

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürden
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls - Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Diplom – Biologe Thorsten Steinberg

aus: Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

1. Herstellung von HPV-16 rekombinanten Pflanzenviren für die Produktion viraler Gene in Leguminosen

(Eine Alternative zu konventionellen Herstellungsverfahren für
die Produktion einer oralen Vakzine)

2. Modulation einer HPV-16-DNA-Vakzine

(Expression und Immunogenität)

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Ingrid Haas

Herrn Prof. Dr. L. Gissmann danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die kontinuierliche Betreuung und vielen Anregungen während meiner Promotion.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. I. Haas für die Übernahme des Gutachtens.

Mein Dank gilt weiter Dr. G. Lomonossoff für die Einführung in die pflanzenbiologischen Methoden und die wertvollen Ratschläge.

**Mein Dank geht auch an die Kollegen aus dem Labor 2.121, die mich auf meinem Weg während der Promotion begleitet haben.
Mein besonderer Dank geht an Peter Öhlschläger für die Unterstützung bei den immunologischen Methoden.**

INHALTSVERZEICHNIS

1.0	EINLEITUNG	1
1.1	Entdeckung und Humanpathogenese der Papillomaviren	1
1.2	HPV-Infektionen und die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs.....	3
1.3	Die genomische Organisation und Morphologie der Papillomaviren.....	4
1.4	Regulierung der Virusreplikation in der Wirtszelle	6
1.5	Die transformierende Aktivität der HPV- Onkoproteine.....	7
1.6	Das Onkoprotein E7 als Schlüsselprotein in der Transformation	7
1.7	Immunbiologie einer Papillomavirus-Infektion	9
1.8	Vakzinierungsstrategien zur Bekämpfung von HPV-Infektionen.....	14
1.8.1	DNA-Vakzinierung.....	15
1.9	Alternative Methode zur Herstellung einer oralen Vakzine gegen eine humane Papillomavirus-Infektion	17
1.9.1	Cowpea Mosaic Virus (CPMV): Ein Werkzeug für eine Pflanzen - Vakzine.....	18
1.9.2	Katalytische Peptidsequenz FMDV 2A integriert in das CPMV-Vektor-System	21
1.9.3	Agrobacterium tumefaciens integriert Fremd-DNA in das Pflanzen-Genom.....	22
1.10	Zielsetzung dieser Arbeit	24
1.10.1	Arbeitsprogramm	25
1.10.2	Infektions-Methoden von Pflanzen (Ergänzung zu 1.10.1, Abschnitt 2:)	25
2.0	MATERIAL	26
2.1	Abkürzungen	26
2.2	Chemische Reagenzien	27
2.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.4	Geräte	29
2.4.1	Zentrifugen.....	29
2.4.2	Sonstige Geräte.....	29
2.5	Radiochemikalien.....	30
2.6	Verwendete Kits	30
2.7	Antikörper	30
2.7.1	Primärantikörper	30
2.7.2	Sekundärantikörper	31
2.8	Nukleinsäuren und Enzyme	31
2.8.1	Plasmide.....	31
2.8.2	Oligonukleotid-Primer	35
2.8.3	Materialien für die Aufarbeitung von DNA.....	39
2.8.4	Plasmidschnellaufarbeitung / Plasmidgrossaufarbeitung mittels Kit ^{*1}	39
2.8.5	RNA-Isolierung aus Zellen/Pflanzen mittels Kit ^{*2}	39
2.8.6	DNA-Extraktion aus Agarosegele mittels Kit ^{*3}	40

2.8.7	Kit für die Reverse Transkription ^{*4}	40
2.8.8	LPS-Detektion/LPS-Entfernung	40
2.8.9	Enzyme	41
2.9	Größenstandards	41
2.9.1	DNA-Größenstandard	41
2.9.2	Protein-Größenstandard	42
2.10	Material für Immunisierung und immunologische Methoden	42
2.10.1	DNA-Immunisierung	42
2.10.2	Isolierung von Milzzellen	42
2.10.3	Zytotoxizitätstest	42
2.10.4	Synthetische Oligopeptide	43
2.10.5	Elispot-Assay (Enzyme-linked Immunospot Assay)	43
2.10.6	Detektion von gesamt IgG im Serum von C57BL/6 (H2 ^D) und BALB/c-Mäusen nach DNA-Immunisierung mittels GST-Capture ELISA	43
2.10.7	Mauslinien	44
2.11	Kultivierung von Zellen	44
2.11.1	Kulturmedien	44
2.11.1.1	Bakterienkultur	44
2.11.1.2	Bakterienstämme (E .coli, Agrobakterien)	44
2.11.1.3	Kultur eukaryotischer Zellen	45
2.11.1.4	Eukaryotische Zelllinien	46
3.0	METHODEN	47
3.1	Mikrobiologische Methoden	47
3.1.1	Aufbewahrung und Kultur von Bakterien	47
3.1.2	Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien	47
3.1.2.1	Herstellung elektrokompenter Agrobakterien	48
3.1.3	Bakterielle Transformation durch Elektroporation (E.coli)	48
3.1.3.1	Bakterielle Transformation durch Elektroporation (Agrobacterium tumefaciens)	49
3.2	Pflanzenbiologische Methoden	49
3.2.1	DNA-Inokulation in Primärblätter von <i>Vigna unguiculata</i> (Cowpea)	49
3.2.2	Agrobakterien-Inokulation in Primärblätter von <i>Nicotiana benthamiana</i> (Wildtabak)	50
3.3	Molekularbiologische Methoden	51
3.3.1	Plasmidschnellaufarbeitung (Plasmid-DNA-Minipräparation)	51
3.3.2	Plasmidgrossaufarbeitung (Plasmid-DNA-Maxipräparation)	52
3.3.3	Restriktionsverdau	52
3.3.4	Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	53
3.3.5	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Qiaex II Gel-Extraktions-Kit	54
3.3.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	54
3.3.7	Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden	55
3.3.8	Ligation von DNA	55
3.3.9	Phenol-Chloroform-Extraktion	56
3.3.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)	56
3.3.11	Fusions-PCR	58
3.3.12	RNA-Extraktion aus Pflanzenblättern	58
3.3.13	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	59
3.3.14	Herstellung einer ³² P-markierten DNA-Sonde	61
3.3.15	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)	61
3.3.16	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970	62
3.3.17	Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blot	63
3.4	Zellbiologische Methoden und Analyse	65
3.4.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	65
3.4.2	Kultivierung von NIH3T3 – und 293T-Zellen	65

3.4.3	Transfektion und transiente Expression in Eukaryonten	66
3.4.4	Durchflußzytometrie	67
3.4.5	SDS-Extrakte	68
3.4.6	Paraformaldehydfixierung für GFP	68
3.5	Tierexperimentelle Methoden	69
3.5.1	Anästhesie der Versuchstiere	69
3.5.2	Kardiotoxin-Applikation	69
3.5.3	DNA-Immunsierung	69
3.5.4	Blutentnahme mittels Herzpunktion	70
3.5.5	Tumor-Regressions-Experiment	70
3.5.6	Tumor-Protektions-Experiment	71
3.6	Immunologische Methoden.....	71
3.6.1	Milzentnahme und Anlegen von Milzzell-Kulturen	71
3.6.2	Inaktivierung von Zellen durch γ -Bestrahlung.....	72
3.6.3	In vitro Restimulierung von zytotoxischen T-Zellen	72
3.6.4	Bestimmung der spezifischen CTL-Aktivität durch ^{51}Cr Freisetzungssassay (Zytotoxizitätstest) [Engers et al., 1975]	73
3.6.5	Elispot-Assay (Enzyme-linked Immunospot Assay) [Lalvani et al., 1997]	74
3.6.6	GST Capture ELISA [Sehr et al., 2001].....	76
3.6.7	Statistische Auswertungen.....	78
4.0	ERGEBNISSE: HERSTELLUNG REKOMBINANTER PFLANZENVIREN	79
4.1	Herstellung rekombinanter CPMVs.....	79
4.1.1	Klonierung von HPV-16 Genen in pCP2/S-2A-GFP	79
4.1.2	Vorbereitung von pCP1 und pCP2/S-2A-HPV-16 für die Inokulation in Pflanzen.....	80
4.1.3	DNA-Inokulation in Blätter von <i>Vigna unguiculata</i> (Cowpea)	82
4.2	Herstellung rekombinanter <i>A.tumefaciens</i> -Plasmide	85
4.2.1	Klonierung von HPV16L1wt, L1 Δ C in binäres Agrobakterien-Plasmid	85
4.2.2	Inokulation von rekombinanten Agrobakterien in Blätter von <i>N.benthamiana</i>	87
4.2.3	Analyse von Pflanzenproben im Westernblot.....	89
4.2.4	RT-PCR-Analyse von mit rekombinanten Agrobakterien inokulierten Pflanzen.....	91
4.2.5	Herstellung von HPV16E7 aus Pflanzen-Kodons (E7pl) mittels Fusions-PCR.....	94
4.2.6	Agro-Inokulation von pBinPS2NT2AHPV16E7wt, E7pl und Analyse.....	96
5.0	ERGEBNISSE: OPTIMIERUNG DER HPV16 - DNA - VAKZINIERUNG	97
5.1	Herstellung eines kodonoptimierten (humanisierten) HPV16E7-Gens	97
5.1.1	Fusions-PCR mit überlappenden Oligonukleotid-Primern	99
5.1.2	Klonierung modifizierter HPV16E7-Gene in Expressionsvektoren.....	100
5.2	DNA-Immunsierung	101
5.2.1	DNA-Immunsierung mit HPV16E7-Konstrukten in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen ..	101
5.2.2	Elispot-Analyse nach DNA-Immunsierung.....	102
5.2.3	Evaluation der Immunogenität der HPV16E7-Konstrukte im Elispot	106
5.2.4	Analyse von funktionellen E7-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten	110
5.2.5	Detektion von HPV16E7-spezifischen Antikörpern mittels GST Capture ELISA	111
5.2.6	Tumorprotektions-Experiment	114
5.2.7	Tumorregressions-Experiment.....	116
5.3	Expression von HPV16E7-Konstrukten in vitro	118
5.3.1	Einfluss des Codon-Usage und der Kozak-Sequenz auf die HPV16E7-Protein Expression.....	118
5.3.2	Transfektion von HPV16E7-Konstrukten in 293T-Zellen (humane Nierenzellen).....	119
5.3.3	Transfektion der HPV16E7-Konstrukte in NIH3T3-Zellen (Mausfibroblasten).....	123
5.3.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Kotransfektionen	125
5.4	DNA-Immunsierung mit HPV16L1-DNA-Konstrukten.....	128
5.4.1	Unterschiedliche Immunogenität von modifizierten L1-Konstrukten analog zu den E7-DNA-Immunsierungen (siehe 5.2).....	128

6.0	DISKUSSION	133
6.1	Herstellung von HPV16L1-rekombinanten CPMVs.....	133
6.1.1	Homologe Rekombination.....	134
6.1.2	Silencing	135
6.1.3	Herstellung von HPV16E7-rekombinanten CPMVs	137
6.2	DNA-Immunisierung von kodonoptimierten HPV16E7-Konstrukten.....	138
6.2.1	Variation der zellulären Immunantwort nach Kodonoptimierung.....	139
6.2.2	Applikation und Modifikation bestimmt die Art der Immunantwort (TH1/TH2)	140
6.2.3	Transfektions-Experimente mit 293T-und NIH3T3-Zellen	142
7.0	ZUSAMMENFASSUNG	144
8.0	ANHANG	145
9.0	REFERENZEN	151

1.0 Einleitung

1.1 Entdeckung und Humanpathogenese der Papillomaviren

Die Infektiösität von Hautwarzen wurde schon lange vermutet, aber erst 1907 von Ciuffo nachgewiesen. Er brachte die Hautwarzen mit einer viralen Infektion in direkten Zusammenhang. Papillomaviren sind weit verbreitet und infizieren viele Wirbeltiere, wie Vögel und Amphibien [Sundberg et al., 1987]. Das erste beschriebene Papillomavirus war das Cottontail - Rabbit-Papillomavirus (CRPV), entdeckt 1933 von Richard Shope. Er fand heraus, dass die Infektion mit CRPV in direktem Zusammenhang mit der kutanen Papillomatosis beim Cottontail - Rabbit steht.

Beschränkt man sich auf die humanen Papillomaviren, sind alleine bis heute 85 HPV-Typen identifiziert und vollständig sequenziert. Mehr als 130 möglicherweise neue Typen wurden teilweise charakterisiert [de Villiers et al., 1997]. Inzwischen wurden sie als eigene Virusfamilie, die Papillomaviridae eingestuft [van Regenmortel et al., 2001].

Alle bisher identifizierten HPV-Typen sind strikt epitheliotroph. Sie infizieren ausschließlich Epithelzellen der Haut oder die Schleimhaut des Anogenital - und Respirationstraktes. Sie sind ausnahmslos wirts – und gewebsspezifisch und werden nach der Sequenz ihres Genoms klassifiziert, indem man die viralen offenen Leseraster der E6-, E7- und L1-Gene analysiert. Der Definition nach ist ein neuer Papillomavirus - Typ definiert, wenn er weniger als 90 % Sequenzhomologie mit irgendeinem anderen Papillomavirus zeigt [Tilston et al., 1997]. Eine engere Verwandtschaft klassifiziert man als Subtyp des Typen mit der größeren Homologie.

Das klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit humanpathogenen Papillomviren (HPV) unterliegt einer großen Variation. Man kann diese Viren grob in mukosotrope - und kutane HPV-Typen unterteilen, abhängig von dem Gewebe, das sie infizieren. Sie können Warzen verursachen (gutartig wuchernde Proliferationen), die im allgemeinen nach einer Weile von selbst wieder zurückgehen. Eine Warze besteht aus einer lokal begrenzten epithelialen Hyperplasie mit einer intakten Basalmembran. Es finden sich in ihr alle differenzierten Schichten eines intakten Epithels. Es besteht aus der Basallamina, die die einzigen Zellen beinhaltet, deren Fähigkeit zur Zellteilung unverändert bleiben. Nach außen folgt das verbreiterte Stratum spinosum (siehe Abb. 1). Die darauf folgende granulöse Schicht (Stratum granulosum) enthält zahlreiche vakuolisierte Zellen mit Kernveränderungen, worauf sich das Stratum corneum anschließt. Die Infektion mit PV erfolgt wahrscheinlich durch kleine Verletzungen der Haut oder der Schleimhaut, wodurch die Basalzellen infektiösen viralen

Partikeln ausgesetzt werden. Das Virus stimuliert die Proliferation der Basalzellen, was die Bildung einer Warze verursacht. Im verhornten Plattenepithel der Haut werden durch die HPV-Typen 1, 2 und 4 Warzen (verrucae plantares) hervorgerufen.

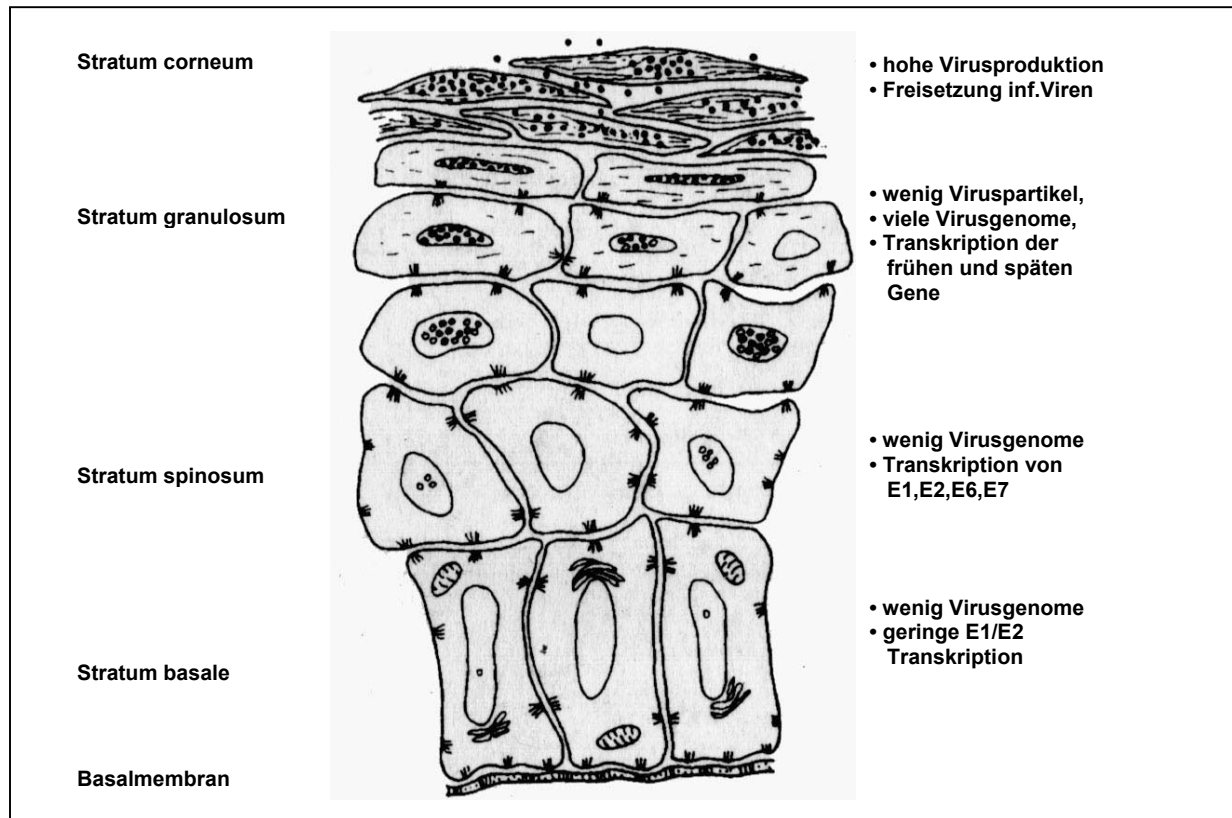


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Epidermis und die darin vorkommende Verteilung der viralen Proteine in den entsprechenden Schichten. Der virale Lebenszyklus geht mit dem Differenzierungsgrad der Epithelzellen einher. Entnommen aus <http://biosun.bio.tu-darmstadt.de/Kletzin-Lehre.html>.

Der Infektionszyklus aller HPV-Typen ist eng an den Differenzierungsstatus des Epithels gebunden (siehe Abb. 1). Die Infektion erfolgt über Verletzungen der Haut. Dabei werden Zellen des Stratum basale infiziert. Dort etabliert sich das Virus-Genom extrachromosomal mit ca. 50-100 Kopien pro Zelle [Dürst et al., 1985]. Wenn sich die Basalzellen teilen, wird die virale DNA auf die Tochterzellen verteilt. Eine der beiden Tochterzellen durchläuft keine weitere Mitose und wandert vom Stratum basale ins Stratum spinosum, wo die Differenzierung der Keratinozyten beginnt. Die andere Tochterzelle verbleibt im Stratum basale, teilt sich weiter und ist somit für die Persistenz des viralen Genoms verantwortlich. Mit der Ausdifferenzierung der Zelle beginnt im Stratum granulosum die vermehrte Replikation des Virus-Genoms, die Synthese der Kapsidproteine und die Aggregation der Viruskapside [Stubenrauch et al., 1999]. Die Virionen werden letztendlich von sich ablösenden Zellen des Stratum corneum freigesetzt (siehe Abb. 1).

Der Rezeptor, der den HPV-Eintritt in die Epithelzellen vermittelt, wurde bisher nicht zweifelsfrei identifiziert, obwohl $\alpha_6\beta_4$ -Integrin (vermehrt exprimiert während der Wundheilung) als potentieller Kandidat gehandelt wird [Evander et al., 1997]. Es wurde allerdings bisher in keinem Experiment gezeigt, dass er den Virus-Eintritt tatsächlich vermittelt. Weiterhin ist bekannt, dass HPV-Virionen an Heparin binden, ein ubiquitäres Polysaccharid, welches für das erste „Andocken“ des Virus verantwortlich sein könnte, gefolgt von der Internalisierung [Joyce et al., 1999]. Als ein weiterer Rezeptor wurde der Fc γ -Rezeptor ins Gespräch gebracht, der auf Humanen- und Maus-Immunzellen (T- und B-Zellen, Granulozyten, unreife dendritische Zellen) exprimiert wird und die Bindung von HPV-Virionen vermittelt [Da Silva et al., 2001]. Der Fc γ -Rezeptor reagiert normalerweise mit Antigen-Antikörper-Komplexen und vermittelt ihre Internalisierung zur intrazellulären Prozessierung der Antigene. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Bindung von VLPs die Reifung von unreifen dendritischen Zellen induzieren kann, was wiederum zur Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen und zur Sekretion von Th1-stimulierenden Zytokinen führt [Rudolf et al., 2001].

Die HPV - Typen, die man mit der Schleimhaut in Verbindung bringt, werden in „low-risk“- und „high-risk“-Typen eingeteilt. Zu den „low-risk“-Typen zählen HPV-6 und 11, man findet sie zu über 90 % in benignen anogenitalen Warzen (Condyloma acuminata; Feigwarzen) und in sog. SILs (low grade squamous intraepithelial lesions). Außerdem verursachen sie Papillome am Larynx und in der Mundschleimhaut. In seltenen Fällen entarten diese Läsionen (nicht bei low-risk) und es entsteht Gebärmutterhalskrebs oder Krebs im Respirationstrakt. Molekulare Analysen von Isolaten aus Krebspatienten, die positiv für HPV-11 und 6 sind, zeigen genomische Veränderungen, die zur Erhöhung ihres pathogenen Potentials geführt haben könnten [DiLorenzo et al., 1992; McGlennen et al., 1992; Rando et al., 1986]. Zu den „high-risk“-Typen, die von großer Bedeutung für den Gebärmutterhalskrebs sind, gehören HPV-16 und 18, die als Hauptursache für dessen Entstehung gelten. Auch andere HPV-Typen, z.B HPV-31, 45, 52 und 58, führen zu genitalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), sie werden aber auch in prämaligen Läsionen der Zervix gefunden.

1.2 HPV-Infektionen und die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs

Humane Papillomaviren, die den Genitaltrakt infizieren, sind für die Krebsentstehung im Anogenitaltrakt (z.B Gebärmutterhalskrebs) beim Menschen verantwortlich. Studien in 22 Ländern identifizierten HPV-DNA in fast allen (99,7 %) von ca. 1000 Gebärmutterhalskrebs-

Patientinnen [Walboomers et al., 1999]. Dabei ist HPV-16 der am häufigsten gefundene HPV-Typ (ca. 50 %) in diesen Tumoren. Annähernd 500.000 Frauen erkranken jedes Jahr an Gebärmutterhalskrebs und 200.000 Frauen sterben jedes Jahr an dieser Krankheit. Demnach ist sie die weltweit zweithäufigste Todesursache, die mit Krebs in Zusammenhang gebracht wird [Pisani et al., 1993].

HPV-18 ist nur sehr selten in milden intraepithelialen Neoplasien (CIN) zu finden, aber um so mehr in CINIII-Läsionen (schwere Dysplasie oder in-situ-Karzinom genannt) und im Gebärmutterhalskrebs (25 %) [Arends et al., 1993; Barnes et al., 1988]. Diese Befunde reflektieren einen schnelleren Krankheitsverlauf bei HPV-18-Läsionen [Arends et al., 1993]. Die DNA von „low-risk“ HPV Typen wurde zumeist nur aus benignen Läsionen isoliert. So sind HPV-11 und HPV-6 zusammen, für die meisten genitalen Condylome und nahezu für alle Kehlkopf-Papillome verantwortlich [Shah et al., 1992]. Mindestens 20 kutane HPV-Typen sind ausschließlich mit der erblichen Krankheit Epidermodyplasia verruciformis (EV) assoziiert.

Die Zeitspanne zwischen einer Erstinfektion und der Entartung zum Krebs kann mitunter sehr lange sein, beim Zervixkarzinom im Durchschnitt 17 Jahre [Ylitalo et al., 2000]. Oftmals sind Co-Faktoren für die Entartung von benignen Tumoren verantwortlich.

- 1) Hautkrebs verursacht durch Infektionen mit HPV-5 und 8 in EV-Patienten tritt häufig in Läsionen auf, die dem Sonnenlicht ausgesetzt waren [Pfister et al., 1992].
- 2) Patienten mit Papillomen im Respirationstrakt wurden in der Vergangenheit mit Röntgenstrahlung behandelt, um die Tumorgröße zu reduzieren. Sie haben allerdings dadurch ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Krebs [Galloway et al., 1960].

1.3 Die genomische Organisation und Morphologie der Papillomaviren

Trotz der großen Diversität besitzen Papillomaviren einen hohen Grad an Übereinstimmung in ihrer Nukleotidsequenz (Homologie). Ihre Genome von ca. 8kB sind in ähnlicher Weise organisiert. Es variieren nur die Länge der einzelnen Leseraster, sowie die Positionen wichtiger Promotoren. Das Genom besteht aus drei funktionell verschiedenen Regionen; die späte und frühe Region. Sie beinhalten die beiden Gene L1 und L2, die für die Strukturproteine kodieren und die bis zu 7 offenen Leseraster (ORF; open reading frame), die für die frühen Proteine kodieren, zuständig für die Virus-DNA-Replikation und die Kontrolle der viralen Genexpression. Außerdem beinhaltet das Genom eine ca. 1kB große Region, die man als URR (upstream regulating region) oder LCR (long control region) bezeichnet. In der

URR befindet sich der ori für die Replikation des viralen Genoms und die Promotoren für die Expression der viralen Transkripte.

