation von Bakterien

2.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium bei 200 UpM oder auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Medium ein entsprechendes Antibiotikum – in der Regel Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) – zugefügt.

LB-Medium

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

10 g Trypton

auf pH 7,0 einstellen

ad 1 l H₂O, autoklavieren

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Agar

2.2.2. Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

2.2.2.1. CaCl₂-kompetente Bakterien

Eine frische *E. coli*-Übernachtskultur wurde 1:100 in 250 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden 5 min auf Eis abgekühlt, 10 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert und in 250 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach

30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ / 14 % Glycerol aufgenommen. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit ca. 100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 90 s bei 42°C inkubiert, 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium verdünnt. Nach 1h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien 1 min bei 16500 x g abzentrifugiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Die Bakterien wurden in den verbliebenen 100 µl resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2. Elektrokompente Bakterien

Eine frische *E. coli*-Übernachtskultur wurde 1:100 in 1 l VM-Elpo-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde dann 20 min in Eiswasser abgekühlt und 10 min bei 5000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 1 l eiskaltem H₂O aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 500 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerol aufgenommen und ein letztes Mal sedimentiert. Nach Resuspendierung in 3 ml eiskaltem 10 % Glycerol wurden die Bakterien in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl des Ligationsansatzes versetzt. Nach Überführung in eine eiskalte Elektroporationsküvette erfolgte die Elektroporation bei einer Spannung von 18 kV/cm. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37 °C inkubiert. Nach 1h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien 1 min bei 16500 x g abzentrifugiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Die Bakterien wurden in den verbliebenen 100 µl resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

VM-Elpo-Medium

3,2 % Trypton

2 % Hefeextrakt

0,5 % NaCl

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der etablierten Zelllinien HeLa, 293T und 911 erfolgte in Einschichtkulturen in Gewebekulturflaschen oder –schalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich um DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamin (Stammlösung 50 mM) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml). Zur Vermehrung wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:10 in frischem Medium ausgesät.

Die im Zytotoxizitätstest verwendeten RMA-E7 und RMA Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Glutamin (Stammlösung 50 mM) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml) kultiviert. Das Medium für die RMA-E7 Zellen enthielt zusätzlich 0,8 mg/ml G418.

2.3.2. Kryokonservierung humaner Zellen

Es wurden ca. 1×10^7 Zellen bei 500 x g sedimentiert, in 1 ml eiskaltem 90 % FKS, 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend in einem Isopropanol-isolierten Behälter innerhalb von 24 h langsam auf –80 °C abgekühlt und dann in einen Flüssig-Stickstofftank überführt.

Eingefrorene Zellen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 500 x g wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt.

2.3.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde ein Aliquot der abgelösten Zellen mit einem gleichen Aliquot 0,4 % Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen wurden dadurch blaugefärbt. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus dem Produkt des Mittelwertes von vier ausgezählten Großquadraten (mit je 16 Kleinquadraten), dem Kammerfaktor 10^4 , dem Verdünnungsfaktor 2 (mit Trypanblau) und dem Suspensionsvolumen in ml.

2.3.4. Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode

Es wurde das modifizierte Kalziumphosphat-Verfahren nach Chen und Okayama (1987) für die Transfektion humaner Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen am Vortag der Transfektion ausgesät (2×10^5 Zellen in 3 ml pro 6 cm-Schale, 1×10^6 Zellen in 10 ml pro 10 cm-Schale), um bei Transfektion eine Zelldichte von ca. 60-70% zu erreichen. Pro Transfektionsansatz wurden 2-6 μg DNA (6 cm-Schale) oder 12-16 μg DNA (10 cm-Schale) mit 150 μl bzw. 500 μl steriler 280 mM CaCl_2 -Lösung gemischt. Nach Zugabe von 150 μl bzw. 500 μl 2 x BBS wurde die Lösung erneut gemischt und anschließend nach 10 min vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Die Transfektionen wurden 16-18 h bei 35 °C und 3 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand durch frisches Medium ersetzt. Die weitere Kultivierung verlief dann bei 37 °C und 5 % CO_2 .

2 x BBS

280 mM CaCl_2

50 mM BES

0,75 mM Na_2HPO_4

0,75 mM NaH_2PO_4

pH 6,95

2.4. Proteinanalyse

2.4.1. Herstellung von Proteinextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurde das Zellkulturmedium von den Schalen abgezogen, die Zellen mit 5 ml PBS abgespült und 10 min bei 500 x g sedimentiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 200 μl (pro 6 cm-Schale) oder 500 μl (pro 10 cm-Schale) 1 x Proteinpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgekocht und beschallt (Branson Sonifier 250), bis die Viskosität abgenommen hatte.

2.4.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Herstellung der Trenngele erfolgte nach Thomas und Kornberg (1975), die Herstellung der Sammelgele nach Laemmli (1970). Zuerst wurden die Trenngele in die mit 1 % Agarose abgedichteten Gelapparaturen gegossen und mit 2-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 2-Butanol mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurden die Trenngele mit den Sammelgelen überschichtet. Zur Herstellung der Geltaschen wurden Kämmen eingeführt. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophorese-Apparaturen eingespannt, die Apparaturen mit Laufpuffer gefüllt und die Kämmen entfernt. Pro Geltasche wurden maximal 25 µl an Probenvolumen aufgetragen. Minigele liefen bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA, Midigele ü. N. bei 8 mA, bis die Bromphenolblau-Front das Ende der Gele erreichte.

15 % Trenngel

2,5 ml Lösung A (30 % Acrylamid und 0,15 % Bisacrylamid)

1,25 ml Lösung B (1,5 M Tris-HCl pH 8,8 und 0,4 % SDS)

1,2 ml H₂O

33,3 µl 10 % APS

3,3 µl TEMED

5 % Sammelgel

250 µl Lösung A (30 % Acrylamid und 9,8 % Bisacrylamid)

625 µl Lösung C (0,75 M Tris-HCl pH 6,8 und 0,4 % SDS)

1,6 ml H₂O

25 µl 10 % APS

5 µl TEMED

Laufpuffer

375 mM Glyzin

50 mM Tris-HCl pH 8,8

0,1 % SDS

2.4.3. Silbernitratfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das Polyacrylamidgel wurde zunächst 1 h in Fixierer inkubiert. Danach wurde das Gel 3 x 20 min in 50 % Äthanol gewaschen und dann 1 min in Blocklösung inkubiert. Das Gel wurde dann dreimal je 20 s mit H₂O gewaschen und anschließend 20 min in Färbelösung inkubiert. Nach erneutem Waschen in H₂O (5 x 30 s) wurde das Gel mit Entwickler bis zur Entstehung klarer, braungefärbter Banden entwickelt. Anschließend wurde das Gel wiederum 3x 20 s in H₂O gewaschen und dann zum Beenden der Farbreaktion in Stopplösung eingelegt. Abschließend wurde das Gel in 50 % und 30 % Methanol gewaschen und zwischen Geltrockenfolien (Promega) über Nacht getrocknet.

Fixierer

50 % Methanol

12 % Essigsäure

0,02 % Formaldehyd

Blocklösung

0,8 mM Na₂S₂O₃ x 5 H₂O

Färbelösung

0,2 % AgNO₃

0,03 % Formaldehyd

Entwickler

6 % Na₂CO₃

0,02 % Formaldehyd

2 % Blocklösung

Stoplösung

50 % Methanol

12 % Essigsäure

2.4.4. Immunblot-Analyse

2.4.4.1. Western-Blot-Transfer von Proteinen

Zur Detektion der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden die Proteine nach dem „Semi-Dry“-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurden 6 Blätter Blotting-Papier und eine Nitrozellulose-Membran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und zusammen mit dem Trenngel in Blotting-Puffer angefeuchtet. Auf die Anode der Transferapparatur wurden der Reihe nach drei Blätter Blotting-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das Gel und die restlichen Blätter Blotting-Papier gelegt. Anschließend wurde die Kathode aufgesetzt und mit ca. 1 kg beschwert. Der Proteintransfer wurde bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Der Proteintransfer wurde durch Anfärbung der Membran mit Ponceau-S überprüft. Dazu wurde die Membran 10 s in Ponceau-S gelegt und sofort darauf mit PBS wieder entfärbt. Die transferierten Proteine wurden dadurch zeitweilig als rote Banden sichtbar. Anschließend wurden die transferierten Proteine immunologisch detektiert.

Blotting-Puffer

20 % Methanol

25 mM Tris-HCl pH 8,0

192 mM Glyzin

Ponceau-S

0,1 % Ponceau-S

1,5 % Trichloressigsäure

1,5 % Sulfosalicylsäure; 4,75 % Essigsäure

2.4.4.2. Immunologische Detektion transferierter Proteine

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper ü. N. bei 4 °C in Blockmilch inkubiert. Der Erstantikörper wurde mit Blockmilch verdünnt (siehe Tabelle unten) und 1 h unter Schwenken bei RT mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 1 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h mit dem 1:5000 in Blockmilch verdünnten Erstantikörper-spezifischen und Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens 1 h unter fünfmaligem Wechsel des Waschpuffers bei RT und unter Schütteln gewaschen. Die Detektion erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion unter Verwendung des ECL-Kits (Amersham oder NEN). Dazu wurde die gewaschene Membran 1 min in ein 1:1 Gemisch der beiden Lösungen des Kits gelegt. Danach wurde die Membran abgetupft und in eine Plastikfolie gelegt. Die emittierten Lichtquanten wurden durch Exposition von Röntgenfilmen detektiert, wobei die Expositionszeiten in der Regel zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten lagen.

Erstantikörper	Puffer	Verdünnung
Anti-E7 (Hybridom II)	Blockmilch	1:5
Anti-GFP	Blockmilch	1:1000
B1	Blockmilch	1:10
CamVir-1	1 % BSA; 0,01% Thimerosal	1:50
4543	Blockmilch	1:500

Blockmilch

6 % Magermilchpulver

in PBS

Waschpuffer

0,3 % Tween 20

in PBS

2.4.5. Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz diente zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung der nachgewiesenen Proteine. Dazu wurden Hela-, 293T- oder 911-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und anschließend transfiziert. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurden die Deckgläschen aus der Zellkulturschale entnommen und zweimal 5 min unter leichtem Schwenken in PBS gewaschen. Die gewaschenen Deckgläschen wurden 10 min in Methanol und dann 5 min in Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Die Deckgläschen wurden daraufhin an der Luft getrocknet und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder sofort für die Immunreaktion verwendet. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen 5 min in PBS inkubiert und dadurch rehydriert. Gereinigte monoklonale sowie polyklonale Antikörper wurden 1:20-200 in 1 % Magermilchpulver in PBS verdünnt. Die Erstantikörper wurden 1 h bei RT auf den Deckgläschen belassen. Anschließend wurden die Deckgläschen fünfmal für 5 min in PBS unter leichtem Schwenken gewaschen. Der Cy3-konjugierte Zweitantikörper wurde 1:300 in 1 % Magermilchpulver in PBS verdünnt auf die Präparate gegeben. Die Deckgläschen wurden abgedunkelt 1 h bei RT inkubiert und anschließend erneut fünfmal für 5 min in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Präparate luftgetrocknet, in Permafluor (Immunotech) eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert.

2.4.6. „capture“-ELISA

Eine flexible Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem monoklonalen Antikörper 1.3 ($3\text{ }\mu\text{g/ml}$ in PBS) beschichtet. Der Antikörper erkennt HPV-16-Kapside und Kapsomere (Müller *et al.*, 1997). Die Lösung wurde aus den Vertiefungen entfernt und durch je $100\text{ }\mu\text{l}$ Blockpuffer ersetzt. Die Platte wurde 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde der Blockpuffer entfernt, die Platte kurz mit PBS gewaschen und die Vertiefungen mit den Verdünnungen der Fraktionen aus der Sedimentationsgeschwindigkeits-Zentrifugation (siehe 2.4.9.) gefüllt. Als Positivkontrolle wurde ein Aliquot gereinigter HPV-16 VLPs (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Birgit Aengeneydt oder Petra Galmbacher (DKFZ)) mitgeführt. Die Platte wurde 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Platte wurde mit PBST gewaschen und pro Vertiefung mit $50\text{ }\mu\text{l}$ einer 1:4000 Verdünnung des polyklonalen Anti-HPV-16-L1-Kaninchenserums 4543 (6th boost, zur Verfügung gestellt von Martin Müller) in Blockpuffer für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Platte wurde erneut mit PBST gewaschen und nun pro Vertiefung mit $50\text{ }\mu\text{l}$ einer 1:4000 Verdünnung eines Peroxidase-

gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde mindestens fünfmal mit PBST gewaschen, um den nichtgebundenen Zweitantikörper möglichst vollständig zu entfernen. Die Vertiefungen wurden mit je 50 µl TMB-Substrat (Devitron) gefüllt und bis zur gewünschten Farbreaktion bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von je 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption der einzelnen Proben bei 450 nm im ELISA-Leser EMax (MWG Biotech) gemessen.

Blockpuffer

3 % Milchpulver in PBS

2.4.7. Elektronenmikroskopie

Durch die Elektronenmikroskopie wurden virusartige Partikel sowohl intrazellulär in transient transfizierten Zellen als auch in Zuckergradientenfraktionen nachgewiesen. Die Arbeiten wurden von Birgit Hub (DKFZ) durchgeführt.

2.4.7.1. Fixierung und Einbettung von Kulturzellen

Um virusartige Partikel (VLP) nach transients Transfektion intrazellulär sichtbar zu machen, wurden 911-, 293T- oder Hela-Zellen auf Glaspüttchen kultiviert und transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die bewachsenen Glaspüttchen entnommen, in PBS gewaschen und in Fixierlösung für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 % Osmiumtetroxid (4 % Stocklösung in Cacodylat-Puffer verdünnen) gefärbt, in steigenden Konzentrationen von Äthanol dehydriert und dann in Epoxidharz eingebettet. Ultradünne Schnitte (Reichert Ultracut, Leica) der eingebetteten Zellen wurden mit 0,5 % Uranylacetat gefärbt und unter dem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10A) untersucht.

Fixierlösung

2,5 % Glutaraldehyd (25 % Stocklösung in Cacodylat-Puffer verdünnen)

1 mM MgCl₂ in PBS

Cacodylat-Puffer

50 mM Cacodylsäure in H₂O

pH 7,2

2.4.7.2. Nachweis von virusartigen Partikeln in Zuckergradientenfractionen

Aliquots der Zuckergradientenfractionen (Kapitel 2.4.9.) wurden 2 h bei 4 °C gegen PBS auf Membranen mit 25 nm Porengröße (Millipore) dialysiert. In der Zwischenzeit wurden mit Kohle befilmte Kupfernetze (300 mesh) (Plano, Wetzlar) beglimmt, um die Hydrophilität der Netze zu erhöhen. Es wurden 5 µl der dialysierten Zuckergradientenfraction auf das Kupfernetz aufgetragen. Nach 2 min Inkubation bei RT wurde die Probe vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt, ohne dass das Netz dabei austrocknete. Das Netz wurde kurz mit 8 µl H₂O (bidestilliert) gewaschen. Danach wurden 8 µl Uranylacetat-Lösung (2 % in H₂O) aufgetragen und 30 s bis 1 min bei RT inkubiert. Die Färbelösung wurde mit Filterpapier abgesaugt. Das Netz wurde getrocknet und im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10A) untersucht.

2.4.8. Durchflusszytometrie (FACS)

Transient transfizierte 293T-Zellen wurden in PBS suspendiert und einmal in PBS gewaschen. Die GFP-Expression wurde in Aliquots von jeweils 10000 Zellen durch Durchflusszytometrie (FACSSort, Becton Dickinson) detektiert und mit dem Programm Cellquest V3.3 ausgewertet.

2.4.9. Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse

2.4.9.1. Herstellung der Zellextrakte

Die Zellen wurden 40 h nach der Transfektion im Zellkulturmedium suspendiert. Die Zellsuspensionen aus zwei Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser wurden vereinigt und 5 min bei 1500 rpm (Heraeus Varifuge RF) sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden zweimal in je 20 ml PBS gewaschen und jeweils erneut 5 min bei 1500 rpm sedimentiert.

Die Zellsedimente wurden in 600 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden aufgeschlossen, indem sie mit 3 x 10 Stößen auf Stufe 5 beschallt wurden (Branson Sonifier 250). Ungelöstes Material wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 7800 g sedimentiert. Alternativ dazu wurden die Zellen durch Frier-Tau-Lyse (dreimal -80°C / 37°C) aufgeschlossen. Das Frier-Tau-Lysat wurde mit 50 U/ml Benzonase (Sigma) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Ungelöstes Material wurde wie oben beschrieben sedimentiert.

Zur Kontrolle wurde dem Überstand ein Aliquot entnommen, mit dem gleichen Volumen 2 x Proteinpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C gekocht und im Immunblot-Verfahren untersucht. Der restliche Überstand wurde in die Sedimentationsgeschwindigkeits-Zentrifugation eingesetzt.

Extraktionspuffer

20 mM Hepes

5 mM MgCl₂

5 mM CaCl₂

150 mM NaCl

0,01 % Triton X-100

0,3 mg/ml PMSF

pH 7,4

2.4.9.2. Sedimentationsgeschwindigkeits-Zentrifugation

Die kontinuierlichen Gradienten wurden mit einem Gradientenmischer (Eigenbau DKFZ) durch Überschichten gelegt. Es wurden je 6 ml einer 5 % und 50 % Saccharose-Lösung (in PBS) eingesetzt. 600 µl des Zellextraktes wurden vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Die Röhren wurden mit Extraktionspuffer austariert. Die Gradienten wurden 3 h bei 36000 Upm (SW 41 oder TST 41.14) und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhreninhalte in 600 µl-Fractionen von unten beginnend fraktioniert. Entweder wurden Aliquots der Fractionen direkt mit 2 x Proteinpuffer versetzt, aufgeköcht und mit Immunblot-Verfahren (siehe 2.4.4.) analysiert oder nach geeigneter Verdünnung in PBS im „capture“-ELISA (siehe 2.4.6.) untersucht. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung einzelner Fractionen (siehe 2.4.7.2.) wurde ein Aliquot auf einer Membran mit 25 nm Porengröße (Millipore) bei 4 °C für 2-4 h gegen PBS dialysiert.

2.4.10. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blau

Das Polyacrylamidgel wurde 20 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärber unter mehrfachem Wechseln der Lösung soweit entfärbt, dass deutliche blaugefärbte Proteinbanden sichtbar wurden. Abschließend wurde das Gel zwischen Geltrockenfolien (Promega) über Nacht getrocknet.

Färbelösung

25 % Methanol

10 % Essigsäure

0,1 % Coomassie Blau

Entfärber

25 % Methanol

10 % Essigsäure

2.5. Präparation, Modifikation und Analyse von DNA

2.5.1. Präparation von Plasmid aus Bakterien

2.5.1.1. Minipräp

Eine mit einem sterilen Zahnstocher isolierte Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium überführt und ü. N. bei 37 °C unter Schütteln (200 UpM) inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde 5 min bei 16500 x g zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte dann wahlweise mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) oder wie im folgenden beschrieben:

Die Bakterien wurden in 300 µl Puffer P1 (4 °C) resuspendiert, mit 300 µl Puffer P2 gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde das alkalische Lysat mit 300 µl Puffer P3 neutralisiert und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Das Präzipitat wurde dann 10 min bei 16500 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überführt, mit 600 µl Isopropanol gemischt und 30 min bei 16500 x g zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

P1

50 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

Rnase A (100 µg/ml)

P2

200 mM NaOH

1 % SDS

P3

3 M Kaliumazetat pH 5,5

2.5.1.2. DNA-Präparation („Maxi“-Maßstab)

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem QIAGEN Maxi-Präp-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert. Dazu wurde von einer 300 ml Übernachtskultur transformierter Bakterien ausgegangen. Die Plasmid-DNA wurde nach Lufttrocknung in 300 µl TE-Puffer aufgenommen.

Abweichend dazu wurde die DNA für die DNA-Immunisierung mit dem QIAGEN Endofree Maxi-oder Mega-Präp-Kit präpariert, um die Belastung der Versuchstiere mit bakteriellen Endotoxinen zu verkleinern. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 1,11 mg/ml eingestellt. Vor der Administration in die Versuchstiere wurden die Präparationen mit 0,1 vol 10 x PBS auf eine Konzentration von 1 mg / ml verdünnt.

2.5.1.3. DNA-Präparation („Mega“-Maßstab)

Großpräparationen an Plasmid-DNA wurden mit dem QIAGEN Mega-Präp-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.2. Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Präparation wurden 1:100 in TE-Puffer verdünnt und photometrisch bei 260 nm gegen TE-Puffer ausgemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml RNA und 33 µg/ml ssDNA. Darüber hinaus ergab sich die Reinheit einer Präparation aus dem Quotienten der gemessenen Werte bei 260 nm und 280 nm. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 1,95 liegen.

2.5.3. Restriktionsverdau

Im Rahmen von Klonierungen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gezielt verdaut. Analytische Verdau dienten der Überprüfung eines Plasmids auf das Vorhandensein bestimmter Schnittstellen. Dazu wurden 0,5 bis 2 µg Plasmid-DNA 1 h mit 5-10 Einheiten des gewünschten Enzyms, sowie dem mitgelieferten Reaktionspuffer unter den empfohlenen Bedingungen in einem Volumen von 20 µl inkubiert.

Für einen präparativen Restriktionsverdau zur Isolierung eines DNA-Fragmentes wurden analog bis zu 20 µg Plasmid-DNA 3-6 h mit bis zu 50 Einheiten in einem Volumen von 50-100 µl inkubiert. Wenn die bei einer Doppelverdau verwendeten Enzyme unterschiedliche Reaktionsbedingungen benötigten, wurde die DNA zunächst nur mit einem Enzym verdaut, danach mittels des GeneClean-Kits gereinigt und dann mit dem zweiten Enzym inkubiert.

2.5.4. DNA-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarosegelen für die DNA-Gelelektrophorese wurden 1 % Agarose-Lösungen in 1 x TAE in einem Mikrowellengerät aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml) und nach Abkühlen auf etwa 60 °C in abgedichtete Gelformen mit eingesetzten Kämmen gegossen.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,1 vol 10 x DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde ein DNA-Marker mit definierten DNA-Fragmenten (siehe 2.1.4.2.) in einer separaten Spur mitgeführt. Die Elektrophorese wurde in Flachgel-Kammern mit 1 x TAE als Laufpuffer bei einer Gleichspannung von $U = 8 \text{ V/cm}$ durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente fluoreszierten unter UV-Licht aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids. Analytische Gele wurden einer Wellenlänge von 254 nm ausgesetzt, während bei präparativen Gelen zur Schonung der DNA eine Wellenlänge von 366 nm verwendet wurde.

2.5.5. Reinigung von DNA-Fragmenten mittels GeneClean

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des GeneClean-Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Mit diesem System wurden sowohl DNA-Fragmente aus Agarosegelen, als auch frei in Lösung befindliche DNA-Fragmente, z. B. bei einem Doppelverdau, gereinigt.

2.5.6. Ligation

Zur Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit linearen doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurden 50-200 ng linearisierte Plasmid-DNA und im molaren Verhältnis dazu die zehnfache Menge an linearem DNA-Fragment eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 1 oder 5 Einheiten T4-Ligase (Roche) ergänzt und im mitgelieferten 1 x Ligase-Puffer ü. N. bei 16 °C inkubiert. Für den Einsatz in der Elektroporation wurde der Ligationsansatz 1:5 in TE-Puffer verdünnt, um die Salzkonzentration zu senken.

2.5.7. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung von Religationen linearisierter Plasmid-DNA wurde die terminale 5'-Pyrophosphatgruppe mit der alkalischen Phosphatase SAP (USB) entfernt. Dazu wurden maximal 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA in dem mitgelieferten 1 x SAP-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Erwärmung auf 65 °C für 10 min wurde das Enzym danach inaktiviert.

2.5.8. DNA-Sequenzierung

Während der PCR kann es zum Auftreten unerwünschter Mutationen in den amplifizierten DNA-Sequenzen kommen. Die PCR-generierten DNA-Fragmente wurden deshalb durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von Dr. H. Delius (Sequenzier-einheit des Deutschen Krebsforschungszentrums) durchgeführt.

2.5.9. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Reaktion (PCR) zur Herstellung der kodonveränderten Leserahmen wurde von Martin Müller durchgeführt. Das Verfahren ist in einer zurückliegenden Arbeit beschrieben worden (Kim *et al.*, 1997). Es wurden insgesamt 26 alternierende Oligonucleotide, die sich in 20-23 Basenpaaren überlappen, als „Primer“ und „Template“ eingesetzt. Es wurden Gruppen von 4 Oligonukleotiden gebildet und einer schrittweisen Polymerase-Kettenreaktion mit einer „Annealing“-Temperatur von 46-56 °C und 30 Amplifikationszyklen mit einer Elongationszeit von 30 s unterzogen. Das molare Verhältnis der innenliegenden Oligonucleotide (beispielsweise 2 und 3) zu den außenliegenden Oligonucleotiden (beispielsweise 1 und 4) wurde auf 1:100 eingestellt, um die Entstehung von verkürzten Nebenprodukten zu vermeiden. Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte in einer weiteren Polymerase-Kettenreaktion als „Template“ mit außenliegenden Oligonucleotiden als „Primer“ eingesetzt (siehe auch Abb. 3.1). So entstanden schrittweise PCR-Produkte, die größere Bereiche der jeweiligen L1-Sequenz abdeckten. Der Einbau von geeigneten Einzelschnittstellen ermöglichte die Klonierung der Gesamtsequenz aus den sequenzierten PCR-Zwischenprodukten.

2.6. Immunisierung von Versuchsmäusen

2.6.1. DNA-Immunisierung

Die Versuchstiere wurden bei Durchführung der einzelnen Applikationen jeweils entweder mit Metofane oder mit Isofluran und 200 µl 0,1 % Rompun / 5 mg/ml Ketavet *i. p.* betäubt. 7 Tage vor der ersten Immunisierung wurden die Hinterbeinmuskeln (*tibialis anterior*) der Versuchsmäuse mit Cardiotoxin vorbehandelt, um die Effizienz der DNA-Immunisierung zu

verbessern (Davis *et al.*, 1993). Dazu wurden pro Muskel 50 µl einer Stocklösung mit einer Konzentration von 10 µM durch eine 0,3 mm Kanüle injiziert. Fünf Tage später wurde das erste Mal immunisiert. Dazu wurden pro Muskel 50 µg endotoxinbefreite Plasmid-DNA (1 mg/ml in PBS) wiederum durch eine 0,3 mm Kanüle injiziert. Die DNA-Immunsierung wurde nach 4 Wochen wiederholt. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Mäuse getötet und ca. 0,5 ml Blut durch Herzpunktion gesammelt. Zur Ermittlung des spezifischen Antikörpertiters wurde das Blutserum im ELISA-Verfahren analysiert. Zur Untersuchung der Induktion E7-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten wurde ausserdem die Milz entnommen und wie beschrieben weiterbehandelt.

2.6.2. Serumgewinnung aus Mäusen

Nach Lagerung für 24 h bei RT war das durch Herzpunktion entnommene Blut koaguliert. Das Serum wurde durch Zentrifugation (3000 UpM, 4 °C, 15 min, Eppendorf-Tischzentrifuge) vom Blutkuchen getrennt und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Analyse im ELISA-Verfahren wurde das Serum bei 4 °C gelagert.

2.6.3. Serumanalyse durch ELISA

Zur Detektion von HPV16 L1-spezifischen Antikörpern wurden Mikrotiterplatten mit 50 µl virusartigen Partikeln mit einer Konzentration von 3 µg/ml in PBS pro Vertiefung ü. N. inkubiert. Daraufhin wurden die Vertiefungen mit 50 µl Blockmilch (5% Magermilchpulver in PBS) gefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung der Blockmilch wurden Verdünnungen (1:10 bis 1:1280 in PBS) der untersuchten Sera auf die Mikrotiterplatten gegeben. Daraufhin wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Platten mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (1:4000 in PBS) erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf das dreimalige Waschen mit PBS folgte die Zugabe der ELISA-Substratlösung (ABTS- oder TMB-Substrat). Nach einer geeigneten Entwicklungszeit wurde zur Quantifizierung der Farbreaktion die Extinktion bei 405 nm für ABTS-Substrat und bei 450 nm für TMB-Substrat (Devitron) mit einem Titertek ELISA-Leser ermittelt. Bei Verwendung von TMB-Substrat wurde die Farbstoffreaktion nach einer geeigneten Inkubationszeit mit 1 M H₂SO₄ gestoppt.

ABTS-Substrat

1 mg /ml ABTS

0,015 % H₂O₂

2.6.4. Analyse der zellulären Immunantwort**2.6.4.1. Isolierung von Lymphozyten aus der Mausmilz**

Die unter sterilen Bedingungen entnommene Milz wurde in 5 ml PBS aufgenommen und auf Eis gehalten. Zur Vereinzelung der Milzzellen wurde die Milz durch ein engmaschiges Drahtnetz gedrückt und die entstandene Zellsuspension in 10 ml PBS in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden sedimentiert (1500 UpM, 4 °C, 5 min, Varifuge RF). Das rosafarbene Zellsediment wurde in 5 ml ACT-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden die Erythrozyten durch osmotischen Schock lysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (1500 UpM, 4 °C, 5 min, Varifuge RF) wurde der rote, Hämoglobin-haltige Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml komplettem α MEM (siehe 2.6.4.3.) aufgenommen und *in vitro* restimuliert.

ACT-Puffer

Lösung A

0,16 M NH₄Cl

Lösung B

0,17 M Tris/HCl pH 0,5

Lösung A (900 ml) und B (100 ml) vereinen (ergibt pH = 7,2) und autoklavieren

2.6.4.2. Zellinaktivierung

RMA-E7-Zellen, die als Fütterzellen in Lymphozytenkulturen dienen, wurden durch Bestrahlung inaktiviert. Durch die Bestrahlung verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit, sterben jedoch nicht unmittelbar ab und eignen sich dann zum Restimulieren der ZTL (RMA-E7 Zellen) oder zur Konditionierung des Kulturmediums (Milzzellen).

Durch γ -Strahlenexposition (^{137}CS -Quelle; Gammacell 1000) wurden die Zellen mit einer Dosis von 100 Gy (12 min) für RMA-E7 Zellen und 33 Gy (4 min) für Milzzellen inaktiviert.

2.6.4.3. Kultivierung und *in vitro* Restimulierung zytotoxischer T-Zellen

Die isolierten Lymphozyten wurden in komplettem αMEM oder - nach der zweiten Restimulierung - in komplettem αMEMmZ bei 37 °C und 7,5 % CO_2 in einer H_2O -gesättigten Atmosphäre in 25 cm^2 Gewebekulturflaschen mit Belüftung oder Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen kultiviert.

Zur ersten *in vitro* Restimulierung wurden 2-4 x 10^7 frisch isolierte Lymphozyten in 25 cm^2 Gewebekulturflaschen ausgesät. Zur Restimulierung wurden die Kultur durch 1/20 inaktiverter RMA-E7 Zellen ergänzt. Die H2-D^b vermittelte Präsentation des E7_{49-57} -Peptids auf der Oberfläche der RMA-E7 Zellen ermöglichte hierbei die spezifische Restimulierung. Nach 5 Tagen wurde die Spezifität und Aktivität der ZTL im Zytotoxizitätstest bestimmt.

Zur zweiten Restimulierung wurden die Lymphozyten nach 7 Tagen entsprechend ihrer Zelldichte mit dem Kulturmedium αMEMmZ in zunehmender Verdünnung in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen subkultiviert. Zu den verdünnten Lymphozyten wurden pro Vertiefung 5 x 10^6 Fütterzellen (inaktivierte Milzzellen aus unbehandelten C57Bl/6 Mäusen) gegeben. Erneut wurde durch Kokultivierung mit 2 x 10^5 inaktivierten RMA-E7 Zellen restimuliert. 5 Tage nach der zweiten Restimulierung wurden im Zytotoxizitätstest nochmals Spezifität und Aktivität der ZTL bestimmt.

αMEM (komplett)

αMEM (Sigma)

10 % FKS

1 % mg/ml Penicillin / Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml)

1 % L-Glutamin (Stammlösung 50 mM)

10 μM β -Merkaptoethanol

αMEMmZ

αMEM (komplett)

25 mM Methyl- α -Mannopyranosid

3,3 % (v/v) ConA-induzierter Rattenmilzzellüberstand

2.6.4.4. Zytotoxizitätstest

5 Tage nach den Restimulierungen der Lymphozyten-Primärkultur wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dabei wurde die Aktivität spezifischer ZTL in der Lymphozytenkultur detektiert.

Der Zytotoxizitätstest basiert auf der Messung der ^{51}Cr -Freisetzung aus Zielzellen. Als Zielzellen dienten RMA-E7 Zellen und RMA Zellen (beladen mit E7₄₉₋₅₇-Peptid und zur Kontrolle unbeladen). Subkonfluent wachsende Zielzellen wurden in PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst. Die Zielzellen wurden in 10 ml RPMI Medium resuspendiert und die Zelldichte der Lösung bestimmt. Danach wurden 2×10^6 Zellen in ein 15 ml Rundbodenröhrchen überführt, abzentrifugiert (1500 UpM, 2 min, 20 °C, Varifuge RF) und in 50-150 μl $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung (100 μCi) für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in je 10 ml komplettem RPMI Medium gewaschen und abzentrifugiert (1500 UpM, 2 min, 20 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5416). Das Zellsediment wurde in 1 ml komplettem RPMI Medium resuspendiert und jeweils 0,5 ml der Zellsuspension in 19,5 ml komplettem RPMI Medium verdünnt. Daraus ergab sich eine Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml. Um die RMA-Zellen spezifisch zu markieren, wurde E7₄₉₋₅₇-Peptid bis zu einer Konzentration von 100 nM zur Verdünnung gegeben. Die markierten Zielzellen wurden bis zur weiteren Verwendung für bis zu 30 min bei 37 °C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die restimulierten Lymphozyten (Effektorzellen) im Kulturmedium mit einer Pipette resuspendiert. Etwa $\frac{1}{4}$ der Zellsuspension wurde zur erneuten Restimulierung weiterkultiviert, der Rest wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1500 UpM, 5 min, 20°C, Varifuge RF). Nach dem Abnehmen des Kulturmediums wurde das Zellsediment in komplettem RPMI aufgenommen (240 μl pro Zielzelllinie im Zytotoxizitätstest).

Die gemeinsame Inkubation von Effektor- und Zielzellen erfolgte auf Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen mit Rundboden (Mikrotiterplatten). Für jede Effektorzellkultur und Zielzelllinie wurde eine vertikale Reihe auf der Platte beladen. In die Vertiefungen der Reihe A und D-H wurden jeweils 100 μl komplettes RPMI Medium vorgelegt. In die Vertiefungen der Reihe B wurden 100 μl Tritonlösung pipettiert. Jeweils 200 μl der Zellsuspension der

Effektorzellen wurden in die entsprechende Vertiefung der Reihe C pipettiert. Von den 200 μl Effektorzellsuspension in den Vertiefungen der Reihe C wurden 100 μl entnommen, mit den 100 μl Medium in den Vertiefungen der Reihe D gemischt, wieder entnommen und auf die gleiche Weise durch die Vertiefungen der Reihe E-H geführt. Die aus den Vertiefungen der Reihe H entnommenen 100 μl Zellsuspension wurden verworfen. Auf diese Weise konnte in den Vertiefungen der Reihe C-H der Mikrotiterplatte eine serielle Verdünnung der Effektorzellen mit dem Faktor 2 erhalten werden. Um das Effektor-/Zielzellverhältnis (E/Z) bestimmen zu können, wurde die Zelldichte im restlichen Volumen der Effektorzellsuspension bestimmt.