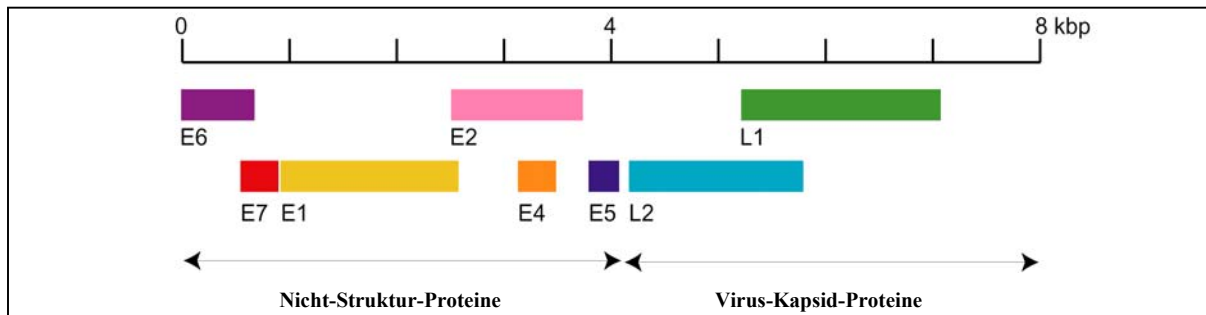


Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung des HPV-16 Genoms in linearisierter Form. Die offenen Leseraster zeigen die frühen Gene E1-E7 und die späten Gene L1 und L2, wobei E4 inzwischen zu den späten Genen gezählt wird. Entnommen aus Expert Reviews in Molecular Medicine, Stepan Man, 1998.

Die Virushülle besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 52-55 nm, bestehend aus dem Hauptstrukturprotein L1 und dem Strukturprotein L2. Das molare Verhältnis von L1:L2 wird auf 30:1 geschätzt [Hagensee et al., 1993; Kirnbauer et al., 1993]. L2 ist für die Bindung und Enkapsidierung des Virus-Genoms verantwortlich [Zhou et al., 1994; Zhao et al., 1998] und trägt entscheidend zum Internalisierungsprozess bei [Kawana et al., 2001]. Betrachtet man ein einzelnes Kapsid (siehe Abb. 1-2), besteht es aus 72 L1-Pentameren, den Kapsomeren und insgesamt aus 360 L1-Molekülen. Die 12 L2-Moleküle befinden sich dagegen inmitten der pentavalenten Kapsomere [Trus et al., 1997]. Pentavalente Kapsomere koordinieren 5 Kapsomere, wogegen hexavalente 6 benachbarte Kapsomere haben, obwohl sie nur aus fünf Untereinheiten bestehen [Belnap et al., 1996].

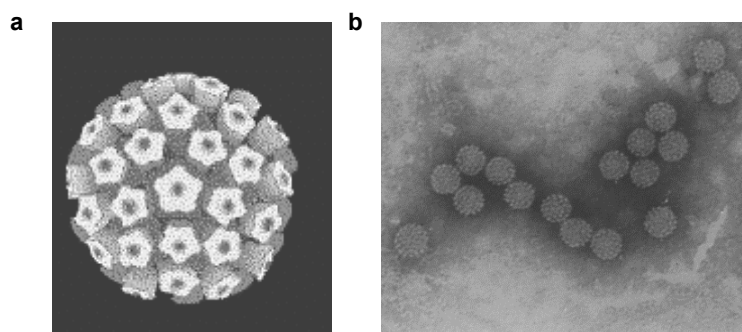


Abbildung 1-2: (a) Computermodell eines HPV-Kapsids, basierend auf Röntgenstrukturanalysen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Entnommen aus <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>. (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV-16 Virionen, kontrastiert mittels „Negativ-Staining“. Entnommen aus <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/3035pics/Papilloma.gif>.

1.4 Regulierung der Virusreplikation in der Wirtszelle

In Folge einer HPV-Infektion werden zunächst die Proteine E1 und E2 exprimiert. Sie spielen hauptsächlich beim produktiven Infektionszyklus eine Rolle. Das Phosphoprotein E1, mit einer Größe von 70-80kDa, ist für die Initiation der Replikation verantwortlich und besitzt sowohl eine Helikase, als auch eine ATPase Aktivität [Del Vecchio et al., 1992; Chiang et al., 1992]. E1 bindet nur mit einer sehr schwachen Affinität an den viralen ori. Diese Bindung wird durch die Interaktion mit E2 verstärkt, das wiederum mit einer sehr hohen Affinität an den ori bindet [Mohr et al., 1990; Frattini et al., 1994]. E2 wird nach der Rekrutierungshilfe wieder freigesetzt und E1 initiiert mit Hilfe der zellulären DNA-Polymerase die Replikation des Virus-Genoms [Park et al., 1994; Masterson et al., 1998].

Die E2 Proteine, bestehend aus 3 funktionellen Domänen, sind innerhalb der Papillomaviren einigermaßen gut konserviert und sind für die virale Transkription zuständig.

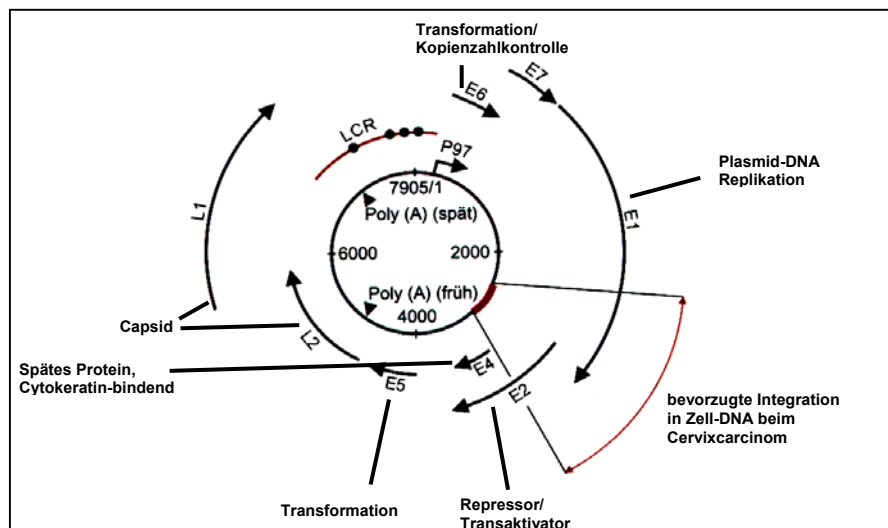


Abbildung 1-3: Zirkuläres Genom von HPV16 mit den frühen Genen E1-E7 und den späten Genen E4, L1 und L2. Angezeigt sind die Hauptaufgaben der jeweiligen kodierten Proteine. E1-E2-Leserraster wird durch die Insertion unterbrochen. Entnommen aus <http://biosun.bio.tu-darmstadt.de/Kletzin-Lehre.html>.

Der N-Terminus beinhaltet die Transaktivierungs-Domäne [Bouvard et al., 1994], der C-Terminus fungiert als Dimerisierungs-Domäne, sowie als DNA-Bindedomäne, an die E2 als Dimer bindet. Die zwischengelegene Region bindet an palindromische Promotor-Sequenzen in der URR und unterdrückt dadurch die Transkription der E6- und E7-Gene [Cripe et al., 1987; Gloss et al., 1989]. Wahrscheinlich wird auf diese Weise im viralen Infektionszyklus von der frühen auf die späte Genexpression umgeschaltet.

In HPV-assoziierten Karzinomen liegt das HPV-Genom meistens in seiner integrierten Form vor und nicht episomal. Die Integrationsstelle liegt meist im E1/E2-Leseraster, welches dabei

unterbrochen wird. Aus diesem Grund kann die Expression von E6 und E7 nicht mehr inhibiert werden [Francis et al., 2000; Nishimura et al., 2000]. Beide Proteine werden in diesen Tumoren konstitutiv exprimiert [Schwarz et al., 1985] und greifen über verschiedene Interaktionen mit zelleigenen Proteinen in den Zellzyklus ein.

1.5 Die transformierende Aktivität der HPV- Onkoproteine

Das onkogene Potential der E6 und E7 Proteine der „high risk“ HPV-Typen resultiert hauptsächlich aus deren Fähigkeit, mit zellulären Proteinen zu interagieren und somit deren Funktion zu beeinflussen. Auf diese Weise inhibieren E6 und E7 die Aktivität der zellulären p53 und RB Tumorsuppressor Proteine. p53 und pRB kontrollieren den Zellzyklus und induzieren Apoptose. Ihre Inaktivierung durch E6 und E7 stellt die Hauptursache für die Entartung einer infizierten Zelle dar. Die kontinuierliche Expression von E6/E7 ist notwendig, um die Zelle in einem proliferierenden und anti-apoptotischen Zustand zu erhalten [Francis et al., 2000; Butz et al., 2000; Hietanen et al., 2000].

Die Fähigkeit von HPV beide Proteine p53 und pRB zu manipulieren, erlaubt dem Virus die Zell-Replikation zu stimulieren, was in einer verstärkten Replikation des Virus-Genoms resultiert, während gleichzeitig Apoptose in infizierten Zellen unterdrückt wird. E6/E7 sind möglicherweise sogar bei der episomalen Replikation der viralen DNA beteiligt [Thomas et al., 1999]. In Tabelle 1-1 sind die bisher bekannten Interaktionen von E6 und E7 mit zellulären Proteinen zusammengefasst.

1.6 Das Onkoprotein E7 als Schlüsselprotein in der Transformation

Das E7-Protein war das erste „high risk“ HPV-Onkogen, das entdeckt wurde. Man fand heraus, dass es Nager-Fibroblasten transformiert [Bedell et al., 1989; Phelps et al., 1988; Schiller et al., 1986] und in Kooperation mit dem *ras*-Onkogen sogar primäre Fibroblasten transformieren kann [Matlashewski et al., 1987; Phelps et al., 1988]. In Kombination mit dem „high risk“ E6-Protein verlängert E7 die Lebensdauer von primären humanen Zellen [Hawley-Nelson et al., 1989; Münger et al., 1989].

E7 ist notwendig, um HPV-infizierte zervikale Krebszelllinien in ihrem proliferativen Zustand zu behalten [Francis et al., 2000; Crook et al., 1989; Alvarez-Salas et al., 1998]. Das E7-Protein hat 98 Aminosäuren und beinhaltet genauso wie E6, zwei Zinkfinger-Bindemotive an seinem C-Terminus [Barbosa et al., 1996; McIntyre et al., 1993]. Normalerweise ist das E7-

Protein durch die Casein-Kinase II phosphoryliert [Barbosa et al., 1990] und in einer Vielzahl von verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert (Zytoplasma dem Nukleus und den Nukleoli) [Smotkin et al., 1986; Zatsepina et al., 1997; Greenfield et al., 1991; Dyson et al., 1989]. E7 kann mit vielen zellulären Proteinen interagieren, wie z.B pRB, p107, p130, Cyklin A, Cyklin E und AP-1 (siehe Tab. 1-1). Betrachtet man die natürlichen Funktionen dieser zellulären Proteine, kann man feststellen, dass die Hauptaufgabe des E7-Proteins wohl darin besteht, die normale Zellzyklus-Kontrolle außer Kraft zu setzten. Eine entscheidende Beobachtung für die Funktion von E7 war die Demonstration, dass E7 an pRB und an Retinoblastoma-Protein-ähnliche „pocket“-Proteine (haben eine ähnliche Bindedomäne, „Tasche“) bindet [Dyson et al ., 1992]. Diese Bindung resultiert in der Phosphorylierung dieser Proteine und ihrer verstärkten Degradation durch Ubiquitinierung [Boyer et al., 1996], sowie in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, was wiederum zur Aktivierung der Gene führt, die die Zellproliferation regulieren [Bagchi et al., 1990; Bandara et al., 1991].

Tabelle 1: Interaktion von E6/E7 mit zellulären Proteinen

Virales Onkoprotein	Interaktions-Partner	Referenz
E6	p53 E6-assoziiertes Protein ERC55 hDLG Paxillin	Werness et al., 1990 Scheffner et al., 1993 Chen et al., 1995 Kiyono et al., 1997 Tong and Howley, 1997
	Interferon-regulierender Faktor 3 Bak E6TP1	Ronco et al., 1998 Thomas and Banks, 1999 Gao et al., 1999
E7	Retinoblastoma Protein (Rb) Rb-zugehörige "pocket"-Proteine E2F/Cyclin A Komplex Histone H1 Kinase TATA Box-Binde-Protein Cyclin E Subunit 4 (S4) Adenosin-Triphosphatase c-jun hTid-1 Mi2 (Histone-Deacetylase-Komplex) M2-Pyruvate-Kinase p48	Dyson et al., 1989 Dyson et al., 1992 Arroyo et al., 1993 Davies et al., 1993 Massimi et al., 1996 McIntyre et al., 1996 Berezutskaya and Bagche, 1997 Nead et al., 1998 Schilling et al., 1998 Brehm et al., 1999 Zwerschke et al., 1999 Barnard and McMillan, 1999
	Entnommen/Modifiziert aus zur Hausen, Review 2000 in J. of the National Cancer Institute	

E7-Proteine von "high-risk" HPV-Typen wurden auch in Cyklin E-und Cyklin A-Komplexen gefunden (siehe Tab. 1). Die Aktivierung von Cyklin E, gefolgt von der Aktivierung von Cyklin A, wird durch E7-Sequenzen vermittelt, die für die Transformation verantwortlich sind [Zerfass et al., 1996]. Die E7-Expression in infizierten Zellen zerstört den Kontrollpunkt von der G₁ zur S-Phase wahrscheinlich durch die veränderte Regulation von Cyklin E [Martin et

al., 1998]. Weitere Funktionen und Auswirkungen auf die infizierte Zelle sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

Tabelle 1-1: Interaktion von E6/E7 mit zellulären Proteinen		
Virales Onkoprotein	Identifizierte Funktion	Referenz
E6	<ul style="list-style-type: none"> · Zell-Immortalisierung · Binding of E6-assozierte Protein resultiert in Degradation von bestimmten Proteinen(p53) · Antiapoptitischer Effekt · Chromosomale Destabilisierung · Verstärkte Integration von Fremd-DNA und Mutagenese · Aktivierung der Telomerase · Blockade der Interferon-Funktionen (?) 	<p>Band et al., 1990 Werness et al., 1990 Scheffner et al., 1993</p> <p>Werness et al., 1990 Thomas and Banks, 1998 White et al., 1994 Kessis et al., 1996 Havre et al., 1995 Klingelutz et al., 1996 Ronco et al., 1998</p>
E7	<ul style="list-style-type: none"> · Zell-Immortalisierung · Aktivierung von Cyclin E und A · Inaktivierung von Retinoblastoma assoziierten „pocket „-Proteinen · Induktion der Apoptose · Inhibition des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors · Verstärkte Integration von Fremd -DNA und Mutagenese · Degradation der Tyrosine-Kinase BIK (?) 	<p>Münger and Phelps, 1993 Arroyo et al., 1993 Zerfass et al., 1995 Dyson et al., 1989, 1992</p> <p>Puthenveetil et al., 1996 Jones et al., 1997 Funk et al., 1997 Kessis et al., 1996 Reznikoff et al., 1996 Oda et al., 1999</p>
Entnommen/Modifiziert aus zur Hausen, Review 2000 in J. of the National Cancer Institute		

1.7 Immunbiologie einer Papillomavirus-Infektion

Eine HPV-Infektion der Zervix, verursacht durch die HPV-Typen 16 und 18, kann zur Entwicklung vom Zervixkarzinom über die *in situ*-Stadien CIN I-III führen. Man detektiert die beiden HPV-Typen in fast 70 % der Fälle [Bosch et al., 1995]. Bei immunkompetenten Patienten bleibt eine Infektion meistens asymptomatisch und verschwindet wieder. Sogar in Fällen, in denen eine Infektion zu Dysplasien geführt hat, bilden sich Läsionen spontan zurück, besonders bei CIN I-Stadien und bei jungen Patientinnen [Syrjänen et al., 1996; Duggan et al., 1998]. Die Persistenz des Virus-Genoms ist auf der anderen Seite assoziiert mit der Entwicklung von Läsionen, die sich zum invasiven Zervixkarzinom entwickeln können [Ho et al., 1995; Remmink et al., 1995]. Es gibt Hinweise, warum die meisten Menschen die Virus-Infektion wieder eliminieren, einige wenige aber nicht. In der Minderheit der Fälle kommt es zu einer persistierenden HPV-Infektion und CIN können sich entwickeln. Diese Entwicklung resultiert in einer verstärkten Expression von immunsupprimierenden Zytokinen IL-10, TGF-β1 und PGE-2 [Jacobs et al., 1998; Mota et al., 1999; Sales et al., 2001], sowie in einem Mangel an pro-inflammatorischen Zytokinen TNF-α [Mota et al., 1999]. Kommt es

nun zum Aufeinandertreffen von HPV-Antigenen und dem Immunsystem in einer Phase, in der immunsupprimierende - über pro-inflammatorische Signale dominieren, wird die Reifung und Aktivierung von LC (Langerhansche Zellen) inhibiert. Die Konsequenz ist, dass das Immunsystem zu spät und somit sehr ineffektiv reagiert [Reviewed S.H. van der Burg et al., 2002]. Die Beteiligung des Immunsystems an der Kontrolle von HPV Infektionen wird bestätigt durch Beobachtungen an immunsupprimierten Patienten, bei denen eine auffallende Häufung an HPV-Läsionen beobachtet wurde [Petry et al., 1994].

HIV-Patienten zeigen häufig einen Rückgang einer zervikalen HPV-Infektion [Fruchter et al., 1996], auf der anderen Seite allerdings ein vermehrtes Auftreten von Genitalwarzen [Fennema et al., 1995], was anscheinend das Risiko erhöht, bei einer Infektion vom subklinischen zum klinischen Phänotyp überzuwechseln [Chirgwin et al., 1995]. Es gibt aber auch Untersuchungen von Transplantat-Empfängern und HIV-infizierten Patienten die belegen, [Palefsky et al., 1999] dass ein Defizit an $CD4^+$ T-Zellen ein größeres Risiko für eine HPV-induzierte Krankheit darstellt, die sich zu einer neoplastischen Progression entwickeln kann. Dies deutet daraufhin, dass $CD4^+$ T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Regulierung einer HPV-Infektion spielen.

Für Warzen die nicht spontan zurückgehen ist charakteristisch, dass sie relativ wenige eingewanderte Immunzellen haben. Die wenigen intraepithelialen Lymphozyten sind $CD8^+$ T-Zellen. Bei Warzen, die sich spontan zurückbilden, wird das Stroma, sowie das Epithel massiv von mononuklearen Zellen infiltriert. Dominiert wird dieser Einstrom an Zellen von $CD4^+$ T-Zellen. Es sind allerdings auch einige $CD8^+$ T-Zellen dabei. Die infiltrierenden Lymphozyten sind aktiviert und exprimieren den IL2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche [Stanley et al., 2001]. Zytotoxische T-Zellen (CTLs) spielen bei der Bekämpfung einer viralen Infektion eine bedeutende Rolle. Gewöhnlich sind CTLs $CD8$ positiv (exprimieren den $CD8$ -Rezeptor auf ihrer Oberfläche) und erkennen fremde virale Antigene auf der Oberfläche von virusinfizierten Zellen in Form von kurzen Peptiden, gebunden an MHC-Klasse I-Moleküle (major histocompatibility complex). Beim Menschen nennt man diese Moleküle HLAs (human leukocyte antigens). Die Präsentation für die Erkennung von $CD8^+$ -Zellen erfolgt über den MHC-Klasse I-Weg (siehe Abb. 1-4).

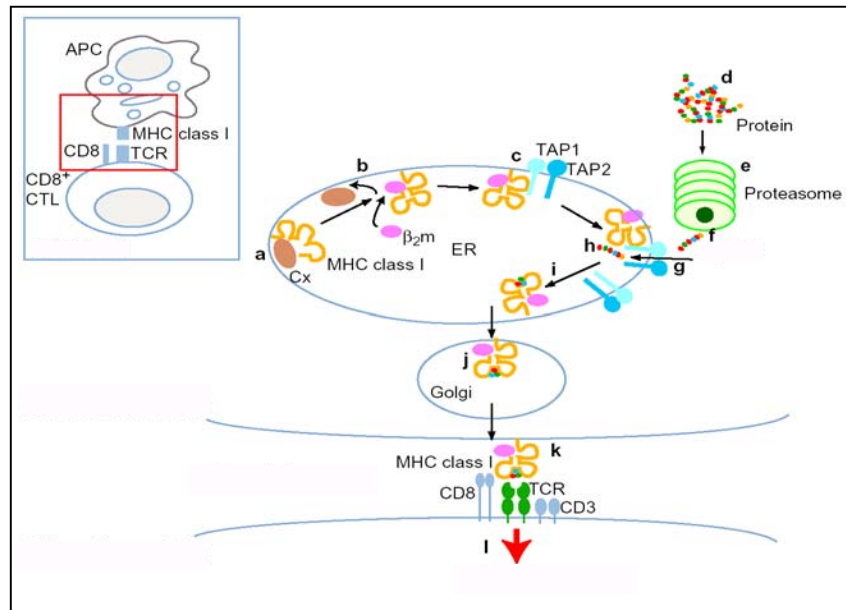


Abbildung 1-4: Degradation und Transport von Antigenen, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden: (a) In einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) binden neu-synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle an Calnexin (Cx), welches sie teilweise-gefaltet im Endoplasmatischen Reticulum (ER) zurückhält. (b) Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen an β_2 -Mikrotubulin (β_2m) und ersetzt Calnexin und erlaubt die Bindung von weiteren Chaperonen. (c) Der MHC-Klasse-I- β_2m -Komplex bindet an den TAP-Komplex (TAP1-TAP2), der die Ausschleusung der Peptide vermittelt. (d) Peptide z.B. von viralen Antigenen, werden durch Degradation von zytosolischen Proteinen gebildet. (e) Die viralen im Zytoplasma synthetisierten Proteine werden von Proteasomen (f) in kurze (8-10 Aminosäuren) Peptide gespalten. (g) Die Peptide werden von den TAPs in das ER transportiert, wo sie dann auf die MHC-Klasse-I- β_2m -Komplexe treffen (h). Die Peptide binden in der sog. Antigenen-Grube der MHCs und stabilisieren so die MHC-Klasse-I-Moleküle, (i) um anschließend über die TAPs das ER zu verlassen. (j) Das vollständig gefaltete MHC-Klasse-I-Molekül mit Peptid beladen wird mittels Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. (k) Dort angelangt, findet die Erkennung des MHC-Klasse-I-Komplexes durch den T-Zellrezeptor (TCR) einer antigen-spezifischen ($CD8^+$, $CD3^+$) zytotoxischen T-Lymphozyte (CTL) statt. (l) Eine Signalkaskade aktiviert nun die MHC-Klasse-I-restringierte Zelle, was allerdings noch eine Co-Stimulation erfordert (B7.1 / B7.2 Rezeptor). Modifiziert aus Molecular Medicine, Stephan Man, 1998 (<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

Die Prozessierung und Präsentation von exogenen Antigenen geschieht normalerweise im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen. Der Komplex aus Klasse II-Molekül und invarianter Kette wird im ER gebildet und zu einem lysosomalen Kompartiment transportiert, in welchem die invariante Kette degradiert und somit erst Platz für die Beladung mit dem Peptid geschaffen wird. An der Zelloberfläche werden die peptidbeladenen MHC-Klasse-II-Moleküle durch $CD4^+$ T-Zellen erkannt (siehe Abb. 1-5). T-Helferzellen sind gewöhnlich $CD4$ positiv. Sie können Zytokine ausschütten, die B-Plasma-Zellen dazu anregen Antikörper zu produzieren oder sie sezernieren Zytokine (IL-12, $IFN\gamma$), um die $CD8^+$ CTL- Antwort zu unterstützen. Sie können weiterhin eine gegen Pathogene gerichtete inflammatorische Antwort auslösen. Auf diese Weise werden wahrscheinlich auch HPV-Proliferationen zur Regression gebracht, die eine intakte Basallamina aufweisen. Die inflammatorischen Zytokine diffundieren durch die intakte Basallamina und rufen im Epithel eine entsprechende Wirkung hervor. $IFN-\alpha$ wirkt z.B. auf virale Promotoren supprimierend.

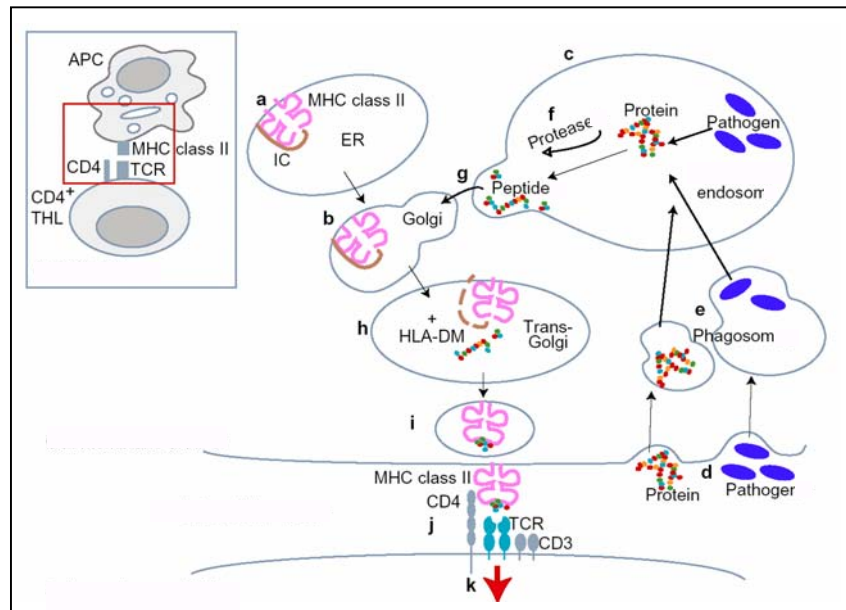


Abbildung 1-5: Degradation und Transport von Antigenen, die an MHC-Klassell-Moleküle binden: (a) In einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) binden neu-synthetisierte MHC-Klassell-Moleküle an die invariante Kette (IC), was die Bindung von Peptiden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verhindert. (b) Die IC erlaubt den Transport von MHC-Klassell-Molekülen von ER in den Golgi-Apparat in die sog. azidifizierte Endosomen. (c) Endosomen enthalten Peptide von exogenen endozytierten (d) Antigenen oder extrazelluläre Proteine (Pathogene) in (e) Phagosomen. (f) Proteasen in den Endosomen degradieren die Proteine in Peptide. (g) Die Endosomen fusionieren mit dem Golgi und bilden den trans-Golgi. (h) In diesem Kompartiment wird die invariante Kette vom MHC-Klassell-Molekül abgespalten, was nun eine Bindung von Peptiden aus dem Endosom an der Bindestelle der MHC-Moleküle zulässt. (i) Der MHC-Klassell-Peptid-Komplex wird anschließend an die Zelloberfläche der APC transportiert, wo er durch den T-Zellrezeptor (TCR) von (CD4⁺, CD3⁺) einer T-Helferzelle (THL) erkannt wird. (k) Eine intrazelluläre Signalkaskade löst anschließend die Aktivierung aus. Modifiziert aus Molecular Medicine, Stephan Man, 1998 (<http://www.ermm.cbuc.cam.ac.uk>).