Von der entsprechend markierten Zielzellsuspension (5×10^4 Zellen/ml) wurden jeweils 100 μl pro Vertiefung der Mikrotiterplatte zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze für 4 – 4,5 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurden je 50 μl des Kulturüberstandes aus den Vertiefungen entnommen und ü. N. bei Raumtemperatur auf Szintillationsplatten (Canberra Packard, Dreieich) getrocknet. Die γ -Strahlung in der getrockneten Mediumprobe wurde anschließend im Szintillationszähler (1450 Microbeta Plus, Wallac, Turku) vermessen. Die aus den markierten Zielzellen in den Überstand freigesetzte Radioaktivität korreliert mit der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen gegen die entsprechenden Zielzellen. Unter Berücksichtigung der spontan aus den Zielzellen freigesetzten Aktivität (aus Reihe A) und der freigesetzten Aktivität nach vollständiger Lyse der Zielzellen (aus Reihe B), ließ sich der prozentuale Anteil an lysierten Zielzellen in den Vertiefungen der Reihe C-H berechnen.

RPMI (komplett) für RMA-E7 und RMA Zellen

RPMI-1640

10 % FKS

1 % L-Glutamin (Stammlösung 50 mM)

1 % Penicillin / Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml)

für RMA-E7 zusätzlich mit 0,8 mg/ml G418

RPMI (Assay-Medium)

RPMI-1640

5 % FKS

1 % L-Glutamin (Stammlösung 50 mM)

1 % Penicillin / Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml)

Tritonlösung

10 % Triton X-100 in H₂O

2.6.4.5. ELISPOT-Analyse

In der ELISPOT-Analyse wird die antigenspezifische IFN γ -Sekretion aktivierter zytotoxischer T-Zellen detektiert.

Die Milzzellen immunisierter Tiere wurden wie beschrieben isoliert (siehe Kapitel 2.6.4.1.), kultiviert und stimuliert (siehe Kapitel 2.6.4.3.). Spezielle Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Millipore) wurden 5 min mit 200 μ l sterilem PBS äquilibriert. Der 1. Antikörper (Ratte-anti-Maus-IFN γ , Pharmingen) wurde auf eine Konzentration von 2 μ g/ml in PBS eingestellt. Nach der Entfernung des PBS wurden die Vertiefungen mit 75 μ l der Verdünnung des 1. Antikörpers befüllt und ü. N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperverdünnung entfernt und die Vertiefungen mit je 100 μ l Medium (α MEM (komplett) siehe 2.6.4.3.) befüllt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums wurden serielle Verdünnungen der Milzzellenkulturen in den Vertiefungen hergestellt. Angefangen mit 600000 Zellen wurde die Milzzellkulturen in drei Reihen schrittweise in 100 μ l α MEM (komplett) verdünnt. Die drei Reihen teilten sich in die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und in die Reihe für die spezifische Stimulation auf. In die Verdünnungen der Positivkontrolle wurden 20 μ l Mitogen-Verdünnung pro Vertiefung gegeben. Die Reihen der spezifischen Stimulation wurden mit 20 μ l E7-Peptid-Verdünnung pro Vertiefung ergänzt. Die Platten wurden 18 - 20 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zell-Lösungen entfernt und die Platten dreimal mit 200 μ l PBST gewaschen. Dann wurde ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und die Platte gründlich ausgeklopft. Der biotinylierte 2. Antikörper (Ratte-anti-Maus-IFN γ (biotinyliert), Pharmingen) wurde auf eine Konzentration von 1 μ g/ml in PBS eingestellt. 75 μ l dieser Verdünnung

wurden pro Vertiefung ausplattiert. Dann wurden die Platten ü. N. bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der ELISPOT entwickelt. Von jetzt an konnte unsteril gearbeitet werden. Zunächst wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platten dreimal mit 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Platte gründlich auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Die Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (Pharmigen # 554065) wurde 1:1000 in PBS verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung pipettiert. Darauf wurden die Platten 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang wurden die Platten gründlich ausgeklopft und zusätzlich der Boden der Platten gelöst und getrocknet. Die Vertiefungen wurden mit 100 µl Entwicklungspuffer BCIP/NBT (Sigma) befüllt und im Dunkeln bei RT inkubiert. Als die ersten fleckenartigen Färbungen (Spots) zu sehen waren, wurde die Platte gründlich mit Wasser gespült. Es musste beachtet werden, dass die Farbreaktion sich nach diesem Schritt noch fortsetzte. Die Spots erhielten dann die charakteristische violette Farbe und konnten im ELISPOT-Zähler (AID EliSpot transtec 1300) gezählt und ausgewertet werden. Die entwickelten Platten wurden im Dunkeln aufbewahrt.

αMEM (komplett)

αMEM (Sigma)

10 % FKS

1 % mg/ml Penicillin / Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml)

1 % L-Glutamin (Stammlösung 50 mM)

10 µM β-Merkaptoäthanol

Mitogen-Verdünnung

10 ng / µl PW-Mitogen (Sigma, #L-8777) in αMEM (komplett)

E7-Peptid-Verdünnung

2 µM E7₄₉₋₅₇-Peptid in αMEM (komplett)

3. Ergebnisse

3.1. Kodonoptimierung der HPV-16 L1-Sequenz

Ziel war es, das HPV-16 L1-Gen in einer DNA-Vakzinierung zur Induktion von kapsid-spezifischen Antikörpern zu verwenden. Da Versuche, das originale HPV-16 L1-Gen in undifferenzierten humanen Zelllinien zu exprimieren, keine befriedigenden Ergebnisse geliefert hatten, sollte die L1-Expression durch Entfernung der negativregulatorischen Elemente entreguliert und durch Anpassung der Kodonbenutzung optimiert werden.

Tabelle 1: Kodonverwendung in L1ori, L1p und L1h

Aminosäure	Kodon	% der Kodons			Aminosäure	Kodon	% der Kodons		
		L1h	L1p	L1ori			L1h	L1p	L1ori
Ala	GCA	0,0	0,2	2,8	Leu	CTA	0,0	0,0	1,4
	GCG	0,0	0,0	0,0		CTG	8,5	0,0	1,0
	GCC	5,9	0,0	1,2		CTC	0,0	0,0	0,0
	GCT	0,0	5,7	2,0		CTT	0,0	8,5	0,6
Arg	AGA	0,0	0,0	0,8	TTA	0,0	0,0	4,6	
	AGG	3,8	3,8	0,8	TTG	0,0	0,0	1,0	
	CGA	0,0	0,0	0,8	Lys	AAA	0,0	6,7	5,3
	CGG	0,0	0,0	0,2		AAG	6,7	0,0	1,4
Asn	CGC	0,0	0,0	0,8	Met	ATG	2,0	2,0	2,0
	CGT	0,0	0,0	0,4	Phe	TTC	4,8	0,0	0,2
	AAC	5,5	0,0	1,4	TTT	0,0	4,8	4,6	
	AAT	0,0	5,5	4,2	Pro	CCA	0,0	7,3	3,0
Asp	GAC	5,3	0,0	1,8		CCG	0,0	0,0	0,0
	GAT	0,0	5,3	3,6		CCC	7,3	0,0	1,0
Cys	TGC	2,4	0,0	0,6		CCT	0,0	0,0	3,4
	TGT	0,0	2,4	1,8	Ser	AGC	6,5	0,0	0,4
Gln	CAA	0,0	3,8	2,2		AGT	0,0	0,0	1,4
	CAG	3,8	0,0	1,6		TCA	0,0	6,5	1,4
Glu	GAA	0,0	3,8	2,8		TCG	0,0	0,0	0,0
	GAG	4,0	0,2	1,2	TCC	0,0	0,0	0,8	
Gly	GGA	0,0	6,9	1,6	TCT	0,0	0,0	2,6	
	GGG	0,0	0,0	0,6	Thr	ACA	0,0	0,0	3,6
	GGC	6,9	0,0	1,8		ACG	0,0	0,0	0,2
	GGT	0,0	0,0	3,0		ACC	8,1	0,0	1,6
His	CAC	2,0	0,0	0,4		ACT	0,0	8,1	2,8
	CAT	0,0	2,0	1,6	Trp	TGG	1,4	1,4	1,4
Ile	ATA	0,0	0,0	2,0		Tyr	TAC	4,4	4,4
	ATC	4,4	0,2	0,0	TAT	0,0	0,0	3,0	
Val	ATT	0,0	4,2	2,4	GTA	0,0	0,0	2,0	
	GTG	6,3	0,0	0,6	GTC	0,0	0,0	0,4	
	GTC	0,0	0,0	0,4	GTT	0,0	6,3	3,4	
	GTT	0,0	6,3	3,4					

Anm.: L1ori, Originalsequenz von HPV-16 L1; L1p, kodonoptimiert für *Solanum tuberosum*; L1h, kodonoptimiert für *Homo sapiens*

Um das Problem der ineffizienten Expression in undifferenzierten Säugerzellen zu lösen, wurden zwei kodonveränderte HPV-16 L1-Gene synthetisiert. In diesen Genen wurde die Kodonverwendung im HPV-16 L1-Gen für Pflanzenzellen (*Solanum tuberosum*, L1p) und für Säugerzellen (*Homo sapiens*, L1h) gemäß Tabelle 1 optimiert. Für diese organismus-spezifischen Kodonveränderungen wurden die Tabellen der Genbank-Datenbank (Nakamura *et al.*, 2000) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) herangezogen. In beiden Konstrukten wurde die Mehrheit der Kodons (78,8 % für L1h und 51,5 % für L1p) variiert. Die korrespondierende Aminosäure-Sequenz wurde jedoch beibehalten. Durch diese Änderungen ist es wahrscheinlich, dass alle bekannten und unbekanntes negativregulatorischen Elemente der kodierenden Region (siehe 1.1.3.2.) inaktiviert wurden.

Bei der Festlegung der neuen DNA-Sequenzen wurden ausserdem die Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsendonukleasen eingeführt, ohne die resultierende Primärsequenz zu verändern. Diese Schnittstellen wurden bei der Synthese verwendet, um Zwischenprodukte zu klonieren.

3.1.1. Herstellung der veränderten Leserahmen

Zur Herstellung der kodonveränderten L1-Gene wurde ein Verfahren nach Kim *et al.*, 1997, verwendet. Es wurden insgesamt 26 Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 85 Nukleotiden synthetisiert. Diese Oligonukleotide sind alternierend vom kodierenden und nicht kodierenden DNA Strang abgeleitet und überlappen in 20-23 Basenpaaren. Dadurch verläuft die 5'-3' Richtung geradzahlicher Oligonukleotide entgegen der 5'-3' Richtung ungeradzahlicher Oligonukleotide (Abb. 3.1). Die Oligonukleotide wurden in eine schrittweise Polymerase-Kettenreaktion als „Template“ und „Primer“ eingesetzt. Zunächst wurden Gruppen aus jeweils vier Oligonucleotiden verwendet. Das molare Verhältnis der in diesem Fall innenliegenden Oligonukleotide (beispielsweise 2 und 3) zu den außenliegenden Oligonukleotiden (beispielsweise 1 und 4) wurde auf 1:100 eingestellt, um die Entstehung von verkürzten Nebenprodukten zu vermeiden. Die anschließende PCR lieferte doppelsträngige DNA-Fragmente, die die Bereiche der eingesetzten „Primer“ umfassten. In einem zweiten Amplifikationszyklus wurden die DNA-Fragmente aus Runde 1 verwendet und größere doppelsträngige Bereiche hergestellt. PCR-Zwischenprodukte wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Aus den klonierbaren Zwischenprodukten wurden die Gesamtsequenzen zusammengesetzt und abschließend durch eine weitere DNA-Sequenzierung auf mögliche PCR-generierte Mutationen überprüft.

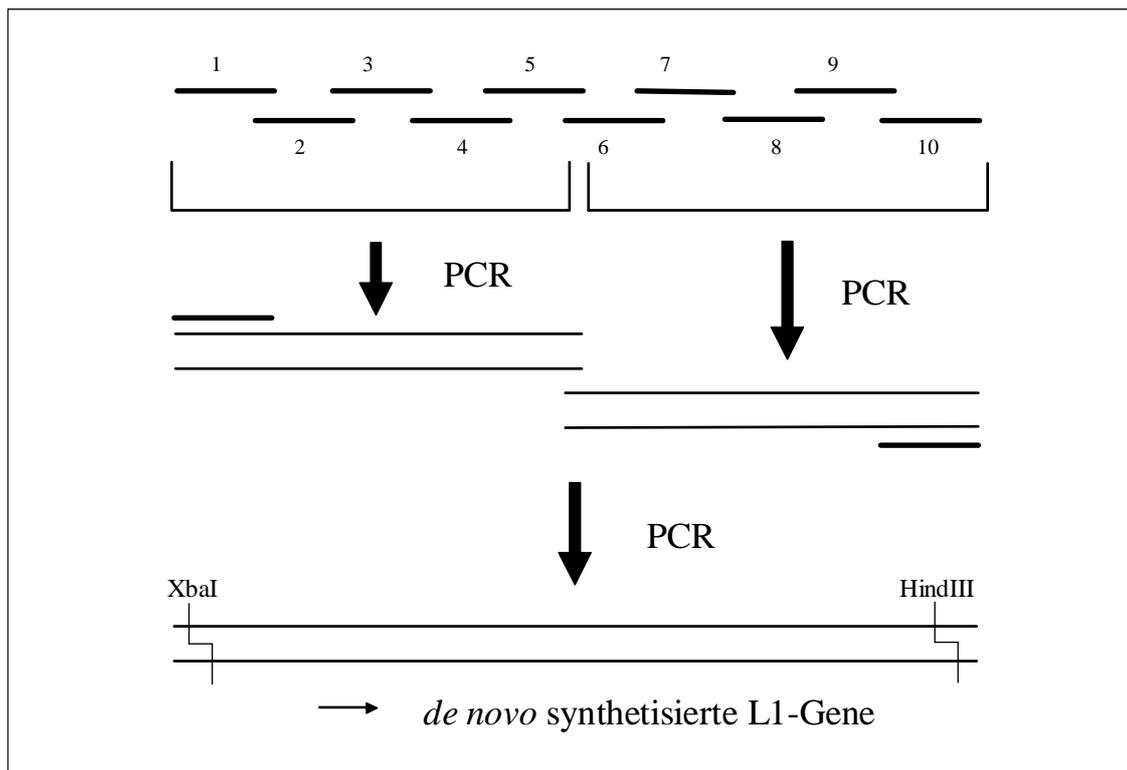


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des PCR-Verfahrens zur Herstellung der veränderten L1-Leserahmen. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden. Abbildung nach Kim *et al.*, 1997.

Die DNA-Sequenzen können in der EMBL Nukleotidsequenzdatenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) unter den Zugangsnummern AJ313181 für L1p und AJ313179 für L1h eingesehen werden.

Für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten wurden die von *XbaI*- und *HindIII*-Schnittstellen flankierten Gesamtsequenzen in den Klonierungsvektor pBS überführt.

Die kodonoptimierten L1-Leserahmen wurden freundlicherweise von Dr. Martin Müller (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Klonierung der Expressionsplasmide

Die synthetisierten L1-Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pUF3 (Zolotukhin *et al.*, 1996) überführt (Abb. 3.2).

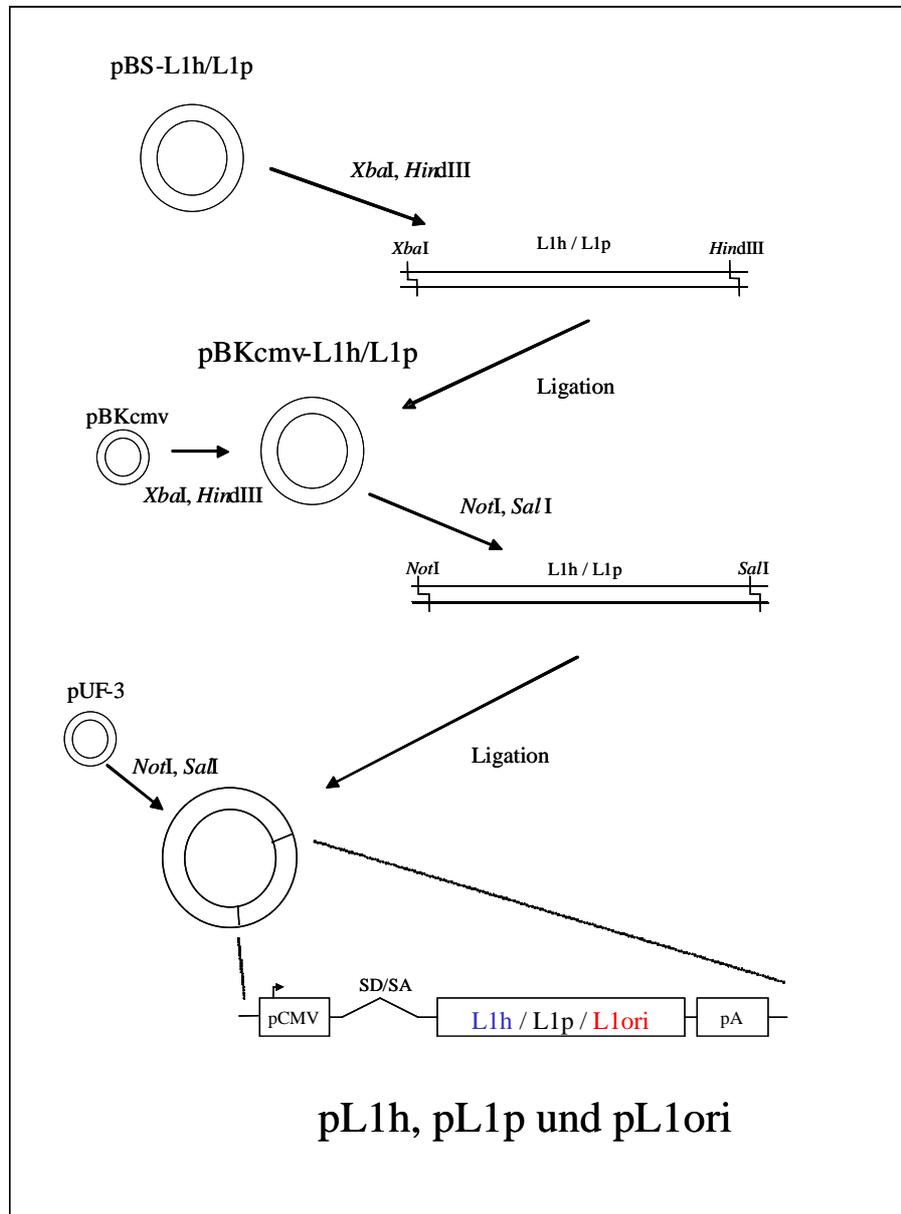


Abb. 3.2: Zweistufige Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsplasmide für die veränderten und den originalen L1-Sequenzen. Um geeignete Schnittstellenorientierungen für die Klonierung des Expressionsplasmides zu haben, wurden die L1-Sequenzen zunächst in das Plasmid pBKcmv überführt. Genauere Plasmidkarten von pL1h, pL1p und pL1ori befinden sich im Anhang. pA, polyA-Signal; pCMV, „immediate early“-Promotor von Cytomegalievirus; SD/SA, „splice donor / splice acceptor site“, Intronssequenz aus SV 40.

Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die jeweilige L1-Sequenz in die *XbaI* und *HindIII*-Schnittstellen von pBKcmv überführt. Im pBKcmv lag die Sequenz dann in

geeigneter Orientierung zu den *NotI*- und *SalI*-Schnittstellen, die schließlich zur Klonierung in das Plasmid pUF3 gewählt wurden. Dadurch entstanden die Expressionsplasmide pL1h, pL1p und pL1ori. In Abbildung 3.2 ist der Aufbau der resultierenden Expressionskassette dargestellt. Genaue Plasmidkarten befinden sich im Anhang. Sie enthält neben dem starken viralen Promotor pCMV („cytomegalovirus immediate-early promoter“) zur Ausbeute-steigerung das Intron aus dem späten Genombereich von SV 40 (SD/SA). Intronsequenzen wurden in einigen Arbeiten mit Erfolg verwendet, um die Proteinexpression zu steigern, indem sie die hnRNA in den Prozessierungs- und Spleißungsweg lenken (Petitclerc *et al.*, 1995). Das abschließende polyA-Signal stammte vom Rinderwachstumshormon.

Durch Verwendung dieser simplen Expressionsvektoren wurde weiterhin sichergestellt, dass regulatorische Elemente im Falle der originalen L1-Sequenz (L1ori) aus dem nichtkodierenden Bereich des HPV-16 Genoms entfernt wurden. Basis für die verwendete originale L1-Sequenz in pL1ori ist das HPV-16-Isolat 114/K (Kirnbauer *et al.*, 1993).

3.1.2. L1-Expression nach transienter Transfektion

Die Effizienz der Expressionsvektoren pL1h, pL1p und pL1ori wurden durch transiente Transfektion von verschiedenen undifferenzierten Säugerzellen (293T, Hela und 911) untersucht und verglichen. Die L1-Expression wurde durch Immunblot und Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 3.3).

In diesen Experimenten war die Expression der originalen L1-Sequenz wie aus Vorversuchen erwartet nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu wurde L1-Protein sowohl nach Expression von pL1h als auch von pL1p detektiert, wobei durch pL1h im Vergleich zu pL1p um zwei Größenordnungen mehr L1-Protein in gleichen Zellen und bei gleicher DNA-Menge produziert wurde (Abb. 3.3 a und b). Das durch Verwendung von L1h überexprimierte L1-Protein lokalisierte erwartungsgemäß hauptsächlich im Zellkern (Abb. 3.3 c und d). Ein Anteil des Proteins verblieb zelltypabhängig im Zytosol.

Durch die Kodonveränderungen konnte also die Expressionsbeschränkung von HPV-16 L1 aufgehoben werden. Die starke Proteinausbeute nach Verwendung von pL1h zeigt ausserdem, dass darüber hinaus die Proteinexpression durch wirtszellspezifische Kodonoptimierung signifikant erhöht werden kann.

Eine interessante Frage war, ob die hohe Proteinexpression von L1 intrazellulär zu einer effizienten Bildung von virusartigen Partikeln führt. Dazu wurden 911-Zellen mit pL1h, pL1p

und pL1ori transfiziert. Von den Zellen wurden ultradünne Schnitte angefertigt und dann durch Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3.4).

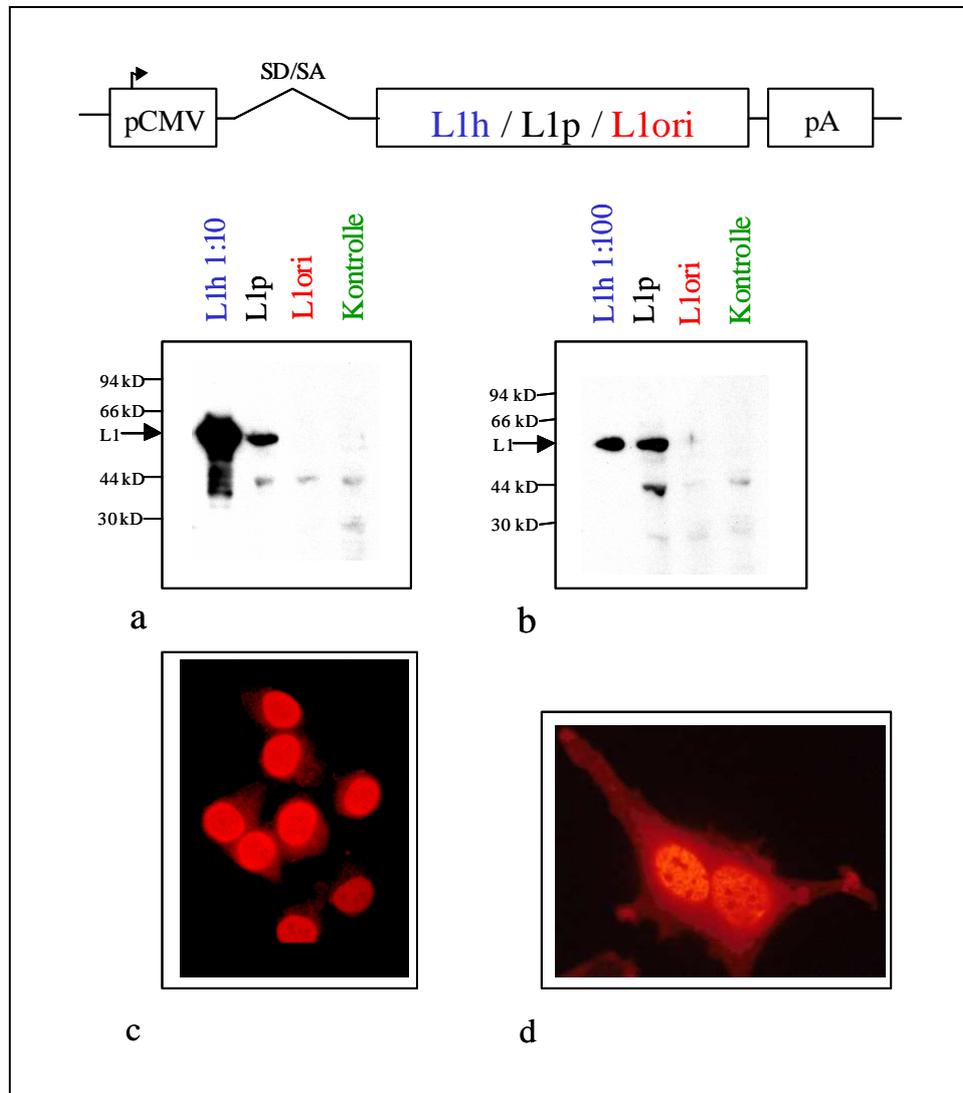


Abb. 3.3: Proteinexpression der L1-Gene.

(a und b) Immunblot-Analyse von Zellextrakten aus 293T-Zellen, die mit pL1h, pL1p und pL1ori transient transfiziert wurden. Extrakte von untransfizierten 293T-Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt. (c und d) Zelluläre Lokalisation von HPV-16 L1 in HeLa- (c) und 911-Zellen (d) nach transienter Transfektion mit pL1h. Beide Analysen wurden mit dem L1-spezifischen monoklonalen Antikörper CamVir-1 durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.4 gezeigt, lassen sich nach Expression von L1h, nicht aber nach Expression von L1p oder L1ori (Daten nicht gezeigt), *in situ* große Mengen an virusartigen Partikeln, erkennbar als zirkuläre Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 55 nm, beobachten. Die virusartigen Partikel fanden sich ausschließlich im Zellkern transfizierter Zellen (Abb 3.4a). Aus den Beobachtungen ergeben sich Hinweise, dass die Kapsidbildung auf den Zellkern beschränkt ist und möglicherweise von der intranukleären Konzentration der Kapsomere und Kapsidproteine abhängt.

Zusätzlich zu den Hinweisen auf virusartige Partikel wurden tubuläre Strukturen mit einer Länge von 100–200 nm in den Zellkernen transfizierter Zellen beobachtet (Abb. 3.4b), die nicht in untransfizierten Kontrollen auftauchten (Daten nicht gezeigt).

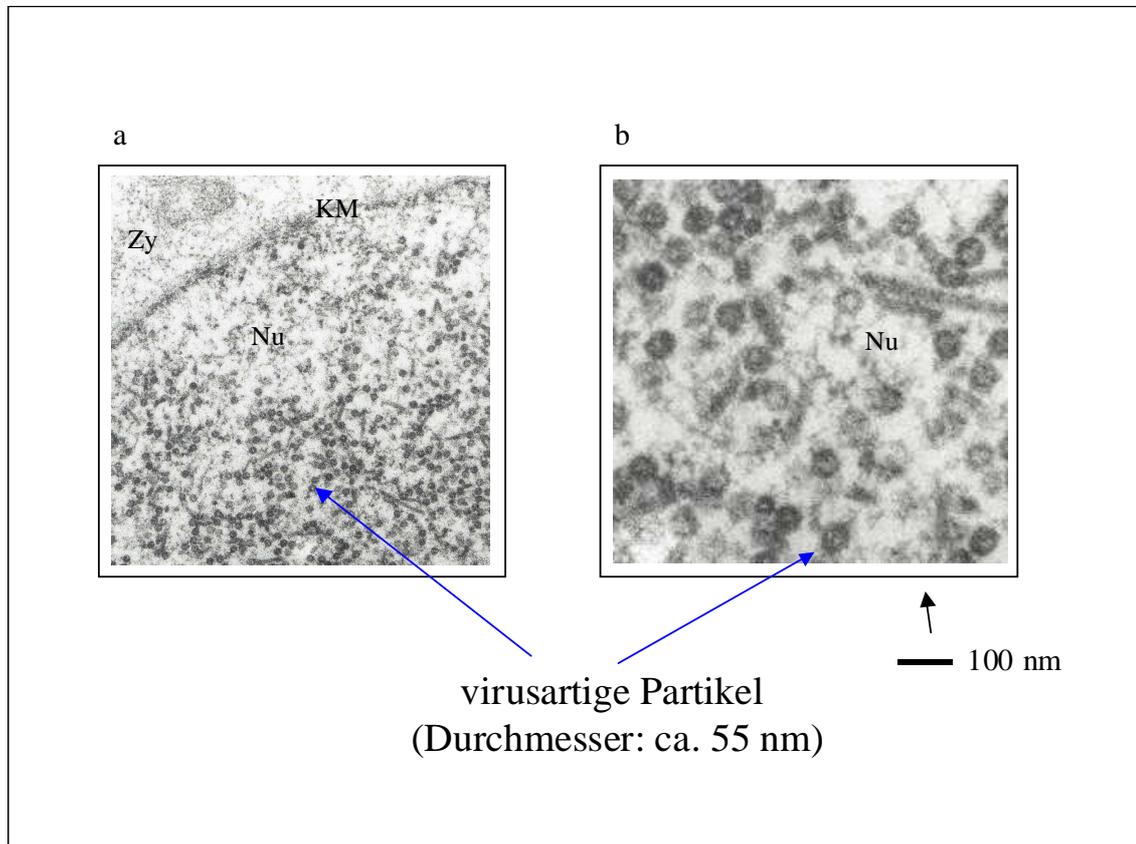


Abb. 3.4: VLP-Bildung durch Überexpression von HPV-16 L1 *in situ*. Gezeigt sind ultradünne Schnitte von 911-Zellen, die mit pL1h transient transfiziert wurden. Zy, Zytosol; KM, Kernmembran; Nu, Zellkern.

3.1.3. Effekte der veränderten Leserahmen

Um zu bestimmen, ob sich die deutlich verbesserte L1-Expression durch die Leserahmenveränderungen auf die direkte Verstärkung der Translation oder andere posttranskriptionelle Einflüsse zurückführen lässt, wurden einige bicistronische Konstrukte hergestellt (Abb 3.5).

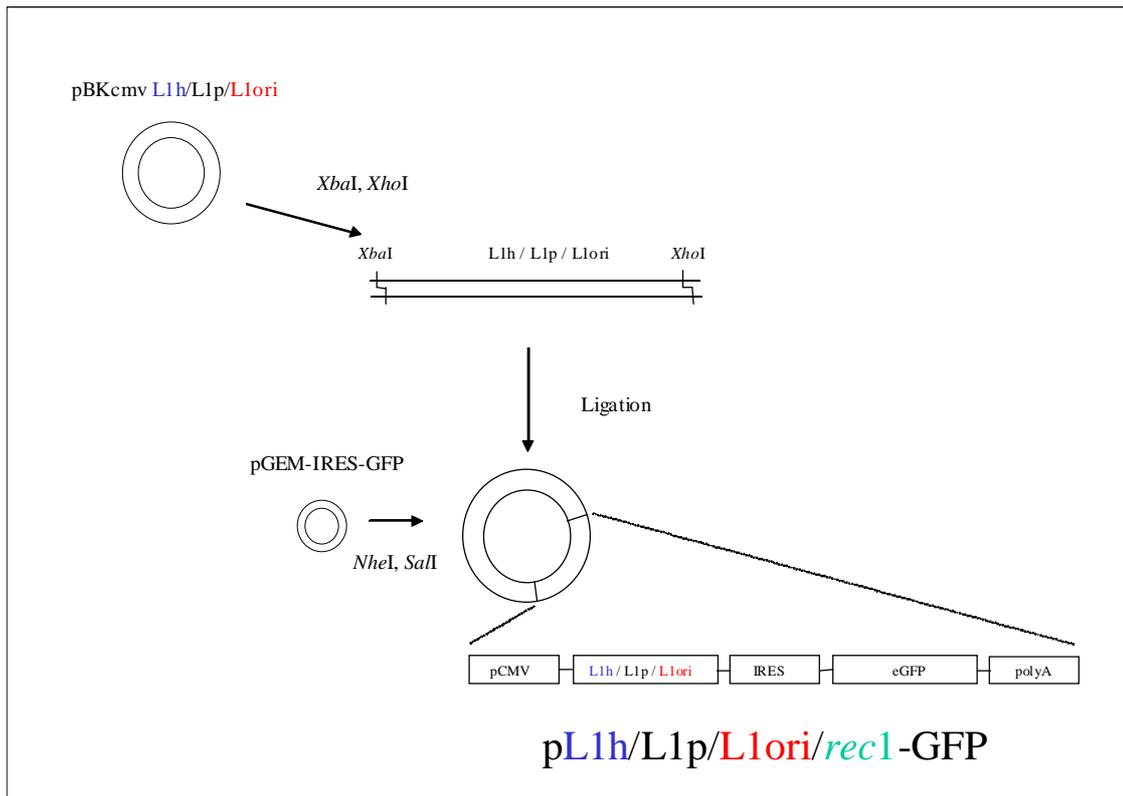


Abb. 3.5: Klonierungsstrategie zur Herstellung der bicistronischen Konstrukte. IRES, interne Ribosomeneintrittsstelle; pCMV, „immediate early“-Promotor von Cytomegalievirus; GFP, grünfluoreszierendes Protein.

In diesen Konstrukten ist das Gen für eGFP „stromabwärts“ von L1h, L1p und L1ori sowie - als Kontrolle für ein HPV-unverwandtes Gen - des Gens *rec1* (Albritton *et al.*, 1989) platziert. Bei der Klonierung wurde ausgenutzt, dass *XbaI* und *NheI*, sowie *SalI* und *XhoI* Isoschizomere sind, die kompatible Schnittenden produzieren. Die Translation des GFP wird in diesen Konstrukten von einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES, „internal ribosome entry site“) möglich. In diesem experimentellen System sollte die An- oder Abwesenheit des Einflusses der negativregulatorischen Elemente auf die mRNA-Stabilität, den RNA-Transport oder die RNA-Prozessierung auch die GFP-Expression beeinflussen. Dagegen sollten effizientere Translation durch Kodonoptimierung und mögliche direkte translatorische Effekte der negativregulatorischen Elemente, z.B. über inhibitorische RNA-bindende Proteine

(Schwartz, 1998), nur die L1-Expression, nicht aber die GFP-Expression, beeinflussen (Abb. 3.6).