Die gängige Meinung war bisher, dass HPV-Antigene ausschließlich über MHC-Klasse I nach intrazellulärer Produktion präsentiert werden. Sie können allerdings auch über einen sog. „alternativen“ Weg präsentiert werden. In diesem Fall nehmen professionelle APCs (Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen) Antigene auf, die sog. „Nicht-APCs“ im Gewebe freisetzen. Normalerweise schlagen exogene Antigene den MHC-Klasse II-Präsentationsweg ein. Dendritische Zellen verfügen allerdings als einzige unter den APCs über die Fähigkeit des sog. „cross-primings“, indem sie exogene Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse II, als auch mit MHC-Klasse I-Molekülen präsentieren [Rock et al., 1993; Shen et al., 2002]. Im natürlichen Kontext ist eine Immunantwort gegen eine HPV-Infektion nur sehr schwach ausgebildet, weil sie durch die Basallamina von wesentlichen Teilen des Immunsystems separiert ist. Eine anti-virale Immunantwort ist somit oftmals erst spät während einer Infektion zu detektieren oder im Falle einer Entartung von ehemals benignen Läsionen. Möglicherweise hängt dies mit der erhöhten Menge an viralem Antigen und der Invasion von infizierten Zellen in das extravaskuläre Gewebe zusammen [Konya et al., 2001]. Warum das Immunsystem eine HPV-Infektion oftmals erst sehr spät erkennt, hängt mit dem

natürlichen viralen Lebenszyklus zusammen. Der Papillomavirus-Lebenszyklus ist strikt an die Differenzierungsstadien des Wirts-Epithels gebunden und deshalb gelangen nur minimale Mengen an replizierten Virus-Partikeln mit dem Immunsystem in den sub-epithelialen Schichten in Kontakt (siehe Abb. 1). Obwohl PV-Kapside sehr immunogen sind, was durch die Induktion von virus-neutralisierenden Antikörpern in Vakzinierungsstudien gezeigt werden konnte [Kirnbauer et al., 1996], sind sie doch im natürlichen Verlauf einer Infektion fast unsichtbar für ihren Wirt. Diese limitierte Expression in den äußeren Schichten des Epithels wird durch transkriptionelle und translationelle Mechanismen, eingeschlossen der Kodon-Verwendung („codon usage“), kontrolliert [Zhou et al., 1999]. Auf der anderen Seite exprimieren infizierte Zellen in den unteren Epithelschichten die frühen Proteine E5, E6 und E7, die nun wiederum unter den Einfluss von anti-viralen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) kommen. Auch die frühen viralen Proteine sind immunogen, wenn man sie als Vakzinpräparationen appliziert [Tindle et al., 1996]. Es scheint allerdings während des natürlichen Verlaufs einer Infektion, dass die viralen Antigene nicht effizient genug dem Immunsystem präsentiert werden, was zu einer ineffektiven Aktivierung der T-Zellen und das wiederum zu einer immunologischen Toleranz gegenüber einer virus-infizierten Zelle führen kann [Review, Philippa et al., 2002]. Zusammenfassend kann man sagen, dass Papillomaviren vom Immunsystem erkannt werden, allerdings in manchen Fällen zu einem sehr geringen Ausmaß, viel zu gering, um dann eine Infektion noch effektiv zu bekämpfen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Gegenwart von virusspezifischen Antikörpern und T-Zellen in Patienten mit einer persistierenden Infektion [Konya et al., 2000]. In diesem Fall liegt die Vermutung nahe, dass auch Papillomaviren, wie viele andere Viren, Mechanismen entwickelt haben, die eine effektive Bekämpfung durch das Immunsystem umgehen. Es gibt viele bekannte virale sog. „immune escape“ Mechanismen, um das Immunsystem zu schwächen, z.B die Unterbrechung des Interferon Typ I –Signalweges (IFN α und IFN β) [Früh et al., 1999; Alcami et al., 2000]. Virus-infizierte Zellen sezernieren Typ I Interferone, die drei Hauptaufgaben erfüllen:

- 1) Sie induzieren Virusresistenz, indem sie zelluläre Gene aktivieren, die die virale mRNA zerstören und die Expression viraler und einiger wirtseigener Proteine inhibieren.
 - 2) Sie induzieren MHC-Klasse I- Expression in den meisten uninfizierten Zellen im Körper, was ihre Resistenz gegenüber NK (natürlichen Killer-Zellen) verstärkt und infizierte Zellen wiederum empfänglicher für einen Angriff durch CTLs macht.
-

- 3) Sie aktivieren NK-Zellen, die anschließend MHC-KlasseI-runterregulierte, virus-infizierte Zellen selektiv attackieren.

In gleicher Weise beeinflussen die PV-Proteine E6 und E7 die natürliche, angeborene Immunantwort, die gegen eine virale Infektion gerichtet ist, indem sie in den IFN-Signalweg eingreifen [Barnard et al., 1999, 2000; Park et al., 2000]. Diese Beeinflussung schränkt die angeborene ("innate") wirtseigene Immunabwehr, sowie das „Priming“ einer antigenspezifischen Immunität ein und erlaubt somit erst die Etablierung einer viralen Infektion.

1.8 Vakzinierungsstrategien zur Bekämpfung von HPV-Infektionen

Bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen eine HPV-Infektion werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: eine prophylaktische - oder eine therapeutische Vakzine. Allgemein gesprochen, löst eine prophylaktische Vakzine eine humorale Immunantwort aus, indem sie die Produktion von Antikörpern induziert, die die Fähigkeit haben virale Antigene zu neutralisieren und somit eine Infektion verhindern können. Therapeutische Vakzine induzieren zelluläre Komponenten des Immunsystems, die wiederum Zellen erkennen und attackieren, die HPV-infiziert sind. In der Impfstoffentwicklung gibt es inzwischen allerdings auch Ansätze die versuchen, mit einem Impfstoff sowohl die Antikörper-, als auch die zelluläre Immunantwort zu stimulieren (cVLPs). In der Historie der Impfstoffentwicklung gibt es einige präventive Impfstoffe, die äußerst effektiv in der Vorbeugung einer Infektion mit anderen humanen Viren sind (Hepatitis B, Masern, Mumps, Polio). Im Gegensatz zu einer oralen Poliovirus-Vakzine, die in einer attenuierten Form appliziert wird, scheitert die Entwicklung einer ähnlichen anti-HPV-Vakzine, weil es kein effektives Kultivierungssystem für das Virus gibt.

Die Entwicklung von prophylaktischen HPV-Vakzinen hat sich auf die Verwendung der viralen Strukturproteine L1 und L2 konzentriert. Das Hauptstrukturprotein L1 organisiert sich selbst in sog. Papillomavirus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs), wenn man es in eukaryontischen Zellen exprimiert [Nardelli-Haefliger et al., 1997]. Für BPV-1 (bovine papillomavirus) und HPV16 konnte gezeigt werden, wenn man das L1-Protein am C-Terminus um 34-Aminosäuren deletiert (L1ΔC), dass es effizienter in Kapside assembliert, als wenn man das komplette L1-Protein verwendet [Paintsil et al., 1996; Müller et al., 1997]. VLPs sind morphologisch von den authentischen Virionen nicht zu unterscheiden. Zudem sind sie nicht infektiös, aufgrund ihres fehlenden viralen Genoms. Obwohl VLPs als Kandidaten für eine prophylaktische Vakzine entwickelt wurden, hat man schließlich chimäre

VLPs (cVLPs) synthetisiert, um zusätzliche virale Antigene für eine zell-vermittelte Immunantwort in eine Vakzine einzubringen [Greenstone et al., 1998]. Der deletierte Anteil vom L1-Protein kann durch heterologe Sequenzen von anderen viralen Proteinen (HPV16E7) ersetzt werden, ohne dass sie ihre Fähigkeit VLPs zu bilden verlieren [Müller et al., 1997]. HPV16L1/E7 cVLPs wurden hergestellt durch die Expression in rekombinanten Baculoviren, in Folge der Insertion von (E7¹⁻⁶⁰) am C-Terminus des L1-Proteins [Müller et al., 1997]. Die Insertion längerer Sequenzen, wie die komplette E7-Sequenz (E7¹⁻⁹⁸) interferiert mit der Bildung kompletter VLPs, erlaubt aber die Formung von pentameren Proteinen, welche die Untereinheiten des Virus-Kapsids (Kapsomere) bilden [Müller et al., 1997]. Diese cVLPs sind nun wiederum morphologisch von VLPs nicht zu unterscheiden und induzieren ebenfalls hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern. Zusätzlich induzieren sie eine CD8⁺/E7-spezifische CTL-Antwort, die vor einer anschließenden Inokulation mit Tumorzellen schützt [Schäfer et al., 1999]. Es werden im Tiermodell auch anti-L1-CTLs detektiert, die haben allerdings in der Praxis möglicherweise keine Relevanz [Oehlschlaeger et al., 2003]. Auch Peptide sind attraktive Vakzin-Kandidaten, weil sie in großer Menge und relativ billig hergestellt werden können. Um diesen Ansatz für eine therapeutische Tumor-Vakzinierung anwenden zu können ist es allerdings erst notwendig, die immunologisch relevanten Ziel-Peptide (CTL-Epitope) zu identifizieren. Inzwischen wurden einige HLA-Klasse I-restringierte Epitope von HPV-16 und HPV-18 E6 und E7 identifiziert, die eine spezifische CTL-Antwort auslösen [Ressing et al., 1995; Stauss et al., 1992; Yoon et al., 1998; Garcia et al 1999]. Auf diese Weise konnte man zeigen, dass humane CTLs, wenn man sie mit einem HLA-A*0201-restringierten, HPV-16 E7-Peptid 11-20 (E7₁₁₋₂₀) oder 86-93 (E7₈₆₋₉₃) stimuliert, die Fähigkeit haben, zervikale CaSki-Tumorzellen, die das HPV-16 Genom enthalten, zu erkennen und zu lysieren [Ressing et al., 1995; Alexander et al., 1996].

1.8.1 DNA-Vakzinierung

Auf Grund der billigen und einfachen Herstellung, sowie der Stabilität von nackter DNA (geeignete Puffer, lyophilisiert), wurde die DNA-Vakzinierungs-Strategie immer attraktiver. DNA kann unterschiedlich appliziert werden, wie z.B intravenös, subkutan, intramuskulär und intradermal. Alle diese Applikationsarten resultieren in der DNA-Aufnahme durch APCs und anderen Zellen, sowie in einer Expression des auf der DNA kodierten Antigens. E7-Plasmid-DNA-Vakzine wurden inzwischen erfolgreich eingesetzt, um E7-spezifische CTL-Antworten zu induzieren und Mäuse gegen eine anschließende Inokulation mit E7-positiven

Tumorzellen zu schützen [Tuting et al., 1999; Shi et al., 1999]. Die intramuskuläre (i.m) Route wird favorisiert, wenn man eher eine Th1-Antwort induzieren möchte. Die relativ große Menge an DNA, die i.m appliziert wird, enthält natürlich auch viel CpG-Motive, von denen bekannt ist, dass sie eine starke IL-12-Produktion stimulieren und deshalb die Immunantwort in Richtung Th1 dirigieren [Corr et al., 1997; Roman et al., 1997; Leclerc et al., 1997]. Allerdings zeigte der experimentelle Einsatz von HPV-16 E7 in einer einfachen Vakzinierung (1 mal 100µg DNA i.m), dass die zelluläre Immunantwort nicht stark genug ist [Michel et al., 2002]. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Immunogenität von E7 in einer DNA-Vakzinierung zu verbessern, u.a die Fusion eines Hitzeschockproteins an E7 [Chu et al., 2000] oder die Fusion einer Signalsequenz, um das E7-Protein in lysosmale Kompartimente zu dirigieren [Ji et al., 1999]. Erst kürzlich wurde der Einfluss des „Codon Usage“ (Kodon-Verwendung) auf die Immunogenität einer DNA-Vakzine gegen eine virale Infektion beschrieben [Andre et al., 1998; Vinner et al., 1999; Zur Megede et al., 2000; Deml et al., 2001a; Leder et al. 2001]. Zu Grunde liegt, dass die Papillomavirus Kapsidprotein-Expression abhängig ist von der Übereinstimmung der verwendeten DNA-Kodons und der Verfügbarkeit der entsprechenden tRNAs in der Zelle [Zhou et al., 1999]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kodon-Modifizierung einer DNA-Vakzine von HPV-16L1 und L2, HPV-6bL1 und BPV-1L2 immunogener als unmodifizierte Vakzine sind, wenn sie mittels „gene gun“ appliziert werden [Liu et al., 2001; Leder et al., 2001]. Im Allgemeinen gilt die Applikation mit der „gene gun“ als Aktivator eine eher Th2 gerichteten Immunantwort, wogegen die intramuskuläre Applikation eher eine Th1-Immunantwort induziert. Verändert man die DNA-Sequenz einer E7-DNA-Vakzine hinsichtlich ihrer Kodon-Verwendung von der viralen in die säugerspezifische Konsensussequenz, resultiert dies in einer erhöhten Translation der mRNA [Zhou et al., 1999] und dadurch in einer verbesserten Expression des Proteins *in vitro* und in einer stärkeren CTL-Antwort und Tumor-Protektion *in vivo* [Liu et al., 2002]. Das Prinzip der DNA-Immunisierung beruht bei Applikation mit der „gene gun“ auf dem „priming“ von CD8⁺ T-Zellen durch direkte Transfektion von DC [Porgardor et al., 1998] oder nach „cross priming“ durch Aufnahme des Antigens aus anderen Zellen [Cho et al., 2001]. Diese Methode des Gentransfers resultiert in einer Aktivierung von DC und induziert deren Wanderung in die ableitenden Lymphknoten, in denen die Antigen-exprimierenden DCs die Proliferation von Antigen-spezifischen CD8⁺ - und CD4⁺ T-Lymphozyten stimulieren [Tuting et al., 1999]. Die einfachste Erklärung für eine bessere Immunantwort auf eine kodonmodifizierte DNA-Vakzine, ist eine verstärkte Protein-Expression [Wherry et al., 1999]. Die

Kodonmodifizierung von HPV16E7 ist wie bereits erwähnt mit einer höheren Proteinexpression assoziiert und die korreliert wiederum mit einer höheren CTL-Antwort gegen E7 [Liu et al., 2002]. Möglicherweise ist eine höhere Antigenexpression erforderlich, um eine starke T-Zell-vermittelte Immunität nicht aber eine messbare Antikörperantwort zu erreichen [Liu et al., 2002]. Gegenteilige Beobachtungen zeigen, dass Kodonmodifizierung von anderen Genen eher die Antikörperantwort verbessert [Cid-Arregui., 2003; Vinner et al., 1999; Zur Megede et al., 2000; Deml et al., 2001a; Leder et al., 2001]. Der Mechanismus der Induktion einer verbesserten Antikörperantwort durch DNA-Vakzinierung ist allerdings noch unklar. Eine mögliche Erklärung ist, wenn intrazelluläre Antigene wie E7 nur schwach sezerniert werden, kann eine Antikörperantwort durch die Lyse einer antigen-exprimierenden Zelle in Folge einer spezifischen zellulären Immunantwort induziert werden [Griesenbach et al., 1998].

1.9 Alternative Methode zur Herstellung einer oralen Vakzine gegen eine humane Papillomavirus-Infektion

Ein weitverbreiteter Ansatz zur Expression von Fremd-Proteinen in Pflanzen ist die stabile genetische Transformation. Sie beinhaltet die Integration von heterologen Genen in das Chromosom der Wirtspflanze und wurde inzwischen erfolgreich eingesetzt, um eine Reihe von immunologisch aktiven Proteinen zu exprimieren. Ein Alternativ-Ansatz verwendet auf Pflanzenviren-basierende Vektoren. Der Hauptvorteil dieser Methode ist, dass sich das virale Genom in der infizierten Zelle multipliziert, was potentiell zu einer sehr hohen Proteinexpression führt. Weitere Vorteile sind, dass das virale Genom sehr klein ist und deshalb leicht manipuliert werden kann und dass die Infektionsmethode einfacher ist als die Transformation und Regeneration von Pflanzen. Natürlich birgt dieser Ansatz auch Nachteile: die Fremd-Gene sind nicht vererbbar, es gibt eine Limitierung in der Größe der Sequenz, die noch genetisch stabil exprimiert werden kann und es gibt Bedenken, dass sich das modifizierte Virus in der Umwelt verbreiten könnte. Das Genom der meisten Pflanzenviren besteht aus einem oder mehreren positiv-strängigen RNA-Molekülen. Diese Viren haben ein großes Wirtsspektrum und erreichen extrem hohe Virus-Mengen (ca. 1-2 g/Kg Pflanzen-Material) in ihrer Wirtspflanze. Genauso wie animale RNA-Viren benutzen sie verschiedene Strategien für die Genexpression, u.a subgenomische Promotoren und Prozessierung von Polyproteinen. Die Verfügbarkeit von infektiösen cDNA-Klonen war die Grundvoraussetzung für die Entwicklung von auf RNA-Viren-basierenden Vektorsystemen [Porta et al., 1996; Chatterji et al., 2002]. Zwei Typen von Vektorsystemen wurden für die Produktion von

immunogenen Peptiden und Proteinen in Pflanzen entwickelt. Der erste Typ, für die sog. „Epitop-Präsentation“, beinhaltet die Insertion einer Sequenz, die für ein antigenes Peptid kodiert, in das virale Kapsidprotein-Gen. Die Insertionsstelle wird so gewählt, dass das Peptid an der Oberfläche des Virus-Kapsids präsentiert wird. Auf diese Weise modifizierte Virionen bezeichnet man als chimäre Virus-Partikel. Diese Partikel sind ein neuer Ansatz für eine Vakzinierungsstrategie, weil durch die Präsentation zahlreicher Kopien des antigenen Peptids auf der Virusoberfläche die Immunogenität bedeutend gesteigert wird [Lomonosoff et al., 1996]. Der zweite Typ wird als „Polypeptid-Expressionssystem“ bezeichnet und beschreibt die Einführung von kompletten Gensequenzen in das virale Genom. Die Insertion des Fremd-Gens wird so gewählt, dass es in infizierten Zellen effizient translatiert wird und anschließend als unfusioniertes Polypeptid vorliegt. Nach Purifikation des exprimierten Proteins, kann es für eine parenterale Vakzinierung oder durch direkte Verfütterung von Pflanzenmaterial appliziert werden [Porta et al., 1994; McLain et al., 1995; Gopinath et al., 2000].

1.9.1 Cowpea Mosaic Virus (CPMV): Ein Werkzeug für eine Pflanzen - Vakzine

Das Cowpea-Mosaic-Virus war das erste Pflanzenvirus, welches als Epitop-Präsentationssystem entwickelt wurde [Usha et al., 1993; Porta et al., 1994]. CPMV ist ein RNA-Virus mit einem zweigeteilten Genom RNA-1 und RNA-2 (siehe Abb. 1-6).

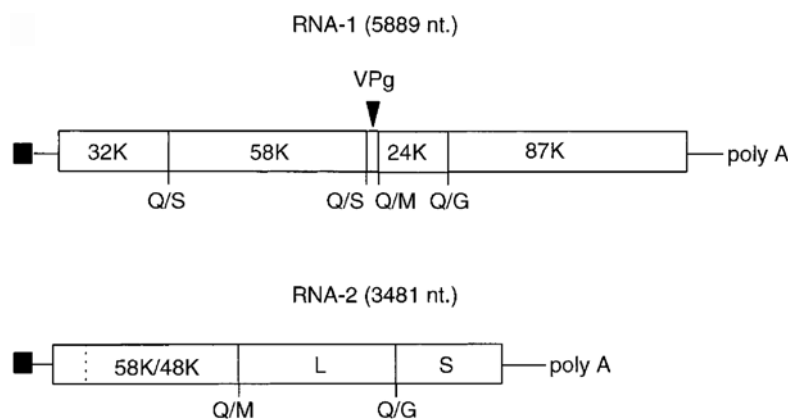


Abbildung 1-6: Organisation des CPMV-Genoms. Das Genom besteht aus zwei separat-verpackten positiv-strängigen RNA-Molekülen (RNA-1 und RNA-2). Beide RNAs sind polyadenyliert und besitzen an ihrem 5'-Ende ein kleines kovalent gebundenes Protein (VP_g), das durch ein schwarzes Quadrat gekennzeichnet ist. Beide RNAs haben nur ein offenes Leseraster (ORF= open reading frame) und werden exprimiert durch Synthese und anschließende Prozessierung des Vorläuferproteins. Die Positionen der Prozessierung des Polyproteins zusammen mit den Dipeptid-Sequenzen, an denen geschnitten wird, sind markiert (Q/S, Q/M, oder Q/G). Die Identität jedes Spaltproduktes ist benannt (z.B., 32K). Beide Hüllproteine (L und S) sind auf der RNA-2 kodiert. Entnommen aus Kathryn et al., 1999.

Beide RNA-Moleküle haben nur ein offenes Leseraster (ORF) und werden durch die Synthese und nachfolgende Prozessierung eines Vorläuferproteins exprimiert. Die dafür notwendige Polymerase ist auf der RNA-1 lokalisiert. Die Prozessierung wird durch eine auf der RNA-1 kodierte Proteinase 24K vermittelt, die eine Anzahl von spezifischen Schnittstellen erkennt (siehe Abb. 1-6). Das CPMV-Kapsid enthält je 60 Kopien vom großen (L; 37kDa) und dem kleinen (S; 23kDa) Kapsidprotein, die in einer ikosaedrischen Symmetrie arrangiert sind [Lomonossoff et al., 1991].

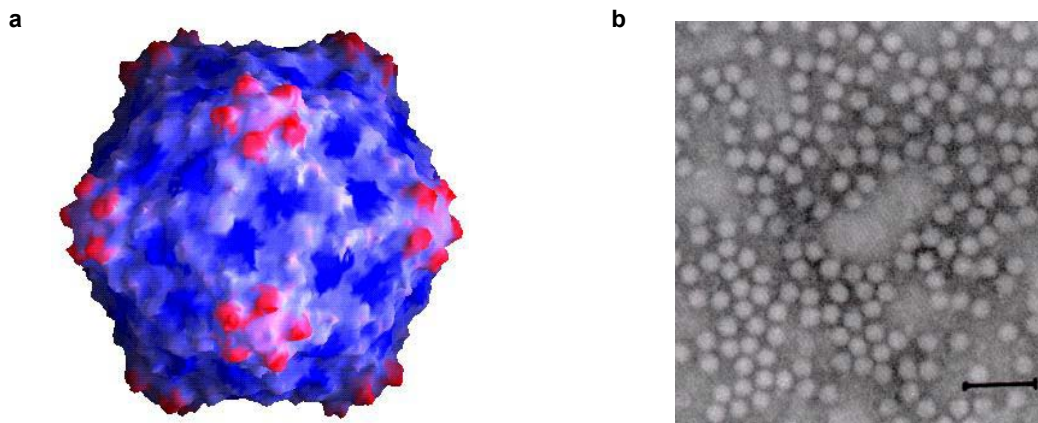


Abbildung 1-7: (a) Dreidimensionale Darstellung der Cowpea Mosaic Virus Hülle. In blau das große Kapsidprotein (L), in rot das kleine Kapsidprotein (S). (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer CPMV-Partikel-Präparation. Der schwarze Balken repräsentiert eine Länge von 100nm. Entnommen aus Gopinath et al., 2000.

Beide RNAs sind für eine Infektion in Pflanzen essentiell. RNA-1 kodiert für Proteine, die für die RNA-Replikation notwendig sind, wogegen auf RNA-2 die Proteine für den Zell-zu-Zell-Transport (48K, M-Protein, movement protein, siehe Abb. 1-6) und für die Verpackung kodiert sind. Das sog. „movement protein“ induziert tubuläre Strukturen in modifizierten Plasmodesmata, durch welche die Virus-Partikel von Zelle zu Zelle wandern [van Lent et al., 1990; Wellink et al., 1993]. Ähnliche Strukturen wurden auch in Protoplasten beobachtet, die mit CPMV infiziert waren [van Lent et al., 1991; Kasteel et al., 1993].

Ein potentieller Vorteil, der CPMV als Vektorsystem so attraktiv macht ist die Tatsache, dass das Virus extrem gut in seiner Wirtspflanze (Cowpea, *Vigna unguiculata*) repliziert, zu einer Menge von ca. 1-2 g/Kg Pflanzenmaterial und dass der Infektionsverlauf an Hand der mosaikartigen gelben Läsionen auf der Blattoberfläche infizierter Pflanzen gut zu verfolgen ist (siehe Abb. 1-8). Übertragen wird das Virus durch Insekten, die allerdings in unseren Breiten nicht heimisch sind. Damit besteht keine Gefahr einer Kontamination anderer Pflanzen durch rekombinante CPMVs.

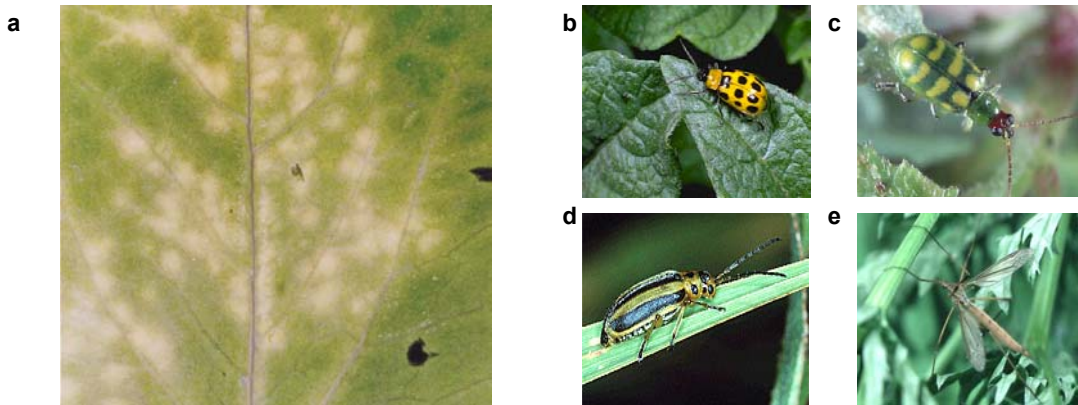


Abbildung 1-8: (a) Ein mit CPMV Wild-Typ infiziertes Blatt von *Vigna Unguiculata* mit den typischen gelben mosaikartigen Läsionen nahe der Blattadern. (b-e) Überträger des cowpea mosaic virus (z.B. **Abb. c** *Diabrotica balteata*, **Abb. e.** *Nematocerus acerbus*).

Zunächst wurden allerdings nur Sequenzen, die für ein Epitop kodieren, in infektiöse RNA-2-Klone eingefügt. Untersucht wurden z.B. die immunologischen Eigenschaften des chimären CPMVs, das ein aus 22 Aminosäuren bestehendes Epitop von gp41 (Kennedy Epitop) von HIV I (human immunodeficiency virus type I) an der Oberfläche präsentiert [Porta et al., 1994]. Ein Schlüsselexperiment für die Anwendung einer auf Pflanzen basierenden Vakzine, war die Immunisierung von Hunden mit inaktiviertem CPMV-PARVO1 (17 Aminosäuren-Epitop aus der N-terminalen Region des VP2-Kapsidproteins von CPV = Canine Parvovirus) und die daraus resultierende Protektion vor einer letalen Dosis CPV [Langeveld et al., 2001]. Das Ziel, ganze Proteine in Pflanzen zu exprimieren, konzentrierte sich auf die weitere Modifikation von RNA-2. Ein Hauptanliegen beim Design dieser Konstrukte war, dass die zunehmende Größe von RNA-2 von der normalen Länge von ca. 3,5 kB bis zur maximalen Größe der RNA-1 (6 kB), die Verpackung der Moleküle nicht beeinflussen sollte. Dabei muss man allerdings berücksichtigen, dass alle auf der RNA-2 kodierten Produkte für die Fähigkeit des Virus sich lokal, als auch systemisch in der Pflanze zu bewegen, absolut notwendig sind [Eggen et al., 1989]. Im ersten Versuch, ein Fremd-Protein von CPMV-RNA-2 zu exprimieren, wurde ein Großteil der kodierenden Sequenz für die Kapsidproteine durch die Sequenz von GFP (Jellyfish green fluorescent protein) ersetzt. Es war allerdings nicht möglich, eine systemische Infektion mit diesem Konstrukt zu erzielen, da kein Kapsidprotein synthetisiert wurde [Verver et al., 1998].

1.9.2 Katalytische Peptidsequenz FMDV 2A integriert in das CPMV-Vektor-System

Ein alternatives, auf RNA-2-basierendes Konstrukt wurde entwickelt, um die natürliche Infektiosität des CPMVs und die Verpackung der modifizierten RNA-2 zu erhalten. Die autokatalytische Peptidsequenz 2A (16 Aminosäuren) wurde aus dem Genom des Picornavirus FMDV (*foot and mouth disease virus*) als zusätzliche Spaltstelle in die RNA-2 am C-Terminus des kleinen Kapsidproteins (S) eingefügt. Im natürlichen Kontext vermittelt das 2A-Peptid die Spaltung zwischen der 2A und der 2B-Region des FMDV-Polyproteins, indem es zwischen Prolin-Glycin im 2B-Protein schneidet [Ryan et al., 1991]. Obwohl in einem Leseraster liegend, entstehen auf diese Weise zwei voneinander unabhängige Proteine. Der Mechanismus dieses Prozesses basiert nicht – wie noch bis vor kurzem angenommen – auf einer durch 2A-vermittelten Proteolyse [Ryan et al., 1991, Ryan et al., 1994; Donnelly et al., 1997], sondern erfolgt auf translationeller Ebene.

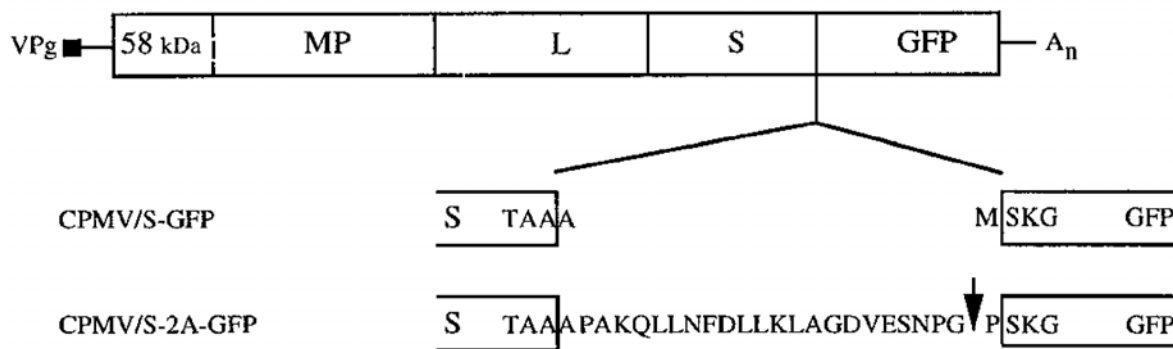


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der entwickelten CPMV-RNA-2 Vektorkonstrukte mit der FMDV (*foot and mouth disease virus*) Protease-Sequenz 2A am C-Terminus des (S) Kapsid-Proteins. Der Pfeil markiert die Spaltstelle mit dem essentiellen Prolin-Rest, der am N-Terminus des Spaltproduktes (P, GFP) verbleibt. Entnommen aus Gopinath et al., 2000.

Nach einem von Donnelly et al. (2001a) vorgeschlagenen Modell, beeinflusst das 2A-Peptid die Aktivität des Ribosoms in einer Weise, die zu einer Hydrolyse der Peptidyl-tRNA-Esterbindung am C-Terminus der 2A-Peptid-Sequenz führt. Das bereits synthetisierte Polypeptid wird aus dem translationellen Komplex entlassen und die Translation der nachfolgenden Sequenz fortgesetzt. 2A-vermittelte Prozessierung konnte im Potato-Virus X-Vektorsystem erstmalig gezeigt werden [Santa Cruz et al., 1996].

Im Gegensatz zu anderen RNA-2-Konstrukten, konnte mit diesem Konstrukt (CPMV/S-2A-GFP) eine systemische Infektion von „Cowpea-Pflanzen“ erreicht werden, die an Hand des

fluoreszierenden GFP-Signals unter einer UV-Lampe verfolgt werden kann (siehe 3.1.3, Abb. 3-3c).

1.9.3 *Agrobacterium tumefaciens* integriert Fremd-DNA in das Pflanzen-Genom

Die virale RNA kann entweder als linearisiertes cDNA Volllänge-Konstrukt oder mittels rekombinanter Agrobakterien in die Pflanze eingeschleust werden. Im letzteren Fall übertragen die Bodenbakterien *Agrobacterium tumefaciens* (siehe Abb. 1-9b) einen kleinen Teil ihrer DNA in Pflanzenzellen und induzieren im natürlichen Kontext die Bildung von Tumoren (sog. Wurzelhalsgallen, siehe Abb. 1-9a) [Nester et al., 1984], die als Lebensraum für diese Bakterien dienen. Gleichzeitig wird die Bildung bestimmter Nährstoffe (Opine) induziert, die nur von diesen Bakterien selbst genutzt werden können.

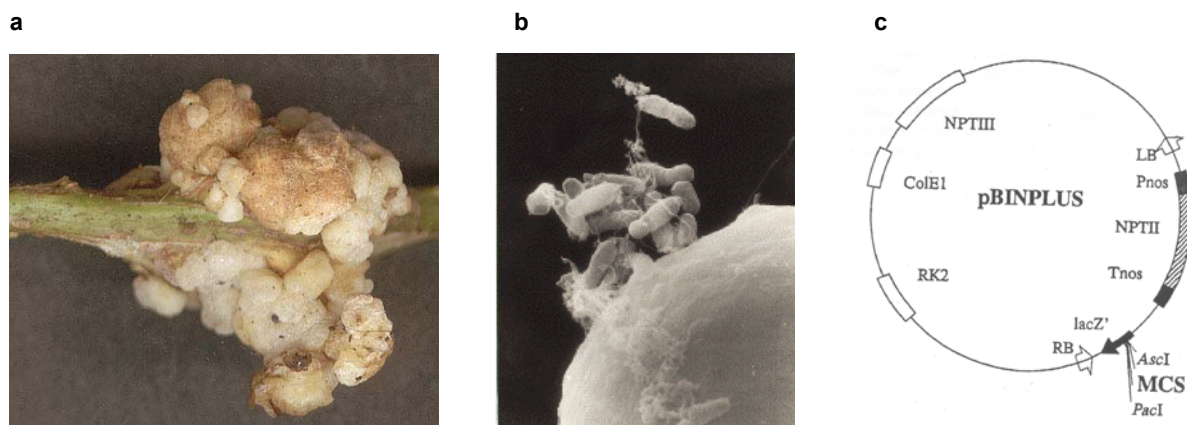


Abbildung 1-9: (a) Durch *Agrobacterium tumefaciens* verursachte Wurzelhalsgalle (Entnommen aus Gentechnik bei Pflanzen, Springer-Verlag). (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. tumefaciens* beim „Andocken“ an eine verletzte Pflanzenzelle (Entnommen aus Gentechnik bei Pflanzen, Springer-Verlag). (c) Binärer Vektor für die Transformation von *A. tumefaciens* [Van Engelen et al., 1995]

In den siebziger Jahren fand man in virulenten Stämmen, also Tumor auslösenden Stämmen von *A. tumefaciens* zusätzlich zur genomischen DNA sehr große Plasmide (200 bis 800 kBp). Durch Transferexperimente auf plasmid-freie nicht-pathogene Stämme wurde gezeigt, dass der Besitz dieser Plasmide für die Tumorauslösung essentiell ist. Man nannte sie daher Tumor induzierende oder kurz Ti-Plasmide [Hooykaas et al., 1992]. Ti-Plasmide tragen Gene für die Opininverwertung (Katabolisierung), die Erkennung verwundeter Zellen und für die Mobilisierung und Transfer der sogenannten T-DNA. Bei der T-DNA handelt es sich um den Teil des Ti-Plasmids, der in die Pflanze übertragen wird (Transfer-DNA). Darauf lokalisiert sind Gene für Tumorinduktion und Opinsynthese.

Die T-DNA wird durch zwei DNA-Bereiche flankiert, die rechte und die linke „Grenze“ genannt werden. Diese „Grenzen“ bestehen aus einer Wiederholung von 25 Bp, die die Erkennungssequenz für die Mobilisierung der T-DNA darstellen. Nach der Übertragung wird die T-DNA in die pflanzliche DNA des Zellkerns eingefügt. Der Integrationsort ist dabei offenbar weitgehend zufällig, allerdings werden transkriptionsaktive Bereiche bevorzugt. Voraussetzung der T-DNA in die Pflanze ist zunächst die Verletzung einer Pflanzenzelle. Hierbei spielen bestimmte phenolische Substanzen (z.B. Acetosyringone), die die Pflanze als Folge der Verwundung bildet, eine wichtige Rolle, denn dieses Signal wird von *Agrobacterium* erkannt und es erfolgt eine Anheftung an die Pflanzenzelle. Hierfür sind auch Gene erforderlich, die nicht auf dem Ti-Plasmid, sondern auf der chromosomalen DNA des Bakteriums lokalisiert sind.

A. tumefaciens erkennt das Acetosyringon mittels eines Rezeptors, der von einem der sogenannten Virulenzgene (*vir*) codiert wird [Winans et al., 1992]. Die Erkennung durch den Rezeptor führt zur Aktivierung der Gen-Expression aller *vir*-Gene [Ankenbauer et al., 1990]. Ein Genprodukt der *vir*-Familie ist eine Endonuklease, die die rechte und linke „Grenze“ der T-DNA erkennt und sie an diesen Stellen herausschneidet.

Durch die Größe des Ti-Plasmids (> 200 kBp), ist es nicht ohne weiteres möglich Fremd-DNA einzuschleusen. Heute verwendet man insbesondere sogenannte binäre Plasmide (z.B. pBINPLUS, siehe Abb. 1-9c), bei denen die Funktion des Ti-Plasmids auf zwei Plasmide verteilt wird. Das größere trägt die *vir*-Region und das kleinere die rechte und die linke „Grenze“ der T-DNA. Dies sind die einzigen essentiell notwendigen Bereiche der T-DNA, die für den Transfer in die Pflanze benötigt werden.

Für die Herstellung von HPV16 rekombinanten CPMVs kann nun unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors die komplette cDNA-1 oder cDNA-2 in das binäre Plasmid zwischen die rechte und linke „Grenze“ der T-DNA inseriert werden. Durch die anschließende Integration in das pflanzliche Genom werden die cDNAs von pflanzeigenen Enzymen transkribiert und nachfolgend translatiert und der virale CPMV Replikationszyklus kann beginnen.

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

In einem alternativen Ansatz zur Entwicklung einer oralen Vakzine gegen eine HPV-Infektion, sollte mittels rekombinanter Pflanzenviren das Hauptstrukturprotein von HPV-16 (L1) in Pflanzen (*Vigna unguiculata*, *Nicotiana benthamiana*) hergestellt werden, welches überexprimiert in Säugerzellen zu VLPs assembliert [Nardelli-Haefliger et al., 1997].

Die Produktion von L1-Protein fand bisher in einem sehr aufwendigen Verfahren, dem Baculovirussystem statt. Diese Herstellungsweise verursacht immense Kosten, die eine potentielle prophylaktische anti-HPV-Vakzine in den Dritte-Welt-Ländern unerschwinglich machen. Aus diesem Grund sollte im Verlauf dieser Arbeit eine kostengünstigere Herstellungsmethode entwickelt werden.

Orale Immunisierung resultiert in einer Aktivierung des lymphoiden Gewebes im Magen (GALT: gut-associated lymphoid tissue). Spezialisierte M-Zellen in den „Payer’s Patches“ des Darmepithels erkennen besondere Strukturen, wie Viren oder Bakterien [Wolf et al., 1981, Buller et al., 1988, Inman et al., 1983].

VLPs sind morphologisch von den HPV-Virionen nicht zu unterscheiden und werden durch die M-Zellen zu den darunter liegenden professionellen antigen-präsentierenden Zellen (APCs) transportiert und initiieren so das Immunsystem [Ball et al., 1999]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Kapsidstrukturen im sauren Milieu des Magens stabil sind und eine Antikörperantwort nach oraler Administration induzieren [Cano et al., 1999]. Um die Produktion einer oralen Vakzine in Pflanzen zu erreichen, sollten in dieser Arbeit verschiedene Pflanzeninfektions-Methoden etabliert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte versucht werden, die Proteinexpression von HPV16L1, E7 durch die Modifikation der viralen Kodons in die Säugerkodon-Konsensussequenz zu steigern, um eine stärkere Immunantwort zu induzieren. Im Anschluss sollte untersucht werden, ob es eine direkte Korrelation zwischen der Immunogenität der verschiedenen E7-Expressionsplasmide *in vivo* und der Proteinexpression *in vitro* gibt.

1.10.1 Arbeitsprogramm

Im einzelnen sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

- 1) Herstellung von HPV16L1- oder E7 rekombinanten CPMVs.
- 2) Vergleich von verschiedenen Infektionsmethoden (DNA-Inokulation, Agrobakterien-Infiltration).
- 3) Herstellung synthetischer HPV16-Gene mittels Fusions-PCR (Kodonmodifizierung).
- 4) Herstellung verschiedener L1-, E7-Expressionskonstrukte mit unterschiedlicher Expressionsstärke (pTH HPV16L1-,E7opt+K/-K) unter Verwendung von humanen anstatt der viralen Kodons und Fusion der Kozak-Sequenz.
- 5) DNA-Immunisierung der verschiedenen Konstrukte und Analyse auf ihre unterschiedliche Immunogenität mittels ELISPOT, GST-Capture ELISA.
- 6) Tumorregressions- und Tumorprogressions-Experimente.
- 7) Transfektions-Experimente mit verschiedenen Zelllinien (293T-Zellen, NIH3T3-Zellen, BMDCs) zur Analyse der unterschiedlichen E7-Proteinexpression in Korrelation zu den Immunisierungs-Daten.

1.10.2 Infektions-Methoden von Pflanzen (Ergänzung zu 1.10.1, Abschnitt 2:)

DNA-Inokulations-Methode:

Bei diesem Ansatz werden virale Volllängeklone (cDNA-1 und cDNA-2) von CPMV in ihrer linearisierten Form zu gleichen Teilen vermischt und mittels mechanischer Verletzung der Blattoberfläche in das Blattgewebe (Cowpea-Pflanze) einmassiert (siehe 4.1.3).

Agro-Inokulations-Methode:

Diese Methode basiert auf der Eigenschaft von Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) Fremd-DNA in das Pflanzengenom einzuschleusen, um die Effizienz einer Infektion mit auf CPMV-basierenden Konstrukten zu erhöhen. Zu diesem Zweck sollten Volllängeklone von RNA-1 und RNA-2-(HPV16L1, E7, GFP) in das *Agrobacterium tumefaciens*-Plasmid pBINPLUS, zwischen den *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S Promotor und den Nos-Terminator eingeschleust werden (siehe 2.8.1). Die auf diese Weise transformierten Agrobakterien werden als Bakterien-Mixtur, die sowohl RNA-1, als auch RNA-2-(HPV16L1, E7, GFP) enthält, in Pflanzenblätter von *Nicotiana benthamiana* und Cowpea (*Vigna unguiculata*) infiltriert (siehe 4.2.2).

2.0 Material

2.1 Abkürzungen

α MEM	alpha minimal essential medium
Amp	Ampizillin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
AS	Aminosäure
ATV	angewandte Tumorstudiologie (Abteilung des DKFZ)
BMDCs	Bone marrow-derived dendritic cells
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BPV	bovine Papillomavirus
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CIP	calf intestine alkaline phosphatase
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin
cpm	Aktivität pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CPMV	Cowpea Mosaic Virus
CR	konservierte Region (<i>conserved region</i>)
CS	Kälberserum (<i>calf serum</i>)
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
CVLP	chimäre virusähnliche Partikel
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	ein beliebiges 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E7WT	Wildtyp-Form von E7 aus HPV-16
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Serum fötaler Kälber (<i>fetal calf serum</i>)
FMDV	<i>foot and mouth disease virus</i>
GFP	green fluorescent protein
HLA	genetische Bezeichnung für MHC (<i>human leucocyte antigen</i>)
H ₂ O	HPLC gereinigtes bidestilliertes Wasser
HPV	humanpathogenes Papillomavirus
hu	humanisiert
i.m.	intramuskulär
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
+/-K	mit oder ohne Kozaksequenz
KB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LCR	Kontroll-Region (<i>long control region</i>)
MES	2-N-Morpholino-ethanesulfonic acid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
MM	Molekulargewichtsmarker
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
nmol	nanomolar

OD ₂₈₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm
opt	optimiert
PCR	Polymerasenkettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pl	Pflanzen-Kodon-adaptiert
pmol	Piko-Mol
pRB	Retinoblastoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RSCU	Relative Synonymous Codon Usage
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SLILs	low grade squamos intraepithelial lesions
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrose-Faktor
U	internationale Enzymeinheiten der Aktivität (<i>units</i>)
ÜNK	Übernacht-Kultur
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VLP	Virus-ähnliche Partikel (<i>virus-like-particles</i>)
WB	Westernblot

2.2 Chemische Reagenzien

Acetosyringone (3'-5'-Dimethoxy- 4'- hydroxyacetophenone)	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Agar	Difco, Hamburg
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Hamburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DL-Norleucin (Amino-N-Capronsre)	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	AGS, Heidelberg
EDTA, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung, 37 %	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
GM-CSF	Sigma, Deisenhofen
Hefe-Extrakt	Difco, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel de Haën, Seelze
Kälber-Serum C9676	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamyzin	Sigma, Deisenhofen
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
MES 2-N-Morpholino-ethanesulfonic acid	Sigma, Deisenhofen

Methanol
 Methyl- α -Mannopyranosid (α MM)
 Mineralöl
 Natriumacetat
 Natriumazid
 Natriumhydroxid
 Penizillin/Streptomycin 15140-114
 Phenol
 Phenol/CIA (1:1)
 Polyethylen Glykol 4000, 8000
 RNase
 Salzsäure
 Schwefelsäure
 SDS
 TEMED
 Tetramethylbenzidin (TMB)
 Tris
 Triton X-100
 Trypanblau
 Wasserstoffperoxid

Riedel de Haën, Seelze
 Sigma, Deisenhofen
 Sigma, Deisenhofen
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Gibco BRL, Paisley, Schottl
 Roth, Karlsruhe
 Roth, Karlsruhe
 Sigma, Deisenhofen
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 GERBU, Gaiberg
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Roth, Karlsruhe
 GERBU, Gaiberg
 Merck, Darmstadt
 Sigma, Deisenhofen

2.3 Verbrauchsmaterialien

Einfriertubes, 2 ml
 Einmalhandschuhe, Gentleskin
 Elektroporations-Küvetten
 96-well ELISA-Platten

 Eppendorf-Reaktionsgefäße,
 1,5 ml und 2,0 ml
 Faltenfilter
 Filter-Pipettenspitzen
 Frischhaltefolie, Melitta Toppits
 Handmonitor LB 1210 B
 Immobilon-Membran
 Kanülen und Plastikspritzen
 Kodak Ektochrome 100
 Kodak Tmax 400 pro
 Kühl- und Gefrierschränke
 96-Lochplatte, Rundboden
 Mikrotiterplatten
 Nitrozellulose Transfermembran
 Papiertücher Kimwipes
 Parafilm

 PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml
 Petrischalen
 Pipettenspitzen
 Plastikküvetten
 PVDF Transfermembran
 Rifampizin
 Röhrchen mit Schraubverschluss
 15 ml (PP und PS)
 Röhrchen mit Schraubverschluss 50 ml
 Röntgenfilme Biomax MR
 Röntgenfilme X-Omat Blue
 Rundbodenröhrchen, 15 ml
 Skalpell
 Sterilfilter 0,2 μ m

Nalgene, Rochester, NY, USA
 Meditrade, Baxter, Thetford, (E)
 Invitrogen, Groningen, (NL)
 Falcon, über Becton Dickinson,
 Heidelberg
 Eppendorf, Hamburg

 Schleicher&Schüll, Dassel
 Greiner, Frickenhausen
 Melitta, Minden
 Berthold, Wildbad
 Millipore, Eschborn
 Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
 Kodak, England
 Kodak, England
 Bosch, Labotect, Göttingen
 Costar, Corning, USA
 Nunc, Roskilde, DK
 Schleicher&Schüll, Dassel
 Kimberley-Clark
 American National Can, Chicago, IL,
 USA
 Eppendorf, Hamburg
 Greiner, Frickenhausen
 Steinbrenner Laborsysteme, Eberbach
 Greiner, Frickenhausen
 Millipore, Eschborn
 Sigma, Deisenhofen
 Sarstedt, Nümbrecht

 Greiner, Frickenhausen
 Kodak/NEN Life Science Prod., Köln
 Kodak/NEN Life Science Prod., Köln
 Greiner, Frickenhausen
 Feather, PMF, Köln
 MembraPure, Lörzweiler

Sterilisationsapparatur, Bottletop-Filter
 Szintillationsplatten (Lumaplate)
 6-Loch- und 96-Lochplatten
 Whatman 3MM Papier
 zur Gewebekultur
 Zellkultur-Flaschen mit Filter
 (25, 50, 75 cm²)

Nalgene, Rochester, USA
 Packard Bioscience, Meriden USA
 Costar, Corning, USA
 Schleicher&Schüll, Dassel

Nunc, Wiesbaden-Biebrich

2.4 Geräte

2.4.1 Zentrifugen

Kühlzentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge 28RS
 Tischzentrifuge Eppendorf 5417R
 Zentrifuge 2MK
 Zentifuge 41 Q3
 Zentrifuge Biofuge 13
 Zentrifuge 5415C
 Zentrifuge Megafuge 1.0

Heraeus, Hanau
 Eppendorf, Hamburg
 Sigma, Deisenhofen
 Heraeus Christ, Osterhode
 Heraeus Christ, Osterhode
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus Christ, Osterhode

Sorvall RC-5 Refrigerated Superspeed Centrifuge

Dupont, Bad Nauheim

Rotoren:

SLA-600 (Festwinkel)

SLA-1500 (Festwinkel)

SLA-3000 (Festwinkel)

SF 28/50 (Festwinkel)

2.4.2 Sonstige Geräte

Analysenwaage 2002 MPI
 Agarosegelfotographierapparatur
 Bakterieneschüttler TR 125
 Bakterieneschüttler SM 25
 Begasungsbrutschrank, Stericult 200
 Bestrahlungsgerät, Gammacell 1000
 Brutschrank 3862 S/N 34757-243
 Brutschrank B6
 DNA Thermal Cyclor 480
 Durchflußzytometer, FACSort ®
 Eismaschine AF-3
 Elektrophoresekammern Horizon™
 Doppel-Elektrophorese Kammer- Vertikal
 MBT70EL 10×15cm Proteingele
 Doppel-Elektrophorese Kammer- Vertikal
 MBT70EL 8×10cm Proteingele
 Elektroblot Apparatur, Semidry-Transfer Cell
 Elektroporationsgerät, E. coli Pulser
 ELISA Lesegerät, Titertek Multiskan MKII
 Feinwaage 2002 MP1
 Heizblock 5436
 Heizblock QBT1
 Inkubator B 5060 EK-002
 -80°C Kühlschränk