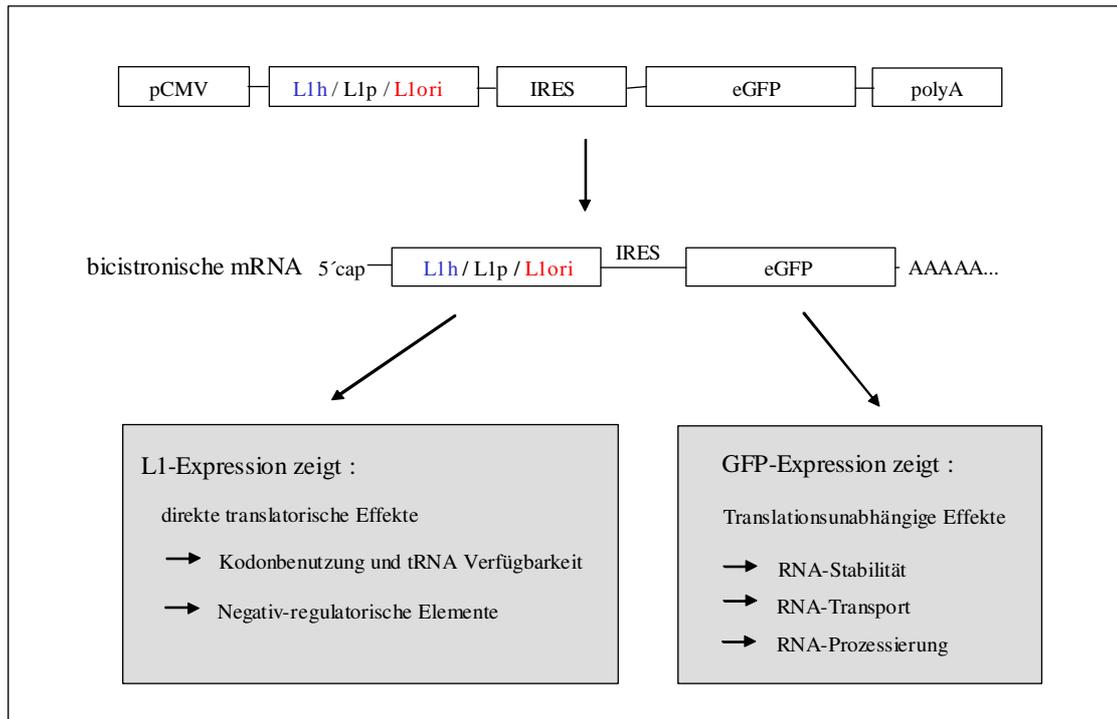


Abb. 3.6: Unterscheidung der direkten und indirekten Effekte der veränderten Leserahmen auf die Translation. eGFP, verstärktes grünfluoreszierendes Protein; IRES, interne Ribosomeneintrittsstelle; polyA, polyA-Signal; pCMV, „immediate early“ Promotor von Cytomegalievirus.

Die Einflüsse der L1-Leserahmen auf die GFP-Expression wurden durch Durchflusszytometrie (FACS) (Abb. 3.7) und Immunblot-Analyse (Abb. 3.8) der GFP-Expression 48 h nach Transfektion bestimmt.

Die Experimente zeigten, dass die originale L1-Sequenz (L1ori) verglichen mit der neutralen, HPV-unverwandten Sequenz *rec1* die GFP-Expression um ca. 60 % senkte, während L1p einen neutralen *cis*-Effekt auf die GFP-Expression hatte. Dagegen verstärkte L1h die GFP-Expression um ca. einen Faktor 2, so dass zwischen L1h und L1ori ungefähr ein Faktor 6-7 lag (Abb. 3.7 und 3.8a). Der Vergleich zwischen GFP- und L1-Expression in denselben Zellextrakten zeigte darüber hinaus, dass die L1-Expression (Abb. 3.8b) auch in *diesem* System durch L1h verglichen mit L1ori um mehrere Größenordnungen erhöht war. Die insgesamt sehr hohe Expressionsteigerung mit L1h lässt sich also zu einem kleinen Teil durch translationsunabhängige, posttranskriptionelle Effekte erklären. Vor allem scheinen aber eine effizientere Translation durch Kodonverbesserung und/oder der Wegfall von negativ-regulatorischen Elementen, die die Translation direkt beeinflussen, die L1-Expression massiv zu erhöhen.

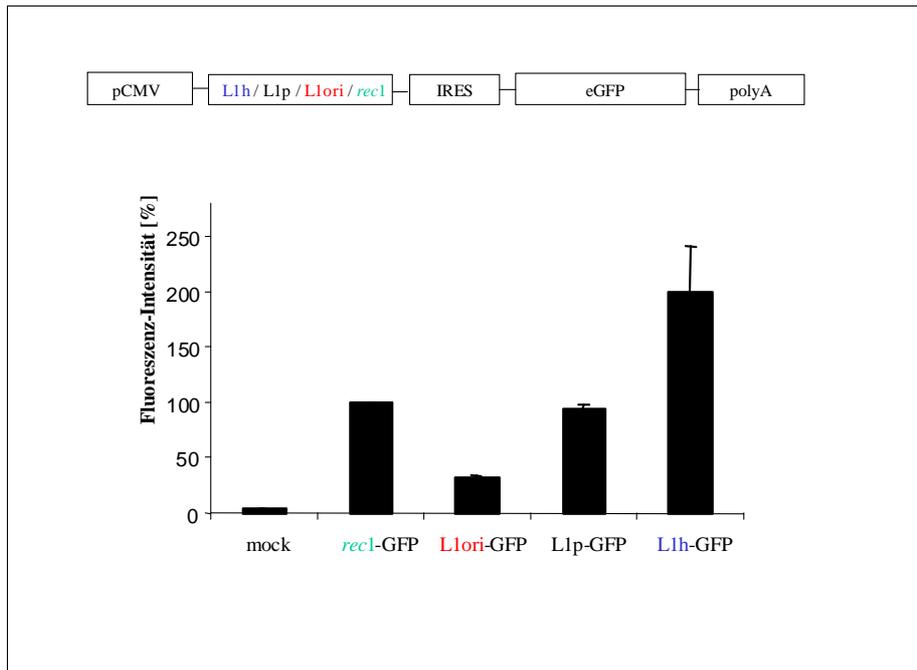


Abb. 3.7: Einfluss der veränderten L1-Leserahmen auf die Expression des „stromabwärts“ lokalisierten *gfp*-Gens in einem bicistronischen Konstrukt. 293T-Zellen wurden mit den verschiedenen bicistronischen Konstrukten transient transfiziert. Die GFP-Expression wurde durch Durchflusszytometrie (FACS) detektiert.

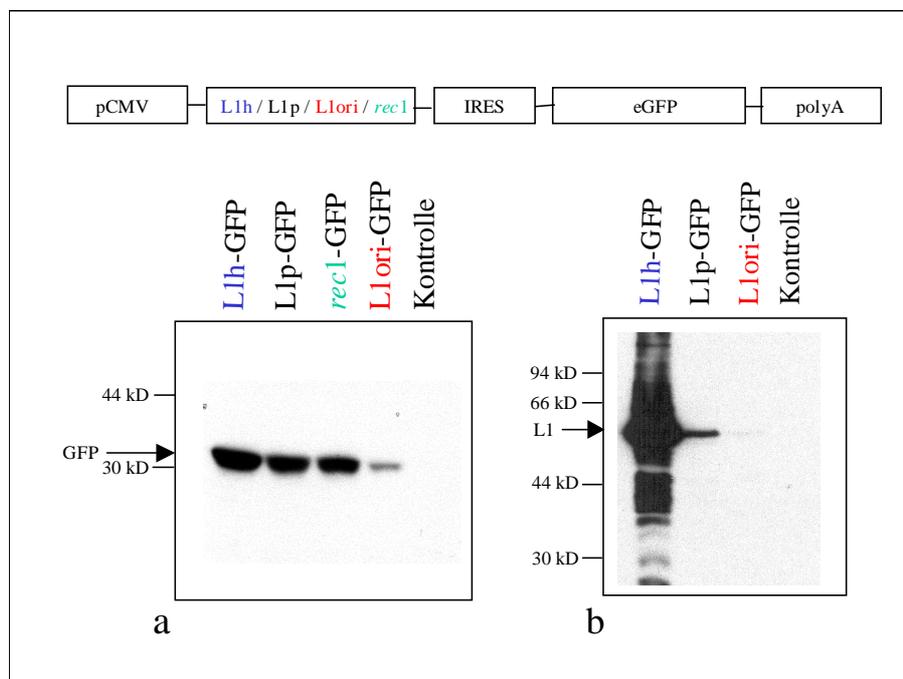


Abb. 3.8: Einfluss der veränderten L1-Leserahmen auf die Expression des „stromabwärts“ lokalisierten *gfp*-Gens in einem bicistronischen Konstrukt. 293T-Zellen wurden mit den verschiedenen bicistronischen Konstrukten transient transfiziert. Die GFP- (a) und L1-Expression (b) wurden in denselben Zellextrakten durch Immunblot-Analyse detektiert.

3.1.4. DNA-Immunisierung mit dem „humanisierten“ Leserahmen

Das ursprüngliche Ziel der Kodonoptimierung war, das L1-Gen für eine DNA-Immunisierung zu verbessern. Bisher war diese Anwendung durch die beschränkte Expression der Original-Sequenz limitiert (Dupuy *et al.*, 1999; Rocha-Zavaleta *et al.*, 2002). In den Experimenten wurden die humoralen Immunantworten auf die intramuskulär applizierten Expressionsplasmide pL1h und pL1ori verglichen (Abb. 3.9) und einem Kontrollplasmid, das kein L1-Gen enthielt (VP22-E7, Michel *et al.*, 2002a), gegenüber gestellt. Die humorale Immunantwort wurde mit Hilfe eines HPV-16 VLP-spezifischen ELISA quantifiziert. In diesem Verfahren wird eine Mikrotiterplatte mit gereinigten virusartigen Partikeln beschichtet. Die Blutseren werden dann in den Vertiefungen geeignet verdünnt. Das detektierte Farbstoffsignal ist abhängig von der Menge der an die VLPs gebundenen Antikörper.

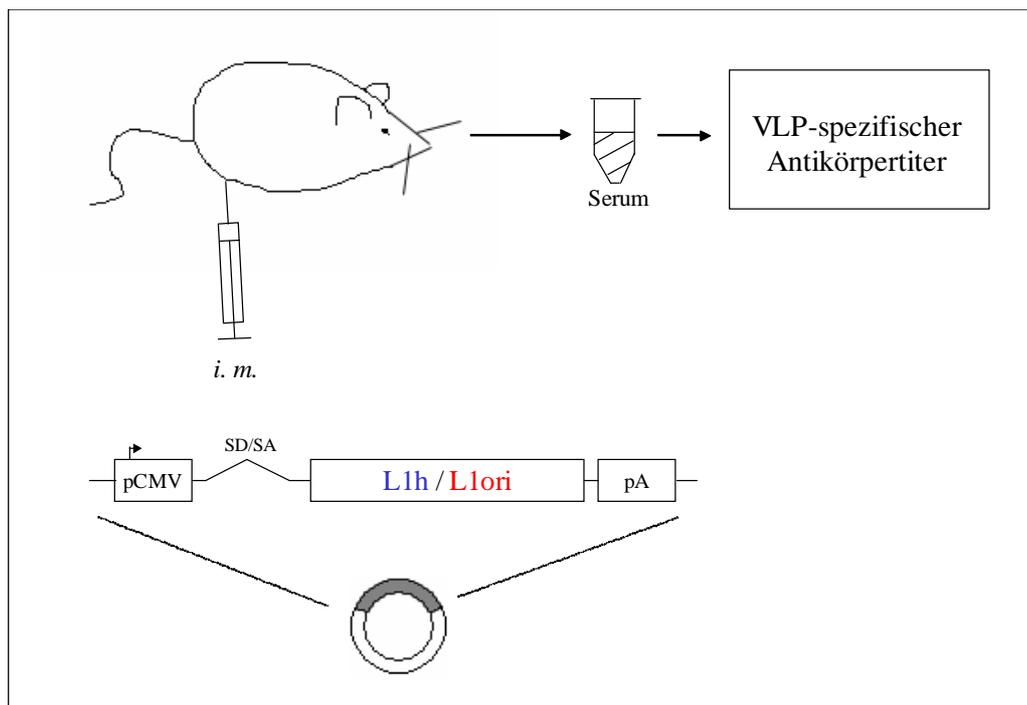


Abb. 3.9: DNA Immunisierung mit dem „humanisierten“ L1-Gen.

Den Versuchsmäusen wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen 100 µg Plasmid-DNA in die zu Beginn der Immunisierung mit Cardiotoxin vorbehandelten Hinterbeine *i. m.* appliziert. Nach weiteren 4 Wochen wurde das Blut entnommen, das Serum gewonnen und der HPV-16 VLP-spezifische Antikörpertiter im ELISA-Verfahren bestimmt.

Während keine der mit dem Kontrollplasmid immunisierten Mäuse VLP-spezifische Antikörper entwickelte (Abb. 3.10 und Tabelle 2), wurden nach Immunisierung mit L1h in allen Fällen hohe Titer gemessen (Abb. 3.11b und Tabelle 2). Im Gegensatz dazu entwickelte in der mit pL1ori immunisierten Gruppe nur eine Maus eine über den Hintergrund hinausgehende Antikörperantwort (Abb. 3.11a, #5). Der Titer dieser Maus lag um etwa 2 Größenordnungen niedriger als der Durchschnitt der L1h-Gruppe (Tabelle 2).

Die Experimente zeigten, dass die humorale Immunantwort gegen HPV-16 Kapside durch die Kodonoptimierung des L1-Leserahmens um ein Vielfaches gesteigert werden kann und liefert dadurch Hinweise, dass die L1-Expression nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* - zumindest in der Maus - verstärkt wird.

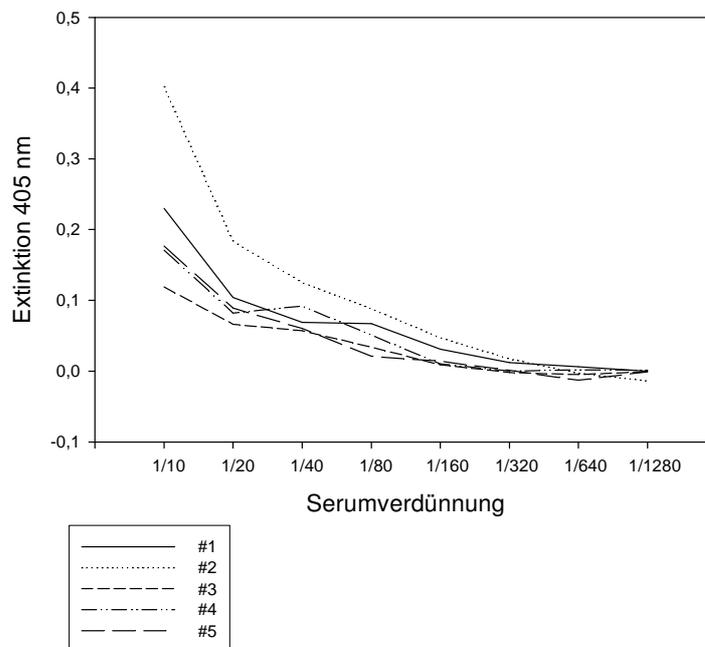
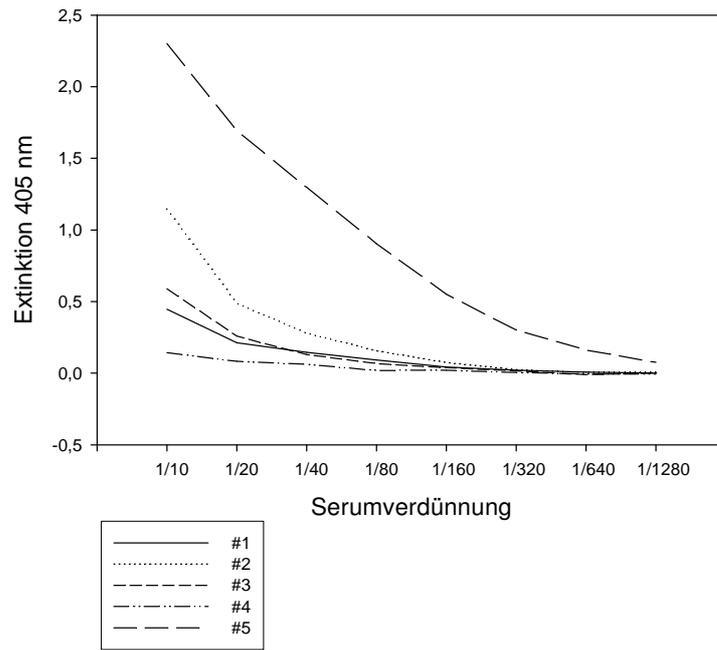


Abb. 3.10: Kontrollexperiment zur Induktion einer kapsidspezifischen Antikörper-Antwort.

Gezeigt sind die Signale der Seren der Kontrollgruppe im VLP-spezifischen ELISA. Die Kontrollgruppe bestand aus vier mit dem Kontrollplasmid VP22-E7 immunisierten Mäusen (1-4) und einer nicht-immunisierten Maus (5).

a



b

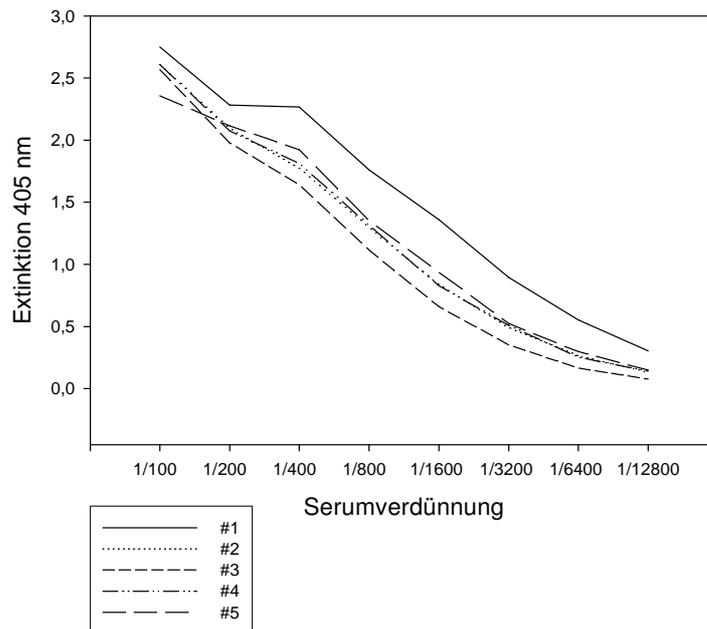


Abb. 3.11: Induktion von VLP-spezifischen Antikörpern durch DNA-Immunisierung. Die Antikörpertiter wurden im HPV-16 VLP-spezifischen ELISA detektiert.
 (a) Seren von 5 mit dem Expressionsplasmid pL1ori immunisierten Mäusen
 (b) Seren von 5 mit dem Expressionsplasmid pL1h immunisierten Mäusen

Tabelle 2: Ergebnisse der DNA-Immunisierung mit pL1h

Konstrukt	Positive Mäuse ^a / immunisierte Mäuse	Antikörper- titer ^b (Mittelwert)
Kontrolle	0/5	-
L1ori	1/5	1:80
L1h	10/10	1:7100

^a positive Mäuse im VLP-spezifischen ELISA-Verfahren

^b Mittelwert der Titer positiver Mäuse

3.2. Prophylaktische und therapeutische Immunisierung gegen HPV-16

Die hohe Expression des „humanisierten“ L1-Leserahmens und die damit verbundene erfolgreiche Anwendung als DNA-Vakzin boten die Erweiterung des bisher rein prophylaktischen, d. h. auf die Erzeugung von HPV-16 kapsidspezifischen Antikörpern ausgerichteten Immunisierungskonzeptes an. Die Idee war, das Hauptkapsidprotein L1 mit Teilen des für die Zelltransformation mitverantwortlichen Proteins E7 zu verbinden und dadurch die Möglichkeit zu eröffnen, zusätzlich zur humoralen Immunantwort gegen HPV-16 Kapside auch eine zelluläre Immunantwort gegen E7-Epitope zu erzeugen (Abb. 3.12). E7 ist ein attraktives Ziel für diese therapeutische Immunisierung, weil es als virales Tumorantigen betrachtet wird, das in Tumorgewebe von Papillomvirus-assoziierten Krebsarten exprimiert wird (zur Hausen, 2002). Durch Erzeugung von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen könnte also vor der Entstehung papillomvirus-assoziiierter Tumore geschützt werden und darüber hinaus könnten bereits vorhandene papillomvirus-assoziierte Tumore therapiert werden.

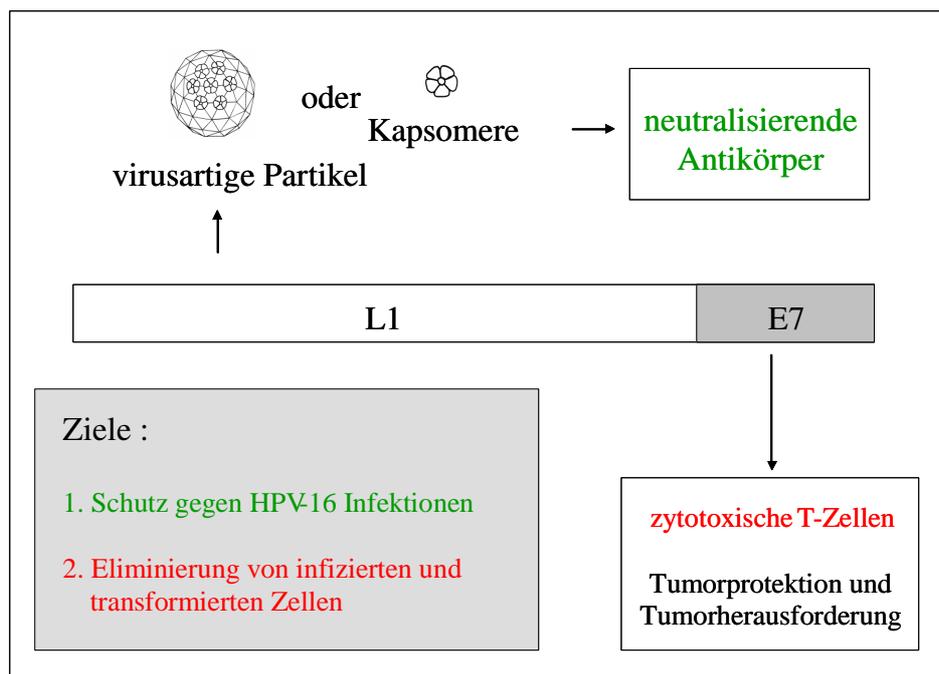


Abb. 3.12: Konzept und Ziele der prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung. Das Hauptstrukturgen L1 und das virale Tumorantigen E7 sollen fusioniert und als DNA-Vakzin exprimiert werden. Die Ziele dieser Strategie sind der Schutz gegen HPV-16 Infektionen durch Induktion von neutralisierenden Antikörpern und die Eliminierung von infizierten und transformierten Zellen durch E7-spezifische zytotoxische T-Zellen.

Die DNA-Immunisierung liefert für das prophylaktische und therapeutische Konzept die nötigen experimentellen Bedingungen, weil bekannt ist, dass sie MHC-I beschränkte CD8+ T-Zellantworten erzeugen kann (Gurunathan *et al.*, 2000).

3.2.1. Konstruktion des L1h/E7-Fusionsgens

Für den E7-Anteil wurden die ersten 60 Aminosäuren ausgewählt. Dieser Bereich schließt das für C57/Bl6-Mäuse bekannte H-2D^b-T-Zell-Epitop (Feltkamp *et al.*, 1993) ein (Abb. 3.13a). Auf der anderen Seite sind im E7₁₋₆₀ die beiden Zink-Finger-Motive (Cys58, 61 und Cys91, 94, Abb. 3.13a) (siehe Kapitel 1.1.5.) unterbrochen, beziehungsweise deletiert. Dadurch wird das Transformationspotential von E7 signifikant verringert (Edmonds und Vousden, 1989).

Basis für das L1h/E7-Fusionsgen war der „humanisierte“ L1-Leserahmen L1h. Die kodonveränderte Sequenz wurde durch eine *Nsi*I-Schnittstelle hinter der Aminosäure 473 der L1-Primärsequenz (Abb 3.13b) ergänzt. Diese Ergänzung (Abb 3.14, pBS-L1h*Nsi*I) wurde hergestellt, indem in der PCR zur Herstellung des kodonveränderten Leserahmens (siehe Kapitel 2.5.9. und 3.1.1.) die beiden diesen Bereich abdeckenden Oligonukleotide gegen zwei modifizierte Oligonukleotide (Nr. 24*Nsi*I und 25*Nsi*I; siehe Kapitel 2.1.2.) ausgetauscht wurden.

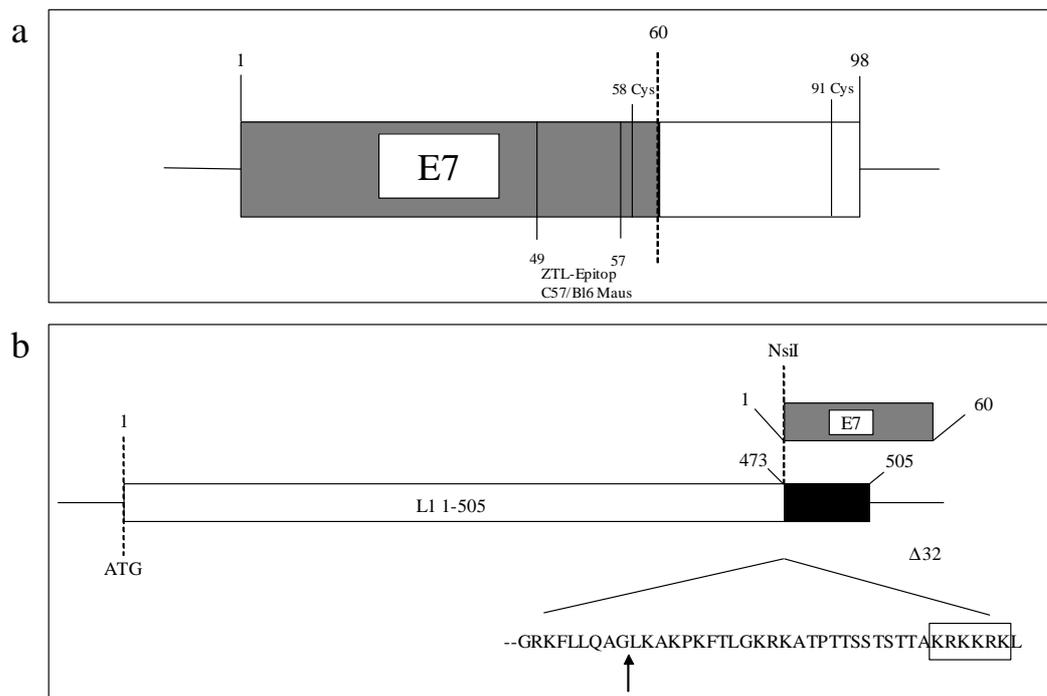


Abb. 3.13: Aufbau des L1h/E7-Fusionsgens.

(a) E7-Anteil aus den Aminosäuren 1-60

(b) Fusionsgen aus dem C-terminalen trunktierten L1 und dem E7-Anteil

Die Position der C-terminalen Verkürzung um 32 Aminosäuren ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Kernwanderungssignal von HPV-16 L1 (Zhou *et al.*, 1991b) ist im Ausschnitt der Primärsequenz eingrahmt.

Abbildung nach Müller *et al.*, 1997.

Die Erkennungssequenz von *Nsi*I lässt sich in die ersten zwei Aminosäuren von HPV-16 E7, Methionin und Histidin, übersetzen und bietet deshalb die Möglichkeit für einen „nahtlosen“

Übergang zwischen L1 und E7. Das L1h/E7-Fusionsgen liess sich nun aus dem *XbaI/NsiI*-Fragment aus pBS-L1hNsiI und einem E7₁₋₆₀-Fragment zusammensetzen und in das Expressionsplasmid pUF3 überführen (gemäß Abb. 3.2). Das resultierende Expressionsplasmid wird im folgenden als pL1h/E7 bezeichnet.

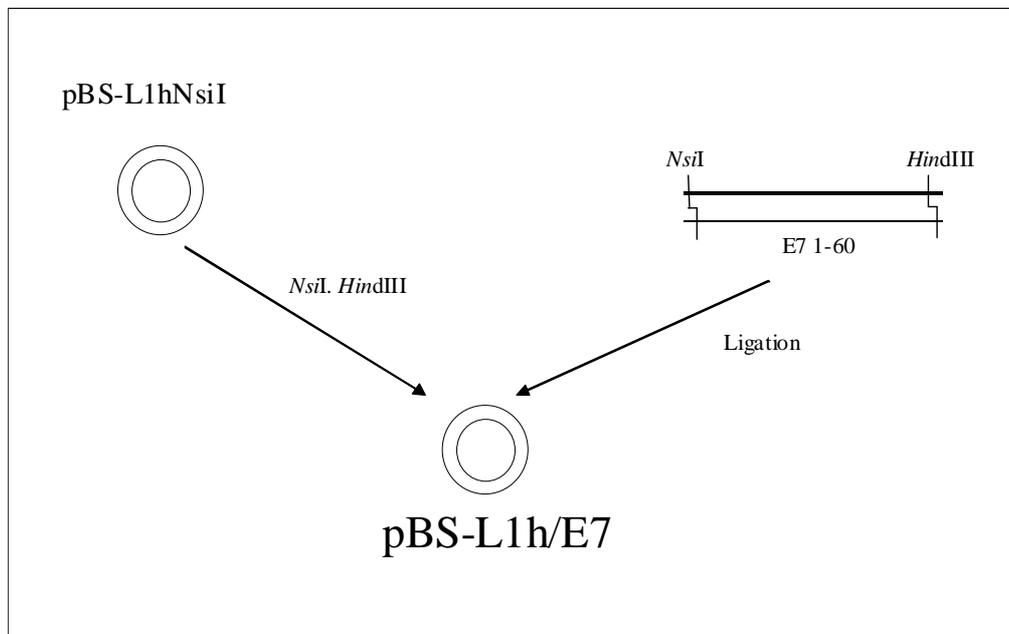


Abb. 3.14: Klonierungsstrategie zur Herstellung des L1h/E7-Fusionsgens. In der L1h-Sequenz wurde an die Position der geplanten Deletion durch Variation der PCR-Synthese eine *NsiI*-Schnittstelle eingefügt. Das E7₁₋₆₀-Fragment konnte in diese Schnittstelle überführt werden, weil die ersten beiden Aminosäuren von E7 durch das Erkennungsmotiv von *NsiI* kodiert werden. Die weitere Umklonierung in den Expressionsvektor pUF3 erfolgte gemäß Abb. 3.2 .

Das L1 ist damit am C-Terminus um 32 Aminosäuren deletiert (Abb. 3.13b). Diese Deletion sollte die Möglichkeit eröffnen, dass das Fusionsprotein einen möglichst großen E7-Anteil toleriert, ohne die Fähigkeit zu verlieren, virusartige Partikel zu bilden. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieses Genprodukt nach Expression in Insektenzellen durch ein Bakulovirussystem prinzipiell die Fähigkeit besitzt, sich zu - in diesem Fall chimären - virusartigen Partikeln zusammenzulagern (Müller *et al.*, 1997).

3.2.2. L1/E7-Expression und Lokalisation nach transienter Transfektion

Die Expression des Fusionsgens in undifferenzierten Säugerzellen wurde durch transiente Transfektion von verschiedenen Zelllinien (293T, HeLa, 911) im Immunblot-Verfahren und durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht.

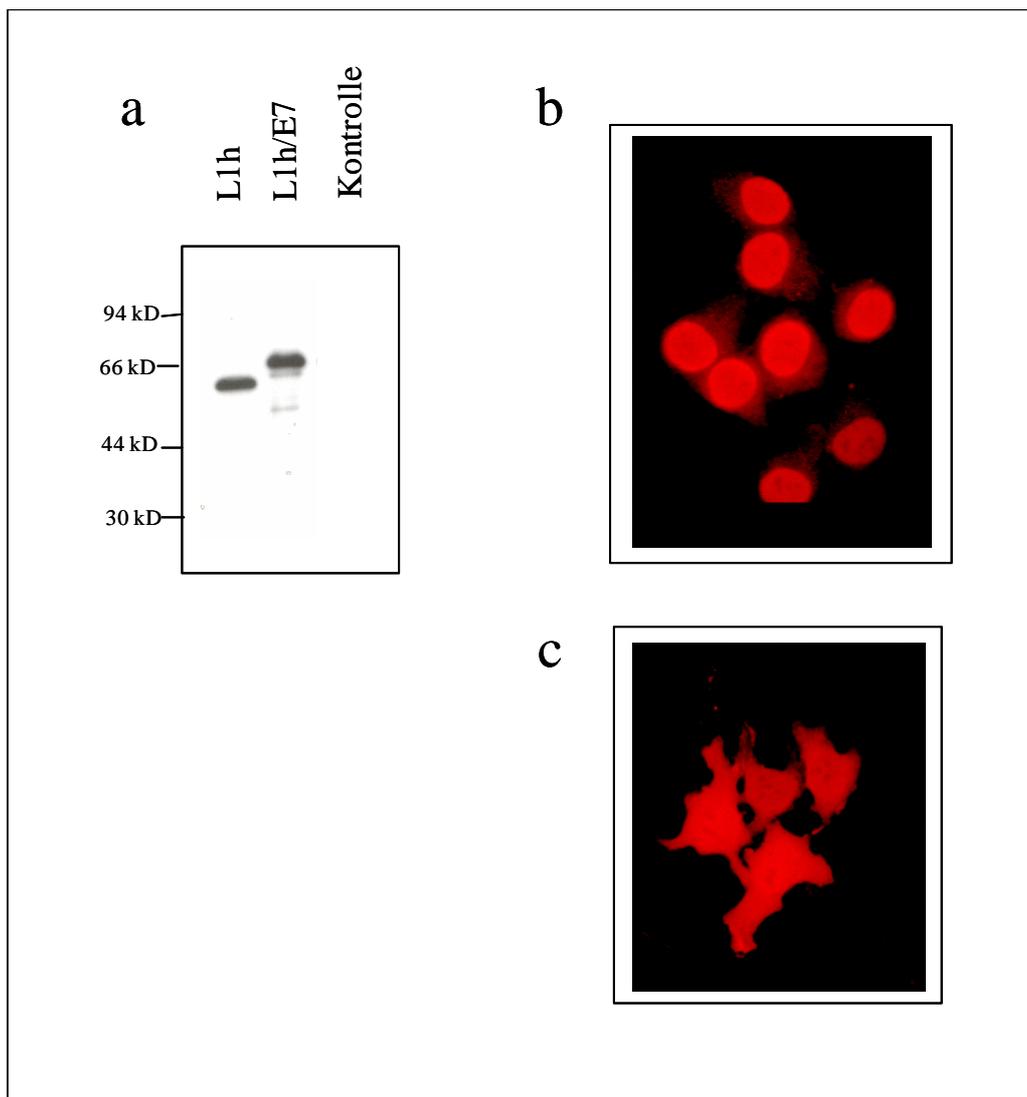


Abb. 3.15: Proteinexpression des L1h/E7 Fusionsgens.

(a) Immunblot-Analyse von Zellextrakten aus 293T-Zellen, die mit pL1h und pL1h/E7 transient transfiziert wurden. Als Kontrolle diente der Extrakt von untransfizierten 293T-Zellen. (b und c) Zelluläre Lokalisation von L1 (b) und dem L1/E7-Fusionsprotein (c) in transient transfizierten HeLa-Zellen. Beide Analysen wurden mit dem HPV-16 L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 durchgeführt.

Die Immunblot-Analyse mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 zeigte, dass das Fusionsgen vergleichbar stark wie L1h exprimiert wird (Abb. 3.15a). Die Größe des nachgewiesenen Genproduktes wies darauf hin, dass das Fusionsprotein korrekt translatiert wird. In der indirekten Immunfluoreszenz von transient transfizierten Zellen war zu beobachten, dass das Fusionsprotein im Gegensatz zum L1 (Abb. 3.15b) hauptsächlich zytosolisch verteilt ist (Abb. 3.15c). Das Ausbleiben der Kernwanderung lässt sich möglicherweise durch die C-terminale Deletion des L1 im Fusionsgen erklären, durch die das dort lokalisierte Kernwanderungssignal KRKKRK (Zhou *et al.*, 1991b) verloren geht (Abb. 3.13b, eingerahmte Aminosäuresequenz).

Besonders interessant war die Frage, ob sich das L1/E7-Fusionsprotein nach Überexpression vergleichbar mit L1 intrazellulär zu – in diesem Fall chimären - virusartigen Partikeln zusammenlagert. Die ausführliche elektronenmikroskopische Suche in ultradünnen Schnitten von transient transfizierten Zellen lieferte allerdings weder im Kern noch im Zytosol Hinweise auf kapsidartige Strukturen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. Kernlokalisierung des L1/E7-Fusionsproteins

Die Experimente aus 3.2.2. hatten gezeigt, dass das L1/E7-Fusionsprotein im Gegensatz zu L1 nicht im Zellkern akkumuliert und keine virusartigen Partikel bildet. Das führte zu der Hypothese, dass die Bildung von virusartigen Partikeln aus dem L1/E7-Fusionsprotein in humanen Zellen von der Kernlokalisierung des Proteins abhängt.

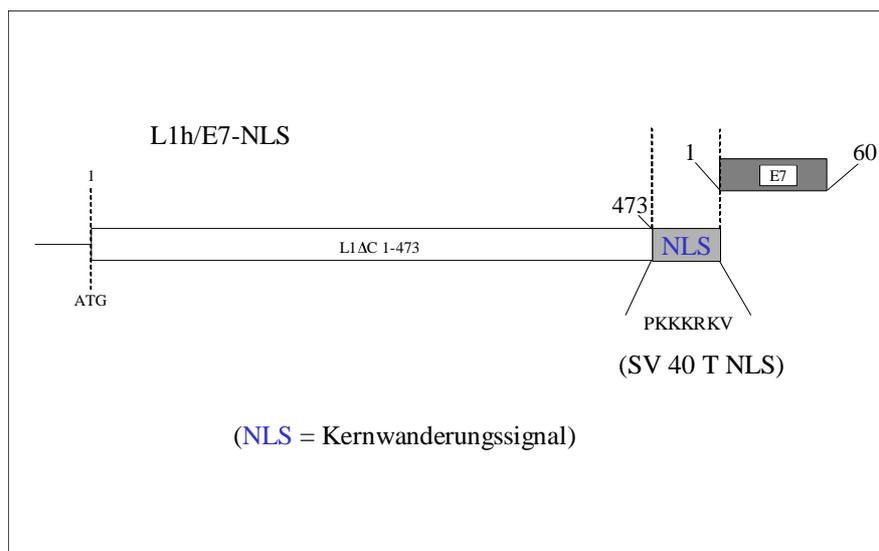


Abb. 3.16: Aufbau des L1/E7-Fusionsproteins (L1h/E7-NLS) mit Kernlokalisierungssignal. Das Fusionsprotein (s. Abb. 3.13b) wurde zwischen dem L1- und E7-Anteil durch das Kernwanderungssignal von SV 40 T (Kalderon *et al.*, 1984), einer Abfolge von basischen Aminosäuren, ergänzt.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das Fusionsgen zwischen dem L1- und E7-Anteil mit dem Kernwanderungssignal (NLS) vom großen T-Antigen aus SV 40 ergänzt (Abb. 3.16) (Plasmid zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Martin Müller (DKFZ)). Dieses Kernwanderungssignal besteht aus insgesamt 7 Aminosäuren, von denen 5 eine basische Seitenkette haben (Kalderon *et al.*, 1984). Dieses Konstrukt wurde pL1h/E7-NLS genannt. Es hat ebenfalls das Expressionsplasmid pUF3 als Basis.

3.2.4. Expression und Lokalisation

Die Expression des Fusionsproteins mit und ohne Kernwanderungssignal wurde nach transients Transfektion von 293T- und HeLa-Zellen durch Immunblot-Analyse und indirekte Immunfluoreszenz überprüft.

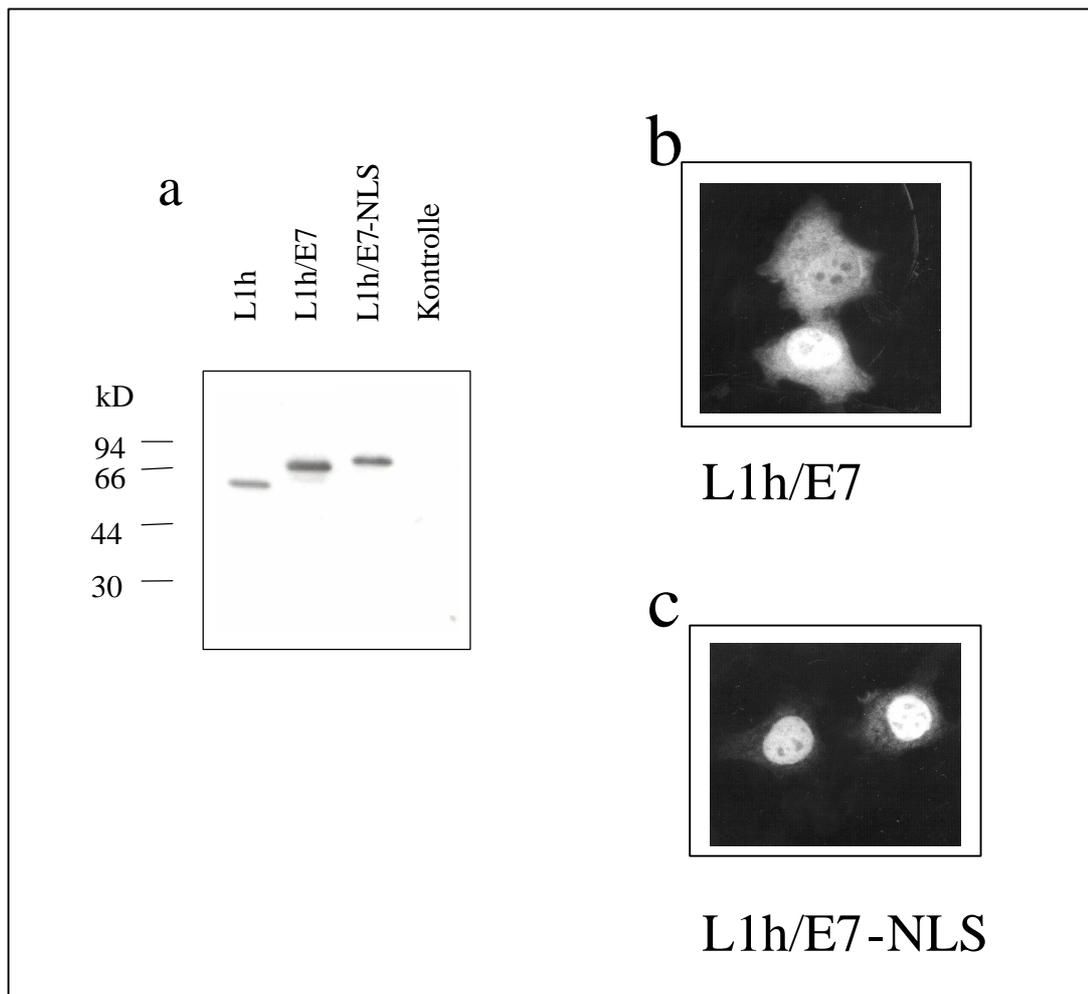


Abb. 3.17: Proteinexpression der L1h/E7-Fusionsgene.

(a) Immunblot-Analyse von Zellextrakten aus 293T-Zellen, die mit pL1h, pL1h/E7 und pL1h/E7-NLS transient transfiziert wurden. Als Kontrolle diente der Extrakt untransfizierter 293T-Zellen. (b und c) Zelluläre Lokalisation des L1/E7-Fusionsproteins mit (c) und ohne (b) Kernlokalisationssignal in transient transfizierten HeLa-Zellen. Beide Analysen wurden mit dem HPV-16 L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 durchgeführt.

Die Experimente zeigten, dass das leicht vergrößerte Fusionsprotein mit Kernwanderungssignal (L1h/E7-NLS) vergleichbar stark wie das unmodifizierte Fusionsprotein (L1h/E7) exprimiert wird (Abb 3.17). Das modifizierte Fusionsprotein lokalisierte im Gegensatz zum

unmodifizierten Fusionsprotein wie angestrebt im Zellkern (Abb 3.17c). Damit konnte gezeigt werden, dass das zusätzlich eingefügte fremde Kernwanderungssignal funktionstüchtig ist. Nach Expression der beiden Fusionsproteine in HeLa-Zellen wurde im Immunblot-Verfahren mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 eine Doppelbande beobachtet (Abb. 3.18a). Die Tatsache, dass nur das obere Signal dieser Doppelbande durch einen E7-spezifischen Antikörper (Hybridom II, Martin Müller (DKFZ)) nachweisbar war (Abb. 3.18b), liefert Hinweise, dass das Fusionsprotein im E7-Anteil zumindest in bestimmten Zelltypen anfällig für proteolytischen Abbau ist, wenn man davon ausgeht, dass die untere Bande ein verkürztes Genprodukt ist, in dem das Epitop des E7-spezifischen Antikörpers verloren gegangen ist (Abb. 3.18c).

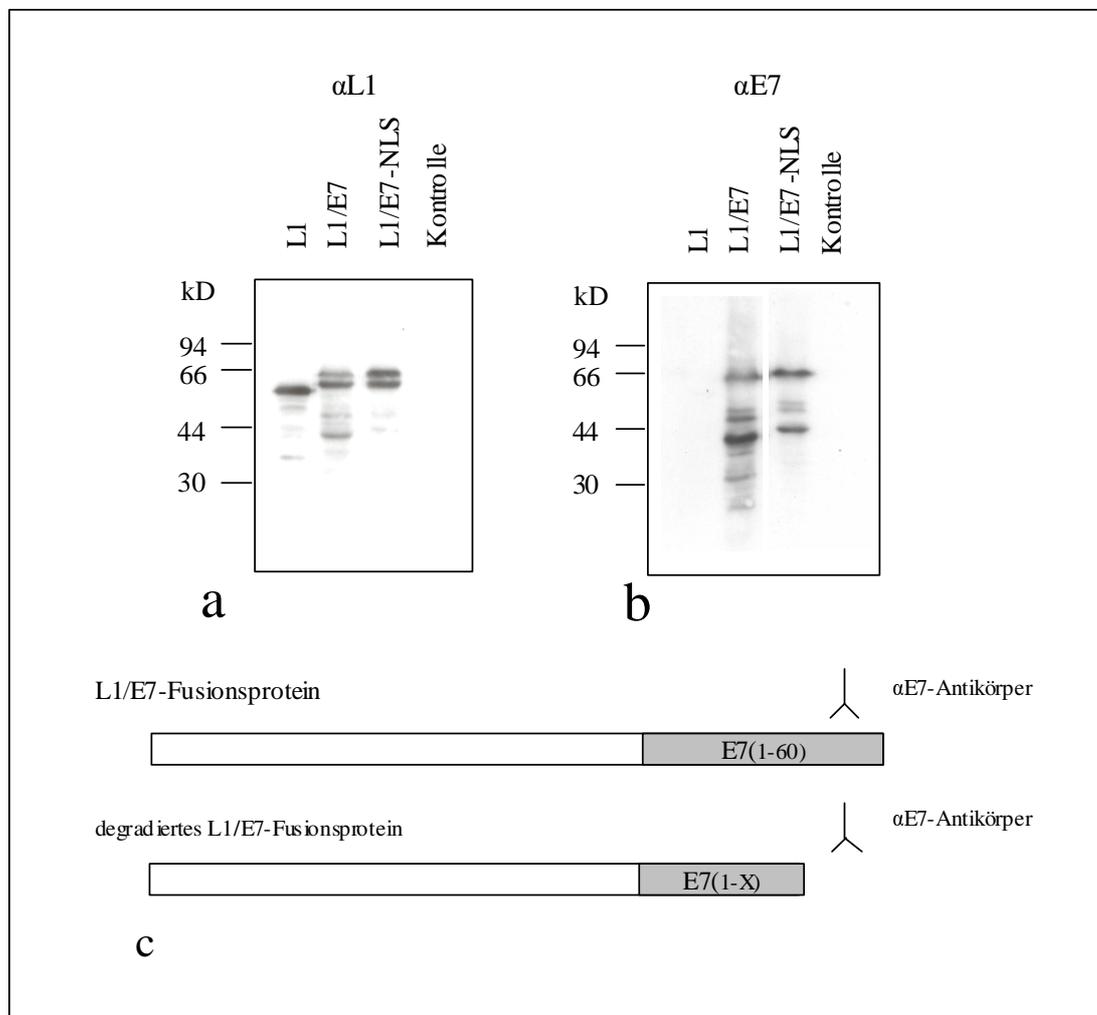


Abb. 3.18: Expression der Fusionsproteine in HeLa-Zellen. Immunblot-Analyse von Zellextrakten aus HeLa-Zellen, die mit pL1h, pL1h/E7 und pL1h/E7-NLS transient transfiziert wurden. Die beiden Analysen (a und b) wurden mit denselben Extrakten durchgeführt.
 (a) Nachweis mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1
 (b) Nachweis mit einem E7-spezifischen Antikörper (Hybridom II)
 (c) Vorschlag für die Degradation des Fusionsproteins.
 Es kann angenommen werden, dass der E7-Anteil bis zur Aminosäure X proteolytisch gespalten wird. Dadurch geht möglicherweise das Epitop des α E7-Antikörpers zwischen Aminosäure X und 60 verloren.

Dieses Ergebnis bestätigt die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass E7 nach Veränderung der Zink-Finger-Motive an Stabilität verliert (Phelps *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1999).

Um der Frage nachzugehen, ob die Kernwanderung des Fusionsprotein einen Einfluss auf die Bildung von virusartigen Partikeln hat, wurden ultradünne Schnitte von transient transfizierten Zellen (293T, HeLa und 911) elektronenmikroskopisch untersucht. Es fanden sich jedoch keine Hinweise auf kapsidartige Strukturen *in situ* (Daten nicht gezeigt). Um eine ausreichende Transfektionseffizienz sicherzustellen, wurde parallel zur Elektronenmikroskopie die Expression in einem Teil der transfizierten Zellkultur durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft.

3.2.5. Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse der Fusionsproteine

Nach Expression der Fusionsgene konnten in der Elektronenmikroskopie keine virusartigen Partikel *in situ* beobachtet werden (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Da jedoch die Ausbildung von virusartigen Strukturen – Kapsomeren oder leeren Virushüllen – vermutlich eine Voraussetzung zur Induktion neutralisierender Antikörper (prophylaktische Immunisierung) ist, wurden die Zusammenlagerungsprodukte der exprimierten Fusionsproteine genauer untersucht. Es bot sich an, die Fusionsproteine in einer Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse in einem Saccharose-Gradienten zu charakterisieren.

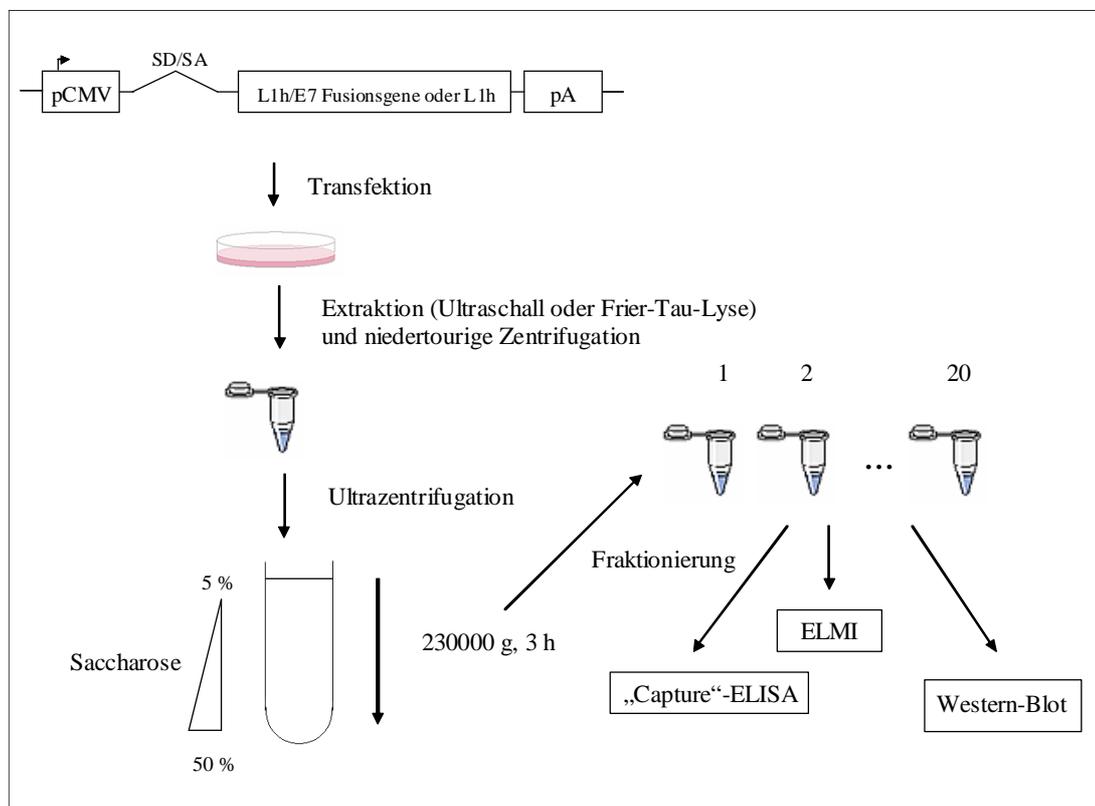


Abb. 3.19: Durchführung der Sedimentationsanalyse zur Charakterisierung der Komplexbildungseigenschaften der L1/E7-Fusionsproteine.

Die Extrakte transfizierter Zellen wurden entweder durch Ultraschall oder durch Frier-Tau-Lyse gewonnen. Nach einer niedertourigen Zentrifugation wurde der Überstand des Extraktes auf einen Saccharose-Gradienten geladen und für 3 h einem Schwerefeld von ca. 230000 g ausgesetzt. Anschließend wurden die Gradientenfraktionen im „capture“-ELISA, durch Elektronenmikroskopie und im Immunblot-Verfahren untersucht. ELMI, Elektronenmikroskopie; ELISA, „enzyme-linked immunosorbent assay“; pA, polyA-Signal; pCMV, „immediate early“-Promotor von Cytomegalievirus.

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse erlaubt es, zwischen Kapsomeren, virusartigen Partikeln und möglichen Kapsidbildungsneben- oder Zwischenprodukten zu unterscheiden, weil diese Strukturen unterschiedliche Sedimentationseigenschaften haben. Das Sedimen-

tationsverhalten von Makromolekülen hängt von Größe, relativer Masse und Form des Makromoleküls ab und ergibt einen charakteristischen Sedimentationskoeffizienten.

Abb. 3.19 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen. Genauere Angaben zur Methodik finden sich im Kapitel 2.4.9.

3.2.5.1. Voruntersuchungen zur Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse

3.2.5.1.1. Positivkontrollen für virusartige Partikel und Kapsomere

Um gesicherte Aussagen über die Komplexbildungseigenschaften der Fusionsproteine treffen zu können, wurden zunächst zur Standardisierung einige Kontrollexperimente mit gereinigten virusartigen Partikeln (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Aengenendt (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

36 µg dieser Partikelpräparation wurden gegen PBS dialysiert. Dann wurde der Ansatz aufgeteilt und beide Hälften einer Sedimentationsanalyse unterzogen. Zuvor wurde jedoch eine der Hälften mit 100 mM DTT und 1 mM EDTA versetzt und ü. N. bei 4 °C inkubiert. DTT reduziert die interkapsomeren Disulfid-Brücken (Sapp *et al.*, 1995; Paintsil *et al.*, 1998) und bewirkt dadurch den Zerfall der Partikel in Kapsomere. Abb. 3.20 zeigt das Sedimentationsverhalten von virusartigen Partikeln (VLP) und reduzierten virusartigen Partikeln. Aliquots der Gradientenfraktionen wurden in einem „capture“-ELISA mit einem konformationsspezifischen Antikörper, der HPV-16 Kapside und Kapsomere nachweisen kann (Müller *et al.*, 1997), untersucht.

Die Vorexperimente zeigten, dass gereinigte virusartige Partikel von HPV-16 einen Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 120 - 140 S haben. Die Reduktion von virusartigen Partikeln bewirkt hauptsächlich den Zerfall in Kapsomere mit einem Sedimentationskoeffizienten von 11 – 20 S. Ein Teil des Materials verbleibt allerdings in größeren Komplexen mit Sedimentationskoeffizienten zwischen 40 und 70 S.

Die Vorexperimente bestätigten die in der Literatur angegebenen Sedimentationskoeffizienten papillomvirusartiger Partikel von 150 S für HPV-11 (McCarthy *et al.*, 1998) und 140 S für COPV (Yuan *et al.*, 2001) sowie von Kapsomeren (für COPV-Kapsomere 11-14 S; Yuan *et al.*, 2001).

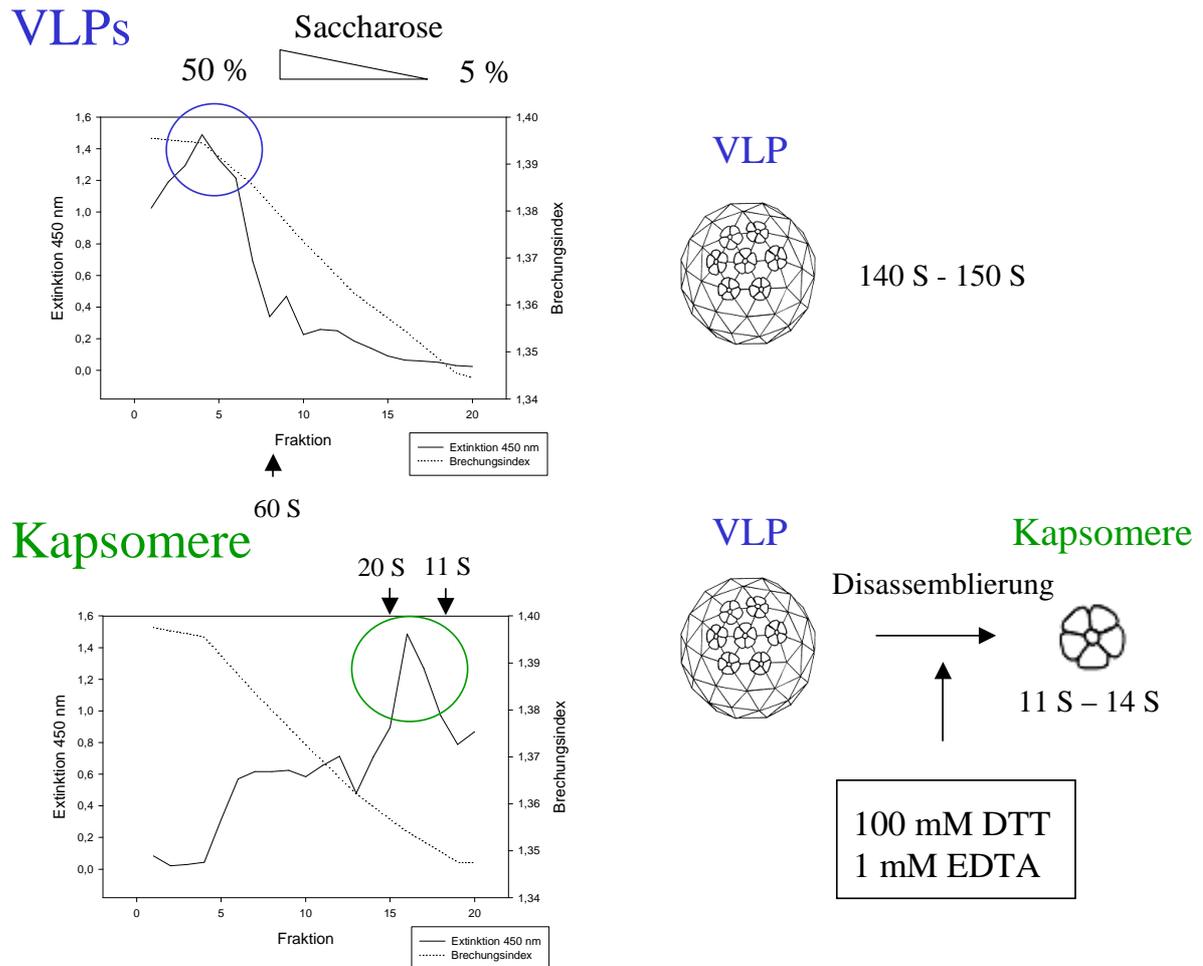


Abb. 3.20: Virusartige Partikel (VLPs) und Kapsomere in der Sedimentationsanalyse. 18 μg VLPs oder reduzierte VLPs wurden auf einen Saccharose-Gradienten geladen und 3 h bei 230000 g zentrifugiert. Aliquots der Gradientenfraktionen wurden im „capture“-ELISA mit dem konformationsspezifischen HPV-16 L1-Antikörper 1.3 analysiert. Als Sedimentationsmarker dienten Katalase (11 S), Thyroglobulin (20 S) und leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (60 S, Wistuba *et al.*, 1995). Die angegebenen Sedimentationskoeffizienten für VLPs und Kapsomere stammen aus der Literatur (siehe Text).

3.2.5.1.2. Extraktionsbedingungen

Die geeignete Zellextraktion musste zwei wichtige Bedingungen erfüllen:

Erstens muss ein möglichst großer Anteil des in der Zelle vorliegenden Fusionsproteins durch die Extraktion in Lösung gehen, um nicht bei der niedertourigen Zentrifugation vor der Beladung des Gradienten verlorenzugehen (Abb. 3.19). Zweitens muss sichergestellt werden, dass die Extraktion intakte Strukturen, vor allem Kapside und Kapsomere, freisetzt.

Um diese Bedingungen zu erfüllen, mussten verschiedene Extraktionsbedingungen getestet werden. Ultraschall stellte sicher, dass ein großer Teil des Proteins untersucht werden

konnte. Dabei musste aber akzeptiert werden, dass virusartige Partikel durch die Beschallung in ihrem Sedimentationsverhalten verändert wurden. Abb. 3.21 und 3.22 zeigen die Einflüsse der Beschallung auf die virusartigen Partikel in der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse und in der elektronenmikroskopischen Analyse.

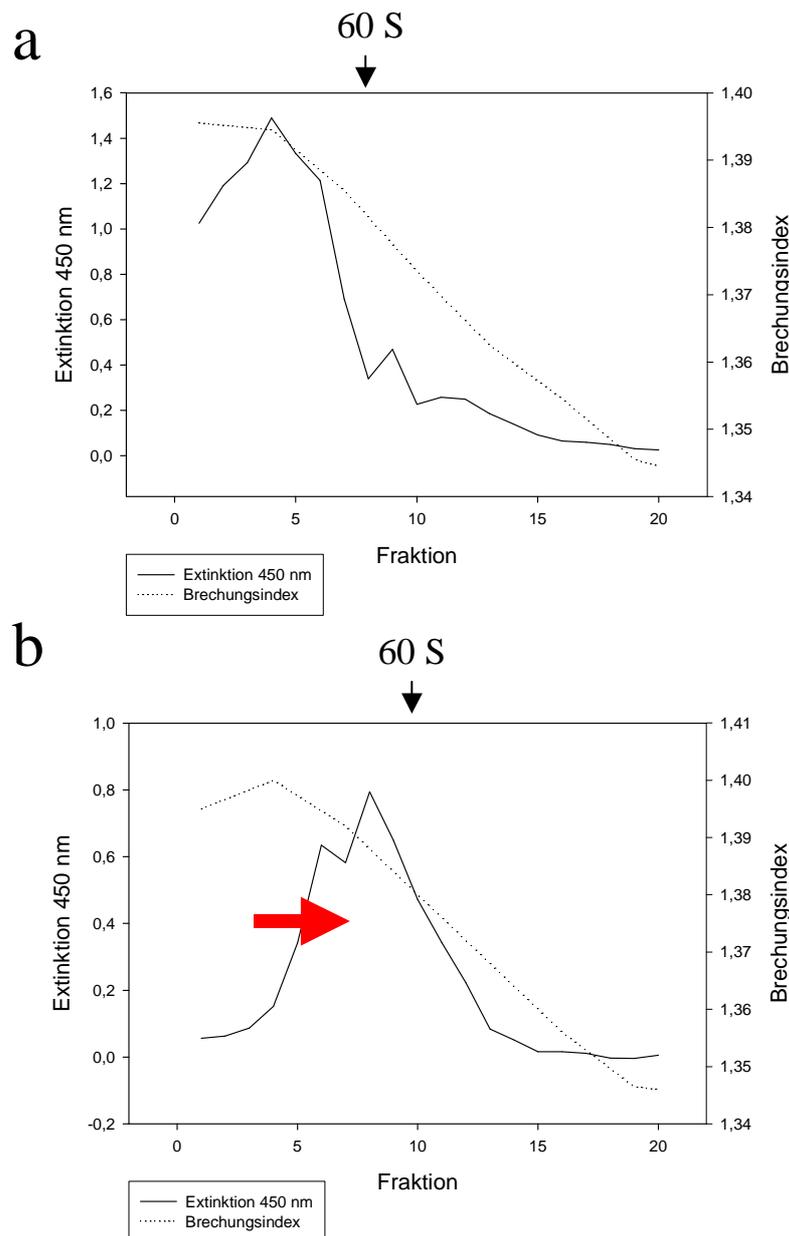


Abb. 3.21: Einfluss von Ultraschall auf die Stabilität von virusartigen Partikeln (VLPs). 6 µg VLPs wurden unhandelt (a) und nach Ultraschall-Behandlung (3 x 10 Stöße, Stufe 3 (Branson Sonifier 250)) (b) auf einen Saccharose-Gradienten geladen und einem Schwerfeld von 230000 g für 3 h ausgesetzt. Aliquots der Gradientenfraktionen wurden im „capture“-ELISA mit dem konformationsspezifischen Antikörper 1.3 analysiert. Als Sedimentationsmarker für 60 S dienen leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (Wistuba *et al.*, 1995).

Mittels elektronenmikroskopischer Analyse ließ sich beobachten, dass die Anzahl intakter Partikel nach Beschallung abnimmt (Abb. 3.22). Die Sedimentationsanalyse zeigte ausserdem, dass die Partikel in Aggregate mit einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 60 - 70 S zerfallen (Abb 3.21).

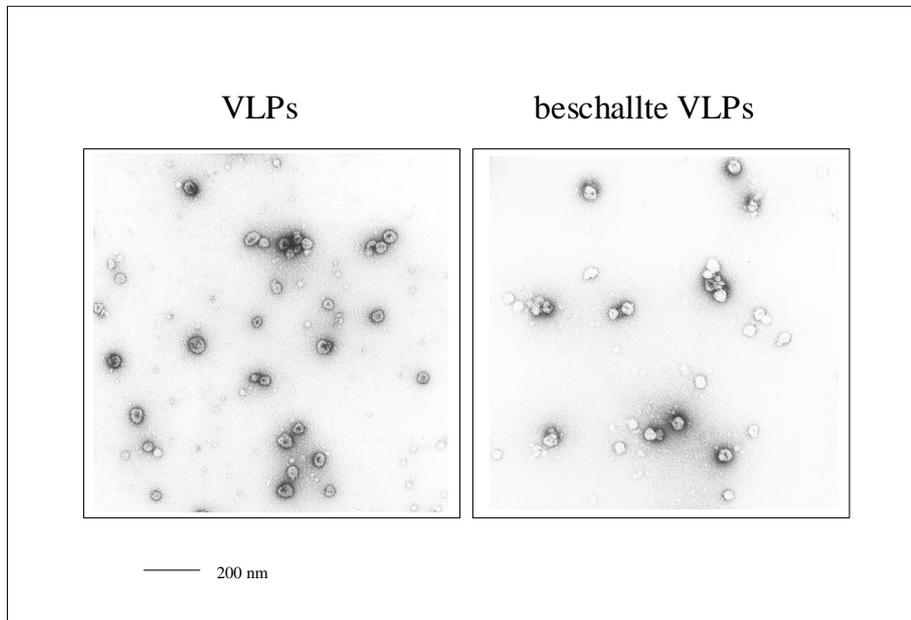


Abb. 3.22: Zerfall von VLPs durch Ultraschall-Behandlung. Je 3 µg VLPs wurden dialysiert, in 300 µl PBS aufgenommen und unbehandelt (links) bzw. nach Beschallung (3 x 10 Stöße, Stufe 5, Branson Sonifier 250) (rechts) in der Elektronenmikroskopie untersucht.

Der Zerfall der virusartigen Partikel durch Ultraschall stellt ein unerwünschtes technisches Artefakt dar, denn das vorrangige Ziel war, möglicherweise vorhandene virusartige Partikel bestehend aus den Fusionsproteinen nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde alternativ eine schonendere Frier/Tau-Lyse mit anschließendem Benzonase-Verdau am Beispiel von überexprimiertem L1 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Extraktionsmethode die virusartigen Partikel intakt lässt (Abb. 3.23). Die Untersuchung der Gradientenfractionen von Extrakten aus L1-überexprimierenden Zellen lieferte im „capture“-ELISA drei charakteristische Signale. Das erste Signal tauchte bei 11 - 20 S auf und kann möglicherweise auf die in diesem Bereich sedimentierenden Kapsomere (Abb. 3.23, grün markiert; siehe zum Vergleich Abb. 3.20) zurückgeführt werden. Ein zweites Signal wurde bei 40 - 50 S beobachtet (Abb. 3.23, rot markiert). Das dort sedimentierende Material hat verglichen mit der Positivkontrolle eindeutig Sedimentationseigenschaften, die von virusartigen Partikeln abweichen. Es kann angenommen werden, dass es sich um Kapsidbildungsnebenprodukte oder -intermediate handelt. Ein weiteres charakteristisches

Signal (Abb. 3.23, blau markiert) hat ähnliche Sedimentationseigenschaften wie gereinigte virusartige Partikel (Abb. 3.20). Die elektronenmikroskopische Untersuchung eines Aliquots der „Peakfraktion“ lieferte eindeutige Hinweise auf intakte virusartige Partikel (Abb. 3.23a, blaues Kästchen). Die Proteinverteilung wurde durch Immunblot-Analyse der Gradientenfractionen mit einem L1-spezifischen Antikörper bestätigt (Abb. 3.23b).