Satorius, Göttingen
 Polaroid, St. Albans, UK
 Infors, Bottmingen, Schweiz
 E. Bühler, Tübingen
 Labotect, Göttingen
 Gammamaster, Ede, Holland
 Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
 Heraeus, Hanau
 Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Scotman, Glasgow, Schottland
 Renner, Heidelberg
 über Neolab Migge, Heidelberg

über Neolab Migge, Heidelberg

Biorad, München
 Bio-Rad, München
 Labsystems, Turku, Finnland
 Sartorius, Göttingen
 Eppendorf, Hamburg
 Grant, Barrington Cambridge, England
 Heraeus Christ, Osterode
 Labotect, Göttingen

Laborwaage 1474-MPB-2
 Lichtmikroskop 80-02458
 Lichtmikroskop 301.314.001
 Lyophylle, Vacuum Concentrator
 Magnetrührer, heizbar, RET
 Microbeta Plus
 Mikrowelle Micromat 135
 Neubauer-Zählkammer
 pH-Meter
 Pipetten, Gilson, 20µl, 200µl, 1000µl
 Pipetboy
 Quarzglasbüvetten QS1000 Hellma®
 Röntgenfilm Expositions-kassetten
 Spannungsgerät PHEROstab 500
 Spannungsgerät EPS 3500
 Spektral-Photometer, U-1100
 Sterile Werkbank, Biogard Hood
 Stickstofftank
 Thermomixer
 UV-Leuchttisch 254 nm
 UV-Leuchttisch 366 nm
 Vortex „Reax Top“
 Wasserbad Thermomix U
 Wippe Typ Rockmat

Sartorius, Göttingen
 Hund, Wetzlar
 Leitz-Diavert, Wetzlar
 Ikamag/Bachofer, Reutlingen
 Janke&Kunkel, Staufen
 Wallac, Freiburg
 AEG, Nürnberg
 Migge, Heidelberg
 Knick, Berlin
 Gilson-Abimed, Langenfeld
 IBS Integra Biosciences, Fernwald
 über Neolab Migge, Heidelberg
 Kodak, Stuttgart
 Biotec-Fischer, Reiskirchen
 Pharmacia Biotech, Semko, Schweden
 Hitachi, Tokyo, Japan
 Labotect, Göttingen
 Messer, Krefeld
 Eppendorf, Hamburg
 K. Benda, Wiesloch
 Vetter, Wiesloch
 Heidolph, Kelheim
 Braun, Melsungen
 Tecnomara, Zürich, Schweiz

2.5 Radiochemikalien

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ($3,7 \times 10^4$ Bq/µl)

^{32}P dCTP

NEN DuPont, Bad Homburg

AmershamPharmaciaBiotech,
 Braunschweig

2.6 Verwendete Kits

Qiagen Maxipräp Kit
 QIAEX II Gel Extraction Kit,
 Qiagen Endotoxin-Free Kit
 Qiagen RNeasy Kit
 Qiashredder

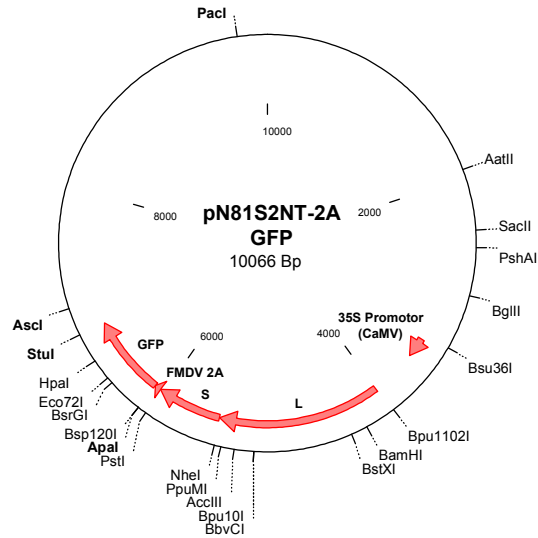
Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden

2.7 Antikörper

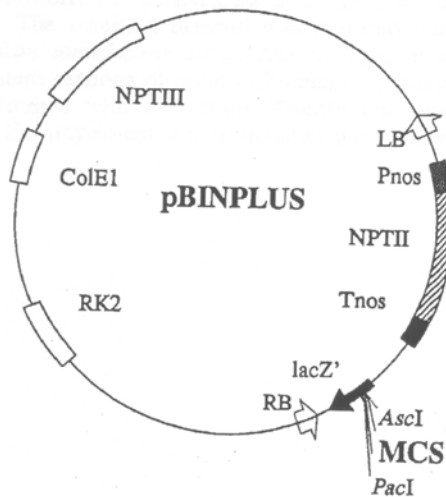
2.7.1 Primärantikörper

α HPV16-L1 CamVir1 Maus, monoklonal
 α HPV16-E7 Maus, monoklonal
 α CPMV (Cowpea Mosaic Virus) Kanninchen, polyklonal

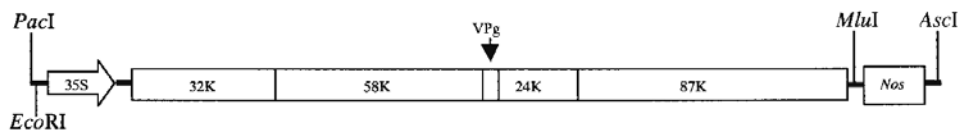
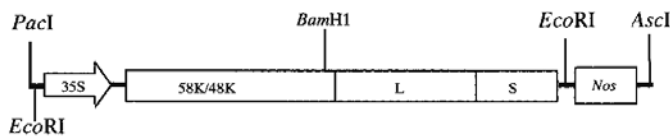
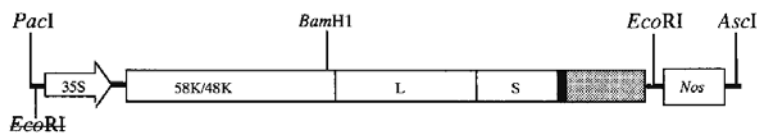
Pharmingen, San Diego, CA, USA
 [McLean et al., 1990].
 Zymed Laboratories, Inc. San Francisco,
 CA, USA.
 erhalten von G. Lomonossoff, John Innes
 Centre, Norwich, UK.



Der Subklonierungsvektor **pN81S2NT-2A-GFP** basiert auf pBluescriptSKII (Stratagene, La Jolla, Kanada). Über die Restriktionsschnittstellen *AscI*, *Pacl* wird entweder die komplette Sequenz von RNA-1 (**pN81S1NT**) oder von RNA-2 (**pN81S2NT**) einkloniert. Die Insertionsstelle für Fremdsequenzen (GFP, HPV16L1,E7) ist am C-Terminus der FMDV-2A-Sequenz (*Apal*, *Stul*). Erhalten von George Lomonosoff (John Innes Centre, Norwich).



pBINPLUS [Van Engelen et al., 1995] basiert auf dem gängigen binären Vektor pBIN19 [Bevan et al., 1984] für Agrobakterien-vermittelte Pflanzen-Transformation.

**pBinPS1NT****pBinPS2NT****pBinPS2NT2AGFP**

Schematisch dargestellt sind die CPMV-spezifischen Anteile in pBINPLUS. In beiden Fällen wurden die Inserts zwischen die Restriktionsschnittstellen *PacI* und *AscI* von pBINPLUS kloniert. **pBinPS1NT** und **pBinPS2NT** beinhalten Volllänge cDNA-Kopien von Wild-Typ CPMV **RNA-1** und **RNA-2**. **pBinPS2NT2AGFP** enthält eine modifizierte Version von RNA-2, die GFP exprimiert. Die Positionen der katalytischen Sequenz 2A und vom GFP sind durch eine schwarze und graue Box markiert. [Liu et al., 2002].

pBluescript KSII+ HPV16L1 (Pflanzenkodons) # 713

Erhalten von Dr. Martin Müller,
DKZ/ATV

pVL HPV16L1 (Wild-Typ) # 191

Erhalten von Dr. Martin Müller,
DKFZ/ATV

pUFHPV16L1h (humanisierte Kodons)

Erhalten von Dr. Martin Müller,
DKFZ/ATV

pIRES HPV16E7 (Wild-Typ)

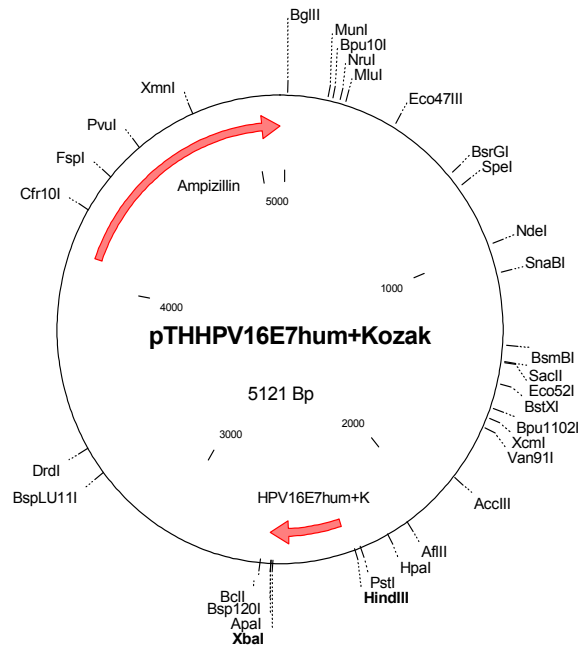
Erhalten von Dr. Wolfram Osen
DKFZ/ATV

pcDNA3.1HPV16E7+K(ACC)

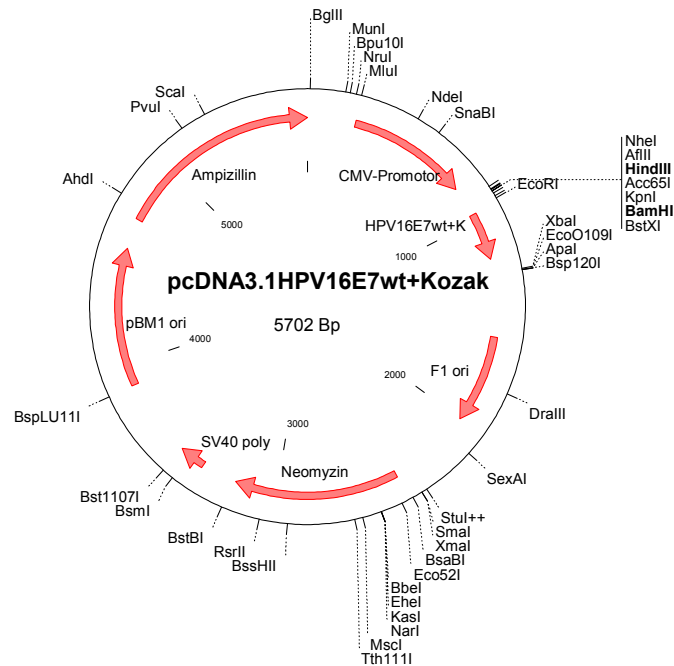
Erhalten von Nico Michel
DKFZ/ATV

pTHHPV16E7hu+Kozak

Erhalten von Peter Öhlschläger
DKFZ/ATV



pTH_{Amp}-HPV16E7hum+Kozak [Hanke et al., 1998]. Der pTH-Vektor basiert auf dem pRc/CMV-Vektor (Invitrogen). Er enthält einer Promotor/Intron-Kassette mit dem humanen CMV-Promotor (immediate early promotor). Zusätzlich enthält er ein Polyadenylierungssignal, das β -Lactamase-Gen und den ColE1 ori (origin of replication), welcher eine hohe Plasmid-Kopienzahl in Bakterien garantiert. In den pTH_{Amp}-Vektor wurden die HPV16E7-Gene E7hum+Kozak, E7hum-Kozak, E7wt+Kozak und E7wt-Kozak über die Restriktionsschnittstellen HindIII und XbaI einkloniert.



pcDNA3.1HPV16E7wt+Kozak: pcDNA3.1Neo(+) (Invitrogen, Groninge NL) konstruiert für die konstitutive Expression in einer Vielzahl von Säugerzelllinien. Er enthält einen CMV-Promotor (Cytomegalovirus), ein Polyadenylierungssignal und eine Transkriptions-Terminations-Sequenz für eine verbesserte Stabilität der mRNA, den SV40 ori für eine episomale Replikation, sowie ein Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien und Säugerzellen. In den Vektor pcDNA3.1(+) wurden die HPV16E7-Gene E7wt+Kozak, E7wt-Kozak über HindIII und BamHI einkloniert.

2.8.2 Oligonukleotid-Primer

Primer zur Herstellung von HPV16E7pl (Cowpea-Kodons) mittels Fusions-PCR:

Vorwärts-Primer

1.) 5' TAT GCA GGG CCC ATG CAT GGA GAT ACT CCA ACC CTT CAC GAA TAC ATG CTC GAC
CTT CAA CCT GAG ACT ACC GAT CTC TAT TGC TAC GAA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' CTC TGC TTG TCC AGC TGG ACC GTC AAT TTC ATC CTC TTC CTC GCT ACT GTC GTT AAG
CTG TTC GTA GCA ATA GAG ATC GGT 3'

Vorwärts-Primer

3.) 5' GGT CCA GCT GGA CAA GCA GAG CCT GAT AGA GCT CAT TAT AAT ATC GTT ACT TTT
TGT TGC AAG TGT GAC AGT ACC CTC 3'

Rückwärts-Primer

4.) 5' GGT TCT AAT ATC AAC GTG AGT GCT CTG AAC GCA AAG CCT GAG GGT ACT GTC ACA
CTT GCA 3'

Vorwärts-Primer

5.) 5' ACT CAC GTT GAT ATT AGA ACC CTC GAA GAC CTT CTC ATG GGT ACT CTT GGA ATC
GTT TGT 3'

Rückwärts-Primer

6.) 5' CAC CGA AGG CCT ATC GCG TTA AGG TTT TTG ACT GCA AAT TGG ACA AAC GAT TCC
AAG AGT ACC 3'

Primer zur Herstellung von HPV16E7hu (humanisierte Kodons) +/- Kozak-Sequenz mittel Fusions-PCR:

Vorwärts-Primer

1.) 5' GAG CAG TCT AGA TTA AGA ATG CAT GGC GAC ACC CCC ACA CTG CAT GAG TAC ATG
CTC GAT CTG CAG CCT GAA ACC ACA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' TCC ATC GAT CTC GTC TTC CTC TTC ACT GCT ATC GTT CAG CTG CTC GTA GCA ATA GAG
GTC TGT GGT TTC AGG CTG CAG ATC 3'

Vorwärts-Primer

3.) 5' GAG GAA GAC GAG ATC GAT GGA CCC GCC GGC CAG GCT GAA CCT GAC CGG GCC CAC
TAT AAT ATC GTG ACC TTC TGT TGC AAG 3'

Rückwärts-Primer

4.) 5' CTC GAG TGT CCG AAT GTC CAC ATG GGT ACT TTG GAC GCA CAG TCT GAG TGT GCT
ATC ACA CTT GCA ACA GAA GGT CAC GAT 3'

Vorwärts-Primer

5.) 5' GTG GAC ATT CGG ACA CTC GAG GAT CTG CTC ATG GGAACC CTG GGC ATC GTC TGT
CCC ATT 3'

Rückwärts-Primer

6.) 5' CTC GTC AAG CTT AAT TCT TTA AGG TTT CTG GCT GCA AAT GGG ACA GAC GAT GCC
CAG GGT 3'

Primer für die Klonierung von HPV16L1wt in pCP2/S-2A über ApaI und StuI.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' ACC AGA GGG CCC ATG TCT CTT TGG CTG CTT AGT 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' ACC AGA AGG CCT TTA CAG CTT ACG TTT TTT GCG 3'

Primer für die Klonierung von HPV16L1pl (Pflanzenkodons, Kartoffel) in pCP2/S-2A über ApaI und StuI.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' ACC AGA GGG CCC ATG TCA CTT TGG CTT CCA TCA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' ACC AGA AGG CCT TCA AAG TTT CCT TTT TTT CCT 3'

Primer für die Klonierung von HPV16L1ΔC in pCP2/S-2A über ApaI und StuI.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' ACC AGA GGG CCC ATG TCT CTT TGG CTG CTT AGT 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' ACC AGA AGG CTT TTA TTG TAG TAA AAA TTT GCG 3'

Primer für die Klonierung von HPV16E7hu-Kozak in pTH_{Amp}**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TAT CAA AAG CTT CCC GGG AAG CTT ATG CAC GGC GAC ACC 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' AGA TCA TCT AGA CTG CAG TTA GGG TTT CTG GCT 3'

Primer für die Klonierung von HPV16E7wt+Kozak in pTH_{Amp} und pcDNA3.1**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TAG CAA AAG CTT CCC GCC GCC ACC ATG CAT GGA GAT ACA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' TAG CAA GGA TCC AAG TCT AGA ATG GTT TCT GAG ACC AGA TGG 3'

Primer für die Klonierung von HPV16E7wt-Kozak in pTH_{Amp} und pcDNA3.1**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TAT CTC AAG CTT CCC GGG AAG CTT ATG CAT GGA GAT ACA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' AGA TCA TCT AGA AAA GGA TCC CTG CAG TTA TGG TTT CTG AGA 3'

Primer für die ortsspezifische (site directed mutagenesis) Mutagenese von HPV16E7hu-Kozak von zwei Mutationen im E7-Gen.

1.) 5' TAC TGC TAC GTG GCA GCT GAA CGA 3' }
 2.) 5' TCG TTC AGC TGC CAC GTA GCA GTA 3' } Mutation 1

3.) 5' ATG AGA TCG ACG GGC CCC GCC GGC 3' }
 4.) 5' TAC TCT AGC TGC CCG GGG CGG CCG 3' } Mutation 2

Primer für die Klonierung von HPV16E7pl (Cowpea-Kodons) in pN81S2NT-2A über ApaI und StuI.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TAC AGG GGG CCC ATC CTA ATG CAT GGA GAT ACT CCA ACC CTT CAC GAA TAC ATG
 CTC GAC CTT CAA CCT GAG ACT ACC GAT CTC TAT TGC TAC GAA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' TTT TGT AGG CCT TTA GGG CTT CTG TGA GCA GAT TGG ACA TAC TAT TCC CAG TGT
 GCC CAT 3'

Primer für die Klonierung von HPV16E7wt in pN81S2NT-2A über ApaI und StuI.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TAT CTC GGG CCC ATG CAT GGA GAT ACA 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' AGA TCA AGG CCT TTA TGG TTT CTG AGA 3'

Primer für die Klonierung von HPV16L1hu +/- Kozak-Sequenz in pTH_{Amp} über HindIII und XbaI**Vorwärts-Primer +Kozak**

1.) 5' CCA AGA AAG CTT CCC GCC ACC ATG AGC CTG TGG CTG CCC AGC GAG 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' CCA TAG TCT AGA TTA GAA AAA CGC TGA GCC TGA TCG AAA TTT GGA 3'

Primer für die Klonierung von HPV16L1wt +/- Kozak-Sequenz in pTH_{Amp} über HindIII und XbaI**Vorwärts-Primer +Kozak**

1.) 5' CCA AGA AAG CTT CCC GCC GCC ACC ATG CAG GTG ACT TTT ATT TAC ATC 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' CCA TAG TCT AGA TTA CAG CTT ACG TTT TTT GCG TTT AGC AGT 3'

Vorwärts-Primer -Kozak

3.) 5' CTC ACC AAG CTT ATG CAG GTG ACT TTT ATT TAC ATC 3'

Primer für den Nachweis von CPMV RNA-1 aus Pflanzenextrakten.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' GCC CAC TGC TGT ATC TAA TGT 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' CGT TCC TTC AGC AAG AAC AAC 3'

Primer für den Nachweis von CPMV RNA-2 aus Pflanzenextrakten.**Vorwärts-Primer**

1.) 5' TGTGTTGCTACCAATCCCAG 3'

Rückwärts-Primer

2.) 5' CTTGCTGAAGGGACGACCTGC 3'

2.8.3 Materialien für die Aufarbeitung von DNA

<u>CIA</u>	Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1		
<u>Phenol</u>	äquilibriertes Phenol, pH 7,5-8,0 in TE-Puffer gesättigt		
<u>Phenol/CIA</u>	50	%	Phenol
	50	%	CIA
<u>TE-Puffer</u>	10	mM	Tris-HCL, pH 7,4
	1	mM	EDTA, pH 8,0
<u>TAE-Puffer</u>	500	mM	Tris-HCL
	200	mM	Natriumacetat
	20	mM	EDTA

2.8.4 Plasmidschnellaufarbeitung / Plasmidgrossaufarbeitung mittels Kit*¹

*1 QIAprep™ Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden

<u>Lysepuffer</u>	50	mM	Tris-HCL, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNAse A
<u>Denaturierungs- puffer</u>	200	mM	NaOH
	1	%	SDS
<u>Renaturierungs- puffer</u>	3	M	Kaliumacetat, pH 5,5
<u>Säulenpuffer</u>	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	%	Isopropanol
	0,15	%	Triton X-100
<u>Waschpuffer</u>	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	%	Isopropanol
<u>Elutionspuffer</u>	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris-HCL, pH 8,5
	15	%	Isopropanol

2.8.5 RNA-Isolierung aus Zellen/Pflanzen mittels Kit*²

*2 RNeasy Mini Kit/RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden

Die Einzelkomponenten der Kit-Bestandteile werden von der Firma Qiagen, Hilden, nicht angegeben.

2.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegele mittels Kit^{*3}

*3 Qiaex II-DNA-Extraktions-Kit der Firma Qiagen, Hilden

Die Einzelkomponenten der Kit-Bestandteile werden von der Firma Qiagen, Hilden, nicht angegeben.

2.8.7 Kit für die Reverse Transkription^{*4}

*4 alle folgenden Komponenten sind Bestandteile des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MBI Fermentas, St. Leon Roth

<u>RevertAid™ Rev. Transkriptase</u>	50	mM	Tris-HCl, pH 8,3
	0,1	M	NaCl
	1	mM	EDTA
	5	mM	DTT
	0,1	%	Triton X-100
	50	%	Glycerol
	ad 120 µl H ₂ O		
	200	U/µl	RevertAid™ Rev. Transkriptase
<u>Ribonuklease-Inhibitor</u>	20	mM	HEPES-NaOH, pH 7,5
	50	mM	NaCl
	8	mM	DTT
	0,5	mM	ELUGENT® Detergenz
	50	%	Glycerol
	ad 120 µl H ₂ O		
	20	U/µl	Ribonuklease-Inhibitor
<u>5x Reaktions-Puffer</u>	250	mM	Tris-HCl, pH 8,3
	250	mM	KCl
	20	mM	MgCl ₂
	50	mM	DTT
	ad 500 µl H ₂ O		
<u>10 mM dNTP-Mix</u>	10	mM	dGTP
	10	mM	dATP
	10	mM	dTTP
	10	mM	dCTP
	ad 250 µl H ₂ O		
<u>Random-Hexamer-Primer</u>	0,2	µg/µl	Primer in wässriger Lösung

2.8.8 LPS-Detektion/LPS-Entfernung

E-Toxate®-Kit

Enthält Limulus-Lysat, Endotoxin-Standard und endotoxin-freies Wasser. Bezogen von Sigma, Deisenhofen.

PolymyzinB

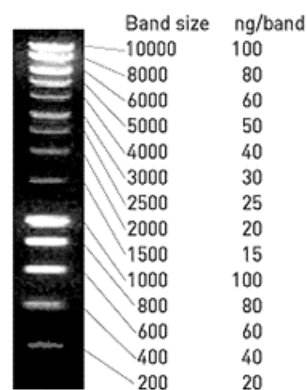
An 4 % Agarose gekoppeltes Polymyzin B von Sigma, Deisenhofen (P-1411).

2.8.9 Enzyme

<u>Restriktionsenzyme/ Puffer</u>	New England Biolabs, Schwalbach MBI-Fermentas, St. Leon Roth
<u>Kälberdarm- phosphatase (CIP)</u>	Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim
<u>T4-Ligase</u>	MBI-Fermentas, St. Leon Roth
<u>DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)</u>	Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim
<u>Pwo-DNA-Polymerase</u>	Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim
<u>Herculase™ Hotstart DNA-Polymerase</u>	Stratagene, La Jolla USA
<u>Taq-DNA-Polymerase</u>	Perkin Elmer, Branchburg, USA
<u>RNaseA</u>	Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim
<u>Trypsin</u>	Gibco BRL, Paisley, Schottland
<u>Deoxyribonuklease I</u>	Gibco BRL, Paisley, Schottland
<u>Mung Bean Exonuklease</u>	New England Biolabs, Schwalbach

2.9 Größenstandards

2.9.1 DNA-Größenstandard



Smartladder von Eurogentech, Darmstadt bezogen

2.9.2 Protein-Größenstandard

Protein	[kD]
Phosphorylase B	113,0
bovines Serumalbumin	93,0
Ovalbumin	50,3
Carbonic Anhydrase	35,5
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	28,8
Lysozym	21,4

Der „Low-range“-Proteinstandard für SDS-PAGE wurde von der Firma BIORAD, München bezogen.

2.10 Material für Immunisierung und immunologische Methoden

2.10.1 DNA-Immunisierung

<u>Kardiotoxin</u>	gewonnen aus <i>Naja nigricollis</i> , bezogen von der Firma Latoxan, Rosans, Frankreich
<u>Isofluran Curamed</u>	Inhalationsnarkotikum mit dem Wirkstoff Isofluran, bezogen von der Firma CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe. Ersatz für das vom Markt genommene Metofane.
<u>Metofane</u>	Inhalationsnarkotikum mit dem Wirkstoff Methoxyfluran, bezogen von der Firma Janssen-Cilag, Neuss
<u>Rompun 2 %</u>	Analgetikum, Anästhetikum und Muskelrelaxan der Firma Bayer Leverkusen, mit dem Wirkstoff Xylazin. Zur Narkose bei DNA- Immunisierung in Verbindung mit Ketamin 10 % eingesetzt. Pro kg Körpergewicht wurden 10 mg Rompun 2 % in Kombination mit 75 mg/kg Körpergewicht Ketamin 10 % eingesetzt.
<u>Ketamin 10 %</u>	Analgetikum und Anästhetikum der Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen. In Verbindung mit Rompun 2 % bei i.m Immunisierung eingesetzt.