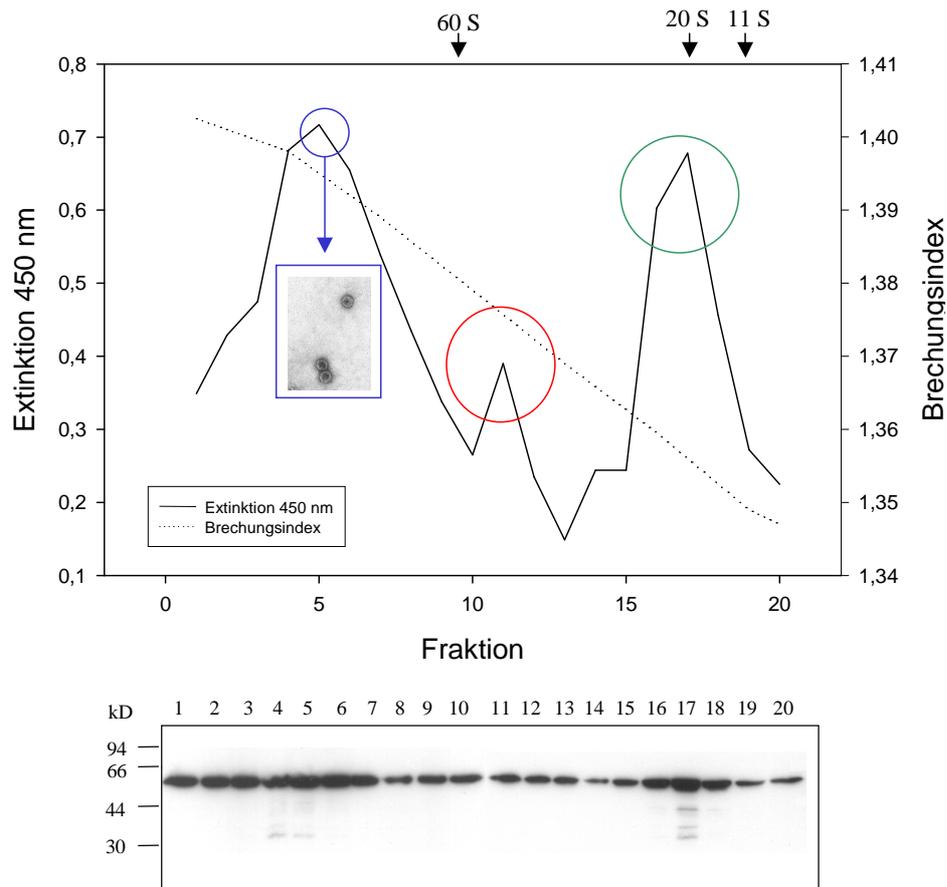


Abb. 3.23: Sedimentationsanalyse von überexprimiertem HPV-16 L1.

Ein durch Frier/Tau-Lyse und anschließendem Benzonase-Verdau gewonnener Zell-extrakt von 293T-Zellen, die mit pL1h transfiziert wurden, wurde gemäß Abb. 3.19 in der Sedimentationsanalyse untersucht. Als Sedimentationsmarker dienten Katalase (11 S), Thyroglobulin (20 S) und leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (60 S, Wistuba *et al.*, 1995). (oben) „capture“-ELISA mit dem konformationsspezifischen Antikörper 1.3 (unten) Immunblot-Analyse derselben Gradientenfractionen mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1

Der Anteil des durch die beiden Extraktionsmethoden freigesetzten Proteins wurde für L1 und die Fusionsproteine untersucht. Dazu wurde jeweils ein vergleichbares Aliquot des durch Zentrifugation geklärten Extraktes (7800 g, 10 min) und dessen Sedimentes denaturiert und im Immunblot-Verfahren untersucht. Dieser Vergleich zeigte, dass die Ultrabeschallung die

überexprimierten Proteine zu ca. 50 % freisetzt (Abb. 3.24a). Die Frier/Tau-Lyse setzte jedoch nur L1 zu ca. 50 % frei, während in diesem Fall die beiden Fusionsproteine größtenteils im Sediment des Extraktes verblieben (Abb. 3.24b).

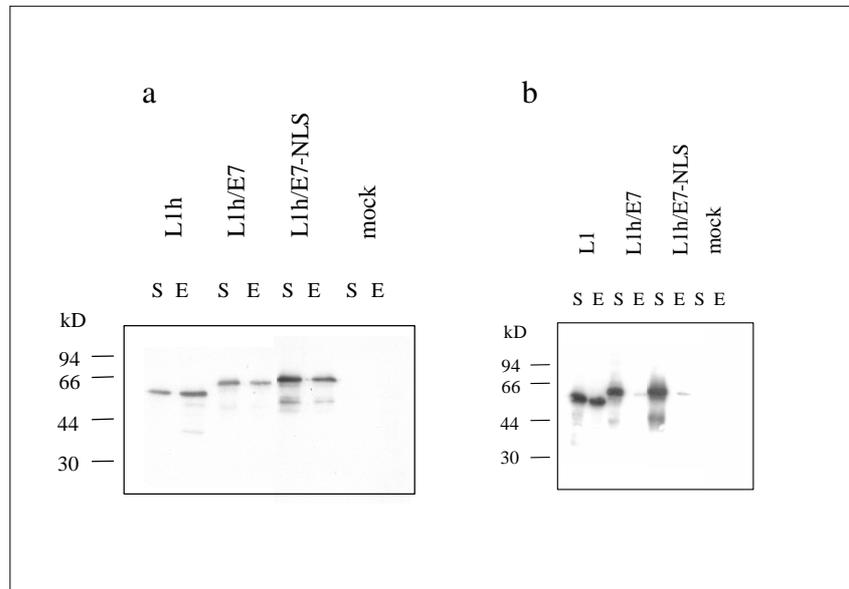


Abb. 3.24: Proteinausbeuten der verwendeten Extraktionsmethoden. Transient transfizierte 293T-Zellen wurden durch Ultraschall (a) oder Frier/Tau-Lyse mit anschließendem Benzonase-Verdau (b) aufgeschlossen. Aliquots der Extrakte (E) und Sedimente der Rohextrakte (S) wurden durch Immunblot-Analyse mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 untersucht.

3.2.5.2. Die Fusionsproteine in der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse

Die Erkenntnisse aus den Voruntersuchungen führten zu der Strategie, die Fusionsproteine sowohl durch Ultraschallung als auch durch Frier/Tau-Lyse zu extrahieren.

Die Experimente mit dem unmodifizierten Fusionsprotein lieferten keine Hinweise auf chimäre virusartige Partikel. Dagegen wurde nach Ultraschallung ein Signal bei 11 - 20 S beobachtet, das auf Kapsomere hindeutet (Abb. 3.25a, grün markiert). Daneben wurde in der Immunblot-Analyse ausserdem komplex-aggregiertes Material mit einem Sedimentationskoeffizienten > 60 S detektiert (Abb. 3.25a und b, rot markiert). Dieses Material wird also nur von dem Antikörper CamVir-1, der ein lineares L1-Epitop erkennt, detektiert, nicht aber von dem konformationsspezifischen Antikörper 1.3 im „capture“-ELISA.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Fraktion lieferte ausserdem keine Hinweise auf kapsidartige Strukturen (Daten nicht gezeigt). Es wurden in diesen Fraktionen lediglich 20 - 40 nm große Aggregate beobachtet.

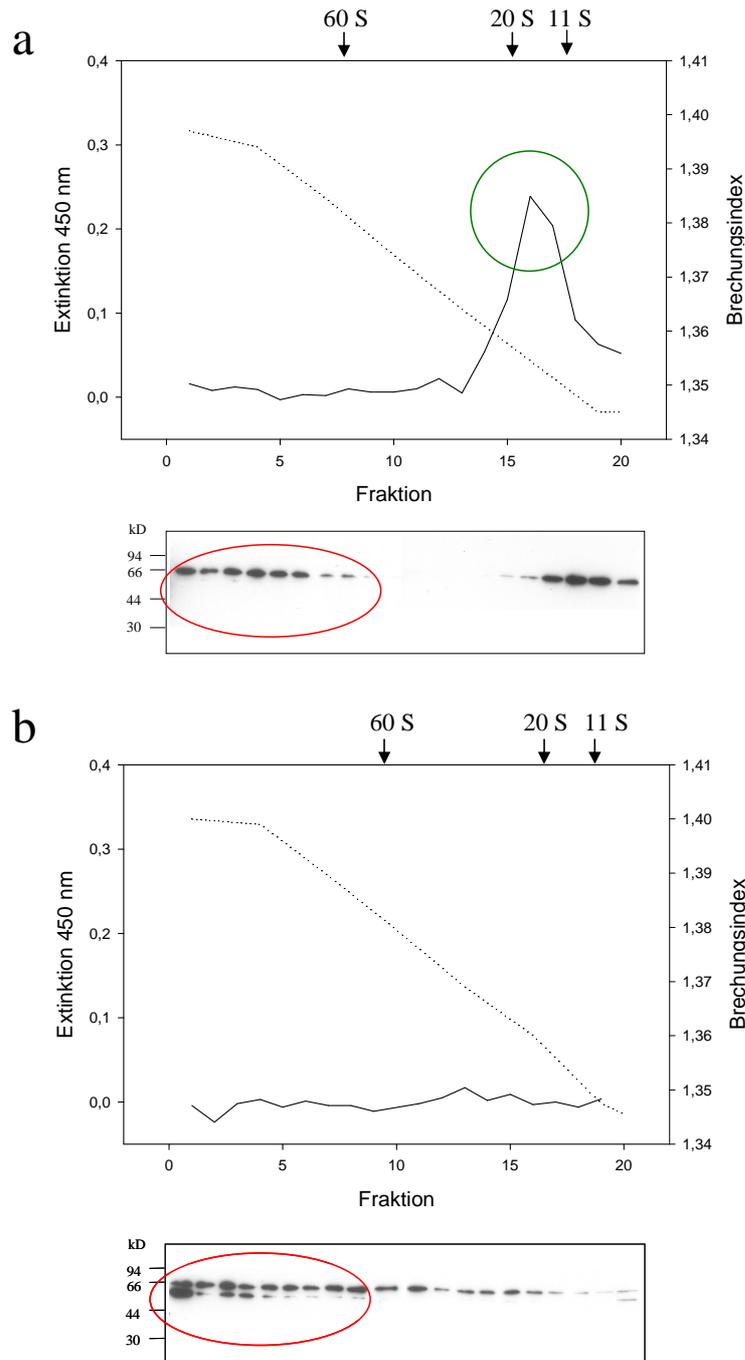


Abb. 3.25: Sedimentationsanalyse des L1h/E7-Fusionsproteins. Transient transfizierte 293T-Zellen wurden gemäß Abb. 3.19 untersucht. Die Zellen wurden durch Ultraschall (a) und Frier/Tau-Lyse (b) aufgeschlossen. Als Sedimentationsmarker dienten Katalase (11 S), Thyroglobulin (20 S) und leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (60 S, Wistuba *et al.*, 1995). Es wurde Hinweise auf Kapsomere (grün markiert) und auf Aggregate, die durch konformationsspezifische Antikörper nicht nachgewiesen werden (rot markiert), gefunden.

Die Kernlokalisierung des Fusionsproteins beeinflusst dagegen offensichtlich das Komplexbildungsverhalten des Proteins. Nach Expression des kernlokalisierten Fusionsproteins

konnten sowohl nach Extraktion durch Ultraschallbehandlung als auch durch Frier/Tau-Lyse im „capture“-ELISA zwei charakteristische Signale beobachtet werden (Abb. 3.26a und b).

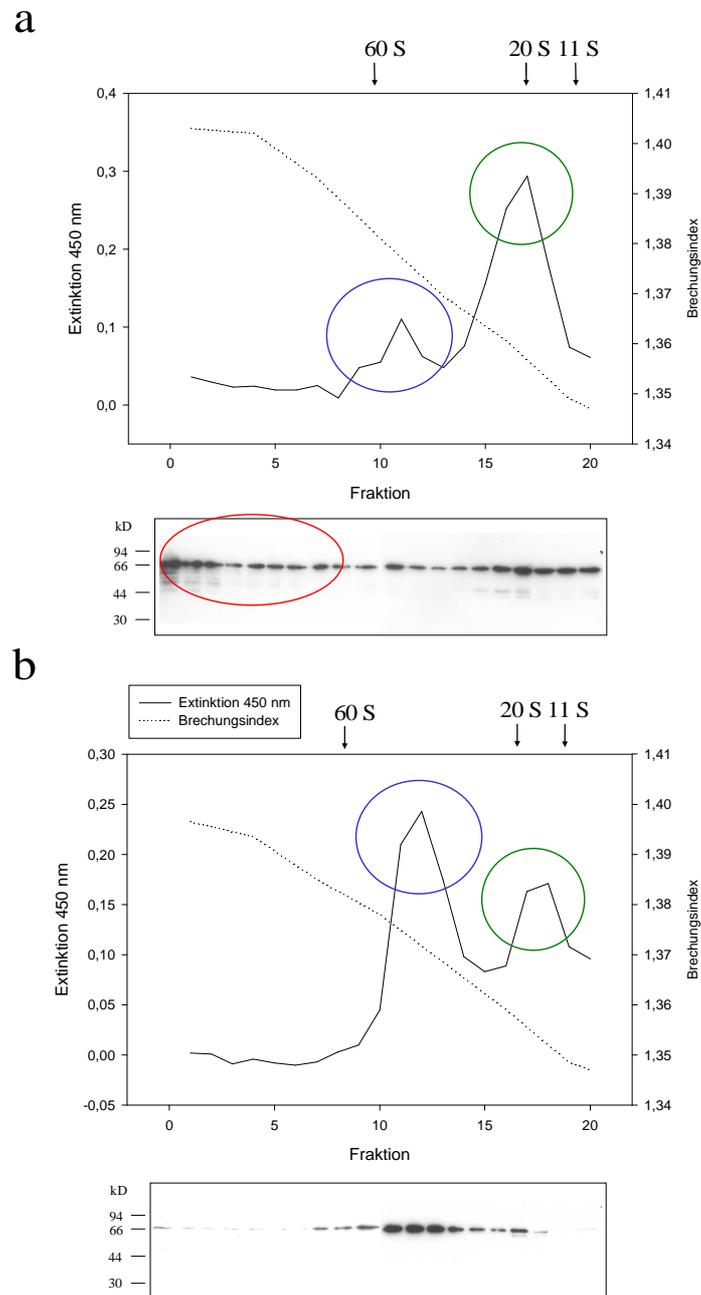


Abb. 3.26: Sedimentationsanalyse des kernlokalisierten L1h/E7-Fusionsproteins. Transient transfizierte 293T-Zellen wurden gemäß Abb. 3.19 untersucht. Die Zellen wurden durch Ultraschall (a) und Frier/Tau-Lyse (b) aufgeschlossen. Als Sedimentationsmarker dienen Katalase (11 S), Thyroglobulin (20 S) und leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (60 S, Wistuba *et al.*, 1995). Es wurden Hinweise auf Kapsomere (grün markiert), auf zusätzliche Aggregate (rot markiert) und auf mögliche Kapsidbildungsintermediate oder –nebenprodukte (blau markiert) gefunden.

Das erste Signal liegt zwischen 11 S und 20 S und liefert damit Hinweise auf Kapsomere (Abb. 3.26a und b, grün markiert). Das zweite Signal stammt von Komplexen mit einem Sedimentationskoeffizienten von 40 - 50 S (Abb. 3.26a und b, blau markiert). Dieses Material wird von dem konformationsspezifischen Antikörper erkannt. Es handelt sich möglicherweise um Kapsidbildungsintermediate oder –nebenprodukte, die auch nach Überexpression von L1 beobachtet wurden (Abb 3.23).

Es fällt auf, dass die Relation der beiden Signale abhängig von der Extraktionsmethode abweicht. Nach Ultraschallbehandlung ist der Anteil des Signals bei 11 - 20 S in Relation zum Signal bei 40 - 50 S größer, während sich nach Frier-Tau-Lyse ein umgekehrtes Bild ergibt.

Diese Beobachtung deutet auf eine selektive Freisetzbarkeit der unterschiedlichen Komplexe vor allem durch die Frier-Tau-Lyse oder auf eine Beeinflussung der Komplexe durch Ultraschall hin.

Die Immunblot-Analyse der Gradientenfractionen bestätigte die im ELISA beobachteten Verteilungen. Zusätzlich wurden hier nach Ultraschallbehandlung - wie schon beim unmodifizierten Fusionsproteinaggregate > 60 S nachgewiesen (Abb. 3.26a, rot markiert), die der konformationsspezifische Antikörper im „capture“-ELISA nicht erkannte.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Fraktionen lieferte keine Hinweise auf kapsidartige Strukturen (Daten nicht gezeigt).

3.2.5.3. Einfluss des E7-Anteils auf das Kapsidbildungsverhalten

Der Einfluss des E7-Anteils auf das Kapsidbildungsverhalten sollte untersucht werden. Die beobachteten Aggregate > 60 S (Abb. 3.25a und b, Abb. 3.26a, rot markiert) verdienen weitere Beachtung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie sich aufgrund des E7-Anteils bilden. Es ist möglich, dass das Oligomerisierungspotential von E7 (Clements *et al.*, 2000; Glastetter, 1997) trotz der Verkürzung zumindest noch teilweise vorhanden ist. Denkbar sind daneben auch Wechselwirkungen zu zellulären Proteinen (Smotkin und Wettstein, 1987; Münger *et al.*, 2001), die unter diesen Bedingungen zu großen Aggregaten führen könnten.

Es wurde zum Vergleich ein Fusionsprotein untersucht, das einen auf die ersten 40 Aminosäuren reduzierten E7-Anteil enthält (Abb. 3.27).

Der Aufbau des verkürzten Fusionsproteins gleicht dem Aufbau des kernlokalisierten Fusionsproteins (Abb. 3.16). Lediglich der E7-Anteil ist in diesem Fusionsprotein C-terminal um 20 Aminosäuren verkürzt. Die Expression erfolgte wie bei den anderen Fusionsgenen mit dem Expressionsplasmid pUF3 (Plasmid zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Martin Müller

(DKFZ)). Die Sedimentationsanalyse des verkürzten Fusionsproteins zeigte, dass der Anteil der Aggregate $> 60 S$ im Vergleich zum unverkürzten Fusionsprotein L1h/E7-NLS signifikant abnimmt (Abb. 3.28, rote Markierung). Gleichzeitig nimmt der Anteil an Komplexen zu, die im Bereich von Kapsomeren sedimentierten (Abb. 3.28, grüne Markierung). Untersuchungen im „capture“-ELISA bestätigten diese Beobachtung (Daten nicht gezeigt).

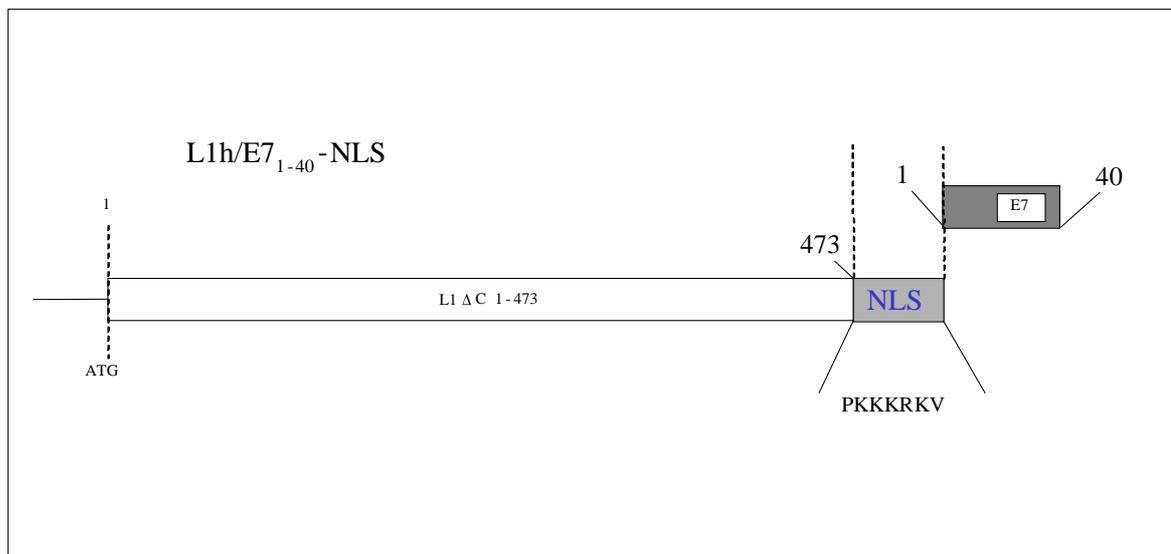


Abb. 3.27: Aufbau des verkürzten Fusionsproteins.

Das Genprodukt gleicht dem Konstrukt aus Abb. 3.16. Lediglich der E7-Anteil ist auf die ersten 40 Aminosäuren verkürzt. Das verkürzte L1h/E7 wurde ebenfalls mit dem Expressionsplasmid pUF3 exprimiert.

Daraus lässt sich schließen, dass die Aminosäuren 41-60 des E7-Anteils möglicherweise an der Ausbildung der Aggregate beteiligt sind und dass die Abnahme von Kapsomeren mit der Aggregatbildung korreliert. Die Aggregatbildung des Fusionsproteins konkurriert offenbar mit der Ausbildung von bekannten immunogenen Strukturen.

Die gezielte Verhinderung der Aggregat-Bildung könnte deshalb die Immunogenität der Fusionsgene steigern. Mit dem Ziel, die Aggregatbildung der Fusionsproteine aufzuklären und dann gegebenenfalls beeinflussen zu können, wurde untersucht, ob die Aggregate unter reduzierenden Bedingungen aufgelöst werden können. Der Zellaufschluss wurde dazu in Anwesenheit von 100 mM Dithiotreitol (DTT) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall der Anteil an Aggregaten $> 60 S$ signifikant abnimmt (Abb. 3.29). Es wurde dabei sichergestellt, dass etwa gleiche Proteinmengen für die parallel durchgeführten Sedimentationsanalysen eingesetzt wurden (Abb. 3.29 rechts). Das bedeutet, dass die Aggregate in Gegenwart eines reduzierenden Agens instabil werden. Es sind möglicherweise also irreguläre Cystein-Brücken an der Aggregat-Bildung beteiligt.

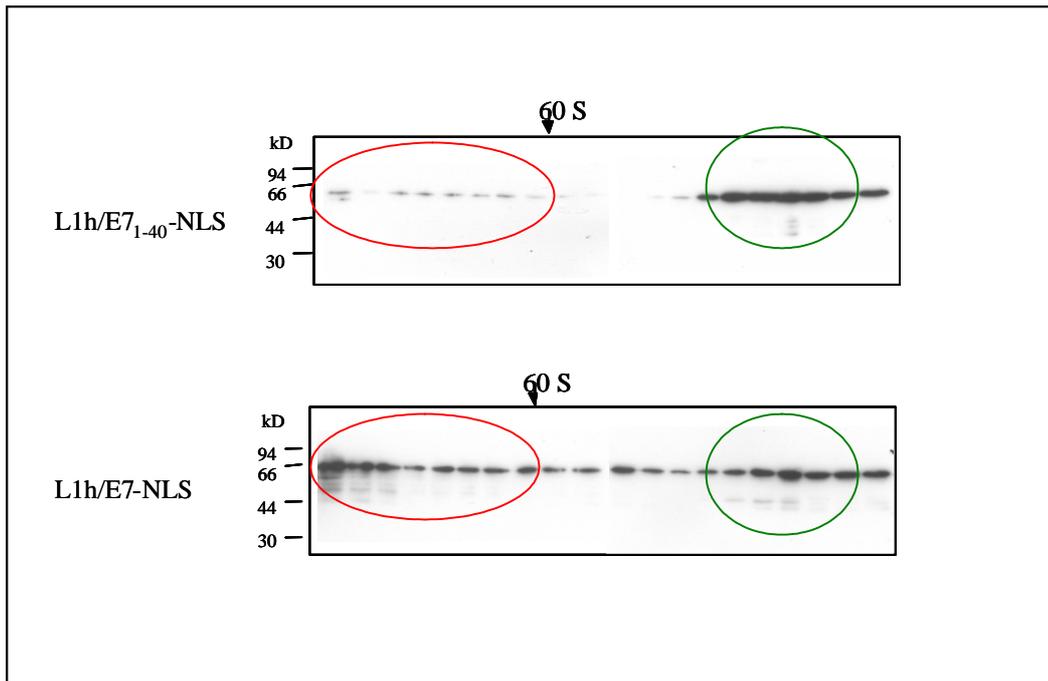


Abb. 3.28: Sedimentationsanalyse des verkürzten Fusionsproteins. Transient transfizierte 293T-Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden gemäß Abb. 3.19 in einer Sedimentationsanalyse untersucht. Aliquots der Gradientenfractionen wurden im Immunblot-Verfahren mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 analysiert. Als Sedimentationsmarker für 60 S dienen leere Kapside des adenoassoziierten Virus 2 (Wistuba *et al.*, 1995).

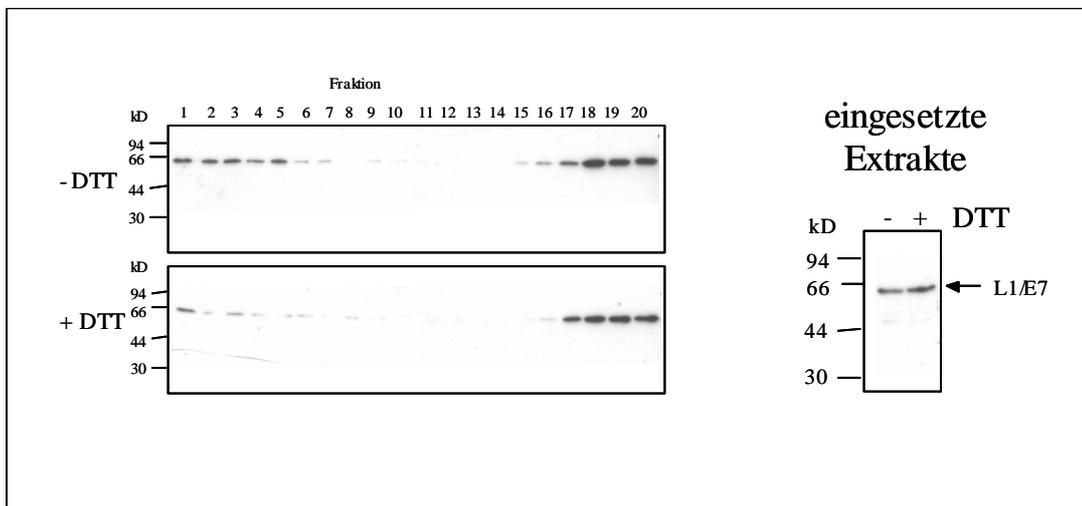


Abb. 3.29 : Einfluss von DTT auf die Fusionsprotein-Aggregate. Mit L1/E7 transient transfizierte 293T-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 100 mM DTT durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellextrakte wurden einer Sedimentationsanalyse gemäß Abb. 3.19 unterzogen. Die Zuckerlösung des Gradienten enthielt ausserdem 10 mM DTT im Aliquots der Gradientenfractionen wurden im Immunblot-Verfahren mit dem L1-spezifischen Antikörper CamVir-1 untersucht.

3.2.6. DNA-Immunisierung mit den L1h/E7 Fusionsgenen

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit war, ein prophylaktisches und therapeutisches Immunisierungsmittel gegen HPV-16 zu entwickeln. Es sollte getestet werden, ob sich eine DNA-Immunisierung mit den Fusionsgenen eignet, dieses Ziel zu erreichen. Den Versuchsmäusen wurden dazu zweimal innerhalb von 4 Wochen jeweils 50 µg Plasmid-DNA der Expressionsplasmide für L1h/E7 (pL1h/E7) und L1h/E7-NLS (pL1h/E7-NLS) (siehe Anhang) pro Hinterbeinmuskeln appliziert (Abb. 3.30). Nach weiteren vier Wochen wurden die Mäuse getötet. Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen, um im Serum die kapsidspezifischen Antikörpertiter zu bestimmen. Ausserdem wurden die Milzen entnommen und die Milzzellen vereinzelt. Die Milzzellkulturen wurden mit bestrahlten E7-exprimierenden Zellen und Milzzellen unbehandelter Mäuse stimuliert. Diese stimulierten Milzzellkulturen wurden dann auf Anwesenheit von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (ZTL) getestet.

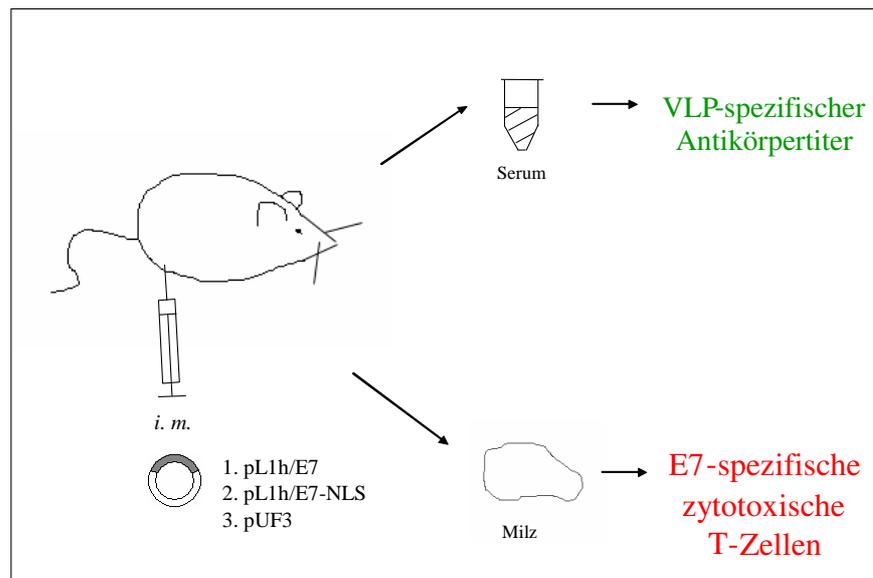


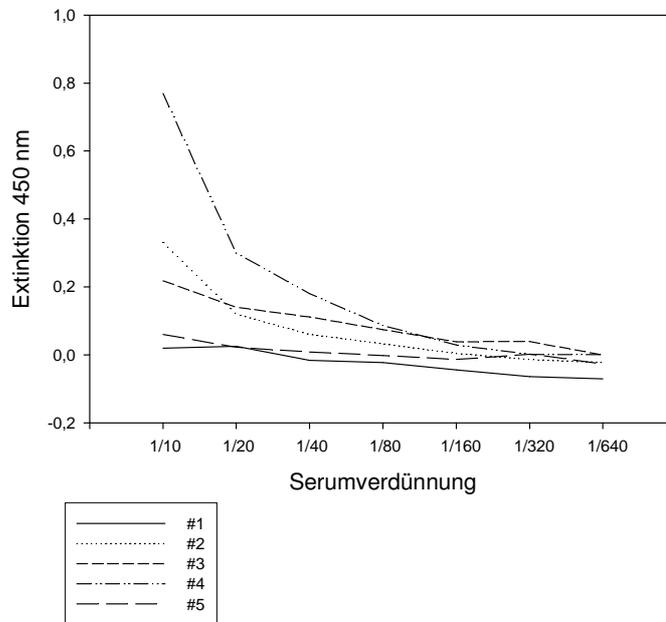
Abb. 3.30: Tierexperimente zur prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung. Die Expressionsplasmide wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen *i. m.* in die mit Cardio-toxin vorbehandelten Hinterbeinmuskeln appliziert. Nach weiteren 4 Wochen wurden das Blut zur Analyse der induzierten VLP-spezifischen Antikörper und die Milz zur Detektion E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen entnommen.

3.2.6.1. Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort wurde durch Quantifizierung der kapsidspezifischen Antikörpertiter gemessen. Der Antikörpertiter wurde im ELISA-Verfahren detektiert. In diesem Verfahren wird eine Mikrotiterplatte mit gereinigten virusartigen Partikeln

beschichtet. Die Blutseren werden dann in den Vertiefungen geeignet verdünnt. Das detektierte Farbstoffsignal ist abhängig von der Menge der an die VLPs gebundenen Antikörper.

a



b

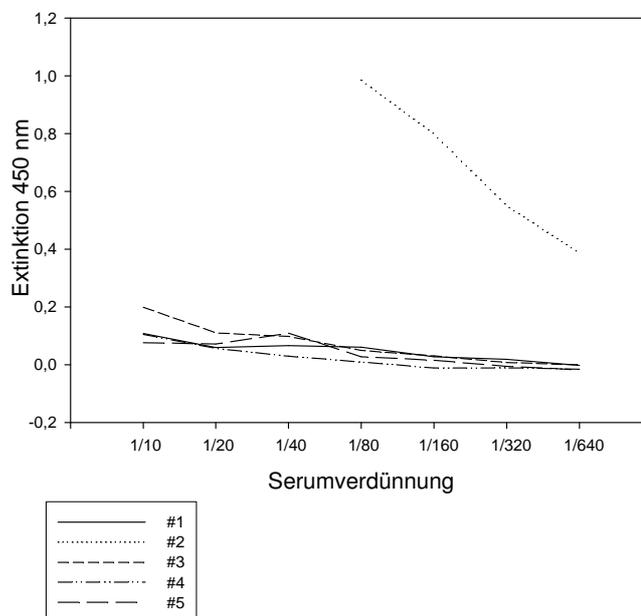


Abb. 3.31: Induktion von L1-spezifischen Antikörpern durch DNA-Immunisierung mit den Fusionsgenen.

Die Antikörpertiter wurden im HPV-16 VLP-spezifischen ELISA detektiert.

(a) Seren von 5 mit pL1h/E7 immunisierten Mäusen

(b) Seren von 5 mit pL1h/E7-NLS immunisierten Mäusen

Während keines der mit dem Expressionsplasmid pUF3 immunisierten Kontrolltiere VLP-spezifische Antikörper entwickelte (Tab. 3), erreichte das ELISA-Signal bei einem von insgesamt zehn Tieren (zwei Immunisierungen mit je 5 Tieren), die mit dem unmodifizierten Fusionsgen (pL1h/E7) immunisiert wurden, Werte oberhalb des Hintergrundes. Abb. 3.31a zeigt exemplarisch die ELISA-Signale der zweiten Immunisierung mit dem unmodifizierten Fusionsgen.

Im Gegensatz dazu reagierten insgesamt drei von zehn mit pL1h/E7-NLS immunisierten Tiere (ebenfalls zwei Immunisierungen mit je 5 Tieren) im VLP-ELISA (Tab. 3). Abb. 3.31b zeigt exemplarisch die Gruppe von 5 Tieren der zweiten Immunisierung. Der mittlere VLP-spezifische Antikörpertiter der positiven Tiere lag um ca. einen Faktor 50 höher als im einzigen positiven Fall nach Immunisierung mit dem unmodifizierten Fusionsgen (Tab. 3).

Die Experimente ergaben demnach, dass die Kernlokalisierung des Fusionsproteins mit einer Erhöhung der humoralen Immunantwort gegen HPV-16 Kapside korreliert.