2.10.2 Isolierung von Milzzellen

<u>ACT-Puffer</u>	17 mM Tris 160 mM Ammoniumchlorid auf pH 7,2 einstellen und autoklavieren
-------------------	---

2.10.3 Zytotoxizitätstest

<u>Tritonlösung</u>	10 % Triton X-10 in PBS, sterilfiltrieren
---------------------	--

2.10.4 Synthetische Oligopeptide

<u>E7-Peptid (AS 49-57):</u>	Bei dem RAHYNIVTF-Motiv handelt es sich um ein H2D ^b restringiertes zytotoxisches T-Zell Epitop, welches zur Restimulierung von Milzzellen und zur Beladung der Zielzellen in Zytotoxizitätstests u. Elispots verwendet wurde. Synthetisiert in der Peptidsyntheseinheit des DKFZ, Heidelberg [Ressing et al., 1995].
<u>L1-Peptid (AS 165-173):</u>	Bei dem AGVDNRECI-Motiv handelt es sich um ein H2D ^b restringiertes zytotoxisches T-Zell Epitop, welches zur Restimulierung von Milzzellen und zur Beladung der Zielzellen in Zytotoxizitätstests u. Elispots verwendet wurde. Synthetisiert in der Peptidsyntheseinheit des DKFZ, Heidelberg [Oehlschlaeger et al., 2003].

2.10.5 Elispot-Assay (Enzyme-linked Immunospot Assay)

<u>IFN-γ Antikörper</u>	Monoklonaler gereinigter Ratten anti-Maus IFN- γ Antikörper der Firma BD PharMingen, Heidelberg. Eingesetzt (2 $\mu\text{g/ml}$) als Erst-Antikörper im Elispot-Assay.
<u>Biotin-IFN-γ Antikörper</u>	Monoklonaler an Biotin gekoppelter Ratten anti-Maus IFN- γ Antikörper der Firma PharMingen, Heidelberg. Eingesetzt (2 $\mu\text{g/ml}$) als Zweit-Antikörper im Elispot-Assay.
<u>SAP</u>	Streptavidin-Alkalin-Phosphatase der Firma BD PharMingen, Heidelberg. Wurde vor der Anwendung 1:1 in Glycerol verdünnt.
<u>BCIP/NBT-Substrat</u>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat / Nitro Blau Tetrazolium. Flüssiges Substrat-System der Firma Sigma, Deisenhofen, 1:1 eingesetzt.

2.10.6 Detektion von gesamt IgG im Serum von C57BL/6 (H2^b) und BALB/c-Mäusen nach DNA-Immunisierung mittels GST-Capture ELISA

<u>Glutathion-Casein</u>	Stocklösung: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ auf 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in Coating-Puffer verdünnt. Zur Verfügung gestellt von Peter Sehr, DKFZ/ATV.
<u>GST-Tag</u>	Stocklösung: 50 mg/ml auf 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Bakterienlysate in Casein-Blockpuffer verdünnt. Zur Verfügung gestellt von Peter Sehr, DKFZ/ATV.
<u>GST-HPV16E7wt</u>	Stocklösung: 16 mg/ml auf 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Bakterienlysate in Casein-Blockpuffer verdünnt. Zur Verfügung gestellt von Peter Sehr, DKFZ/ATV.
<u>IgG-Antikörper</u>	Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG-Antikörper, der gegen die H- und L-Ketten gerichtet ist und in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Bezogen von der Firma Dianova, Hamburg.

2.10.7 Mauslinien

In den DNA-Immunisierungsexperimente wurden Tiere der Mausinzuchtstämme C57BL/6 (H2^b) und BALB/c verwendet. Die Lieferung der Tiere erfolgte durch die Firma Charles River WIGA, die Kultur erfolgte unter Isolator -Bedingungen im Tierlabor des DKFZ.

2.11 Kultivierung von Zellen

2.11.1 Kulturmedien

2.11.1.1 Bakterienkultur

<u>LB-Medium</u>	10	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
	ad 1000 ml H ₂		
	auf pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren		
<u>LB-Agarplatten</u>	98,5	%	LB-Medium
	1,5	%	Bacto-Agar
	nach dem Autoklavieren Lösung auf etwa 50°C abkühlen lassen, Ampizillin zugeben		
<u>Ampizillin</u>	Stammlösung = 100 mg/ml; 100 µl der Stammlösung/ml Bakterienmedium		
<u>Rifampizin</u>	Stammlösung = 50 mg/ml Für Agrobakterien-Kultivierung 50 µg/ml		
<u>Elektroporations-Medium</u>	1	ml	1M Glukose
	49	ml	LB-Medium
<u>S.O.C.-Medium</u>	97	ml	H ₂ O bidest.
	2	g	Bacto-Trypton
	0.55	g	Bacto-Hefeextrakt
	1	ml	1M NaCl
	1	ml	1M KCl
	Steril autoklavieren und auf 55 °C abkühlen lassen.		
	1	ml	1M MgCl ₂
	1	ml	1M MgSO ₄
	1	ml	2M Glucose
	Durch 0,2µm Filter sterilfiltrieren.		

2.11.1.2 Bakterienstämme (*E. coli*, Agrobakterien)

<u>DH5α</u>	supE44□lacU169 (φ80 lacZ□M15) hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 deoR. Der Stamm kann besonders effizient transformiert werden. Zusätzlich besitzen sie den genetischen Hintergrund, um große Plasmide zu stabilisieren und vor Degradation zu schützen. Bezogen von Invitrogen, Groningen (NL).
-------------	---

E.coli (sure)

e14- (McrA-) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lac^qZDM15 Tn10 (Tet^r)].

Dieser Stamm ist geeignet, DNA mit unregelmäßigen Sekundärstrukturen und Methylierungen zu produzieren. Bezogen von Stratagene, La Jolla (USA).

E.coli K12 (GM 2163)

F- ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136(StrR) dam13::Tn9(CamR) xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2.

Der Stamm ist Dam⁻ und Dcm⁻ für die Herstellung von unmethylierter DNA. Bezogen von Invitrogen, Groningen (NL).

Agrobacterium tumefaciens (LBA4404)

Der Agrobakterien-Stamm LBA4404 enthält das Ti-Plasmid pAL, welches nur die *vir* und *ori* Region beinhaltet (disarmed) [Heokema et al., 1983]. Bezogen von Invitrogen, Groningen (NL).

2.11.1.3 Kultur eukaryotischer Zellen

<u>αMEM</u>	10	%	FCS
	2	mM	L-Glutamin
	100	U/ml	Penizillin
	100	µg/ml	Streptomycin
	5x10 ⁻⁵	M	β-Mercaptoethanol
<u>αMEM-Con A</u>	10	%	FCS
	2	mM	L-Glutamin
	100	U/ml	Penizillin
	100	µg/ml	Streptomycin
	0,01	mM	β-Mercaptoethanol
	25	mM	Methyl-α-Mannopyranosid
	3,3	%	Concanavalin A-induzierter Rattenmilz Zellüberstand als Quelle für IL-2

Bei Concanavalin A handelt es sich um ein starkes T-Zell-Mitogen, welches aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) gewonnen wird.

<u>1 x DMEM</u>	10	%	CS
	2	mM	L-Glutamin
	100	U/ml	Penizillin
	100	µg/ml	Streptomycin

<u>RPMI</u>	5	%	FCS
	2	mM	L-Glutamin
	100	U/ml	Penizillin
	100	µg/ml	Streptomycin

<u>RPMI+</u>	5	%	FCS
	2	mM	L-Glutamin
	100	U/ml	Penizillin
	100	µg/ml	Streptomycin
	600	µg/ml	Genitizin (G418)

<u>Kryokonservierung</u>	45	%	α MEM-Con A
	45	%	FCS
	10	%	DMSO

Sowohl FCS wie auch CS wurden für 60 Minuten bei 56 °C inaktiviert; die den Grundmedien zugesetzten Ingredienzien wurden durch 0,2 μ m Sterilfilter gepresst.

Concanavalin A-induzierter Rattenmilzzellüberstand wurde aus 8 Monate alten Lewis Ratten gewonnen (Zur Verfügung gestellt von Wolfram Osen, DKFZ-Heidelberg).

<u>Trypsin/EDTA-Lsg.*</u>	140	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	0,56	mM	Na ₂ HPO ₄
	25	mM	Tris
	5	mM	Glukose
	0,125	%	EDTA
	0,125	%	Trypsin

*Trypsin/EDTA wurde von der Firma Gibco BRL, Paisley, Schottland, bezogen.

<u>10 x PBS</u>	80	g	NaCl
	20	g	KCl
	14,4	g	Na ₂ HPO ₄
	2,4	g	KH ₂ PO ₄
	ad 1 L mit Aqua bidest, autoklavieren		

2.11.1.4 Eukaryotische Zelllinien

<u>RMA</u>	T-Lymphomzellen einer C57BL/6-Maus [Ljunggren et al., 1985]
<u>RMA-S</u>	RMA-Zelllinie, TAP-defizient (Transporter ist involviert in die Antigen-Prozessierung), [Ljunggren et al., 1990]
<u>2F11</u>	stabil E7-exprimierender Transfektanten-Klon, Synonym RMA-E7 [Speidel et al., 1997].
<u>NIH3T3</u>	Mausfibroblastenzelllinie [Copeland et al., 1979], bezogen von European Collection of Cell Cultures (Salisbury/Wiltshire, UK).
<u>Caski</u>	Zelllinie aus einem humanen Zervixkarzinom, die HPV-16 E7 exprimiert und etwa 400 DNA-Kopien von HPV-16 enthält [Pattillo et al., 1977].
<u>293T-Zellen</u>	293-Zellen sind humane epitheliale Nierenzellen, die durch das Adenovirus E1A –Genprodukt transformiert werden. Sie exprimieren zusätzlich das grosse SV40 T-Antigen (293T-Zellen), was die episomale Replikation von Plasmiden erlaubt, die einen SV40 ori und eine frühe Promotorregion enthalten. Sie lassen sich sehr gut transfizieren mit einer Effizienz von bis zu 70 % mit dem Effecten-Kit (Qiagen, Hilden). Zur Verfügung gestellt von Thorsten Pisch, DKFZ/ATV.

Primäre
dendritische Zellen

Bone marrow derived dendritic cells (BMDC), entnommen aus Femur und Tibia von C57BL/6-Mäusen (siehe Methoden). Im Knochenmark befinden sich alle möglichen Lymphzellen (hauptsächlich B-Zellen und rote Blutplättchen), eine Mischung aus reifen und unreifen DCs. Aus 2 Mausbeinen kann man 1×10^8 DCs gewinnen. Zur Verfügung gestellt von Eva-Jasmin Freyschmidt, DKFZ/ATV.

C3-Zellen

Tumorzelllinie, transformiert mit dem kompletten HPV16-Genom [Feltkamp et al., 1993]

3.0 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Aufbewahrung und Kultur von Bakterien

Bakterien können in einer Flüssigkultur bei 4 °C etwa drei Wochen aufbewahrt werden, auf LB-Agarplatten etwa vier Wochen. Für eine längere Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 1 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml 86 %-igem (v/v) Glycerin (sterilfiltriert) vermischt und bei -70 °C eingefroren.

Bakterienklone wurden durch Ausplattieren von Bakterien auf Agarplatten mit einem Drigalski-Spatel hergestellt. Für eine Flüssigkultur wurde eine geeignete Menge Nährmedium mit einer Einzelkolonie von einer Platte oder aus einer Glycerinkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C.

3.1.2 Herstellung kompetenter E.coli-Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation durch Elektroporation wurden 500ml LB-Medium mit 5ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C mit 220 rpm geschüttelt, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 ($\pm 0,03$) erreicht hatten. Dies dauert ca. 2,5-3 Stunden. Der OD-Wert sollte häufiger kontrolliert werden, wenn er einen Wert von 0,2 erreicht hat, um ein Überwachsen zu verhindern. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis gekühlt und dann bei 4 °C mit 4000 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 500 ml kaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte erneute Zentrifugation (4 °C / 4000 rpm / 10 min),

Resuspendierung in 50 ml kaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin und 20 min Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert, (4 °C / 4000 rpm / 10 min), in 2 ml kaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei -70 °C eingefroren.

3.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Aus einem Glycerolstock, der bei -80 °C gelagert wurde, werden 20 µl LBA4404-Agrobakterien entnommen und in 10 ml LB-Medium (siehe 2.10.1.1) bei 28 °C für 48 Stunden kultiviert. Aus dieser Kultur wurden anschließend 5 ml entnommen und 100 ml LB_{Rif}-Medium (Rifampizin 50 µg/ml) hinzugegeben. Die Agrobakterien-Kultur wurde für weitere 4 Stunden bei 28 °C auf einem Schüttler expandiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und bei 4000 rpm bei 4°C für 15 min abzentrifugiert, in 20 ml Puffer 1 (1 mM HEPES mit KOH auf pH 7,0 eingestellt) bei 4 °C resuspendiert. Anschließend werden die Zellen erneut bei 4000 rpm für 5 min abzentrifugiert, nochmals in 20 ml Puffer 1 aufgenommen, nochmals 5 min abzentrifugiert und in 0,7 ml 10 %-iger (v/v) Glycerol-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden zu 40 µl Aliquots abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Bakterielle Transformation durch Elektroporation (E.coli)

Die Elektroporation ist ein Verfahren, um Plasmid-DNA schnell und effizient in Bakterien einzuschleusen.

Hierzu wurden 0,2 µg DNA auf den Boden einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette pipettiert, dazu wurden 40 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien (siehe 3.1.2) hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte in der Elektroporations-Apparatur bei einem Impuls von 25 kV, 25 µF und 200 Ohm Schutzwiderstand. Die Zeitkonstante τ , d.h. der Zeitraum, in der die Spannung auf $1/e$ abfällt, betrug im optimalen Fall 4 ms. Es wurden umgehend 1 ml eisgekühltes LB-Glukose-Medium oder S.O.C-Medium (siehe 2.10.1.1) hinzugegeben und der gesamte Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden LB-Agarplatten mit Ampizillin (100 µg/ml Medium) angeimpft, wobei mehrere Verdünnungsstufen der Bakterienlösung im Bereich 1:10 bis 1:10.000 ausplattiert wurden. Die angeimpften LB-Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien durch

Plasmidschnellaufarbeitung, analytischen Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.1.3.1 Bakterielle Transformation durch Elektroporation (*Agrobacterium tumefaciens*)

Für eine Elektroporation mit LBA4404 (*Agrobacterium tumefaciens*) wurden 40 μl elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 μl in TE-Puffer gelöster DNA gemischt und in Elektroporations-Küvetten (Elektroden mit 2 mm Abstand, Invitrogen Groningen) pipettiert. Alle verwendeten Materialien wurden auf Eis vorgekühlt. Die DNA-Bakterien-Mischung wurde einem Elektroschock ausgesetzt (Biorad Gene Pulsar).

Einstellung:	2,5	kV
	25	μF
	200	Ohm

Die Zeitkonstante τ , d.h. der Zeitraum, in der die Spannung auf $1/e$ abfällt, betrug im optimalen Fall 4 ms. Es wurden umgehend 1 ml eisgekühltes YEP-Medium hinzugegeben und der gesamte Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 2-3 stündigen Inkubation bei 28 °C wurde die Bakteriensuspension in Selektionsmedium (LB-Medium, 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) überführt und weitere 3 Tage bei 28 °C kultiviert.

3.2 Pflanzenbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Inokulation in Primärblätter von *Vigna unguiculata* (Cowpea)

Die zu inokulierende DNA (pCP1, pCP2S-2A-rekombiant) wurde zunächst mit den entsprechenden (MluI, EcoRI) Enzymen linearisiert und mit H_2O -bidest auf eine DNA-Konzentration von 20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ eingestellt. Die DNA-Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt (je 125 μl pCP1 und pCP2S-2A) und bis zur Inokulation bei 4 °C aufbewahrt. Der Ansatz von 250 μl reicht für 5 Pflanzen, denn es wurde pro Pflanze immer nur eines der primären Blätter mit jeweils 50 μl der DNA-Lösung behandelt. Zuvor wurden die zu inokulierenden Blätter allerdings mit einem sehr feinen Glaspuder bestäubt. Anschließend wurden 50 μl auf ein Blatt gegeben und mit leichtem Druck in die Blattoberfläche einmassiert. Durch das Glaspuder wurde die Kutikula (Wachsschicht) der Blattoberfläche

verletzt und die DNA-Moleküle können in die Pflanzenzellen eindringen. Für die Virusreplikation (CPMV) in der Pflanzenzelle ist es notwendig, dass beide linearisierten DNA-Moleküle in die Zelle gelangen. Nach dieser sehr groben Inokulationsmethode wurden die primären Blätter mit Wasser bespritzt und die Pflanzen abgedunkelt für die nächsten 8 Stunden weiterkultiviert, um zu verhindern, dass die Blätter vergilben und absterben. Nach 3 Tagen wurden die Pflanzen regelmäßig auf eventuelle Symptome (gelbe Läsionen) in Folge einer Virusinfektion überprüft. Methode nach [Dessens al., 1993].

3.2.2 Agrobakterien-Inokulation in Primärblätter von *Nicotiana benthamiana* (Wildtabak)

<u>MMA:</u>	10 mM MgCl ₂ , 10 mM MES, pH 5,6, 100µM Acetosyringone			
<u>MMA-Puffer:</u>	1	ml	1M	MgCl ₂
	10	ml	0,1M	MES
	100	µl	0,1M	Acetosyringone
	ad 100 ml H ₂ O			

Ausgehen von Glycerinkulturen (-80 °C) mit Agrobakterien, die mit rekombinanten binären Plasmiden transformiert sind, wurden jeweils 10 ml LB-Medium (50 µg/µl Kanamycin) mit einer Impföse inokuliert und für 48 Stunden bei 28 °C (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die rekombinanten Agrobakterien (Konstrukte siehe Tab. 4-1) bei 4000 rpm 4 °C geerntet und das Pellet in 10 ml MMA-Puffer resuspendiert. Die Agrobakterien-Suspensionen mit entweder RNA-1 oder RNA-2 wurden in Verhältnis 1:1 gemischt (jeweils 2 ml), in 1 ml Spritzen aufgezogen und in die Suspension an verschiedenen Stellen der Unterseite der Tabakblätter inokuliert. Inokuliert wird ohne Kanüle und mit leichtem Druck. Auf diese Weise kann man beobachten, wie sich die Suspension im Blatt verteilt. Auch hier ist zu beachten, dass das Blatt nicht zu stark verletzt wird, um ein Absterben zu verhindern. Methode nach [Grimsley et al., 1989, 1995]. Auch bei dieser Methode wurden die Pflanzen in regelmäßigen Abständen auf Symptome untersucht. Im Falle von Pflanzen, die mit einem GFP-Konstrukt inokuliert wurden, kann man die GFP-Fluoreszenz mit Hilfe einer UV-Lampe detektieren (siehe Ergebnisse Abb. 4-3, 4-6).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Plasmidschnellaufarbeitung (Plasmid-DNA-Minipräparation)

Für den analytischen Restriktionsverdau sowie für Transformationen ist es ausreichend, kleine DNA-Mengen zur Verfügung zu haben. Diese Methode liefert relativ kleine Plasmid-DNA-Mengen in ausreichender Qualität.

Es wurden am Vortag einzelne Bakterienkolonien von LB-Agarplatten in jeweils 10 ml LB-Medium mit Ampizillin überführt und bei 37 °C und 200 UPM über Nacht auf dem Schüttler kultiviert. Von der gewachsenen Bakterienkultur wurden 1,7 ml abgezogen, mit 0,3 ml reinem Glycerol in 2 ml Kryokonservierungsröhrchen gut vermischt und bei -70 °C gelagert. Die restliche Bakteriensuspension wurde bei 4 °C und 4500 UPM (Heraeus-Zentrifuge) für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 0,3 ml Lysepuffer (siehe, wie auch die anderen aufgeführten Puffer, 2.8.4) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Denaturierungspuffer und kurzem Mischen wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Addition von 0,3 ml eiskaltem Renaturierungspuffer und eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Das Bakterienlysat wurde 10 Minuten bei 13.000 UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert, der DNA-haltige Überstand in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 ml eines Phenol/CIA-Gemisches (1:1) zur Protein-Fällung zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde für 5 Minuten bei 13.000 UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert und die organische Phase mit den gefällten Proteinen abgenommen. Zu der DNA-haltigen wässrigen Phase wurde 1 ml Isopropanol zugegeben und direkt im Anschluss für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren wurde das DNA-Pellet für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl H₂O oder TE-Puffer gelöst und nach Zugabe von 10 U RNase bei -70 °C gelagert.

Zur Kontrolle der gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit 1 µl ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt.

3.3.2 Plasmidgrossaufarbeitung (Plasmid-DNA-Maxipräparation)

Größere Plasmid-DNA-Mengen in sehr reiner Qualität (OD_{260} / OD_{280} -Quotient = 1,8-2,0) für Klonierungen, Transformationen, Transfektionen, Immunisierungen und Sequenzanalysen können durch die Plasmidgrossaufarbeitung gewonnen werden.

Mit 200 µl Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid enthält und deren Lagerung in Glycerin bei -70 °C erfolgte, wurden 250 ml LB-Medium mit Ampizillin angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler bei 200 UPM kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde 10 Minuten bei 6.000 UPM (Sorvall GS-3-Rotor) und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 10 ml Lysepuffer (siehe, wie auch die anderen aufgeführten Puffer, 2.8.4) resuspendiert. Es wurden 10 ml Denaturierungspuffer zugegeben, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml eisgekühlter Renaturierungspuffer zugefügt, gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 30 Minuten bei 15.000 UPM (Sorvall SA-600-Rotor) und 4 °C zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand auf die, während der Zentrifugation mit Säulenpuffer equilibrierte, Qiagen-Säule gegeben. Nachdem die DNA-haltige Flüssigkeit durch die Säule gelaufen war, wurde zwei mal mit je 30 ml Waschpuffer gewaschen und abschließend die DNA mit 15 ml Elutionspuffer eluiert. Die DNA wurde mit 12 ml Isopropanol präzipitiert und das Pellet nach dem Zentrifugieren (45 Minuten, 4 °C, 5.000 UPM, Heraeus-Zentrifuge) mit 5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (30 Minuten, 4 °C, 5.000 UPM, Heraeus-Zentrifuge) wurde das bei RT getrocknete Pellet in 300 µl H₂O oder TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

3.3.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen, die in der Regel 4-6 Basenpaare umfassen. Der Schnitt erfolgt entweder direkt innerhalb der Erkennungssequenz oder in der Nähe dessen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen, wobei der Phosphatrest am 5'-Ende zurückbleibt. Die Einheit eines Restriktionsenzym ist als diejenige Menge definiert, die unter optimalen Reaktionsbedingungen in einer Stunde 1 µg des angegebenen Substrates spaltet. Die Restriktionsverdau erfolgte in dem für die jeweilige Restriktionsendonuklease angegebenen Puffer. Sowohl die Restriktionsendonukleasen wie auch die entsprechenden Puffer wurden

von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach und MBI-Fermentas, St. Leon Roth, bezogen.

Da Glycerin mit etwa 50 % wesentlicher Bestandteil der meisten Puffer ist und bei einer Gesamtkonzentration von über 5 % die Aktivität der Enzyme sowie die Sequenz-Spezifität negativ beeinflusst, ist darauf zu achten, den Volumenanteil an Enzymen auf 1/10 des Gesamtvolumens zu beschränken. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Stunden, präparative Verdauungen wurden in der Regel über Nacht angesetzt.

Während bei den analytischen Ansätzen etwa 1 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut wurden, erfolgte der Verdau größerer DNA-Mengen zur präparativen Aufreinigung (10-30 µg DNA) in einem Gesamtvolumen von 200-300 µl. Die Enzym- und Puffermenge wurde, wie vom entsprechenden Hersteller empfohlen, eingesetzt - nach gegebener Empfehlung wurde noch BSA zugesetzt und schließlich mit H₂O auf das gewählte Gesamtvolumen aufgefüllt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Fragmente durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt (siehe 3.3.4).

3.3.4 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die negativ geladenen Nukleinsäuren trennen sich im elektrischen Feld nach ihrer Größe auf, die anhand eines parallel laufenden Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden kann. Die Gele wurden zur Abschätzung der DNA-Konzentration, zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten und zur analytischen Auftrennung von Restriktionsverdauen gefahren.

Es wurden 1 %-ige Agarosegele gegossen, hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Elektrophorese-Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml). Nach dem Aushärten des Gels wurden die Proben, denen zuvor 1/5 ihres Volumens 6 x BPB-Ladepuffer zugegeben wurde, in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte, je nach gewünschter Auftrennung, über 2-6 Stunden, bei einer Spannung von 60-80 Volt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Leuchtschirm bei 254 nm Wellenlänge mit einer Polaroid-Kamera fotografiert oder das Bild wurde direkt auf Diskette gespeichert. Präparative Gele wurden unter langwelligem UV-Licht (366 nm) betrachtet und die gewünschte Bande isoliert. Als Molekulargewichtsmarker der DNA Smart Ladder eingesetzt.