Tabelle 3: Humorale Immunantwort nach DNA-Immunisierung

Konstrukt	positive Mäuse ^a	Antikörpertiter ^b
Kontrolle	0/5 ; 0/5	-
pL1h/E7	0/5 ; 1/5	1 : 80
pL1h/E7-NLS	2/5 ; 1/5	1 : 4400

^a im VLP-ELISA positive Mäuse / Anzahl der Mäuse pro Gruppe

^b mittlerer Antikörpertiter im VLP-ELISA positiver Blutseren

3.2.6.2. Zelluläre Immunantwort

HPV-16 E7 hat in zurückliegenden Arbeiten in DNA-Immunisierungen bisher nur eine schwache Immunogenität gezeigt (Shi *et al.*, 1999; Smahel *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 2002a). Erst die Fusion mit Proteinexportsignalen und die Erhöhung der E7-Proteinkonzentration („steady-state level“) führten zu starken E7-spezifischen T-Zellantworten nach DNA-Immunisierung (Hung *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2002a). Ein L1/E7-Fusionsgen auf Basis des originalen L1-Leserahmens war in der DNA-Immunisierung nur sehr schwach immunogen

(Smahel *et al.*, 2001). Die Hypothese war deshalb, dass die Kombination von E7-Anteilen mit dem kodonveränderten L1-Leserahmen die Aktivierung von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen aus zwei Gründen entscheidend verbessert: Einerseits könnte mit diesem System eine größere Menge des Antigens bereitgestellt werden und andererseits könnten ausserdem immunogene oder potentiell immunogene Komplexe, entstanden durch Komplexbildung des Fusionsproteins (Kapitel 3.2.5.2.), die Immunogenität steigern.

Die zelluläre Immunantwort gegen E7 nach DNA-Immunisierung wurde mit zwei verschiedenen Methoden gemessen (Abb. 3.32). Im ELISPOT-Verfahren wird ausgenutzt, dass aktivierte zytotoxische T-Zellen das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ sezernieren. Die T-Zellen werden auf einer mit einem anti- $\text{IFN}\gamma$ -Antikörper beschichteten Membran kultiviert und mit dem H-2D^b-spezifischen E7-Peptid (Feltkamp *et al.*, 1993) aktiviert. Als Kontrollen dienen unstimulierte und durch ein Mitogen stimulierte Anteile der T-Zellkultur. Das freigesetzte, von dem Antikörper gebundene $\text{IFN}\gamma$ wird in einer Farbstoffreaktion nachgewiesen, die punktartige Verfärbungen auf der Membran hinterlässt. Die punktartigen Verfärbungen werden ausgezählt und gegen die Kontrollen quantifiziert.

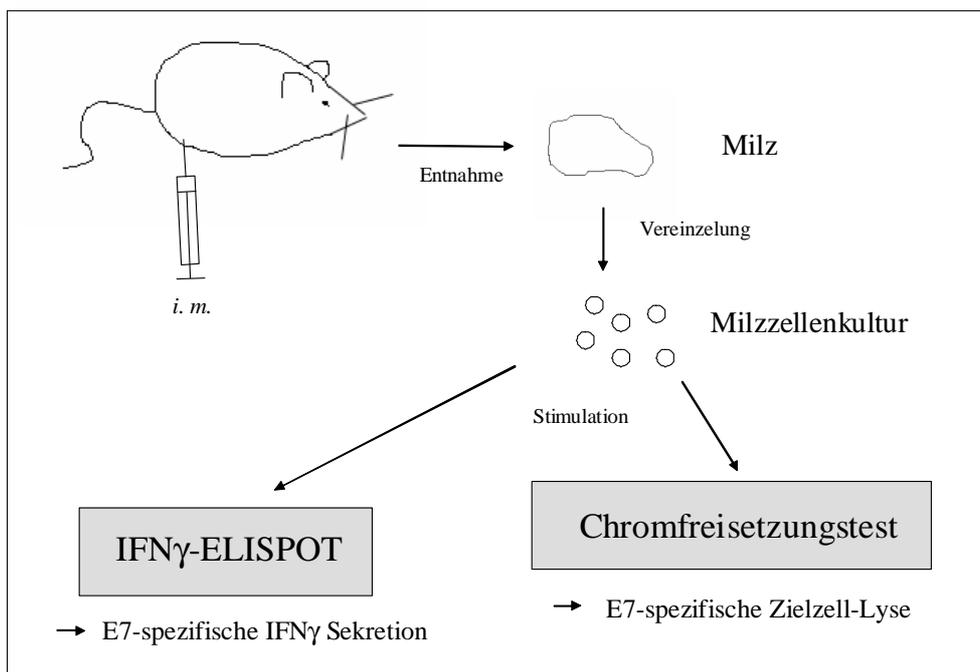


Abb. 3.32: Messung der zellulären Immunantwort.

Nach der Entnahme der Milz und der Vereinzlung der Milzzellen wurden die Milzzellkulturen zunächst mit inaktivierten E7-exprimierenden Zellen und Milzzellen stimuliert. Anteile der Milzzellkulturen wurden dann in der ELISPOT-Analyse und im Chromfreisetzungstest auf die Anwesenheit von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen untersucht. Während die ELISPOT-Analyse lediglich die $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach Antigenstimulation detektiert, wird im Chromfreisetzungstest die Lyse von antigenexprimierenden Zielzellen gemessen.

Im Chromfreisetzungstest wird die spezifische Lyse von E7-exprimierenden Zielzellen (RMA-E7) durch aktivierte zytotoxische T-Zellen gemessen. Die E7-exprimierenden Zielzellen werden dazu mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ beladen und zusammen mit den aktivierten T-Zellen inkubiert. Die Freisetzung des radioaktiven Chroms aus apoptotischen Zielzellen korreliert mit der antigen-spezifischen Aktivität der zytotoxischen T-Zellen. Als Kontrolle dienen Zielzellen, die kein E7 exprimieren (RMA).

Die ELISPOT-Analyse (Abb. 3.33; Tabelle 4) und der Chromfreisetzungstest (Abb. 3.34; Tabelle 5) ergaben für beide Konstrukte nach DNA-Immunisierung eine E7-spezifische T-Zellantwort, die allerdings nicht in allen Tieren einer Gruppe ausgelöst wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Konstrukten kann aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden. Das bedeutet, dass die Kernlokalisierung des Fusionsproteins zwar die humorale Immunantwort gegen Kapside verstärkt, nicht aber zu einer Steigerung der zellulären Immunantwort führt. Es ist bemerkenswert, dass in der $\text{IFN}\gamma$ -ELISPOT-Analyse in beiden Fällen mehr Tiere positiv waren als im Chromfreisetzungstest. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass auch das unmodifizierte Fusionsgen auf Basis des kodonveränderten L1-Leserahmens in einer DNA-Immunisierung zu einer Induktion von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen führt.

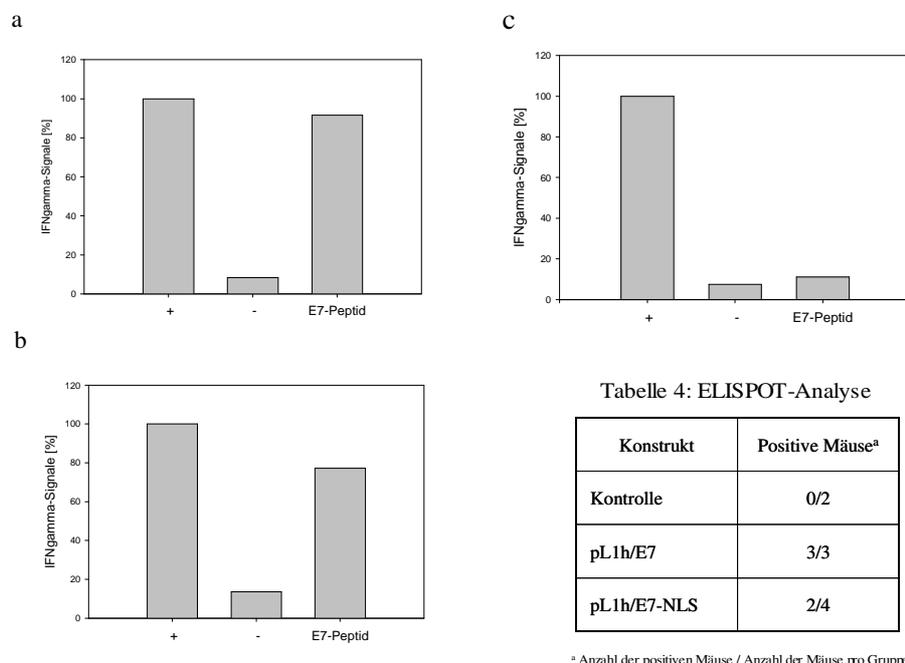


Abb. 3.33: DNA-Immunisierung mit den Fusionsgenen: ELISPOT-Analyse. Gezeigt sind die Ergebnisse der ELISPOT-Analyse von beispielhaften Tieren nach Immunisierung mit pL1h/E7 (a) und mit pL1h/E7-NLS (b) sowie mit dem Kontrollplasmid pUF3 (c). Tabelle 4 fasst die Gesamtergebnisse der Analyse zusammen. +, mitogen-stimulierte T-Zellkultur; -, unstimulierte T-Zellkultur; E7-Peptid, E7-spezifisch stimulierte T-Zellkultur

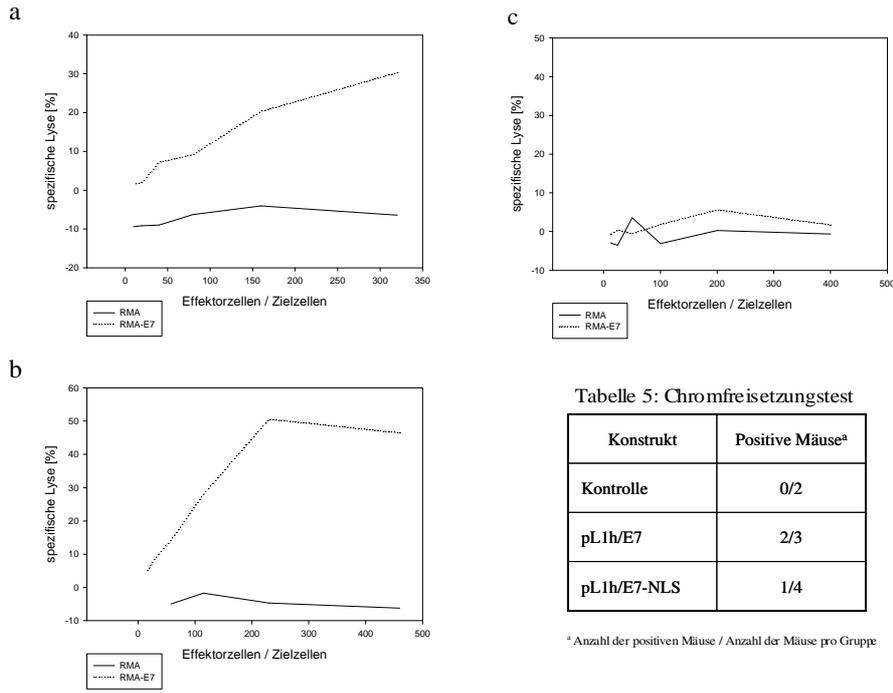


Tabelle 5: Chromfreisetzungstest

Konstrukt	Positive Mäuse ^a
Kontrolle	0/2
pL1h/E7	2/3
pL1h/E7-NLS	1/4

^a Anzahl der positiven Mäuse / Anzahl der Mäuse pro Gruppe

Abb. 3.34: DNA-Immunisierung mit den Fusionsgenen: Chromfreisetzungstest. Gezeigt sind die Ergebnisse des Chromfreisetzungstestes von beispielhaften Tieren nach Immunisierung mit pL1h/E7 (a) und mit pL1h/E7-NLS (b) sowie mit dem Kontrollplasmid pUF3 (c). RMA-E7, E7-exprimierende Zielzellen; RMA, Kontrollzellen. Tabelle 5 fasst die Gesamtergebnisse der Analyse zusammen.

Ausserdem kann festgestellt werden, dass das Auftreten einer zellulären Antwort nicht notwendigerweise mit der Induktion von kapsidspezifischen Antikörpern korrelierte. Umgekehrt zeigten jedoch Individuen mit einer kapsidspezifischen humoralen Immunantwort auch eine T-Zellantwort gegen E7.

4. Diskussion

4.1. Expressionssteigerung durch Kodonoptimierung

Die strikte Verknüpfung zwischen der Expression der sogenannten späten Papillomvirus-Gene (L1 und L2) und der terminalen epithelialen Differenzierung hat bisher nicht nur die Erforschung der Proteinfunktionen im viralen Vermehrungszyklus der Papillomviren weitgehend verhindert, sondern auch die Verwendung des späten Gens L1 in der DNA-Immunisierung stark eingeschränkt (Schreckenberger *et al.*, 2000; Dupuy *et al.*, 1999; Smahel *et al.*, 2001; Rocha-Zavaleta *et al.*, 2002).

Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, die HPV-16 L1-Expression zu steigern. Es wurden dazu zwei Leserahmen konstruiert, in denen die Kodonbenutzung in Richtung von Kodons, die besonders häufig in Säuger- bzw. Pflanzenzellen auftreten, verändert wurde.

Ein erster Schritt, um die Expression der späten Papillomvirus-Gene von der strikten Regulation zu entkoppeln, wurde bereits von Zhou *et al.* für BPV-1 L1 und L2 in einer zurückliegenden Arbeit getan, wobei sich in dieser Arbeit darauf konzentriert wurde, lediglich Kodons, die in menschlichen Genen sehr selten vorkommen, auszutauschen (Zhou *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression sich jedoch noch weiter steigern lässt. Interessanterweise lässt sich das pflanzenmodifizierte L1-Gen (L1p) ebenfalls in undifferenzierten Säugerzellen in höherem Maße exprimieren, obwohl es zum Teil die von Zhou *et al.* postulierten limitierenden Kodons enthält. Eine Erklärung sind mögliche Unterschiede zwischen der Regulation der BPV-1 und HPV-16 L1-Expression. Ausserdem könnte es sein, dass nur bestimmte Positionen im Leserahmen die Translation limitieren. Es wäre interessant, diese möglichen kritischen Kodons aufzuklären, um die Entregulierung der Kapsidgenexpression auf andere Papillomviren leichter übertragen zu können.

Die Verwendung von seltenen Kodons ist ein möglicher Weg zur Regulierung der Genexpression. Die Kodonbenutzung kann die heterologe Genexpression beeinflussen (Smith, 1996). Veränderungen der kodierenden Sequenzen in Richtung von im jeweiligen Organismus häufig vorkommenden Kodons begünstigen eine Erhöhung der Expression. Expressionssteigerungen durch Änderungen der Kodonbenutzungen wurden für verschiedene Gene in einigen zurückliegenden Arbeiten erfolgreich durchgeführt (Haas *et al.*, 1996; Zolotukhin *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997). Eine effiziente Expression, messbar durch die Elongationsrate, korreliert mit der Verwendung selektiver Kodons in einem bestimmten

Organismus (Holm, 1986). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass sich ein wesentlicher Anteil der in dieser Arbeit vorgestellten stark erhöhten Proteinexpression auf die Verbesserung der tRNA-Verfügbarkeit durch Anpassung der Kodonverwendung zurückführen lässt. Möglich sind daneben veränderte Sekundärstrukturen der Transkripte, die effizienter translatiert werden können.

Man geht heute aber ausserdem davon aus, dass die Expression der späten Papillomvirus-Gene nicht nur durch die Kodonbenutzung, sondern zusätzlich auf der posttranskriptionellen Ebene durch sogenannte negativregulatorische RNA-Elemente (NRE) auf differenzierte Keratinozyten beschränkt wird. Es sind Hinweise auf negativregulatorische Elemente sowohl in der untranslatierten 3'-Region (UTR) (Kennedy *et al.*, 1990; Dietrich-Goetz *et al.*, 1997) als auch in der kodierenden Region (Tan *et al.*, 1995; Schwartz, 1998; Collier *et al.*, 2002) gefunden wurden. Die negativregulatorischen Elemente regulieren die Genexpression, indem sie möglicherweise den mRNA-Export oder die mRNA-Stabilität beeinflussen (Kennedy *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1995). Ausserdem ist bekannt, dass die negativregulatorischen Elemente mit zellulären Faktoren interagieren (Dietrich-Goetz *et al.*, 1997; Koffa *et al.*, 2000).

Der hohe Modifikationsgrad (78,8 % für L1h und 51,5 % für L1p) in den vorgestellten kodonveränderten L1-Leserahmen führt höchstwahrscheinlich dazu, dass sämtliche bekannte und unbekannte negativregulatorische Elemente inaktiviert werden. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Leserahmenveränderungen tatsächlich auch die posttranskriptionellen, translationsunabhängigen Regulationen kompensieren. Dazu wurden bicistronische Konstrukte analysiert, die „stromabwärts“ der verschiedenen L1-Gene eine Expressionskassette für *gfp* enthielten. Das *gfp*-Gen wurde unter die Kontrolle einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) gestellt. In diesen Konstrukten sollte die Translation der L1-Gene unabhängig von der GFP-Translation sein. Auf der anderen Seite sollten translationsunabhängige Effekte der L1-Sequenzen wie der Einfluss auf den RNA-Export, die RNA-Stabilität und die RNA-Prozessierung auch die GFP-Expression beeinflussen, da sie aus derselben mRNA hervorgeht. Der Vergleich zwischen dem „humanisierten“ und dem originalen L1-Leserahmen zeigte eine ca. sechs- bis siebenfache Steigerung der GFP-Expression nach Verwendung des „humanisierten“ Leserahmens. Das bedeutet, dass sich die um mehrere Größenordnungen verbesserte Proteinexpression des „humanisierten“ L1-Leserahmens nur zu einem kleinen Teil durch translationsunabhängige Effekte erklären lässt.

Daneben wurde beobachtet, dass die GFP-Expression signifikant gesenkt wird, wenn der originale L1-Leserahmen *in cis* positioniert und mit einem Gen, das nicht aus HPV

stammte, verglichen wurde. Diese Ergebnisse bestätigten die in früheren Arbeiten vorgeschlagenen Effekte von L1ori auf mRNA-Stabilität und mRNA-Transport (Kennedy *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1995). Tan *et al.* hatten insbesondere gezeigt, dass die Anwesenheit der kodierenden Sequenz von HPV-16 L1 den Gehalt der jeweiligen mRNA reduzierte (Tan *et al.*, 1995). Die Verwendung des pflanzenoptimierten L1-Leserahmens zeigte, dass auch die in L1p vorgenommenen Sequenzveränderungen die negativregulatorischen Effekte des originalen Leserahmens neutralisierten.

Die Ergebnisse untermauern also, dass die umfangreichen Sequenzveränderungen vor allem die Translation direkt verbessern. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ausserdem bisher unbekannte negativregulatorische Sequenzen, die die Translation unabhängig von der tRNA-Verfügbarkeit direkt beeinflussen, eliminiert wurden. Denkbar sind z. B. Sequenzen, die eventuell durch Bindung von inhibitorischen Proteinen zu einer vorzeitigen Termination der Translation führen. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings, dass es gelungen ist, HPV-16 bzw. BPV-1 L1 mit Hilfe von Vaccinia- und Semliki-Forest-Viren in Säugerzellen zu exprimieren (Heino *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1993). Beide Systeme generieren ihre mRNAs direkt im Zytosol und umgehen damit den Kernexport. Die geschilderte mögliche direkte Beeinflussung der Translation müsste dagegen auch in diesen Fällen ablaufen, wobei bedacht werden muss, dass die Infektion mit Vaccinia- oder Semliki-Forest-Viren möglicherweise zelluläre Faktoren beeinflusst.

Die gezielte Ausschaltung von negativregulatorischen Elementen und damit verbunden die Entregulierung der HPV-16 L1-Expression wurde kürzlich von Collier *et al.* durch gezielte Veränderung der DNA-Sequenz des 5'-Endes der kodierenden Region von HPV-16 L1 bestätigt (Collier *et al.*, 2002).

4.2. Intrazelluläre VLP-Bildung

Rekombinante Expression von HPV-16 L1 mit Vacciniaviren, Bakuloviren oder Hefen führt zur Bildung von sogenannten virusartigen Partikeln, die aus 72 Kapsomeren mit je 5 L1-Monomeren bestehen und die strukturell den nativen Virionen sehr ähnlich sind (Zhou *et al.*, 1991a; Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993; Sasagawa *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die entregulierte und gesteigerte HPV-16 L1 Expression durch den „humanisierten“ Leserahmen in undifferenzierten menschlichen Zellen zur intrazellulären Anhäufung von virusartigen Partikeln führt.

Die virusartigen Partikel konnten durch Elektronenmikroskopie *in situ* und in der Sedimentationsanalyse von Zellextrakten transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Es wurden Hinweise gefunden, dass die virusartigen Partikel im Zellkern akkumulieren. Die Sedimentationsanalyse lieferte neben den virusartigen Partikeln auch noch Hinweise auf freie Kapsomere und darüber hinaus auf andere L1-Komplexe, deren Sedimentationseigenschaften darauf hindeuten, dass diese kleiner als virusartige Partikel sind. Die Komplexe präsentieren kapsid- oder kapsomerspezifische konformative Epitope, was durch die Reaktion mit konformations-spezifischen Antikörpern belegt wird. Es ist verlockend zu spekulieren, dass es sich bei diesen Komplexen um bisher noch nicht beschriebene Kapsidbildungsintermediate handelt. Möglich ist auch, dass es sich um Kapsidbildungsnebenprodukte handelt, die aufgrund der Überexpression des L1-Proteins artifiziell entstehen. Kapsidbildungsintermediate sind für Papillomviren bisher nicht bekannt. Erste Hinweise, dass die Strukturproteine das Potential dazu haben, fanden Florin *et al.*, als sie beobachteten, dass eine zytosolisch lokalisierte L1-Mutante, die keine Kapside bilden konnte, mit L2 im Zytosol komplexiert und in den Kern wandert (Florin *et al.*, 2002). Dagegen sind für die verwandten Polyomaviren schon früh Kapsidbildungsintermediate beobachtet und charakterisiert worden (Yuen und Consigli, 1985).

Kapsidbildungsnebenprodukte sind in der Literatur als irregulär kleine Kapside nach Überexpression von HPV-16 L1 beschrieben worden (Zhou *et al.*, 1991a; Sasagawa *et al.*, 1995). Auch *in situ* wurden in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf Kapsidbildungsalternativen gefunden. Es wurden kernlokalisierte tubuläre Strukturen in transfizierten 911-Zellen beobachtet. In der Literatur sind ähnliche Kapsidbildungsalternativen nach Expression von HPV-16-L1 mit Hilfe rekombinanter Bakuloviren in Insektenzellen (Kirnbauer *et al.*, 1993) und nach Koexpression von HPV-6-L1 und L2 in Hefen (Sasagawa *et al.*, 1995) beschrieben worden. Solche tubulären Strukturen sind im übrigen nicht nur nach Überexpression, sondern auch in frühen Arbeiten nach Reinigung von Papillomviren aus infizierten Geweben beobachtet worden (Finch und Klug, 1965; Kiselev und Klug, 1969).

Die Resultate aus den Transfektionsexperimenten *in vitro* können als Fortschritt betrachtet werden. Virusartige Partikel wurden in Säugerzellen bisher nur durch Überexpression der Strukturproteine mit Virussytemen, die ihre mRNAs im Zytosol generieren, beobachtet (Zhou *et al.*, 1991a; Hagensee *et al.*, 1993; Heino *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite haben sich virusartige Partikel als sehr immunogen erwiesen (Kirnbauer *et al.*, 1992). Tatsächlich werden gegenwärtig virusartige Partikel als Vakzine entwickelt (Schiller, 1999;

Schiller und Lowy, 2000). Eine erste klinische Erprobung von HPV-16 VLPs wurde kürzlich erfolgreich abgeschlossen (Koutsky *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression kann in Zukunft also eine genauere Betrachtung des Kapsidbildungsprozesses von HPV-16 ermöglichen und darüber hinaus die Viruspropagation und die Untersuchung der Proteinfunktionen im viralen Vermehrungszyklus erleichtern, zumal das Kodonoptimierungskonzept auf das zweite Strukturprotein HPV-16 L2 erweitert werden konnte (Leder *et al.*, 2001). Denkbar ist neben diesen virologischen Fortschritten aber auch eine Verbesserung der VLP-Produktion zur Vakzinherstellung.

4.3. Protektive DNA-Immunisierung

Als Alternative zur relativ teuren VLP-basierten Vakzinierung, die kostenintensive Produktions- und Reinigungsprotokolle benötigt, bietet sich eine simple DNA-Immunisierung an. Die Immunisierung mit antigenkodierender Plasmid-DNA hat sich in zurückliegenden Arbeiten als effizienter Ansatz zur Erzeugung von protektiven Immunantworten gegen virale (Chen *et al.*, 1999), parasitäre (Nielsen *et al.*, 1999) und bakterielle (Fensterle *et al.*, 1999) Pathogene erwiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das kodonveränderte, „humanisierte“ L1-Gen eine stark erhöhte Immunogenität – verglichen mit dem originalen L1-Gen - *in vivo* nach DNA-Immunisierung besitzt. Die Resultate zeigen, dass das „humanisierte“ L1-Gen hohe Titer von VLP-spezifischen Antikörpern erzeugt. Es ist wichtig zu bemerken, dass die Basis des ELISA-Verfahrens zur Titerbestimmung HPV-16-virusartige Partikel sind. Zurückliegende Arbeiten haben gezeigt, dass virusartige Partikel erfolgreich als Basis für ELISA-Verfahren zur Detektion typenspezifischer und kreuzreaktiver Antikörper gegen humane Papillomviren in Seren von HPV-DNA positiven Patienten eingesetzt werden können (Kirnbauer *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1994). Aufgrund der in früheren Arbeiten festgestellten morphologischen Ähnlichkeiten zwischen nativen Virionen und virusartigen Partikeln (Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1993) kann von der VLP-Spezifität höchstwahrscheinlich auf eine Kapsidspezifität der Antikörper geschlossen werden. Ein geeigneter Test auf kapsidneutralisierende Antikörper stand aber aufgrund der oben erwähnten Schwierigkeiten bei der Herstellung von Papillomvirusvirionen oder – pseudovirionen nicht zur Verfügung. Frühere Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass die

Immunantwort gegen virusartige Partikel zu typenspezifischen neutralisierenden Antikörpern führt (Roden *et al.*, 1996).

Weiterhin konnte eine - wenn auch schwache - VLP-spezifische Antikörperantwort nach Verwendung des originalen L1-Gens detektiert werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass *in vivo* aber nicht *in vitro* unter bestimmten Umständen eine signifikante Expression des originalen L1-Leserahmens auftreten kann. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit zurückliegenden Arbeiten, die nach DNA-Immunisierung mit dem originalen HPV-16 L1-Gen wenn auch schwache Antikörperantworten gemessen haben (Dupuy *et al.*, 1999; Rocha-Zavaleta *et al.*, 2002). Interessant ist, dass im Gegensatz dazu in drei unabhängigen Studien berichtet wurde, dass höhere Papillomvirus-L1-spezifische Antikörpertiter durch DNA-Immunisierung induziert werden können. Matsumoto *et al.* konnten mit HPV-6 L1-DNA nach Administration durch die sogenannte „gene gun“ typenspezifische neutralisierende Antikörper erzeugen (Matsumoto *et al.*, 2000). In zwei weiteren Studien wurde mit CRPV-L1 DNA immunisiert. Sundaram *et al.* administrierten die DNA ebenfalls mit Hilfe von Goldpartikeln (Sundaram *et al.*, 1996), während Donnelly *et al.* die Plasmide in verschiedene Muskeln injizierten (Donnelly *et al.*, 1996). Die Gegensätze dieser drei Arbeiten zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die L1-Gene von CRPV und HPV-6 weniger strikt als HPV-16 L1 reguliert sein könnten. Ausserdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Abweichungen durch unterschiedliche Immunisierungsprotokolle ergeben.

Zusätzlich lässt sich sagen, dass das in dieser Arbeit vorgestellte Konzept zur Erhöhung der Immunogenität der späten Papillomvirus-Gene durch Änderung der Kodonbenutzung kürzlich für HPV-6b L1 und BPV-1 L2 bestätigt wurde (Liu *et al.*, 2002a).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgestellte VLP-spezifische DNA-Immunisierung mit einem kodonoptimierten HPV-16-L1-Gen berechtigterweise als mögliche Alternative zur VLP-Immunisierung im Hinblick auf eine prophylaktische Immunisierung gegen HPV-16-Infektionen in Betracht kommt.

4.4. Expression und Kapsidbildung des Fusionsproteins

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich ein Fusionsgen aus einer kodonveränderten, „humanisierten“ HPV-16 L1-Sequenz und den ersten 60 Kodons von HPV-16 E7 in undifferenzierten Zellen überexprimieren lässt. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage, ob die gezeigte starke Immunogenität von L1 in diesem Kontext erhalten

bleibt. Im Zusammenhang damit steht die Frage, ob das Fusionsprotein intrazellulär immunogene chimäre virusartige Partikel bildet. Transient transfizierte Zellen wurden sowohl *in situ* durch Elektronenmikroskopie als auch in der Sedimentationsanalyse von Zellextrakten untersucht. Beide Methoden lieferten jedoch keine Hinweise auf intrazellulär entstandene virusartige Partikel. Das steht im Widerspruch zu früheren Daten von Müller *et al.*, die gezeigt hatten, dass das Fusionsprotein zumindest nach Überexpression in Insektenzellen durch rekombinante Bakuloviren chimäre virusartige Partikel bildet (Müller *et al.*, 1997). Am Ende dieses Kapitels werden mögliche Gründe für diese unterschiedlichen Beobachtungen angeführt.

In der Sedimentationsanalyse konnten jedoch Hinweise gefunden werden, dass das überexprimierte Fusionsprotein chimäre Kapsomere – bestehend aus fünf Monomeren – ausbildet. Kapsomere werden momentan als alternative immunogene Strukturen diskutiert, die neutralisierende Antikörper (Rose *et al.*, 1998; Fligge *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001) und zytotoxische T-Zellen (Öhlschläger *et al.*, 2003) erzeugen können.

Es wurde die Hypothese untersucht, ob die Kernlokalisierung des Fusionsproteins zu einer Bildung von chimären virusartigen Partikeln führt. Es ist bekannt, dass in der späten Phase von Papovavirusinfektionen¹ die synthetisierten Strukturproteine in den Kern transportiert werden und dort zu Virionen reifen (Tooze, 1981). Die hier vorgestellten Experimente zeigten allerdings, dass auch die Kernlokalisierung des Fusionsproteins nicht zur Bildung von virusartigen Partikeln führt. Es konnte jedoch herausgearbeitet werden, dass sich der Komplexbildungsprozess nach Kernlokalisierung des Fusionsproteins verändert. In der Sedimentationsanalyse wurden nach Expression des kernlokalisierten Fusionsproteins Komplexe nachgewiesen, die nach Expression des unmodifizierten, zytosolisch lokalisierten Fusionsproteins nicht entstanden. Diese Komplexe präsentieren kapsomer- oder kapsidähnliche konformative Epitope und haben von virusartigen Partikeln deutlich unterscheidbare Sedimentationseigenschaften, die darauf hindeuten, dass diese Komplexe kleiner als virusartige Partikel sind. Es kann spekuliert werden, ob es sich bei diesen Komplexen um Aggregate aus Kapsomeren handelt oder ob es verkleinerte kapsidähnliche Strukturen sind. Solche verkleinerten Kapsidstrukturen sind in der Literatur für bestimmte L1-Mutanten beschrieben worden. Diese sogenannten „small“ VLPs sind als ikosaedrisches Gitter mit einer T=1 Symmetrie aufgebaut, bestehen aus 12 Kapsomeren und haben einen Durchmesser von ca. 30 nm (Chen *et al.*, 2000b). Der Sedimentationskoeffizient dieser

¹ Papillomviren und Polyomaviren wurden in der Vergangenheit aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zur Familie der Papovaviridae zusammengefasst. Heute werden beide in eigene Familien eingeteilt (van Regenmortel *et al.*, 2000).

Partikel ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Möglich ist ausserdem, dass es sich um Kapsidbildungsintermediate handelt. Das würde darauf hindeuten, dass der Kapsidbildungsprozess des Fusionsproteins nach Kernwanderung zwar fortgeschritten, aber weiterhin unvollständig ist. Es ist wichtig zu erwähnen, dass Komplexe mit vergleichbaren Sedimentationseigenschaften auch nach Überexpression von L1 in dieser Arbeit beobachtet wurden (siehe Abb. 3.23). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es hier einen Zusammenhang gibt. Kapsidbildungsintermediate sind für Papillomviren bisher nicht beschrieben worden, wohl aber für die ebenfalls zu den Papovaviren gehörenden Polyomaviren (Yuen und Consigli, 1985). Papillomvirkapside ähneln strukturell den Polyomaviruskapsiden. Polyomavirus-Kapside bestehen ebenfalls aus 72 Pentameren des Hauptstrukturproteins (Rayment *et al.*, 1982).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit ausserdem gezeigt werden, dass das Fusionsprotein zusätzlich Aggregate bildet, die keine vergleichbaren kapsid- oder kapsomerspezifischen konformativen Epitope präsentieren, sich also anscheinend strukturell von Kapsomeren und Kapsiden unterscheiden. Es wurde herausgearbeitet, dass sich diese Aggregate größtenteils aufgrund der Aminosäuren 41-60 des E7-Anteils bilden und dass sie unter reduzierenden Bedingungen instabil sind. Das deutet auf eine Beteiligung von Cystein-Resten hin. In diesem Bereich liegen zwei Cysteine auf Position 58 und 59 (Edmonds und Vousden, 1989). Es kann also spekuliert werden, dass diese Cystein-Reste möglicherweise zur irregulären Aggregation beitragen. Es ist bekannt, dass die Cystein-Reste des E7-Proteins im nativen Protein nicht zu Schwefelbrücken verknüpft sind, d. h. sie liegen in reduziertem Zustand vor (Roth *et al.*, 1992). Diese reduzierten Cysteinreste könnten mit L1 interagieren und zu einer inkorrekten Aggregation führen. Über den Zusammenhang zwischen den Cysteinen des E7 und einer möglichen Störung der Formierung chimärer virusartiger Partikel ist schon in einer früheren Arbeit spekuliert worden. Eine Verbesserung der VLP-Bildung nach Mutagenese der E7-Cysteine konnte allerdings nicht erreicht werden (Glastetter, 1997). Daneben ist denkbar, dass in dem E7-Anteil 1-60 ein Rest des Oligomerisierungs- bzw. Multimerisierungspotentials von E7 erhalten geblieben ist. Die möglichen Kapsidbildungsalternativen sind in Abb. 4.1 zusammengefasst.

Schon früh wurde vermutet, dass E7 in multimeren Komplexen mit sich und zellulären Proteinen vorliegt (Smotkin und Wettstein, 1987). Auch die beobachtete verminderte Freisetzbarkeit der Fusionsproteine durch Frier-Tau-Lyse lässt die Hypothese zu, dass es zu einer Komplexbildung des E7-Anteils möglicherweise mit zellulären Proteinen, z. B. mit F-Aktin (Münger *et al.*, 2001) (siehe Abb. 1.5), kommt. Dagegen spricht das Argument, dass die

beiden Zinkfinger-Motive in dem verwendeten E7-Anteil entfernt bzw. unterbrochen sind. Zahlreiche zelluläre Faktoren interagieren mit dem C-Terminus von E7 (siehe Abb. 1.5) und die Intaktheit der Zink-Finger-Motive hat sich für die Protein-Protein-Wechselwirkung zur Ausbildung von Oligomeren des E7 als notwendig erwiesen (McIntyre *et al.*, 1993).

Diese alternative Aggregation scheint aber dazu zu führen, dass der Anteil an potentiell immunogenen chimären Kapsomeren auf Kosten der Aggregate abnimmt. Eine Strategie zur Verhinderung dieser Aggregationsbildung, z. B. durch Mutagenese der Cysteine 58 und 59, wird deshalb möglicherweise die Immunogenität des Fusionsproteins erhöhen.