3.3.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Qiaex II Gel-Extraktions-Kit

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit möglichst wenig Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und gewogen. Je nach Gewicht des herausgetrennten Gelblocks und der Länge der zu isolierenden DNA-Fragmente wurde die entsprechende Menge des Puffers QX 1 (siehe, wie auch die anderen Kit-Komponenten, 2.8.6) sowie das Reagenz Qiaex II hinzugegeben. Für 10 Minuten wurde das Gemisch bei 50 °C inkubiert, dabei alle 2 Minuten gemischt, um die Silizium-Kügelchen, an welche die DNA bindet, in Suspension zu halten. Durch die Ingredienzien des Puffers QX 1 wird der Gelblock aufgelöst. Da die aus dem Gel gelöste DNA nur unter definierten pH-Bedingungen optimal an die Kügelchen bindet, enthält der Puffer QX 1 einen pH-Indikator, der sich bei einer vorhandenen Übersäuerung orange färbt. In diesem Fall wurde mit 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung alkalisiert. Nach der zehnminütigen Inkubation wurde für 30 Sekunden bei 12.000 UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde das Pellet in 500 µl Puffer QX 1 gelöst und erneut zentrifugiert. Es wurde zwei weitere Male mit Puffer PE gewaschen, um die aufgelösten Gel-Bestandteile von den - mit DNA beladenen - Kügelchen zu trennen. Nach dem letzten Dekantieren wurde das Pellet für etwa 10-30 Minuten an der Luft getrocknet. Sobald das Pellet eine weißliche Farbe angenommen hatte, wurde mit 20 µl H₂O eluiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur (bei zu isolierenden DNA-Fragmenten mit einer Größe von über 4000 bp 5 Minuten bei 50 °C) inkubiert und schließlich für 30 Sekunden bei 12.000 UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand, der die gelöste DNA enthielt, wurde abschließend abgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in wässriger Lösung wurde u.a. die foto-metrische Bestimmung verwendet. Hierbei wurde die Absorption der Nukleinsäuren in einer geeigneten Verdünnung (Endvolumen 500 µl) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei entspricht die Absorption bei 260 nm (optische Dichte 260, OD₂₆₀) von 1 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Proteine zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm (OD₂₈₀), dementsprechend ist der gemessene Wert in diesem Wellenlängenbereich ein Maß für die Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen. Ein OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotient zwischen 1,8 und 2,0 entspricht einer sehr reinen DNA-Lösung.

Wurde DNA aus Agarosegelen extrahiert, erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung durch Abschätzen anhand des Molekulargewichtsmarkers bei den obligatorischen Kontroll-Agarosegelen.

- für einzelsträngige DNA und RNA: $OD_{260, 1 \text{ cm}} = 1 \quad c \sim 33 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- für doppelsträngige DNA: $OD_{260, 1 \text{ cm}} = 1 \quad c \sim 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

3.3.7 Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden

Um ein vorzeitiges Schließen eines linearisierten Plasmides zu verhindern, können glatte wie auch überstehende 5'-DNA-Enden durch Kälberdarmphosphatase (CIP, calf intestine phosphatase) dephosphoryliert werden.

Die zu dephosphorylierende DNA wurde direkt nach dem Restriktionsverdau in CIP-Puffer (Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim) in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g} / 10 \mu\text{l}$ Puffer aufgenommen. Beim Schneiden von 5'-überstehenden Enden wurden 0,1 U CIP (Boehringer Mannheim (LaRoche), Mannheim) je pmol eingesetzter DNA zugesetzt und für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (siehe 3.3.9) , um eine Dephosphorylierung der Insert-DNA bei der Ligation durch die Phosphatase zu unterbinden. Die 5'-dephosphorylierte DNA wurde anschließend in 30 μl H₂O gelöst und bei -70 °C gelagert.

3.3.8 Ligation von DNA

Für die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyende und der 5'-Phosphatgruppe, wurde die T₄-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Es wurden äquimolare Mengen Plasmid-DNA und Insert-DNA mit H₂O auf ein Volumen von 17 μl gebracht.

$$1 \mu\text{g} = \frac{10^6}{(\text{Bp Vektor/Insert}) \times (660\text{Da})} = \text{pmol DNA}$$

Das DNA-Gemisch wurde 5 Minuten bei 45 °C inkubiert, um potentiell vorhandene sekundäre DNA-Strukturen aufzulösen. Sofort nach der Inkubation wurde auf Eis weitergearbeitet. Es wurde 1 μl der Enzymlösung (1 U/ μl) und 2 μl des entsprechenden

Puffers hinzugegeben und mindestens 1 Stunden bei RT inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden jeweils 1,5 µl für die Elektroporation (siehe 3.1.3) eingesetzt und der Rest bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3.9 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Verunreinigungen wie Proteinen und Lipiden aus Nukleinsäure-Gemischen. Die Proteine denaturieren durch die Phenol-Einwirkung und können, ebenso wie die Lipide, zusammen mit dem Phenol entfernt werden. Durch Ethanoleinwirkung wird im Anschluss der ausgesprochen hydrophilen DNA die sie umgebenden H₂O-Moleküle entzogen, wodurch sie ausfällt. Zur DNA-Lösung wurde im gleichen Verhältnis Phenol/CIA sowie zusätzlich 200 µl TE-Puffer gegeben, für etwa eine Minute intensiv geschüttelt, um schließlich für 5 Minuten bei 13.000 UPM (Tischzentrifuge) zu zentrifugieren. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und es wurden 400 µl CIA zugegeben, um erneut zu extrahieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand wieder in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung das 2,5-fache Volumen eiskaltes absolutes Ethanol zugefügt und mindestens 20 Minuten bei -70 °C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4 °C, 13.000 UPM (Tischzentrifuge) über 30 Minuten hinweg, wurde dekantiert und, um mitgefällte Salze zu entfernen, mit 70 %-igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert (4 °C, 13.000 UPM, 15 Minuten, Tischzentrifuge), dekantiert und nach dem Abdampfen des Alkohols bei Raumtemperatur über 15-20 Minuten hinweg, letztlich das DNA-Pellet in TE-Puffer oder H₂O gelöst. Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte bei -70 °C.

3.3.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion können gezielt bestimmte DNA-Regionen amplifiziert werden. Hierzu werden Primer (siehe 2.8.2) verwendet, die zumindest teilweise komplementär zu den Ausgangs-DNA-Strängen („template“) sind und an den Enden der zu amplifizierenden DNA-Stückes binden. Die PCR verläuft in Zyklen, welche jeweils aus Denaturierung (denaturation), Anlagerung (annealing) und Verlängerung (elongation) bestehen. Durch die Hitze-Denaturierung liegt die zu amplifizierende DNA einzelsträngig (ssDNA) vor. Im nächsten Schritt, dem Annealing, lagern sich die Primer an komplementäre

Nukleotidsequenz der Template-DNA. Der dritte Schritt (Elongation) umfasst das Binden der thermostabilen DNA-Polymerase an die Primer und die Synthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnittes. Mit dem nun folgenden Denaturierungsschritt beginnt der Zyklus von neuem und die Doppelstränge aus Template und neu synthetisierter DNA werden getrennt. Pro Doppelstrang aus Template und neu synthetisiertem DNA-Strang entstehen so zwei Templates. Für die Amplifizierung der kodonoptimierten E7-Gene wurde in dieser Arbeit die *Herculase*TM-Hotstart-DNA-Polymerase verwendet, die sich durch die Eigenschaft des Proof-Readings, hohen Genauigkeit und einer guten Prozessivität auszeichnet, wodurch die Wahrscheinlichkeit PCR-bedingter, unerwünschter Mutationen sinkt.

Pipettierschema:

5 µl 10x PCR-Puffer (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
 2 µl Primer 1 (75 ng/µl)
 2 µl Primer 2 (75 ng/µl)
 1 µl dNTP-Mix (je dNTP 2,5 mM)
 1 µl Template (50 ng/µl)
 1 µl *Herculase*TM-Hotstart-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
 H₂O ad 50 µl

Die PCR-Ansätze wurden unter der sterilen Werkbank pipettiert, um Kontaminationen mit Nukleinsäuren zu vermeiden. Jeder Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl abgedeckt, damit keine Flüssigkeit aus dem Reaktionsgemisch verdunsten kann. Die Ansätze wurden unter folgenden Bedingungen inkubiert:

1 Zyklus	3 Minuten		98 °C
10 Zyklen	{ 40 Sekunden 30 Sekunden 60 Sekunden/kb Amplifikat	PrimerT _m	98 °C
			-5 °C
			72 °C
25 Zyklen	{ 40 Sekunden 30 Sekunden 60 Sekunden/kb Amplifikat +10 Sekunden	PrimerT _m	98 °C
			-5 °C
			72 °C
1 Zyklus	10 Minuten		72 °C
		bis zu 24 Stunden bei	4 °C

Nach der PCR-Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit der amplifizierten DNA abpipettiert, um eine Trennung vom Mineralöl zu bewirken. Das Ergebnis der PCR wurde in einem analytischen Agarosegel untersucht und gegebenenfalls das restliche Volumen in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, um die verbliebenen Nukleotide, Primer und Proteine von der amplifizierten DNA zu trennen.

3.3.11 Fusions-PCR

Die Fusions-PCR funktioniert durch das Hintereinanderschalten von mehreren PCR-Schritten (siehe Abb. 4-10). Es werden im Falle von HPV16E7pl (cowpea-kodon-optimiert) in zwei getrennten PCR-Reaktionen jeweils 4 Oligonukleotid-Primer eingesetzt, die sich an ihren Enden an jeweils 21 Basenpaare überlappen. An diesen Überlappungsbereichen hybridisieren die Primer mit den komplementären Sequenzen und die DNA-Polymerase füllt die Lücken mit Nukleotiden auf. Auf diese Weise entstehen zwei Subfragmente (A und B, siehe Abb. 4-10) von HPV16E7pl. Die Subfragmente wurden anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. In einer dritten PCR-Reaktion hybridisieren die beiden Subfragmente mit ihren komplementären Sequenzen und das komplette HPV16E7pl-Gen wird mittels der endständigen Primer amplifiziert (siehe Abb. 4-10). Die Kodonoptimierung (Humanisierung) des HPV16E7-Gens wurde analog durchgeführt (siehe 5.1, 5.1.1). Über die 5' Primer wurde vor das HPV16E7-Gen zusätzlich die Kozak-Sequenz eingeführt (CCC GCC GCC ACC, siehe 2.8.2) [Kozak et al., 1987]. So entstanden die Konstrukte pTHHPV16E7wt+K, pTHHPV16E7opt+K, pcDNA3.1HPV16E7wt+K.

3.3.12 RNA-Extraktion aus Pflanzenblättern

*2 RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden

Es ist wichtig mit der richtigen Menge an Pflanzenmaterial zu beginnen, um die optimale RNA-Ausbeute und Reinheit in den Säulen zu erreichen. Ein Maximum von 100 mg Pflanzenmaterial kann von den RNeasy-Säulen noch verarbeitet werden. Eine Überladung der Säulen würde zu einer deutlichen Reduzierung der RNA-Ausbeute führen. Es kann frisches, sowie gefrorenes Pflanzmaterial verwendet werden. Für eine längere Aufbewahrungszeit sollten die Blätter mit flüssigem Stickstoff schockgefroren werden und anschließend sofort bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Dort kann es für mehrere Monate aufbewahrt werden, ohne dass die RNA degradiert. Das gefrorene Blattmaterial ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) wird mit flüssigem Stickstoff versetzt und im Mörser zu Pulver zermahlen. Alle verwendeten Reaktionsgefäße müssen RNase-frei sein. Das Pulver wird in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und 450 μl RLT-Puffer hinzugegeben (1 ml RLT + 10 μl β -ME). Die Mischung wird 1-3 Minuten bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und zwischendurch „gevortext“. Das Lysat wird anschließend auf Qiashredder-Säulen pipettiert und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss aus der Säule wird aufgefangen und der Überstand vorsichtig in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es werden nun 225 μl 100 %-iges Ethanol zupipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Das entstandene Präzipitat (RNA/DNA) wird auf die sog. RNeasy Mini-Säulen gegeben und

für 15 sek bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, die Säule auf ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und 500 µl RPE-Puffer (Waschpuffer) zupipettiert. Die Säule wird erneut bei 15 sek. bei 8000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Dieser Schritt wird nochmals mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt und die Säule anschließend für 2 min. bei 8000 rpm zentrifugiert, um die Silica-Gel-Membran der Säule zu trocknen und alle Spuren des Waschpuffers zu entfernen. Um die RNA aus der Säule zu eluieren wird die RNeasy-Säule auf ein neues Tube gesetzt, 30-50 µl RNase-freies Wasser zugegeben und für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Die erwartete RNA-Menge liegt bei ca. 20 µg. Normalerweise ist für die weitere Verwendung der RNA in einer RT-PCR (Methoden) kein DNase-Verdau notwendig, weil die Technologie der Silica-Membran fast die komplette DNA entfernt. Es ist allerdings empfehlenswert für einen sensitiven RNA-Nachweis eine DNA-Kontamination auszuschließen, indem man einen DNase-Verdau mit der eluierten RNA anschließt. Die eluierte RNA wurde im Agarosegel auf ihre Quantität hin getestet. Nach dem Test- gel wurde die RNA für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der Deoxyribonuklease I (Invitrogen, Groningen NL) behandelt, die sowohl ssDNA wie auch dsDNA zu Oligodeoxy-Ribonukleotiden mit 5'-Phosphorylierung verdaut.

Pipettierschema:

1 µg eluierte RNA
1 µl 10x DNase I Reaktions-Puffer (Gibco BRL)
1 µl DNase I (Amplifikationsgrad, 1 U/µl)

Die eluierte, DNA-freie RNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.13 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird die aus dem Pflanzegewebe isolierte RNA in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA dient dann als Template für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.2.10). Unter Verwendung speziell gewählter Vorwärts- und Rückwärtsprimer (siehe 2.8.2) wird ein bestimmter Bereich der cDNA amplifiziert. Die RT-PCR ermöglicht somit den Nachweis von sehr geringen RNA-Mengen in der zu bestimmenden Probe.

Zunächst wurde die reverse Transkription der aufgereinigten RNA (siehe 3.2.12) vorbereitet, wozu der RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MBI-Fermentas, St. Leon Roth, verwendet wurde (siehe 2.7.10). Hierzu wurden folgende Komponenten auf Eis pipettiert:

1 µg der aufgereinigten RNA
 1 µl Random Hexamer-Primer (0,2 µg/µl)
 ad 12 µl H₂O (deionisiert, nukleasefrei)

Es wurde für einige Sekunden zentrifugiert und anschließend bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde wieder für einige Sekunden zentrifugiert, um Kondentropfen vom Deckel des Eppendorf-Reaktionsgefäßes zu lösen. Auf Eis arbeitend, wurden anschließend folgende weitere Komponenten dem Reaktionsgemisch zupipettiert:

4 µl 5x Reaktions-Puffer
 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl)
 2 µl dNTPs (10 mM)

Nach kurzem Mischen wurde erneut kurz zentrifugiert und für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert, wobei die zugesetzten Primer an verschiedene komplementäre Zufallssequenzen binden. Zuletzt wurde die Reverse Transkriptase zugegeben:

1 µl RevertAid™-Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Das Reaktionsgemisch wurde zuerst für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, direkt im Anschluss für 60 Minuten bei 42 °C. Die Reaktion wurde durch eine zehnmündige Hitze einwirkung von 70 °C gestoppt, die einzelsträngige cDNA bei -20 °C gelagert.

An die reverse Transkription folgte die PCR:

Pipettierschema:

10 µl 10x PCR-Puffer (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
 1 µl Primer 1 (75 ng/µl)
 1 µl Primer 2 (75 ng/µl)
 1 µl dNTPs (je 2,5 mM/dNTP)
 1 µl Template (100 ng/µl)
 2 µl MgCl₂
 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
 H₂O ad 50 µl

Die Inkubation der PCR-Ansätze erfolgte unter folgenden Konditionen:

1 Zyklus	{	2 Minuten	95 °C
10 Zyklen	{	1 Minute	95 °C
		1 Minute	58 °C
		1 Minute	74 °C
20 Zyklen	{	1 Minute	95 °C
		1 Minute	62 °C
		1 Minute	74 °C

Nach der Inkubation wurde das Ergebnis in einem analytischen Agarosegel untersucht.

3.3.14 Herstellung einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde

<u>Oligo-labelling-buffer (OLB)</u>	250	mM	Tris-HCl pH 8.0
	25	mM	MgCl ₂
	2	mM	je dATP, dGTP, dTTP
	5	mM	β -Mercaptoethanol
	1	mM	HEPES pH 6.6
	27	U/ml	Hexadeonucleotide
<u>2 x TNE-Puffer</u>	1	ml	100 x TE
	2	ml	0.5 M EDTA
	10	ml	1 M NaCl
	25	ml	H ₂ O
	50	mg	Bromphenolblau / 250 mg Dextranblau

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurden 40 ng DNA in 9 μl H₂O aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Dann wurden 4 μl OLB, 2 μl 2 %-iges (w/v) BSA, 2 μl Klenow-Polymerase (16U) und 2,5 μl ^{32}P -dCTP (25 μCi) zugefügt. Nach 4 Stunden Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 μl 2 x TNE und 20 μl H₂O abgestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über Säulenchromatographie von der markierten Sonde abgetrennt. Dazu wurde eine Pasteurpipette mit einer Glaskugel versehen, mit in TE gequollenem Sephadex G-50 befüllt und 4 x mit 1ml TE / 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Der Markierungsansatz wurde aufpipettiert, die erhöhte Strahlung der Sonde mit einem Zählrohr detektiert und die markierte DNA separat aufgefangen. Die Radioaktivität der Sonde wurde in einem β -Counter (Tricarb Liquid Scintillation Analyzer, Packard) vermessen.

3.3.15 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot)

<u>10 x SSC</u>	0.15	M	NaCl
	1.5	mM	Na-Citrat
<u>NaPP (Natriumphosphatpuffer)</u>	1	M	Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O
	1	M	NaH ₂ PO ₄ •2 H ₂ O
	beide Lösungen mischen bis pH 6.5 erreicht ist		
<u>Vorhybridisierungslösung</u>	50	%(v/v)	Formamid
	0.1	mg/ml	tRNA 10 min bei RT denaturieren
	5 x		SSC
	0.1	%(v/v)	Denhardt
	20	mM	NaPP
	10	%(v/v)	H ₂ O
1	%(w/v)	SDS	

Zur Vorhybridisierung, die der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen dient, wurde die Membran mindestens 2 h bei 4 °C in Vorhybridisierungslösung (0,1 ml/cm² Blotmembran) in

einem Hybridisierungs-Ofen inkubiert. Die Sonde wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 3 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 3×10^6 cpm der denaturierten Sonde pro ml Vorhybridisierungslösung über Nacht bei 42 °C. Die Membran wurde dreimal bei 60 °C in 2 x SSC / 0,1 % (w/v) SDS gewaschen, und dann wurde ein Röntgenfilm für 1 bis 2 Tage bei -70 °C zur Exposition auf die Membran gelegt.

3.3.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970

Rotiphoresegel 30 (30 %-ige Acrylamidstammlösung AA mit 0,8 % Bisacrylamid BA)

<u>10 x Proteinlauf-Puffer</u>	50	mM	Tris-HCl pH 8.0
	1,45	% (w/v)	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS
<u>2 x Proteingel-Ladepuffer</u>	2	mM	EDTA pH 8.0
	0,1	M	Tris-HCl pH 8.0
	4	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Glycerin
	10	% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	0,02	% (w/v)	Bromphenolblau
<u>APS (Ammoniumpersulfat (NH₄)₂S₂O₈)</u>	10	% (w/v)	

TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und S-S reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95 °C erhitzt, und so die Tertiär und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. β -Mercaptoethanol, oder Dithiothreitol (DTT), aufgespalten (Auflösen der Quartärstruktur). Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die Gele sind aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporigen Trenngel zusammengesetzt.

Trenngellösungen (für ein großes Gel)

	10%	12,5%	15%	17,5%
30% AA/0,8% BA	10 ml	12,5 ml	15 ml	17,5 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml
H ₂ O	8,15 ml	5,65 ml	3,15 ml	0,65 ml
10% SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Sammelgellösung (für ein großes Gel)

	4,5%
30% AA/0,8% BA	1,5 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	7 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	15 µl

Die Trenngellösung wurde in die Gelapparatur gegossen und bis zur Auspolymerisation mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde anschließend abgegossen, die Sammelgellösung eingefüllt und mit eingestecktem Kamm polymerisiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Proteinlauf-Puffer bis zum Eintritt ins Trenngel bei 90 V, dann bei 120-150V.

3.3.17 Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blot

<u>Blockierlösung/Waschpuffer</u>	5 % (w/v) 0,05 % (v/v) in 1 x PBS	Magermilchpulver / Tween 20
<u>Transfer-Puffer 1</u>	0,3 M 20 % (v/v)	Tris/HCl Methanol
<u>Transfer-Puffer 2</u>	0,025 M 20 % (v/v)	Tris/HCl Methanol
<u>Transfer-Puffer 3</u>	0,025 M 20 % (v/v) 0,04 M	Tris/HCl Methanol DL-Norleucin
<u>Antikörper-Inkubations-Lösung</u>	4 % (w/v) 0,05 % (v/v) in 1 x PBS	BSA Tween 20
<u>ECL-Lösung</u>	200 ml 1,25 mM 2,7 mM	0.1 M Tris-HCl pH 8.6 Sodium-Luminol H ₂ O ₂
<u>Enhancer</u>	11 mg in 10 ml DMSO	p-Hydroxy-Cumarinsäure

Vorbereitend wird die Immobilonmembran (PVDF-Membran, Millipore, Eschborn) für 2 Minuten in 100 %-iges Methanol eingelegt und für 15 Minuten in Aqua dest. gespült. Durch diese Maßnahme wird die hydrophobe Oberfläche der Immobilonmembran hydrophiler. Anschließend werden pro Polyacrylamidgel 11 Filterpapiere (Whatmanpapier) in Gelgröße vorbereitet. Die ersten 2 Lagen werden mit Transfer-Puffer 1 angefeuchtet und kommen sofort in die Semidry-Blotkammer (Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewendet). Die nächsten 4 Lagen werden in Transfer-Puffer 2 eingeweicht mit Blottransfer-Puffer angefeuchtet und aufgelegt. Jetzt wird die Filtermembran (0,45 μm , Immobilon.-P, Millipore) aus dem Methanol genommen, mit Wasser abgespült, für 5 min. in Transfer-Puffer 2 inkubiert und anschließend auf die schon vorhandenen Filterpapiere aufgelegt. Gleichzeitig wird das SDS-Gelstück 5 min. in Transfer-Puffer 3 eingelegt und danach ebenfalls auf die Immobilonmembran aufgelegt. Als abschließende Schicht kommen noch 5 Filterpapiere, die zuvor in Transfer-Puffer 3 eingeweicht wurden. Alle Luftblasen werden mit einer Glaspipette ausgestrichen. Danach wird die Transferzelle geschlossen. Das Blotgerät wird an die Stromquelle angeschlossen und eingeschaltet. Der Blotvorgang dauert etwa 45 Minuten bei einer Betriebsstromstärke von 180 mA ($0,8 \text{ mA/cm}^2$). Im Anschluss wird überprüft, ob die Markerbanden auf der Membran gut zu sehen sind, was für einen guten Transfer der Proteine auf die Membran spricht. Die Membran wird nun für 40 min. in eine Blockierlösung gelegt, um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzublocken. Andernfalls käme es zu unerwünschten Hintergrundsignalen, die das eigentliche Signal überdecken. Anschließend wird die in der Blocklösung enthaltene Milch mit Wasser kurz abgespült, die Antikörperlösung aufpipettiert (monoklonales Maus-Anti-HPV16E7-Antiserum, Verdünnung 1:2000) und für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Im Anschluss wird $5 \times$ Minuten mit der Waschlösung auf der Wippe gewaschen, die Milch mit Wasser erneut entfernt, die 2. Antikörperlösung zupipettiert (Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Maus-Antikörper, Verdünnung 1:5000) und für 1 Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert. Abschließend wird nochmals 4×5 Minuten gewaschen, die Milch mit Wasser entfernt und für 1 Minute die ECL-Lösung zugegeben. Die Membran wird kurz abgetrocknet in Klarsichtfolie in einer Expositionskassette gelegt und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm abgedeckt. Die Darstellung der spezifischen Banden erfolgte durch Oxidation von Luminogen PS-3 acridan durch HRP und H_2O_2 in Acridiniumester Intermediate, die mit H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen reagieren und dabei Licht der Wellenlänge 430 nm emittieren. Dieses Licht kann dann von einem geeigneten Autoradiographie-Film (Hyperfilm

ECL, Amersham) aufgefangen werden. Die Exposition dauert je nach Signalstärke zwischen 30 Sekunden und 1 Stunde.

3.4 Zellbiologische Methoden und Analyse

3.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer subkonfluenten 10 cm Schale wurden trypsiniert wie oben beschrieben und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml kaltem FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und je 1 ml in ein Kryo-Röhrchen überführt. Damit die Zellen langsam einfrieren, wurden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt, 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie endgültig in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Zum schnellen Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml warmem Kulturmedium in 10 cm Schalen ausgesät. Nach 4-5 h, wenn sich alle Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

3.4.2 Kultivierung von NIH3T3 – und 293T-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 werden in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) mit 10 % Kälberserum (CS) im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 gehalten. Sie werden alle 2- 3 Tage auf eine neue Petrischale (100 mm) in einer Konzentration von $2 - 4 \times 10^5$ Zellen pro Platte ausgesät (Zellen zählen mit der Neubauer Zählkammer). Hierzu wird zunächst das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen 1x mit PBS - Lösung gewaschen. Dann wird 1 ml 0,5 % Trypsinlösung auf die Zellen gegeben (bei 293T-Zellen nicht notwendig, lassen sich abspülen). Die proteolytische Wirkung des Enzyms wird genutzt, um die adhärent wachsenden Fibroblasten von der Petrieschale abzulösen. Nach einer Einwirkdauer von etwa 1 - 3min wird die Trypsinlösung abgesaugt und die Zellen mit 3 ml DMEM von der Petrischale gespült und suspendiert. 1 ml der Zellsuspension wird in eine neue Petrischale, in die schon ca. 5 ml DMEM vorgelegt wurden gegeben. Die Zellen werden gleichmäßig in der Schale verteilt und im Brutschrank gehalten.