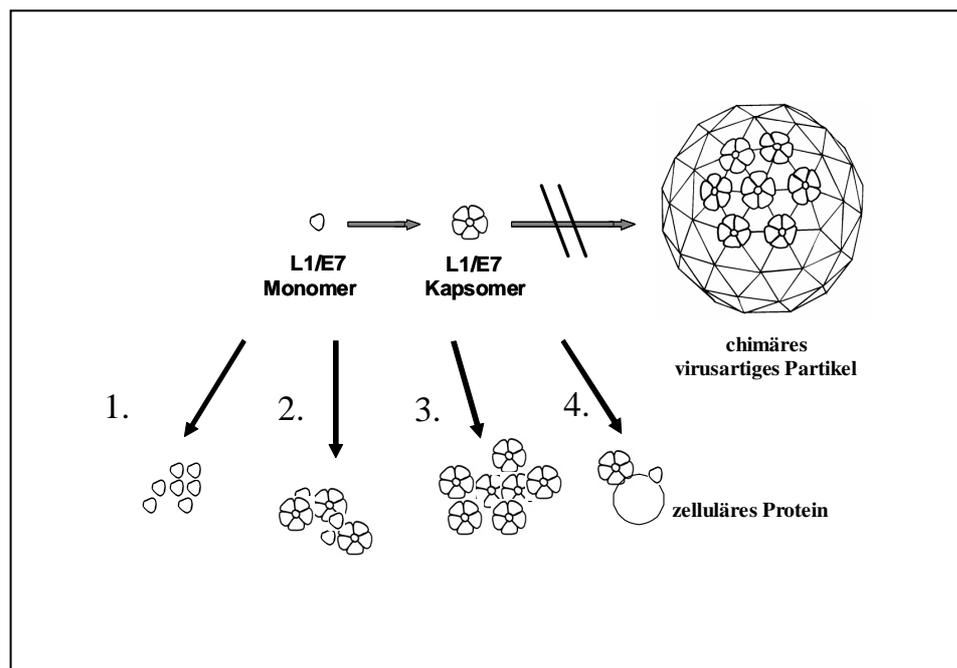


Abb. 4.1: Angenommenes Komplexbildungsverhalten des L1/E7-Fusionsproteins. L1/E7-Monomere bilden Kapsomeren, nicht aber virusartige Partikel. Vier Alternative können aus den Monomeren und Kapsomeren entstehen:
 1. irreguläre Aggregate aus Monomeren; 2. irreguläre Aggregate aus Monomeren und Kapsomeren; 3. irreguläre Aggregate oder Komplexe aus Kapsomeren; 4. Aggregate aus Kapsomeren und/oder Monomeren und zellulären Proteinen.

Zusätzlich wurden Hinweise gefunden, dass das Fusionsprotein zumindest in HeLa-Zellen im E7-Anteil proteolytisch gespalten wird. Es ist bekannt, dass das E7-Protein eine relativ kurze biologische Halbwertszeit hat (Smotkin und Wettstein, 1987; Selvey *et al.*, 1994) und dass das Ubiquitin/Proteasom-System am Abbau beteiligt ist (Reinstein *et al.*, 2000). Ausserdem wurde in zurückliegenden Arbeiten festgestellt, dass die Stabilität des E7-Proteins durch die Entfernung eines oder mehrerer Cystein-Reste aus den beiden Zink-Finger-Motiven erheblich vermindert wird (Phelps *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1999). Bei dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Fusionsprotein sind die beiden Zink-Finger-Motive

unterbrochen bzw. entfernt. Eine daraus resultierende Destabilisierung muss also für das vorgestellte Modell in Betracht gezogen werden und ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete proteolytische Verkürzung. Kenntnis und Beeinflussung der Degradation könnten zu einer erhöhten Protein-Halbwertszeit und damit verbunden zu einem noch höheren „steady-state level“ führen. Das dadurch erhöhte Antigen-Angebot könnte die Immunogenität noch weiter steigern. Auf der anderen Seite haben jedoch verschiedene Gruppen festgestellt, dass instabile Proteine ein größeres Potential als stabile Proteine haben, zytotoxische T-Zellen zu induzieren (Shi *et al.*, 1999; Tobery und Siliciano, 1997; Townsend *et al.*, 1988).

Die Frage, warum das Fusionsprotein nach Überexpression in humanen Zellen nicht – wie zuvor in Insektenzellen nach Bakulovirusexpression gezeigt – chimäre virusartige Partikel bildet, verdient eine nähere Betrachtung. Zwei mögliche Gründe sind dafür zu nennen: Erstens könnte es sein, dass ein großer Teil der Fusionsproteine zu irregulären Komplexen aggregiert und dadurch dem regulären Kapsidbildungsprozess verloren geht. Möglicherweise entstandene virusartige Partikel könnten dann unter der Nachweisgrenze geblieben sein. Dafür wäre höchstwahrscheinlich der E7-Anteil verantwortlich.

Zweitens könnte es sein, dass die C-terminale Deletion des L1-Anteils speziell in humanen Zellen eine korrekte Kapsidbildung verhindert. Es muss dabei ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass C-terminale HPV-16-L1-Deletionen von bis zu 34 Aminosäuren in mehreren unabhängigen Arbeiten zu VLP-Bildung führten (Müller *et al.*, 1997; Touze *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000b), wobei allerdings beobachtet wurde, dass der Anteil an regulären Kapsiden signifikant abnahm. In diesen Arbeiten wurde das Protein in Insektenzellen (Müller *et al.*, 1997; Touze *et al.*, 2000) und in *E. coli* (Chen *et al.*, 2000b) exprimiert. Der Widerspruch zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten könnte sich also durch den Unterschied in den verwendeten Expressionssystemen erklären. Es bliebe dann die Frage, warum der C-Terminus speziell in humanen Zellen für den Kapsidbildungsprozess kritisch ist. Der C-Terminus von L1 wird in früheren Arbeiten mit der DNA-Bindung, der DNA-Verpackung und der Kernwanderung in Verbindung gebracht (Li *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1991b; Touze *et al.*, 2000). Das dort lokalisierte Kernwanderungssignal (Zhou *et al.*, 1991b) kann aber nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit nicht alleiniger Grund für die Unterbrechung des Kapsidbildungsprozesses sein. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung des Fusionsproteins nicht zur Bildung von nachweisbaren Mengen chimärer virusartiger Partikel führt.

Hinweise, dass der C-Terminus unter Umständen für den Kapsidbildungsprozess der Papovaviren wichtig sein könnte, finden sich bei den Polyomaviren. Ou *et al.* konnten zeigen,

dass die C-terminale Deletion von mehr als 16 Aminosäuren am JC-Virus-VP1 die Bildung von virusartigen Partikeln nach Überexpression in *E. coli* verhindert (Ou *et al.*, 2001). Lediglich die Bildung von Kapsomeren blieb in diesem Fall erhalten. Ausserdem wurde aus Daten der Röntgenstrukturanalyse von Papillomvirkapsiden das Modell entwickelt, dass der C-Terminus von L1 möglicherweise in das benachbarte Kapsomer hineinragt und dadurch wichtige interkapsomere Wechselwirkungen schafft (Modis *et al.*, 2002). Ein Eingriff in diese Wechselwirkungen könnte die Kapsidbildung unterbrechen. Natürlich muss man trotzdem argumentieren, dass diese Wechselwirkungen offenbar unter bestimmten Bedingungen, z. B. in bakulovirusinfizierten Insektenzellen, für den Kapsidbildungsprozess nicht notwendig sind oder möglicherweise umgangen werden können.

Interessant ist in diesem Kontext, dass es Liu *et al.* mit einem kodonveränderten C-terminal trunkierten HPV-6b-L1 gelungen ist, durch DNA-Immunisierung hohe VLP-spezifische Antikörpertiter zu induzieren (Liu *et al.*, 2002a). Die Analyse des Kapsidbildungsprozesses dieses Proteins in humanen Zellen wurde jedoch nicht angeführt. Der Unterschied zu den Ergebnissen der vorgestellten Experimente könnte sich durch Unterschiede zwischen HPV-6b L1 und HPV-16 L1 erklären. Es ist auch möglich, dass die beobachteten VLP-spezifischen Titer nicht durch virusartige Partikel, sondern durch kapsidähnliche Komplexe erzeugt wurden.

Daneben können spezielle Besonderheiten in Insektenzellen nach Bakulovirusinfektion, die die VLP-Bildung speziell in diesem System begünstigen, nicht ausgeschlossen werden. Denkbar sind besondere Milieubedingungen, das Fehlen von inhibitorischen Faktoren bzw. das Vorhandensein von Hilfsfaktoren und eine sehr hohe Proteinexpression.

4.5. Prophylaktische und therapeutische Immunisierung

Seit humane Papillomviren als ätiologischer Schlüsselfaktor für das Zervixkarzinom erkannt wurden, ist mit Nachdruck an der Entwicklung von prophylaktischen aber auch therapeutischen Impfstoffen gegen HPV gearbeitet worden. Die prophylaktischen Ansätze richteten sich gegen die Strukturproteine L1 und L2 mit dem Ziel, kapsidspezifische neutralisierende Antikörper zu erzeugen, die den Viruseintritt verhindern sollen. Die therapeutischen Ansätze zielten auf die Auslösung von zellulären Immunantworten gegen die viralen Onkoproteine E6 und E7 ab (Breitburd und Coursaget, 1999). E6 und E7 sind die einzigen viralen Proteine, die anhaltend in Zervixkarzinomzellen und –zelllinien exprimiert

werden. Sie werden deshalb als virale Tumorantigene betrachtet (Chen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Idee verfolgt, die prophylaktischen und therapeutischen Immunisierungsstrategien zu verbinden und zwar wurde dazu das „humanisierte“ L1-Gen mit einem Anteil von E7 kombiniert, um einerseits kapsidspezifische Antikörper und andererseits zytotoxische T-Zellen gegen E7-Epitope zu induzieren.

Die Kombination aus L1 und E7 wurde bisher auf Basis von sogenannten chimären virusartigen Partikeln entwickelt. Das Fusionsprotein aus einem C-terminal trunkierten L1 und den ersten 60 Aminosäuren von E7 konnte in zurückliegenden Arbeiten in Insektenzellen durch ein Bakulovirussystem exprimiert werden, und es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein unter diesen Bedingungen die Fähigkeit behält, virusartige Partikel zu bilden (Müller *et al.*, 1997). Gereinigte chimäre virusartige Partikel wurden in früheren Arbeiten erfolgreich eingesetzt, um zelluläre Immunantworten gegen E7-Epitope und eine Tumorphrotektion zu erreichen (Greenstone *et al.*, 1998; Peng *et al.* 1998; Schäfer *et al.*, 1999).

Der E7-Anteil wurde aus drei Gründen auf die ersten 60 Aminosäuren reduziert:

Erstens ist in früheren Arbeiten gezeigt worden, dass die Mutation der beiden Zink-Finger-Motive bei Cys 58 und 91 einen starken Rückgang der transformierenden Aktivität von E7 bewirkt (Edmonds und Vousden, 1989).

Zweitens konnten Shi *et al.* zeigen, dass die Mutation der Zink-Finger-Motive zu einer erhöhten Degradation des Genproduktes und zu einer Verstärkung der zytotoxischen T-Zellantwort führt (Shi *et al.*, 1999).

Drittens sollte durch die Verkürzung des E7-Anteils die prinzipielle Kapsidbildungsfähigkeit des Fusionsproteins - wie in früheren Arbeiten gezeigt (Müller *et al.*, 1997) - erhalten bleiben.

4.5.1. Humorale Immunantwort

Man geht heute davon aus, dass ungefähr 20 % der erwachsenen Bevölkerung im Laufe des Lebens mit HPV-16 infiziert werden (Koustky *et al.*, 2002). Obwohl die meisten Infektionen einen gutartigen Verlauf haben, können einige zur Entstehung von anogenitalem Krebs führen. Das vorrangige Ziel einer Impfung gegen HPV-16 ist deshalb, die mögliche Entstehung insbesondere des Zervixkarzinoms zu verhindern. Eine protektive Immunisierung zielt darauf ab, Antikörper zu erzeugen, die den Viruseintritt in die Zelle verhindern. Die Immunogenität der Papillomviren beinhaltet die Präsentation von konformationsspezifischen

Epitopen auf den viralen Kapsiden. In Kapitel 3.1.4. konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines kodonveränderten L1-Gens in einer simplen DNA-Immunisierung zu einer starken Antikörperantwort gegen virale Kapside führen kann. Um das Immunisierungskonzept auf eine therapeutische Ausrichtung zu erweitern, wurde das kodonveränderte L1 mit einem E7-Anteil verbunden. Es wurde eine DNA-Immunisierung auf Basis dieses Fusionsgens durchgeführt. Allerdings zeigte es sich, dass in diesen Experimenten eine vergleichbar starke kapsidspezifische Immunantwort ausblieb. Lediglich eine von zehn immunisierten Mäusen reagierte schwach im VLP-basierten ELISA. Die Diskrepanz zwischen den Immunogenitäten des kodonveränderten L1-Gens und des Fusionsgens kann möglicherweise durch Unterschiede im Kapsidbildungsverhalten der beiden Genprodukte *in vitro* erklärt werden. Während klar gezeigt werden konnte, dass die Expression des kodonveränderten L1 in undifferenzierten Säugerzellen zu großen Mengen an virusartigen Partikeln führt, scheint sich das Fusionsprotein nicht zu nachweisbaren Mengen von chimären virusartigen Partikeln zusammenzulagern. Die trotzdem beobachtete schwache kapsidspezifische Antikörperantwort kann möglicherweise durch Unterschiede zwischen der Situation *in vitro* und *in vivo* erklärt werden. Es ist ausserdem möglich, dass die nachgewiesenen Kapsomere zu dieser Immunantwort führten. Kapsomere haben in einigen früheren Arbeiten neutralisierende Antikörper erzeugt (Rose *et al.*, 1998; Fligge *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001). Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass eine humorale Immunantwort gegen Kapsomere möglicherweise nicht durch den VLP-ELISA detektiert wird. Das VLP-ELISA-Verfahren hat hier möglicherweise Beschränkungen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass also trotzdem - wie in früheren Arbeiten für Kapsomere gezeigt - neutralisierende Antikörper generiert werden, die im VLP-ELISA nicht nachweisbar waren. Die Detektion neutralisierender Antikörper konnte aufgrund der obengenannten Schwierigkeiten, Virionen oder Pseudovirionen für einen geeigneten Test zu produzieren (siehe Kapitel 4.3.), nicht durchgeführt werden.

Interessant ist, dass die kapsidspezifische Antikörperantwort gesteigert werden konnte, nachdem das Fusionsprotein durch ein Kernwanderungssignal ergänzt wurde, also folglich im Zellkern akkumulierte. Drei von zehn Tieren entwickelten Antikörpertiter, die im Durchschnitt etwa einen Faktor 50 höher waren als die schwache Antwort nach Verwendung des Ausgangsfusionsgens. Mögliche Erklärungen für diese Verbesserung sind die *in vitro* beobachteten Unterschiede im Kapsidbildungsverhalten des Fusionsproteins nach Kernlokalisation. Obwohl auch das kernlokalisierte Fusionsprotein offenbar nicht chimäre virusartige Partikel bilden, wurden nach Analyse des kernlokalisierten Fusionsproteins neben

Kapsomeren alternative Komplexe nachgewiesen, die kapsid- oder kapsomerähnliche konformative Epitope präsentieren. Es kann deshalb spekuliert werden, dass diese Komplexe strukturelle Ähnlichkeiten zu regulären Kapsiden haben und aus diesem Grund möglicherweise kapsidspezifische Antikörper erzeugen können. Ausserdem kommen mögliche Unterschiede zwischen der Expression *in vitro* und *in vivo* als mögliche Erklärung in Frage. Denkbar wäre z. B., dass *in vivo* kleine Mengen an chimären virusartigen Partikeln entstehen und zur Immunantwort führen, die in den Analysen unter der Nachweisgrenze blieben. Daneben ist es möglich, dass sich unterschiedliche Immunantworten durch die beobachtete unterschiedliche Freisetzbarkeit der Fusionsproteinkomplexe mit und ohne Kernlokalisation ergeben.

Die Beobachtung, dass nur 3 von 10 Tiere eine signifikante kapsidspezifische humorale Immunantwort zeigten, lässt sich nicht durch das Immunisierungsprotokoll erklären, da die Immunisierungsserien jeweils eine Kontrollgruppe enthielten, die mit pL1h immunisiert wurden. Sämtliche Mäuse dieser Kontrollgruppen hatten hohe kapsidspezifische Antikörpertiter.

4.5.2. Zelluläre Immunantwort

Ein weiterer Gesichtspunkt der prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung war die Messung der zellulären Immunantwort gegen E7 nach DNA-Immunisierung mit den Fusionsgenen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine signifikante ZTL-Antwort gegen E7 erzeugt werden kann, wenn E7-Anteile mit einem stark exprimierbaren L1-Gen gekoppelt und in der DNA-Immunisierung eingesetzt werden. Die Daten aus der ELISPOT-Analyse und dem Chromfreisetzungstest bestätigten sich hier gegenseitig, wobei in beiden Fällen in der ELISPOT-Analyse mehr Individuen positiv waren als im Chromfreisetzungstest. Es gibt Hinweise, dass die ELISPOT-Analyse sensitiver ist (Michel *et al.*, 2002b). Daneben ist es aber ausserdem wichtig zu bemerken, dass lytische Zytotoxizität und IFN γ -Sekretion unabhängig reguliert werden (Snyder *et al.*, 2003). Deshalb sollte die funktionale Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen sowohl auf der Ebene der Zytokinsekretion als auch der Ebene der Zytotoxizität gezeigt werden.

Die Erzeugung von E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen scheint im Gegensatz zur humoralen Immunantwort gegen Kapside (Kapitel 4.5.1.) allerdings unabhängig von der zellulären Lokalisation des Fusionsproteins zu erfolgen. Ausserdem korrelierte das Auftreten

einer zellulären Antwort nicht notwendigerweise mit der Induktion von kapsidspezifischen Antikörpern. Umgekehrt zeigten jedoch Tiere mit einer kapsidspezifischen humoralen Immunantwort auch eine T-Zellantwort gegen E7.

Einige Argumente lassen sich als mögliche Begründungen für die beobachteten zellulären Immunantworten heranzuführen:

Erstens konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein *in vitro* unabhängig von der Lokalisation Kapsomere bildet. Diese chimären Kapsomere tragen höchstwahrscheinlich zur zellulären Immunantwort bei. Es ist bekannt, dass Kapsomere immunogen sind. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Kapsomere zytotoxische T-Zellen erzeugen können (Öhlschläger *et al.*, 2003).

Zweitens wurde durch die Kombination mit dem kodonveränderten L1 unabhängig von der Lokalisation eine hohe Proteinexpression erreicht. Das führt in beiden Fällen zu einem erhöhten Antigen-Angebot, sowohl in den direkt transfizierten Zellen als auch in professionellen antigenpräsentierenden Zellen nach post-apoptotischem oder post-nekrotischem Transfer. Es muss allerdings bedacht werden, dass eine hohe Proteinexpression und ein hohes „steady-state-level“ nicht unbedingt für eine erhöhte Immunogenität notwendig sind. In einer zurückliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Proteinhalfwertzeit, z. B. durch Fusionierung mit Ubiquitin, die Induktion von zytotoxischen T-Zellen sogar verbessern kann (Rodriguez *et al.*, 1997).

Ein verstärkter post-apoptotischer oder post-nekrotischer Transfer würde nicht nur das „cross-priming“ (Gurunathan *et al.*, 2000) von zytotoxischen T-Zellen bewirken, sondern zudem die Antigenpräsentation über den exogenen Weg erhöhen und zu einer stärkeren akzessorischen T-Helferzellantwort führen, wobei bekannt ist, dass die T-Helferantwort zur optimalen Tumorprotektion beiträgt (Hung *et al.*, 1998).

Drittens könnte es sein, dass die durch die Eliminierung der Zink-Finger-Motive möglicherweise erhöhte Degradation des E7-Anteils (Shi *et al.*, 1999) zusammen mit der hohen Expression des Fusionsproteins zu einer verstärkten Antigenprozessierung über den endogenen Weg und damit zu einer verstärkten Induktion von zytotoxischen T-Zellen führt. Hinweise auf eine Degradation des E7-Anteils wurden in der vorliegenden Arbeit zumindest *in vitro* beobachtet (Kapitel 3.2.4.).

Es lässt sich bilanzieren, dass die für E7 postulierten Mechanismen, dem Immunsystem *in vivo* zu entkommen, nämlich die Minimierung der Expression und die Verhinderung der Reifung von dendritischen Zellen (Tindle, 2002), mit der vorgestellten Immunisierungsmethode erfolgreich überwunden werden können.

4.6. Schlussbetrachtung

In der vorgestellten Arbeit konnte das prophylaktische und therapeutische Immunisierungskonzept weiterentwickelt werden. Zunächst wurde die L1-Expression entreguliert. Dadurch wurde die Möglichkeit für eine genetische Immunisierung mit Polynukleotiden auf Basis von L1 geschaffen. Die Durchführbarkeit konnte in einer DNA-Immunisierung aufgezeigt werden. Auch die Kombination einer prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung wurde ermöglicht. In den vorgestellten Experimenten wurde jedoch deutlich, dass die Kapazität des L1/E7-Fusionsgens, kapsidspezifische Antikörper zu erzeugen, auch nach Kernlokalisierung des Genproduktes gegenüber dem nicht-fusionierten L1-Gen vermindert ist. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein nicht in gleichem Maße wie L1 die Fähigkeit besitzt, in humanen Zellen virusartige Partikel zu bilden. Zwei mögliche Erklärungen müssen hierfür in Betracht gezogen werden:

Erstens könnte der E7-Anteil durch Ausbildung von alternativen Aggregaten den Kapsidbildungsprozess insbesondere in humanen Zellen behindern.

Zweitens ist es möglich, dass die Manipulation des C-Terminus des L1-Anteils die VLP-Bildungskapazität zumindest in humanen Zellen senkt.

Wesentliche Verbesserungen der prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung setzen an diesen Punkten an:

Denkbar ist zum einen, den E7-Anteil so zu manipulieren, dass die Aggregation des Fusionsproteins verhindert wird, mit dem Ziel, den Anteil an bekannten immunogenen Strukturen (Kapsomere oder Kapside) zu erhöhen.

Ausserdem muss in Erwägung gezogen werden, den Aufbau des Fusionsgens so zu verändern, dass der C-Terminus des L1 erhalten bleibt. Diese Änderung hat möglicherweise die Konsequenz, dass nur ein kürzerer E7-Anteil bei der VLP-Bildung toleriert wird. Durch eine solche Verkürzung wird die Verwendung des Fusionsproteins jedoch wesentlich eingeschränkt, weil dadurch nur bestimmte E7-Epitope für zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen abgedeckt werden könnten. Das System wäre dadurch aufgrund der Polymorphismen der MHC-Komplexe auf bestimmte Mausmodelle oder auf bestimmte Menschen beschränkt. Denkbar wäre es, das System zunächst für das bekannte H-2D^b-ZTL-Epitop (Feltkamp *et al.*, 1993) in C57/B16-Mäusen zu testen. Im positiven Fall könnte es dann auf das bekannte menschliche Allel HLA-A*0201, das in ca. 30 % der weißen Bevölkerung exprimiert wird (Stevanovic, 2002), erweitert werden. Das E7-ZTL-Epitop für diesen Immunkomplex ist schon bestimmt worden (Ressing *et al.*, 1995).

Für die Erweiterung des Konzeptes auf einen möglichst großen Anteil von Menschen müsste dann eine Individualisierung erfolgen, d. h. bei der jeweiligen CIN-Patientin müsste zunächst eine HLA-Typisierung durchgeführt werden, die dann datenbankgestützt zur individuellen Zusammensetzung des Fusionsproteins mit dem geeigneten E7-Anteil herangezogen werden könnte. Alternativ könnte man eine Mischung aus Fusionsgenen mit verschiedenen kurzen E7-Anteilen zur Immunisierung einsetzen. In diese Überlegungen sollten die jeweiligen T-Helferzell-Epitope mit einbezogen werden, um eine konzertierte Aktion des Immunsystems zu erzeugen. Eine Reihe von T-Helferzell-Epitopen von E7 sind in früheren Arbeiten bestimmt worden (Tindle *et al.*, 1991; van der Burg *et al.*, 2001).

Ein möglichst großer E7-Anteil würde die Entwicklung des Konzeptes also zweifelsohne erleichtern. Mit einer Vergrößerung des E7-Anteils wächst jedoch auch die Gefahr, dass die transformierende Aktivität des E7 zumindest teilweise erhalten bleibt. Das wäre im Hinblick auf eine Anwendung in der DNA-Immunisierung unakzeptabel. Es bestünde die Gefahr, durch DNA-Integration prä-maligne Zellen zu erzeugen. Osen *et al.* ist ein interessanter Ansatz gelungen, um dieses Problem zu lösen. Die E7-Primärsequenz wurde so rearrangiert, dass das Genprodukt die transformierende Aktivität verliert, auf der anderen Seite aber zumindest im verwendeten Mausmodell weiterhin die Fähigkeit besitzt, E7-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren (Osen *et al.*, 2001). Das Problem könnte ausserdem gelöst werden, indem man die RB-Bindungsstelle mutiert, um dadurch in Kombination mit der Beeinflussung der beiden Zink-Finger-Motive das Transformationspotential auszuschalten. In diesem Kontext haben Smahel *et al.* im übrigen gezeigt, dass bestimmte Mutationen in der RB-Bindungsstelle von E7 zu einer erhöhten Immunogenität in der DNA-Immunisierung führen (Smahel *et al.*, 2001).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass in der vorliegenden Arbeit ein vielversprechender Ansatz zur Kombination von prophylaktischen und therapeutischen Immunisierungsstrategien gegen HPV-16 entwickelt wurde. Die vorgestellten Ergebnisse liefern zudem Möglichkeiten, eine Viruspropagation in Zellkulturen zu entwickeln und damit verbunden die Proteinfunktionen der HPV-16-Genprodukte im Infektionszyklus zu erforschen.

5. Literatur

- Albritton, L. M., L. Tseng, D. Scadden, and J. M. Cunningham,** 1989. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*. **57**:659-666
- Baker, T. S. and Howley, P. M.,** 1987. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *Embo J.* **6**:1027-1035
- Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C. and Brown, J. C.,** 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. *Biophys J.* **60**:1445-1456
- Baker, C. C. and Noe, C. C.,** 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):3529-3534
- Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R and Vousden, K. H.,** 1990. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J.*, **9**:1404-1407
- Barry, M. and Bleackley, R. C.,** 2002. Cytotoxic T Lymphocytes: All Roads lead to Death. *Nat Rev Immunol.*, **2**(6):401-409
- Bechtold, V., Beard, P. and Raj, K.,** 2003. Human Papillomavirus Type 16 E2 Protein Has No Effect on Transcription from Episomal Viral DNA. *J Virol.*, **77**(3):2021-2028
- Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W. G., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Bourns, M. E. G., Rutherford, E., Hickling, J. K. and Inglis, S. C.,** 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet.*, **347**:1523-1527
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K. V.,** 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
- Burkhardt, A., Willingham, M., Gay, C., Jeang, K. T. and Schlegel, R.,** 1989. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* **170**:334-339
- Breitburd, F. and Coursaget, P.,** 1999. Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol.* **9**:431-445
- Chen, C., H. Okayama,** 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2745-2752
- Chen, L. P., Thomas, E. K., Hu, S. L., Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E.,** 1991. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**:110-114
- Chen, L., Mizuno, M. T., Singhal, M. C., Hu, S. L., Galloway, D. A., Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E.,** 1992. Induction of cytotoxic T lymphocyte specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Immunol.* **148**:2617-2621
- Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G. and Harrison, S. C.,** 2000b. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1-Protein of Human Papillomavirus 16. *Mol Cell.* **5**:557-567
- Chen, C. H., Wang, T. L., Hung, C. F., Yang, Y., Young, R. A., Pardoll, D. M. and Wu, T. C.,** 2000a. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res.* **60**:1035-1042
- Chen, Z., Yoshikawa, T., Kadowaki, S., Hagiwara, Y., Matsuo, K., Asanuma, H., Aizawa, C., Kurata, T., Tamura, S.,** 1999. Protection and antibody responses in different strains of mouse immunized with plasmid DNAs encoding influenza virus hemagglutinin, neuraminidase and nucleoprotein. *J Gen Virol.*, **80**:2559-2564

- Clements, A., Johnston, K., Mazzarelli, J. M., Ricciardi, R. P. and Marmorstein, R.,** 2000. Oligomerization Properties of the Viral Oncoproteins Adenovirus E1A and Human Papillomavirus E7 and Their Complexes with the Retinoblastoma Protein. *Biochemistry*. **39**:16033-16045
- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M. and Schwartz, S.,** 1998. Translational inhibition *in vitro* of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem*. **273**:22648-22656
- Collier, B. D. Öberg, X. Zhao and S. Schwartz,** 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)**:2739-2752
- Daemen, T., Regts, J., Holtrop, M. and Wilschut, J.,** 2002. Immunization strategy against cervical cancer involving an alphavirus vector expressing high levels of a stable fusion protein of human papillomavirus 16 E6 E7. *Gene Ther*. **9**:85-94
- Davis H. L., Demeneix B. A., Quantin B., Coulombe J., Whalen R. G.,** 1993. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* **4(6)** : 733-40
- Dietrich-Goetz, W., I. M. Kennedy, B. Levins, M. A. Stanley and J. B. Clements.** 1997. A cellular 65-kDa protein recognizes the negative regulatory element of human papillomavirus late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**:163-168
- Donnelly, J. J., Martinez, D., Jansen, K. U., Ellis, R. W., Montgomery, D. L. and M. A. Liu.** 1996. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J Infect Dis*. **173**:314-320
- Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P. and Münger, K.,** 2001. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res*. **61**:2356-2360
- Dupuy, C., D. Buzoni-Gatel, A. Touze, D. Bout, and P. Coursaget.** 1999. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles or with HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol*. **73**:9063-9071
- Edmonds, C. and Vousden, K. H.,** 1989. A Point Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein. *J Virol.*, **63(6)**:2650-2656
- Fallaux, F. J., O. Kranenburg, S. J. Cramer, A. Houweling, H. van Ormondt, R. C. Hoeben, und A. J. van der Eb,** 1996. Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. **7**:215-22
- Felber, B. K. and Pavlakis, G. N.,** 1993. Molecular biology of HIV-1: Positive and negative regulatory elements important for virus expression. *AIDS*. **7(Suppl)**:51-62
- Feltkamp, M. C. W., Smits, H. L., Vierboom, M. P. M., Minaar, R. P., Jongh, B. M. D., Drijhout, M. J. W., Schegget, J. T., Melief, C. J. M., and W. M. Kast,** 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*. **23**:2242-2249
- Fensterle, J., Grode, L., Hess, J. and Kaufmann, S. H.,** 1999. Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun. *J Immunol.*, **163**:4510-4518
- Fernando, G. J., Murray, B., Zhou, J. and Frazer, I. H.,** 1999. Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *Eur J Immunol*. **23**:2242-2249
- Finch, J. T. and Klug, A.** 1965. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type III. Structure of rabbit papilloma virus. *J Mol Biol*, **13**:1-12
- Fligge, C., Giroglou, T., Streeck, R. E. and Sapp, M.** 2001. Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology.*, **283**:353-357

- Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. and Sapp, M.**, 2002. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. *J Virol.*, **76(19)**:10009-10014
- Furth, P. A. and Baker, C. C.**, 1991. An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. *J Virol.* **65**:5806-5812
- Furth, P. A., Choe, W.-T., Rex, J. H., Byrne, J. C. and Baker, C. C.**, 1995. Sequences homologous to 5' splice sites are required for the inhibitory activity of papillomavirus late 3' untranslated regions. *Mol Cell Biol.* **14**:5278-5289
- Gariglio, P., Benitez-Bribiesca, L., Berumen, J., Alcoer, J. M., Tamez, R. and Madrid, V.**, 1998. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Arch Med Res.* **29**:279-284
- Glastetter, E.**, 1997. Analyse von HPV16 L1/E71-98 chimären Proteinen nach Einführung von Punktmutationen in E7. *Diplomarbeit, Heidelberg.*
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U. and 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
- Greenstone, H. L., Nieland, J. D., de-Visser, K. E., De-Bruijn, M. L., Kirnbauer, R., Roden, R. B., Lowy, D. R., Kast, W. M. and Schiller, J. T.** 1998. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:1800-1805
- Görnemann, J., Hofmann, T. G., Will, H. and Müller, M.**, 2002. Interaction of Human Papillomavirus Type 16 L2 with Cellular Proteins: Identification of Novel Nuclear Body-Associated Proteins. *Virology.* **303**:69-78
- Gurunathan, S., D. M. Klinman and R. A. Seder**, 2000. DNA vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annu Rev Immunol*, **18**:927-974
- Haas, J., Park, E.-C. and Seed, B.** 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol.* **6**:315-324
- Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S. and Galloway, D. A.**, 1994. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol.* **68**:4503-4505
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N., Galloway, D. A.**, 1993. Self-assembly of Human Papillomavirus Type 1 Capsids by Expression of the L1 Protein Alone or by Coexpression of the L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol.*, **67(1)**:315-322
- Hariharan, K., Braslawsky, G., Barnett, R. S., Berquist, L. G., Huynh, T., Hanna, N. and Black, A.**, 1998. Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PROVAX. *Int J Oncol.* **12**:1229-1235
- He, Z., Wlazlo, P., Kowalczyk, D. W., Cheng, J., Xiang, Z. Q., Giles-Davis, W. and Ertl, H. C. J.**, 2000. Viral Recombinant Vaccines to the E6 and E7 Antigens of HPV-16. *Virology.*, **270**:146-161
- Heath, W. R. and Carbone, F. R.**, 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol.*, **1**:126-134
- Heino, P., J. Dillner, and S. Schwartz**, 1995. Human papillomavirus 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki Forest virus assemble into virus-like particles. *Virology.* **214**:349-359
- Holm, L.**, 1986. Codon usage and gene expression. *Nucleic Acids Res.* **14**:3075-3087
- Howley, P. M.**, 1996. Papillomavirinae : The viruses and their replication. 3rd ed. *Fundamental Virology (B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds.)*. :947-978
- Huang, J. and Liang, T. J.**, 1993. A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with rev responsive element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol.* **13**:7476-7486

- Hughes, J. P., Garnett, G. P. and Koutsky, L.,** 2002. The Theoretical Population-Level Impact of a Prophylactic Human Papilloma Virus Vaccine. *Epidem.* **13**:631-639
- Hung, C. F., Cheng, W. F., Chai, C. Y., Hsu, K. F., He, L., Ling, M., and Wu, T. C.,** 2001. Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *J Immunol.* **166(9)**:5733-5740
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond, W. A., Lowenstein, C., Pardoll, D. and Levitsky, H.** 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* **188**:2357-2368
- Hwang, E. S., Nottoli, T. and DiMaio, D.,** 1995. The HPV 16 E5 protein: Expression, detection and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* **211**:227-233
- Ji, H. X., Wang, T. L., Chen, C. H., Pai, S. I., Hung, C. F., Lin, K. Y., Kurman, R. J., Pardoll, D. M., Wu, T. C.,** 1999. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther.* **10**:2727-2740
- Jones, D. L., Alani, R. M. and Münger, K.,** 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21CIP-1-mediated inhibition of CDK2. *Genes Dev.* **11**:2101-2111
- Kabsch, K. and Alonso, A.,** 2002. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in HaCaT Cells by Different Mechanisms. *J Virol.* **76(23)**:12162-12172
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E.,** 1984. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature.* **311**:33-38
- Kanduc, D.,** 1997. Changes of tRNA population during compensatory cell proliferation: differential expression of methionine- tRNA species. *Biochem Biophys.* **342**:1-6
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and T. Kanda.,** 2001. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralizing epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol.* **75**:2331-2336
- Kawana, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and T. Kanda.,** 1999. Common neutralization epitope in minor capsid protein of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol.* **73**:6188-6190
- Kennedy, I. M., J. K. Haddow, and J. B. Clements.** 1990. Analysis of human papillomavirus type 16 late mRNA 3' processing signals *in vitro* and *in vivo*. *J Virol.* **64**:1825-1829
- Kennedy, I. M., J. K. Haddow, and J. B. Clements.** 1991. A negative regulatory element in the human papillomavirus 16 genome acts at the level of late mRNA stability. *J Virol.* **65**:2093-2097
- Kim, C. H., Oh, Y., and Lee, T. H.,** 1997. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene.* **199**:293-301
- Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller,** 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembly into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **89**:12180-12184
- Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Wheeler, C. M., Becker, T. M., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.,** 1994. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst.*, **86**:494-499
- Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Dürst, L. Gissmann, D. R. Lowy, and J. T. Schiller,** 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol.* **67**:6828-6936

- Kiselev, N. A. and Klug, A.** 1969. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type V. Tubular variants built of pentamers. *J Mol Biol.*, **40**:155-160
- Klausner, R. D., Roul, T. A. and Harford, J. B.**, 1993. Regulating the fate of the mRNA : The control of cellular iron metabolism. *Cell.* **72**:19-28
- Koffa, M. D., Graham, S. V., Takagaki, Y., Manley, J. L. and J. B. Clements.** 2000. The human papillomavirus type 16 negative regulatory RNA element interacts with three proteins that act at different posttranscriptional levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:4677-4682
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M. and Jansen, K., U.** 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* **347**(21):1645-1651
- Krul, M. R. L., Tijhaar, E. J., Kleijne, J. A. F. W., Van Loon, A. M., Nievers, M. G., Schipper, H., Geerse, L., Van der Kolk, M., Steerenberg, P. A., Mooi, F. R. and Den Otter, W.**, 1996. Induction of an antibody response in mice against human papillomavirus (HPV) type 16 after immunization with HPV recombinant Salmonella strains. *Cancer Immunol Immunother.*, **43**:44-48
- Laemmli, U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5
- Lambert, P. F.**, 1991. Papillomavirus DNA replication. *J Virol.* **65**:3417-3420
- Leder, C., Kleinschmidt, J. A., Wiethe, C. and M. Müller**, 2001. Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes. *J Virol.*, **75**(19):9201-9209
- Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K. and Garcea, R. L.**, 1998. Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disassembly. *J Virol.* **72**(3):2160-2167
- Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C. and Garcea, R. L.** 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**:2988-2995
- Liu, Y., Chiriva-Internati, M., Grizzi, F., Salati, E., Roman, J. J., Lim, S. and Hermonat, P. L.**, 2001. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther.*, **8**(12):948-957
- Liu, W. J., Gao, F., Zhao, K. N., Zhao, W., Fernando, G. J. P., Thomas, R and Frazer, I. H.** 2002b. Codon Modifies Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine Enhances Cytotoxic T-Lymphocyte Induction and Anti-tumour Activity. *Virology.* **301**:43-52
- Liu, W. J., Zhao, K.-N., Gao, F. G., Legatt, G. R., Fernando, G., J., P. and I. H. Frazer**, 2002a. Polynucleotide viral vaccines : codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy. *Vaccine.* **20**:862-869
- Ljunggren, H.G. und Kärre, K.**, 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* **162**:1745-1757
- Marzluff, W. F. and Hanson, R. J.**, 1993. Degradation of a nonpolyadenylated messenger: Histone mRNA decay. *Control of Messenger RNA Stability (J. Belasco and G. Brawerman, Eds; Academic Press, San Diego)*:267-292
- Matsumoto, K., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda, T.**, 2000. DNA Vaccination of Mice With Plasmid Expressing Human Papillomavirus 6 Major Capsid Protein L1 Elicits Type-Specific Antibodies Neutralizing Pseudovirions Constructed *In Vitro*. *J Med Virol.*, **60**:200-204

- McCarthy, M. P., White, W. I., Palmer-Hill, F., Koenig, S. and Suzich, J. A.**, 1998. Quantitative Disassembly and Resassembly of Human Papillomavirus Type 11 Viruslike Particles *In Vitro*. *J Virol.*, **72(1)**:32-41
- McLean, C. S., M. J. Churcher, J. Meinke, G. L. Smith, G. Higgins, M. Stanley, and A. C. Minson**, 1990. Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papilloma virus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J. Clin. Pathol.* **43**:488-492
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R. and Laimins, L. A.**, 1993. Human Papillomavirus Type 18 E7 Protein Requires Intact Cys-X-X-Cys Motifs for Zinc Binding, Dimerization, and Transformation but Not for Rb Binding. *J Virol.* **67(6)**:3142-3150
- Meneguzzi, G., Cerni, C., Kieny, M. P. and Lathe, R.**, 1991. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology.*, **181**:62-69
- Merle, E., Rose, R. C., LeRoux, L. and Moroianu, J.**, 1999. Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin $\alpha\beta 1$ heterodimers. *J Cell Biochem.* **74**:628-637
- Michel, N., W. Osen, L. Gissmann, T. N. M., Schumacher, H. Zentgraf, and M. Müller**, 2002a. Enhanced Immunogenicity of HPV 16 E7 Fusion Proteins in DNA Vaccination. *Virology.* **294**:47-59
- Michel, N., Öhlschlager, P., Osen, W., Freyschmidt, E.-J., Guthöhrlein, H., Kaufmann, A. M., Müller, M. and Gissmann, L.**, 2002b. T Cell Response to Human Papillomavirus 16 E7 in Mice: Comparison of Cr Release Assay, intracellular IFN γ Production, ELISPOT and Tetramer Staining. *Intervirology.* **45**:290-299
- Modis, Y., Trus, B. L. and Harrison, S. C.** 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J.*, **21(18)**:4754-4762
- Modrow, S. und Falke, D.** 1997. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, 1997
- Müller, M., Zhou, J., Reed, T., D., Rittmüller C., Burger A., Gabelsberger, J., Braspenning J. and Gissmann, L.**, 1997. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology.* **234(1)**:93-111
- Münger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzales, S. L., Grace, M. and Zacny, V. L.**, 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* **20**:7888-7898
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. and Schlegel, R.**, 1989. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary keratinocytes. *J Virol.* **63**:4417-4423
- Murakami, M., Gurski, K. J., Marincola, F. M., Ackland, J. and Steller, M. A.**, 1999. Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. *Cancer Res.* **59**:1184-1187
- Nakamura, Y., T. Gojobori, and T. Ikemura**, 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**:292
- Nardelli-Haeffliger, D., Roden, R. B. S., Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbühl, J. P., Schiller, J. T., Lachat, P., Potts, A. and De Grandi, P.**, 1997. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun.*, **65**:3328-3336
- Nielsen, H. V., Lauemoller, S. L., Christiansen, L., Buus, S., Fomsgaard, A., Petersen, E.**, 1999. Complete protection against lethal toxoplasma gondii infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect Immun.*, **67**:6358-6363
- Nirenberg, M.**, 1965. The genetic code: II. *Sci Am.* **208**:80-94

- Nuss Parker, J., Zhao, W., Askins, K. J., Broker, T. R. and Chow, L. T.,** 1997. Mutational analysis of differentiation-dependent human papillomavirus type 18 enhancer elements in epithelial raft cultures of neonatal foreskin keratinocytes. *Cell Growth Differ.* **8**:751-762
- Oda, H., Kumar, S and Howley, P. M.,** 1999. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:9557-9562
- Öhlschläger, P., Osen, W., Dell, K., Faath, S., Garcea, R. L., Jochmus, I., Müller, M., Pawlita, M., Schäfer, K., Sehr, P., Staib, C., Sutter, G. and Gissmann, L.,** 2003. Human papillomavirus (HPV) type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57Bl/6 mice. *J Virol.* **77**(8):4635-45
- Osen, W., Peiler, T., Öhlschläger, P., Caldeira, S., Faath, S., Michel, N., Müller, M., Tommasino, M., Jochmus, I. and Gissmann, L.,** 2001. A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine.* **19**:4276-4286
- Ou, W.-C., Chen, L.-H., Wang, M., Hseu, T.-H. and Chang, D.,** 2001. Analysis of minimal sequences on JC virus VP1 required for capsid assembly. *J Neuro Virol.*, **7**:298-301
- Paintsil, J.,** 1998. Studies on Papillomavirus Structural Proteins and their Role in Virus Capsid Assembly. *Ph. D. thesis, Loyola University Chicago, Chicago, Ill, USA*
- Paintsil, J., Müller, M., Picken, M., Gissmann, L. and Zhou, J.,** 1998. Calcium is required in reassembly of bovine papillomavirus *in vitro*. *J Gen Virol.* **79**:1133-1141
- Parkin, D. M., Pisani, P. and Ferlay, J.,** 1999. Estimates of the worldwide Incidence of Major Cancers in 1990. *Int J Cancer.* **80**:827-841
- Pear, W. P., G. P. Nolan, M. L. Scott, und D. Baltimore,** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**:8392-6
- Peng, S., Frazer, I. H., Fernando, G. J. and Zhou J.** 1998. Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virology.* **240**:147-157
- Petitclerc, D. , Attal, J., Theron, M. C., Bearzotti, M, Bolifraud, P., Kann, G., Stinnakre, M.-G., Pointu, H., Puissant, C., Houdebine, L.-M.,** 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**:169-178
- Phelps, W. C., Münger, K., Yee, C. L., Barnes, J. A. and Howley, P. M.** 1992. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* **66**:2418-2427
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D. and Murakami, W. T.** 1982. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature.* **295**:110-115
- Raymond, V., Atwater, J. A. and Verma, I. M.,** 1989. Removal of an mRNA destabilizing element correlates with the increased oncogenicity of protooncogene c-fos. *Oncogene Res.* **4**:861-865
- Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A. and Schwartz, A.,** 2000. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene.* **19**:5944-5950
- Ressing, M. E., de Jong, J. H., Brandt, R. M. P., Drijfhout, J. W., Benckhuijsen, W. E., Schreuder, G. M. T. Offringa, R., Kast, W. M. and Melief, C. J. M.,** 1999. Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma. *Eur J Immunol.* **29**:1292-1303
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M. P., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J. M. and Kast, W. M.** 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus

type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol.*, **154**:5934-5943

Reuter, J., Vivas-Gonzales, B. E., Gomez, D., Wilson, J. H., Brandsma, J. L., Greenstone, H. L., Rose, J. K. and Roberts, A., 2002. Intranasal Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Cottontail Rabbit Papillomavirus L1 Protein Provides Complete Protection against Papillomavirus-Induced Disease. *J Virol.*, **76**(17):8900-8909

Rocha-Zavaleta, L., Alejandre, J. E., and A. Garcia-Carranca. 2002. Parenteral and Oral Immunization With A Plasmid DNA Expressing the Human Papillomavirus 16-L1 Gene Induces Systemic and Mucosal Antibodies and Cytotoxic T Lymphocyte Responses. *J Med Virol.* **66**:86-95

Roden, R. B. S., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R. and Schiller, J. T., 1996. *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol.*, **70**:5876-5883

Rodriguez, F., Zhang, J. and Whitton, J. L., 1997. DNA immunization Ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol.*, **71**:8497-8503

Roman, M., Martin-Orozo, E., Goodman, J. S., Nguyen, M-D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A. and Raz, E., 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.*, **3**:849-854

Romanczuk, H., Thierry, F. and Howley, P. M., 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):2849-2859

Rose, R. C., Bonnez, W., Reichman, R. C., and R. L. Garcea, 1993. Expression of Human Papillomavirus Type 11 L1 Protein in Insect Cells: *In Vivo* and *In Vitro* Assembly of Virus-like Particles. *J Virol.*, **67**(4):1936-1944

Rose, R. C., Bonnez, W., Rin, C. D., McCance, D. J. and Reichman, R. C., 1994. Serological differentiation of human papillomavirus type 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J Gen Virol.*, **75**:2445-2449

Rose, R. C., White, W. I., Li, M., Suzich, J. A., Lane, C. and Garcea, R. L. 1998. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol.*, **72**:6151-6154

Ross, J., 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* **59**:15-95

Roth, E. J., Kurz, B., Liang, L., Hansen, C. L., Dameron, C. T., Winge, D. R., and Smotkin, D. 1992. Metal thiolate coordination in the E7 proteins of human papillomavirus 16 and cottontail rabbit papillomavirus as expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **15**:16390-16395

Saiga, A., Orita, S., Minora-Tada, N., Maeda, M., Aono, Y., Asakawa, M., Nakahara, K., Kubota, R., Osame, M. and Igarashi, M., 1997. *Cis*-acting inhibitory elements within the pol-env region of human T-cell leukaemia virus type 1 possibly involved in viral persistence. *J Virol.* **71**:4485-4494

Sachs, A. B., 1993. Messenger RNA degradation in eucaryotes. *Cell.* **74**:413-421

Sapp, M., Volpers, C., Muller, M. and Streeck, R. E., 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol.* **76**:2407-2412

Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J. R. and Streeck, R. E., 1998. Papillomavirus Assembly Requires Trimerization of the Major Capsid Protein by Disulfides between Two Highly Conserved Cysteines. *J Virol.* **72**(7):6186-6189

Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, M. A., Finch, J., Crawford, L., Tomassino M., 1995. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomavirus type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virol.*, **206**:126-135

- Sato, H., Watanabe, S., Furuno, A. and Yoshiike, K.**, 1989. Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Expressed in *Escherichia coli* and Monkey COS-1 Cells : Immunofluorescence Detection of the Nuclear E7 Protein. *Virology*. **170**:311-315
- Schäfer, K., Müller, M., Faath, S., Henn, A., Osen, W., Zentgraf, H., Benner, A., Gissmann, L., Jochmus, I.**, 1999. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: Induction and antitumor activity. *Int J Cancer*. **81**:881-888
- Schiller, J. T.**, 1999. Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *Mol Med Today.*, **5**:209-215
- Schiller, J. T. and Lowy, D. R.**, 2000. Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, **2000**:50-54
- Schreckenberger, C., P. Sethupathi, A. Kanjanahaluethai, M. Müller, J. Zhou, L. Gissmann, and L. Qiao.** 2000. Induction of an HPV 6b L1-specific mucosal IgA response by DNA immunization. *Vaccine*. **19**:227-233
- Schwartz, S.** 1998. Cis-Acting Negative RNA Elements on Papillomavirus Late mRNAs. *Sem Virol*. **8**:291-300
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A and zur Hausen, H.**, 1985. Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. **314**:111-114
- Seder, R. A. and Gurunathan, S.**, 1999. DNA Vaccines – Designer Vaccines for the 21st Century. *N Engl J Med*. **22(7)**:277-278
- Selvey, L. A., Dunn, L. A., Tindle, R. W., Park, D. S. and Frazer, I. H.**, 1994. Human papillomavirus (HPV) type 18 E7 protein is a short-lived steroid-inducible phosphoprotein in HPV-transformed cell lines. *J Gen Virol.*, **75**:1647-1653
- Shi, W., Bu, P., Liu, J., Polack, A., Fisher, S., and Qiao, L.** 1999. Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: Mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol* **73(9)**:7877-7881
- Smahel, M., Sima, P., Ludvikova, V. and V. Vonka.** 2001. Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccines against E7-containing oncogenic cells. *Virology*. **281**:231-238
- Smahel, M., Sobotkova, E., Vonka, V., Hamsikova, E., Zak, R., Kitasato, H., and Ludvikova, V.** 1999. DNA vaccine against oncogenic hamster cells transformed by HPV16 E6/E7 oncogenes and the activated ras oncogene. *Oncol Rep*. **6(1)**:211-215
- Smith, D. W.** 1996. Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog*. **12**:417-422
- Smotkin, D. and Wettstein, F. O.** 1987. The Major Human Papillomavirus Protein in Cervical Cancers Is a Cytoplasmic Phosphoprotein. *J Virol*. **61**:1686-1689
- Snyder, J. E., Bowers, W. J., Livingstone, A. M., Lee, F. E-H., Federoff, H. J. and Mosmann, T. R.** 2003. Measuring the frequency of mouse and human cytotoxic T cells by the Lysis spot assay: independent regulation of cytokine secretion and short-term killing. *Nat Med*. **9(2)**:231-235
- Sokolowski, M., Zhao, C., Tan, W. and Schwartz, S.**, 1997. AU-rich mRNA instability elements on HPV-1 late mRNAs and c-fos mRNA interact with the same cellular factors. *Oncogene*. **15**:2303-2319
- Sokolowski, M, Tan, W., Jellne, M. and Schwartz, S.**, 1998. mRNA instability elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region. *J Virol*. **72**:1504-1515
- Speidel, K., Osen, W., Faath, S., Hilgert, I., Obst, R., Braspenning, J., Momburg, F., Hämmerling, G.J. und Rammensee, H.G.** 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens *in vivo*: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol*. **27**: 2391-2399

- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. and Beard, P.**, 1998. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol.* **283**:529-536
- Stevanovic, S.** 2002. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer.* **2**(7):1-7
- Strauss, E. G., Strauss, J. H. and Levine, A. J.** 1996. Virus evolution. In *Fields, Knipe and Howley (ed.), Fundamental Virology.* Lippincott-Raven, Philadelphia : 149-159
- Sundaram, P., Xiao, W and J. L. Brandsma.** 1996. Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen). *Nucleic Acids Res.* **24**:1375-1377
- Tan, W., B. K. Felber, A. S. Zolotukhin, G. N. Pavlakis, and S. Schwartz.** 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**:5607-5620
- Thomas, J. O., and Kornberg, R. D.,** 1975. An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**:2626-30
- Tindle, R. W.** 2002. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* **2**:59-65
- Tindle, R. W., Fernando, G. P., Sterling, J. C. and Frazer, I. H.,** 1991. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **88**:5887-5891
- Tobery, T. W. and Siliciano, R. F.** 1997. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses *in vivo* after immunization. *J Exp Med.* **185**:909-920
- Toes, R. E. M., Ossendorf, F., Offringa, R., Melief, C. J. M.,** 1999. CD4 T cells and Their Role in Antitumor Immune Responses. *J Exp Med.*, **189**(5):753-756
- Tooze, J. (ed.).** 1981. DNA tumor viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Tornese Buonamassa, D., Greer, C. E., Capo, S., Yen, T. S. B., Galeotti, C. L. and Bensi, G.,** 2002. Yeast Coexpression of Human Papillomavirus Types 6 and 16 Capsid Proteins. *Virology.* **293**:335-344
- Touze, A., Mahe, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combata-Rojas, A., Bousarghin, L., Sizaret, P.-Y. and Coursaget, P.,** 2000. The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Micro Lett.*, **189**:121-127
- Townsend, A., Bastin, J., Gould, K., Brownlee, G., Andrew, M., Coupar, B., Boyle, D., Chan, S. and Smith, G.** 1988. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J Exp Med.* **168**:1211-1224
- van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M. C., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L. M. C., Ottenhoff, T. H. M., Fleuren, G. J., Kentner, G., Melief, C. J. M. and Offringa, R.,** 2001. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: Identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer.*, **91**:612-618
- van Driel, W. J., Rensing, M. E., Kenter, G. G., Brandt, R. M. P., Krul, E. J. T., van Rossum, A. B., Schuurung, E., Offringa, R., Bauknecht, T., Tamm-Hermelink, A., van Dam, P. A., Fleuren, G. J., Kast, W. M., Melief, C. J. M. and Trimbos, J. B.,** 1999. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer.*, **35**:946-952
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., De Witt, D. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C.,**

- Shiver, J. W., Montgomery, D. C. and Liu, M. A.**, 1993. Heterologous protection against influenza by infection of DNA encoding a viral protein. *Science*. **259**:1745-1749
- Unckell, F., Streeck, R. E. and Sapp, M.**, 1997. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol*. **71**:2934-2939
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B.**, 2000. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of viruses. The Seventh Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic press, San Diego
- Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C. and Schlegel, R.**, 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*. **75**:4467-4472
- Wagatsuma, M., Hashimoto, K. and 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
- Werness, B. A., Levine, A. J. and Howley, P. M.**, 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. **248**:76-79
- Wistuba, A., Weger, S., Kern, A. and Kleinschmidt, J. A.**, 1995. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol*. **69**:5311-9
- Yuan, H., Estes, P. A., Chen, J., Newsome, J., Olcese, V. A., Garcea, R. L. and Schlegel, R.**, 2001. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol.*, **75**:7848-7853
- Yuen, L. K. C. and Consigli, R. A.**, 1985. Identification and Protein Analysis of Polyomavirus Assembly Intermediates from Infected Primary Mouse Embryo Cells. *Virology.*, **144**:127-138
- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B. and Jansen-Dürr, P.**, 1995. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol*. **69**:6389-6399
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. and Jansen-Dürr, P.**, 1996. Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. **13**:2323-2330
- Zhang, B., Spandau, D. F. and 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, C., Tan, W., Sokolowski, M. and Schwartz, S.**, 1996. Identification of nuclear and cytoplasmic factors that interact specifically with an AU-rich, cis-acting inhibitory sequence in the 3' untranslated region of human papillomavirus type 1 late mRNAs. *J Virol*. **70**:3659-3667
- Zhou, J., Doorbar, J., X. Y. Sun, D. J., Crawford, L. V., McLean, C. S. and I. Frazer**, 1991b. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology.*, **185**:625-632
- Zhou, J., W. J. Liu, S. W. Peng, X. Y. Sun, and I. Frazer**, 1999. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol.*, **73**:4972-4982
- Zhou, J., Stenzel, D. J., X. Y. Sun, and I. Frazer**, 1993. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles *in vitro*. *J Gen Virol* . **74**:763-768
- Zhou, J., X. Y. Sun, D. J. Stenzel and I. Frazer**, 1991a. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 und L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology.*, **185**:251-257

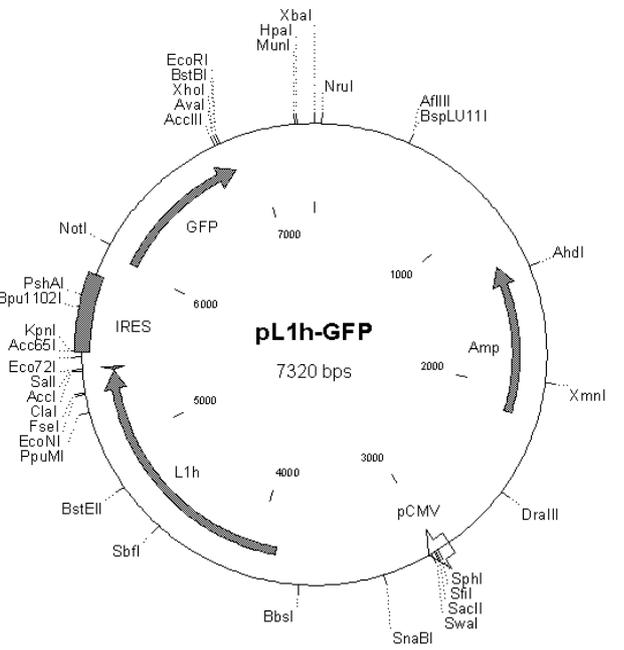
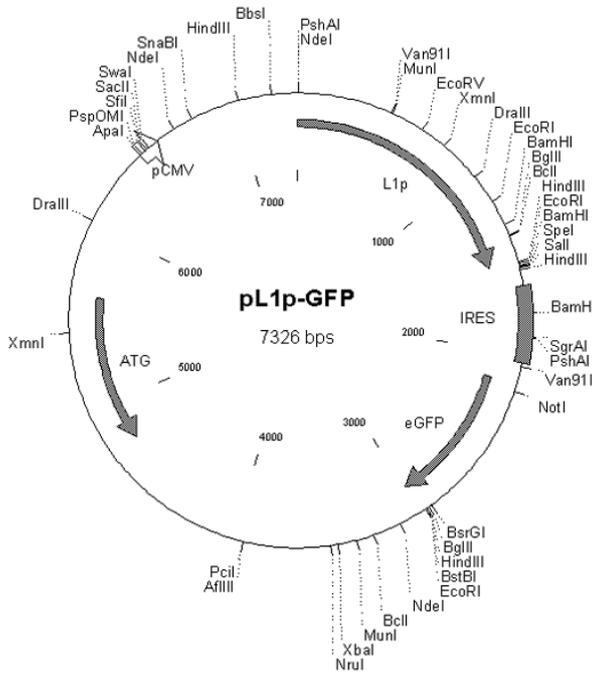
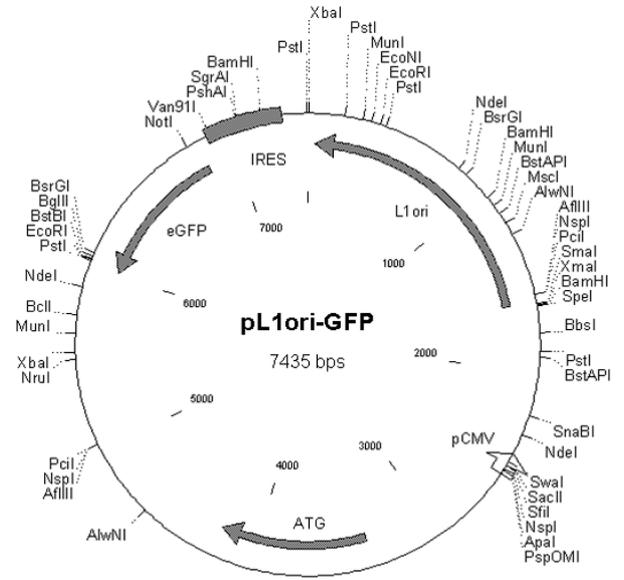
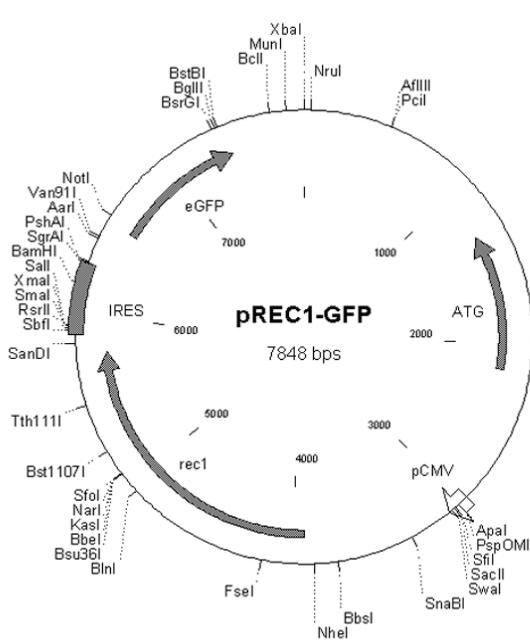
Zolotukhin, S., M. Potter, W. W. Hauswirth, J. Guy, und N. Muzyczka, 1996. A „humanized“ green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol.*, **70**:4646-4654

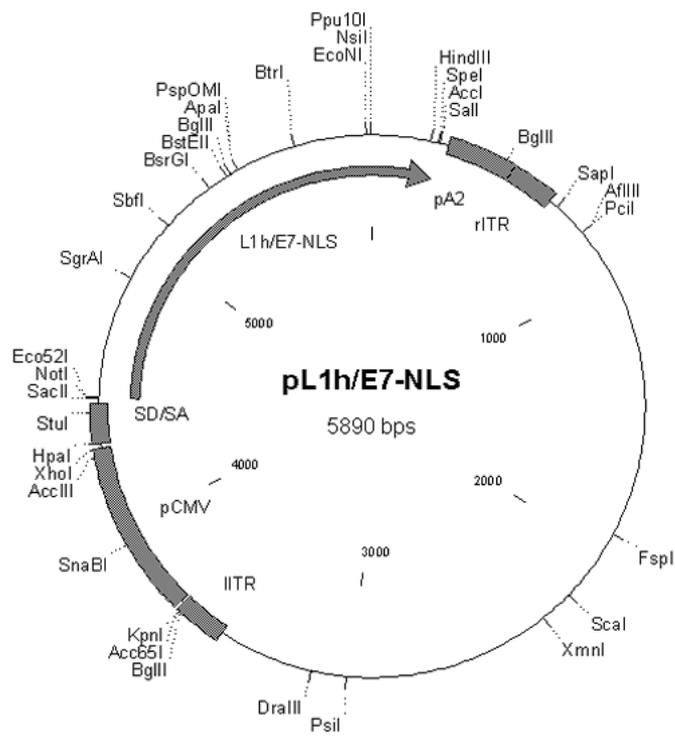
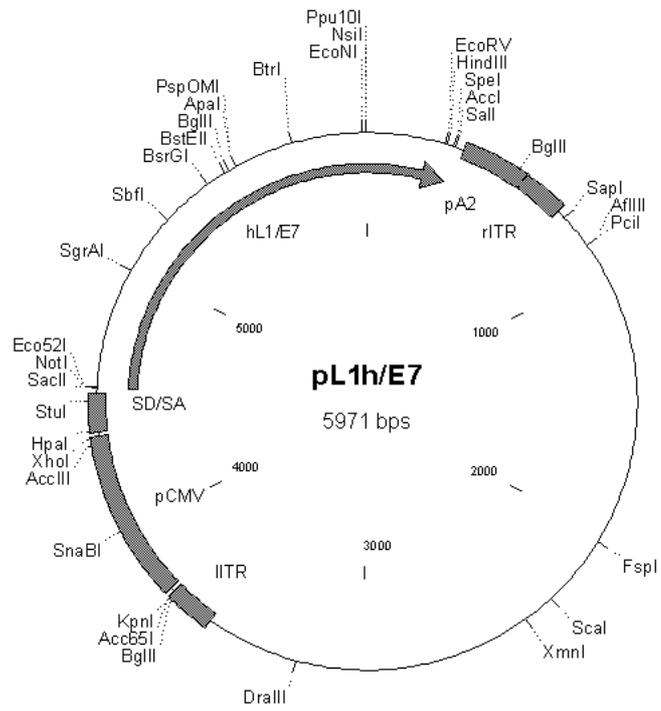
zur Hausen, H., 1977. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* **78**:1-30

zur Hausen, H., 2000. Papillomaviruses Causing Cancer : Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst.* **92(9)**:690-698

zur Hausen, H., 2002. Papillomaviruses and cancer : From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, **2(5)**:342-350

Zwerschke, W. and Jansen-Dürr, P., 2000. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: Interaction with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res.* **65**:1-29





7. Lebenslauf

von Christoph Leder, geb. am 31.03.1972 in Lüneburg

Schulbildung

1978-1991 Schulbildung: Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium

5/1991 Abitur

1991-1992 Wehrdienst

Studium

1992-1994 Studium der Chemie an der TU Braunschweig

SS/1994 Vordiplom Chemie

1994-1998 Studium der Biochemie an der Universität Hannover

WS/1995 Vordiplom Biochemie

10/1997-12/1997 Forschungspraktikum bei Prof. F. Markland, Dept. Biochemistry, University of Southern California, Los Angeles, USA

5/1998-11/1998 Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg

11/1998 Diplom in Biochemie

Promotion

2/1999-7/2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Thema der Diplomarbeit:

„Expression der Prostaglandin-H-Synthasen in neonataler Maushaut“;

durchgeführt in der Abteilung von Prof. F. Marks, Deutsches Krebsforschungszentrum

Thema der Doktorarbeit:

„Prophylaktische und Therapeutische Immunisierung gegen das humane Papillomvirus 16“;

durchgeführt in der Abteilung von Prof. J. Rommelaere bei PD Dr. J. Kleinschmidt, Deutsches Krebsforschungszentrum

8. Veröffentlichungen

aus Prioritätsgründen wurden Teile der Arbeit veröffentlicht:

Leder, C., Kleinschmidt, J. A., Wiethe, C. und Müller, M. 2001. Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes. *J Virol.* 75(19):9201-9209

Leder, C., Müller, M., Kuck, D. und Kleinschmidt, J. A. 2002. Prophylactic and Therapeutic DNA Immunization against HPV-16 Infections. 2nd Heinrich F. C. Behr Symposium “Infections and Human Cancers: Parasites, Bacteria and Novel Viral Agents”, Heidelberg, Nov 10-13, 2002. Conference Abstract und Poster

Patentanmeldung:

Müller, M., **Leder, C.**, Kleinschmidt, J. A., Sonnewald, U., Biemelt, Sophia:

Für die Expression in Eukaryonten optimierte HPV-16 L1 und HPV-16 L2 kodierende DNA-Sequenzen.

Aktenzeichen: DE01/03618

Danksagung

Diese Dissertation wurde in den Laboren von Priv.-Doz. Dr. Jürgen Kleinschmidt und Dr. Martin Müller im Institut für Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg im Zeitraum von Februar 1999 bis Mai 2003 angefertigt.

Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Bereitschaft, das Hauptreferat zu übernehmen und für den Rückhalt, der die Basis für mein selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten war.

Prof. Dr. K. Resch danke ich gleichzeitig für die Übernahme des Koreferates.

Dr. Jürgen Kleinschmidt danke ich für den Themenvorschlag, die engagierte wissenschaftliche Betreuung, den Freiraum bei den experimentellen Arbeiten und die hilfreiche Durchsicht von Teilen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Müller für die konsequente und entschiedene Unterstützung, die offenen Ratschläge, seine positive Haltung, insbesondere während und nach schweren Zeiten und natürlich konkret für diverse Plasmide, andere Materialien und die Durchsicht der Arbeit.

Für die produktive Arbeitsatmosphäre und die wichtige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei den zahlreichen Kollegen aus den beiden Arbeitsgruppen bedanken. Vielen Dank an Svenja Bleker, Dr. Ralf Dubielzig, Dr. Dirk Grimm, Andrea Kern, Dr. Jason King, Steffi Kronenberg, Lars Krüger, Dr. Dirk Kuck, Tobias Lau, Dr. Oliver Müller, Petra Pobersch, Kristin Schmitt, Florian Sonntag und Dr. Christiane Wobus aus der Kleinschmidt-Gruppe; sowie an Hinke Dekter, Petra Galmbacher, Marcel Jung, Diana Maas, Nico Michel, Katja Parsche, Georg Pougialis und Sabrina Schumacher aus der Müller-Gruppe!

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Birgit Hub für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Techniken, bei Dr. Hajo Delius für die Sequenzierungen der veränderten L1-Sequenzen und bei den Mitarbeitern des Zentralen Tierlabors des DKFZs für die Pflege der Versuchstiere.

Natürlich möchte ich mich bei meinen Angehörigen für ihre unerschütterliche Liebe und Unterstützung in all den Jahren - vor allem, als es „auf der Kippe“ stand – bedanken!

Ausserdem konnte ich mich auf den wichtigen Rückhalt mehrerer teurer Freunde verlassen. Christine, Hendrik, Ragen, Silvio und Susanne, danke für Eure Unterstützung!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, sowie die herangezogenen Hilfeleistungen Dritter vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Heidelberg, den

(Christoph Leder)