3.4.3 Transfektion und transiente Expression in Eukaryonten

Transfektions-Kit: Effectene® Transfection Reagent

Kit-Komponenten: 1 ml Effectene® Transfection Reagent (1 mg/ml), 0,8 ml Enhancer (1 mg/ml), 2 x 15 ml Puffer EC, ausreichend für 40 Transfektionen in 60 mm Petrischalen oder 160 Transfektionen in 12-well Platten.

Die Transfektion mit diesem Kit (Effectene-Kit der Firma Qiagen, Hilden; Einzelkomponenten der Kit-Bestandteile werden nicht angegeben) ermöglicht die Aufnahme kondensierter DNA. Die Nukleinsäuren werden hierbei von Lipiden umgeben und gelangen durch Membranfusion in die Säugerzellen. In dieser Arbeit wurden 293T-Zellen (erhalten von Thorsten Pisch, DKFZ-Heidelberg), NIH3T3-Zellen (European Collection of Cell Cultures (Salisbury/Wiltshire, UK) und Primäre Dendritische Zellen verwendet und mit jeweils 2 µg gereinigter Plasmid-DNA (HPV16E7-Konstrukte) und 0,2 µg pGreenLantern-Plasmid (Stratagene, La Jolla USA) kotransfiziert. Die zusätzliche Transfektion mit dem GFP-Plasmid diente zur Ermittlung der Transfektions-Effizienz (FACS-Analyse, siehe 3.4.4) in dem jeweiligen Ansatz.

Für jeden Transfektions-Ansatz wurden zunächst 2×10^6 Zellen in einer 100 mm Petrischale ausgesät, über Nacht im Inkubator kultiviert, damit die Zellen sich absetzen können. Für einen Transfektions-Ansatz in der 100 mm Petrischale wurde nach dem Pipettierschema in Abbildung 3-4 2 µg DNA, 16 µl Enhancer, 60 µl Effectene und 3 ml den Zellen entsprechendes Kulturmedium zugegeben. Während der Vorbereitung der DNA-Effectene-Komplexe wurden die Zellen mit $1 \times$ PBS gewaschen und anschließend wieder mit 7 ml des entsprechenden Kulturmediums überdeckt. Die Transfektions-Komplexe wurden in 3 ml Medium verdünnt und vorsichtig auf den Zellrasen aufgetropft, durch Schwenken verteilt und für 72 Std. bei 37°C / 5 % CO₂ kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen geerntet. Eine Hälfte wurde in $1 \times$ PBS aufgenommen und im FACS analysiert (siehe 3.4.4) und die andere Hälfte als Zellextrakt für die Analyse im Westernblot aufgearbeitet (siehe 3.4.5).

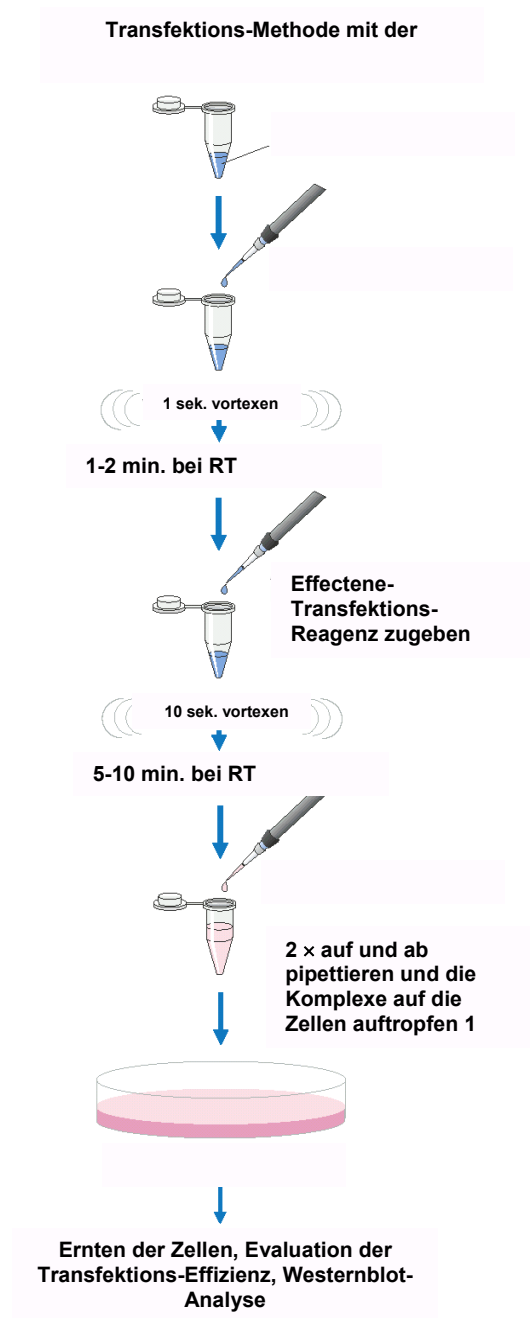


Abbildung 3: Pipettierschema für die Transfektion von adhärenenten Zellen (293T-Zellen, NIH 3T3-Zellen) und die transiente Expression von HPV-Genen.

3.4.4 Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie wird die Fluoreszenz einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom in Abhängigkeit von der Absorption und der Fluoreszenzintensität der eingesetzten Farbstoffe gemessen. Da einzelne Zellen detektiert werden, können

Zellpopulationen quantifiziert werden und damit das Maß eines Gentransfers bzw. der Expression eines Transgens. Das Sediment wurde in $1 \times$ PBS resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Für eine Bestimmung der GFP-Expression wurden die Zellen direkt nach der Aufnahme in $1 \times$ PBS gemessen. Für die Messung am FACS Gerät (FACSort, Becton Dickinson) wurden die unten angegebenen Einstellungen vorgenommen und 50000 Ereignisse analysiert. Es wurde die CELLQuest Software verwendet und im FITC Detektorfilter FL-1 gemessen.

	V	A	
FSC	E-1	5,24	Lin
SSC	196	1	Lin
FL-1	420		Log

3.4.5 SDS-Extrakte

Für Western Blot Analysen eignen sich SDS-Proteinextrakte sehr gut, da sie relativ unempfindlich gegenüber mehrmaligem Einfrieren und Auftauen sind. Zur Proteinextraktion wurde das Medium von den konfluenten Zellschalen entfernt und zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Dann wurde eine entsprechende Menge an 95°C heißem 1 % SDS auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt (für 100 mm Schalen wurden $500\ \mu\text{l}$ SDS, für 6er wells $200\ \mu\text{l}$ SDS verwendet). Zum Scheren der DNA wurde die Zellsuspension zweimal über eine QIAshredder-Säule bei 14000 rpm kurz zentrifugiert. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden $10\ \mu\text{l}$ des Lysats entnommen, der Rest wurde bei -80°C eingefroren.

3.4.6 Paraformaldehydfixierung für GFP

Nach dem Waschen der Deckgläser in kaltem PBS wurden diese für 20 min mit 3 % Paraformaldehyd/PBS bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Präparate in kaltem PBS gewaschen, für 10 min zur Absättigung der freien Aldehydgruppen mit 50 mM NH_4Cl /PBS inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert, wonach erneut in PBS gewaschen wurde. Zum Schluss wurden die Proben mit Evanol eingedeckelt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop photographiert.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Anästhesie der Versuchstiere

Für die Kardiotoxin-Applikation (siehe 3.5.2), DNA-Immunsierung (siehe 3.5.3) und C3-Zellen-Inokulation (siehe 3.5.5) wurden die Tiere mit Methoxyfluran (Methofane®) oder mit Isofluran (Isofluran Curamed®) betäubt. Bei der Methofane-Betäubung (500 µl für 5-8 Tiere) oder Isofluran-Narkose (100 µl pro Tier, schnell flüchtig) wurden die Narkosegase auf Zellulosepapier aufgetropft und in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben. Bei der Narkose mit Metofane wurden die Tiere einzeln mit der Hand fixiert und ca. für 1 Minute dem Gas ausgesetzt, bis eine völlige Muskelrelaxion auftrat. Die Narkosedauer betrug ca. Minute. Im Falle der Isofluran-Narkose setzte die völlige Entspannung der Muskeln schon nach ca. 5-10 Sekunden ein. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von Isofluran wurden die Tiere nach der Muskelrelaxion lediglich etwas vom Falconröhrchen entfernt und die Narkose konnte so auf mehrere Minuten verlängert werden.

3.5.2 Kardiotoxin-Applikation

Fünf Tage vor einer geplanten DNA-Immunsierung wurde den zuvor narkotisierten (siehe 3.5.1) Versuchstieren in beide Wadenmuskel (*Musculus tibialis anterior*) über eine 0,3 mm Kanüle jeweils 50 µl Kardiotoxin (3 µg) injiziert. Es ist bekannt, dass durch die Applikation des Schlangengiftes eine effizientere DNA-Immunsierung erzielt wird [Davis et al., 1993; Danko et al., 1994]. Kardiotoxin verursacht eine lokale inflammatorische Reaktion, wodurch es zur Infiltration von Immunzellen, so auch professionellen antigenpräsentierenden Zellen, kommt.

3.5.3 DNA-Immunsierung

Nach erfolgter Kardiotoxin-Vorbehandlung (siehe 3.5.2) wurde fünf Tage später die DNA-Immunsierung durchgeführt. Es wurde Plasmid-DNA aus der Plasmidgrossaufarbeitung (siehe 3.3.2), in PBS gelöst (1 µg/µl), verwendet. Die narkotisierten Tiere (siehe 3.5.1) erhielten in jeden Wadenmuskel (*tibialis anterior*) durch eine 0,3 mm Kanüle 50 µl der gelösten DNA.

3.5.4 Blutentnahme mittels Herzpunktion

Die Versuchstiere wurden entweder durch CO₂ oder durch Überstreckung des Genickes getötet und unmittelbar im Anschluss wurde an ihnen eine Herzpunktion durchgeführt. Hierzu wurde eine Injektionsnadel der Größe 20G 1 ½ durch die Haut in das Herz gestochen und das Blut langsam angesaugt. Das so gewonnene Blut wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt, auf Eis für etwa 1 Stunde gelagert und anschließend in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm für 15 Minuten 4 °C abzentrifugiert. Das Serum im Überstand wurde anschließend abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.5 Tumor-Regressions-Experiment

Um den Effekt einer E7-induzierten zellulären Immunantwort in vivo zu überprüfen wurden Tumor-Regressions-Experimente notwendig. Die adhärenent wachsenden C3-Tumorzellen wurden kurz vor der geplanten Applikation vorbereitet. Hierzu wurden sie durch Trypsinierung abgelöst und dreimal in RPMI-Medium gewaschen, um Kanamycin und Genitizin (aus dem C3-Selektionsmedium RPMI-C3) und das Trypsin auszuwaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in PBS aufgenommen und ausgezählt. Für jedes Tier wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100-200 µl PBS vorbereitet und separat in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Mittels der Aliquotierung der Zellen soll die Applikation der exakten Zellzahl sichergestellt werden, was ansonsten aufgrund der Verklumpung der Zellen untereinander nicht gewährleistet wäre. Den Tieren wurden die Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Erfahrung hat gezeigt, dass in der Regel nach 5 Tagen in allen Tieren kleine Tumore tastbar sind (Persönliche Mitteilung von Peter Öhlschläger, DKFZ-Heidelberg). Man sollte demnach am C3-Applikationstag auch Kardiotoxin intramuskulär (siehe 3.5.2) applizieren. In der Regel wurde am fünften Tag nach der C3-Zellen-Inokulation die erste DNA-Immunisierung durchgeführt und nach etwa 14-21 Tagen erfolgte, wie bei den Experimenten angegeben der Boost. Die Tumorgröße wurde alle 2-4 Tage mit Hilfe eines Lineals bestimmt. Die Tumore wuchsen leider nicht immer sehr gleichmäßig an, so dass es teilweise zu einer großen Streuung der Messungen innerhalb eines Experimentes kommen kann.

3.5.6 Tumor-Protektions-Experiment

Nach der zweimaligen DNA-Immunsierung (Prime-Boost-Vakzinierung) von HPV16E7-Konstrukten wurde ein Tumor-Protektions-Experiment durchgeführt. Fünf Tage nach der Kardiotoxin-Vorbehandlung (siehe 3.5.2) wurden intramuskulär (i.m) 50 µg Plasmid_DNA in jeden Muskel (*tibialis anterior*) appliziert. 14 Tage später erfolgte, nach erneuter Kardiotoxin-Behandlung, der Boost mit der gleichen DNA-Menge. 16 Tage nach der zweiten DNA-Immunsierung wurden die C3-Zellen, wie unter 3.5.5 beschrieben für die Applikation vorbereitet und sukutan in die rechte Flanke inokuliert. Zuvor wurden die Mäuse an der Inokulationsstelle rasiert, um das Ertasten der Tumore zu erleichtern. Teilweise wurden Milzen aus Total-Respondern/Teil-Respondern entfernt und in Kultur genommen (siehe 5.2.6). Die E7-spezifische zelluläre Immunantwort wurde im IFN- γ Elispot-Assay quantifiziert (siehe 3.6.5).

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Milzentnahme und Anlegen von Milzzell-Kulturen

10 Tage nach einer DNA-Immunsierung (siehe 3.5.3) wurden den Versuchstieren unter sterilen Bedingungen die Milzen entnommen und sofort in eiskaltem PBS bis zur weiteren Verwendung gelagert. Jede Milz wurde einzeln in einer Petrischale durch ein engmaschiges Metallgitter mit Hilfe eines Plastikstempels gedrückt und getrennt weiterverarbeitet. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1.200 UPM (Heraeus) zentrifugiert und das Zellpellet nach dem Dekantieren des Überstandes in 3 ml ACT-Puffer zur Erythrozyten-Lyse resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde für 3 Minuten bei 1.200 UPM (Heraeus) zentrifugiert und dekantiert. Die Zellen wurden, um den restlichen Lysepuffer auszuwaschen, einmal in PBS gewaschen. Von jeder Milz wurden in der Regel zwei Zellkulturen angelegt. Dazu wurden jeweils 2×10^7 Milzzellen in eine 25 cm² Kulturflasche überführt. In eine der beiden Kulturflaschen wurde ad 10 ml, in die andere ad 9 ml α MEM-Medium pipettiert. Es folgte die erste Restimulierung (siehe 3.6.3). Im Anschluss wurden die Zellen bei 37 °C, 95 %-iger Luftfeuchtigkeit und 7,0 % CO₂-Gehalt in der Luft kultiviert.

3.6.2 Inaktivierung von Zellen durch γ -Bestrahlung

Um ein Überwachsen der Milzzell-Kulturen zu vermeiden wurden Zellen, die zur Restimulierung eingesetzt wurden (RMA-Zellen, 2F11-Zellen, mit Peptid beladene RMA-S-Zellen, unbeladene RMA-S-Zellen) und Zellen, die den Lymphozyten in den Milzzell-Kulturen als sog. Fütterzellen („Feederzellen“, frisch isolierte Milzzellen) dienen, radioaktiv bestrahlt. Für diese Prozedur wurde das Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 (^{137}Cs) eingesetzt. Die 2F11-Tumorzellen wurden mit 100 Gy, die Fütterzellen mit 33 Gy bestrahlt. Durch die verabreichte Strahlendosis verlieren die Zellen die Fähigkeit zu proliferieren und sterben innerhalb weniger Tage ab.

3.6.3 *In vitro* Restimulierung von zytotoxischen T-Zellen

Die *erste Restimulierung* der T-Lymphozyten erfolgte direkt nach dem Anlegen der Milzzell-Kulturen (siehe 3.6.1). Von jeder Milz wurden in der Regel zwei Zellkulturen mit je 2×10^7 Zellen angelegt. Im Falle der DNA-Immunisierung wurde pro Fläschchen mit α MEM-Medium ad 9 ml aufgefüllt und jeweils 2×10^6 γ -bestrahlte RMA-Zellen/2F11-Zellen (in 1 ml α MEM-Medium aufgenommen) zugegeben. Milzzellen aus Mäusen, die mit HPV16L1 Plasmid-DNA immunisiert wurden, erhielten wie oben beschrieben- bestrahlte unbeladene, mit L1₁₆₅₋₁₇₃-Peptid-beladene RMA-S-Zellen. RMA-S-Zellen sind TAP-defiziente Zellen, die in der Lage sind leere MHC I-Moleküle zu exprimieren, die allerdings sehr instabil sind. Durch Kultivierung der Zellen bei Raumtemperatur über 2-4 Stunden hinweg sammeln sich leere MHC I-Moleküle an der Zelloberfläche, die durch die Zugabe von Peptid stabilisiert werden können. Das L1₁₆₅₋₁₇₃-Peptid wurde für etwa 30 Minuten bei 37 °C mit den RMA-S-Zellen (in serumfreien RPMI-Medium) inkubiert, anschließend dreimal mit RPMI-Medium gewaschen. Jeder Milzzellkultur wurden 2×10^6 γ -bestrahlte RMA-S-Zellen (aufgenommen in 1 ml, Gesamtkultur 10 ml) zugegeben.

In allen Fällen wurde mit den Milzzellkulturen aus den DNA-Immunisierungen ein *ex vivo* Elispot-Assay durchgeführt (siehe 3.6.5). Nach fünf weiteren Tagen in Kultur unter den in 3.6.1 angegebenen Bedingungen wurde zur Bestimmung der E7/L1-spezifischen Aktivität der CTLs ein Zytotoxizitätstest (siehe 3.6.4) und ein Elispot-Assay (siehe 3.6.5) durchgeführt.

Zwei Tage nach dem Zytotoxizitätstest erfolgte die *zweite Restimulierung*. Hierzu wurden die restlichen Milzzellen in 24-Loch-Gewebekulturplatten in zunehmender Verdünnung ausplattiert, wobei jede Milzzellkultur auf 6 Vertiefungen verteilt wurde. Jede Vertiefung

wurde auf etwa 2 ml mit IL 2-haltigem α MEM-ConA-Medium aufgefüllt, wodurch eine Proliferation der Lymphozyten erzielt wurde. In jede Vertiefung wurde 100 μ l α MEM-ConA-Medium mit 5×10^6 inaktivierten Milzzellen (siehe 3.6.1 und 3.6.2) pipettiert. Die Milzzellkulturen, die bei der ersten Restimulierung 2F11-Zellen erhalten hatten, wurden weiter mit den E7-Transfektanten (1×10^5 /Vertiefung) restimuliert, in die peptidstimulierten Kulturen wurde Peptid (100 ng/ml pro Vertiefung) gegeben. Bis zum zweiten Zytotoxizitätstest nach 7 Tagen wurden die Zellen wie oben angegeben kultiviert. Auf diese Weise wurde bis maximal zur 4. *in vitro* Restimulierung verfahren. Der Zytotoxizitätstest/Elispot-Assay erfolgte immer 5 Tage nach der entsprechenden *in vitro* Restimulierung.

3.6.4 Bestimmung der spezifischen CTL-Aktivität durch ^{51}Cr Freisetzungssassay (Zytotoxizitätstest) [Engers et al., 1975]

Jeweils 5 Tage nach der letzten Restimulierung wurde die E7-spezifische Aktivität der zytotoxischen Lymphozyten durch einen ^{51}Cr -Freisetzungssassay bestimmt. Es wurden Zielzellen (2F11-Zellen und RMA-S-Zellen mit L1₁₆₅₋₁₇₃-Peptid beladen, sowie als Kontrolle RMA-Zellen/unbeladene RMA-S-Zellen) in ^{51}Cr -haltigem Medium inkubiert und nach Inkubation mit der Lymphozytenkultur die Aktivität des radioaktiven Überstandes gemessen. Die Zielzellen nehmen ^{51}Cr auf und geben es nach Lyse in den Überstand ab.

Die Stärke der gemessenen Radioaktivität korreliert dabei direkt mit der Aktivität der eingesetzten CTLs. Für die Chromierung der Zielzellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen in einem Rundboden-röhrchen bei 1.500 UPM (Varifuge RF) für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde durch Ziehen über ein Metallgitter aufgerüttelt und schließlich die Zellen mit 0,05-0,1 mCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ je Ansatz bei 37 °C für 1-1,5 Stunden inkubiert, währenddessen ^{51}Cr in das Zytoplasma der Zellen aufgenommen wird. Die radioaktiv markierten Zellen wurden dreimal in jeweils 10 ml RPMI-Medium gewaschen und bei 1.500 UPM (Varifuge RF) für 2 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde sehr gründlich dekantiert und jedes Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen. Die markierten Zellen wurden in der Regel jeweils in 19 ml RPMI-Medium 1:20 verdünnt, wodurch sich eine Zelldichte von 1×10^4 /ml ergibt.

Während der Inkubation der Zielzellen in ^{51}Cr wurden die 96-Loch-Mikrotiterplatten vorbereitet. Von jeder 10 ml Milzkultur mit den darin enthaltenden aktivierten Lymphozyten (Effektorzellen) wurden nach Resuspendieren 6 ml abgenommen und für 2 Minuten bei 1.500

UPM (Heraeus) zentrifugiert. Zu jedem Pellet wurden nach dem Dekantieren des Überstandes 500 μ l RPMI-Medium gegeben (mit dem zurücklaufenden Medium und dem Zellpellet ergab sich ein Volumen von etwa 700 μ l), resuspendiert und in die Mikrotiterplatten vorgelegt.

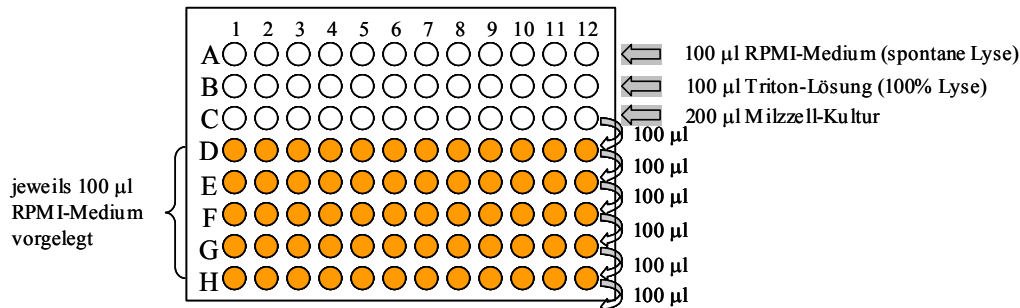


Abbildung 3-1: Pipettierschema einer 96-Loch-Mikrotiterplatte zur gemeinsamen Inkubation von Effektor- und Zielzellen. Erläuterungen siehe Text.

In die Reihe A wurden in jede Vertiefung 100 μ l RPMI-Medium, in die Reihe B in jede Vertiefung 100 μ l einer 10 %-igen Triton X-100-Lösung pipettiert. Jeweils 100 μ l RPMI-Medium wurden in den Reihen D-H vorgelegt. In die Reihe C wurden von jeder Milzzellkultur 3 Vertiefungen mit je 200 μ l Zellsuspension belegt. Von jeder Milzzellkultur wurde eine serielle Verdünnung in vertikaler Richtung pipettiert, indem von Reihe C ausgehend, jeweils 100 μ l in die nächste Vertiefung überführt wurden (siehe Abb. 3-1). Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt, die verbleibenden 100 μ l aus Reihe H wurden verworfen.

3.6.5 Elispot-Assay (Enzyme-linked Immunospot Assay) [Lalvani et al., 1997]

Im IFN- γ Elispot-Assay wird die Anzahl von aktivierten IFN- γ sezernierenden Zellen gemessen. Hierzu werden 96-Loch Multi-Screen Elispot-Platten MAHAS 4510 für 5 Minuten mit 200 μ l PBS/Vertiefung bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend mit 200 ng Maus-Anti- IFN- γ -Antiserum/Vertiefung in 100 μ l PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Antikörperlösung abgeschüttet und die Elispot-Platte für zwei Stunden bei 37°C mit 100 μ l/Vertiefung RPMI-Medium geblockt. Anschließend wurden die Milzzellen in 3 Reihen/Kultur in einer seriellen Verdünnung von 200.000 Zellen bis 25.000 Zellen/Vertiefung und jedes Well ad 200 μ l mit RPMI-Medium aufgefüllt. Eine Reihe blieb unbehandelt (Negativkontrolle), die zweite wurde mit Pokweed-Mitogen (200 ng/Vertiefung, Lektin aus der Pflanze *Phytolacca americana*, Positivkontrolle) und die dritte mit dem Peptid (0,2 μ mol in 2 μ l PBS: E7₄₉₋₅₇/L1₁₆₅₋₁₇₃) für 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen

wurden durch sehr gründliches Waschen der Platten [5 × mit PBS 0,5 % Tween, 1 × mit *aqua bidest*, 1 × PBS (jeweils 200 µl/Vertiefung)] entfernt. Zwischen den einzelnen Waschschrinen wurden die Platten kräftig auf Zellulosepapier ausgeklopft. Es folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (200 ng Biotin-gekoppelter anti-Maus IFN- γ Antikörper in 200 µl/Vertiefung) bei 4 °C über Nacht. Dieser wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS (200 µl/Vertiefung) entfernt und in 200 µl PBS/Vertiefung für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 ml/Vertiefung erfolgte die Substratreaktion (im Dunkeln) durch Zugabe von 100 µl/Vertiefung BCIP/NBT. Die Reaktion wurde, sobald deutliche Spots in der Positivkontrolle sichtbar wurden, durch Waschen unter kaltem Leitungswasser abgestoppt. Jeder einzelne Spot entspricht einer IFN- γ sezernierenden Zelle. Die Quantifizierung der Spots erfolgte im automatischen Elispot-Reader (siehe Abb. 3-2). Bei der Auswertung wurde die Anzahl der Spots in der Negativkontrolle, Positivkontrolle und der Probe (Milzzellen + Peptid) addiert. Anschließend wurden die Spots der Negativkontrolle von den Spots der Positivkontrolle und der Probe subtrahiert. Die erhaltene Anzahl der Spots aus der Probe und Positivkontrolle werden miteinander dividiert und mal 100 in % ausgedrückt.

Eine weitere Auswertungsvariante grenzt die Spots der Positivkontrolle aus und bezieht sich nur auf die Spots der Negativkontrolle und der Probe. Hier wird die Anzahl der Spots in der Negativkontrolle von der Anzahl der Spots in der Probe (Milzzellen + Peptid) subtrahiert.

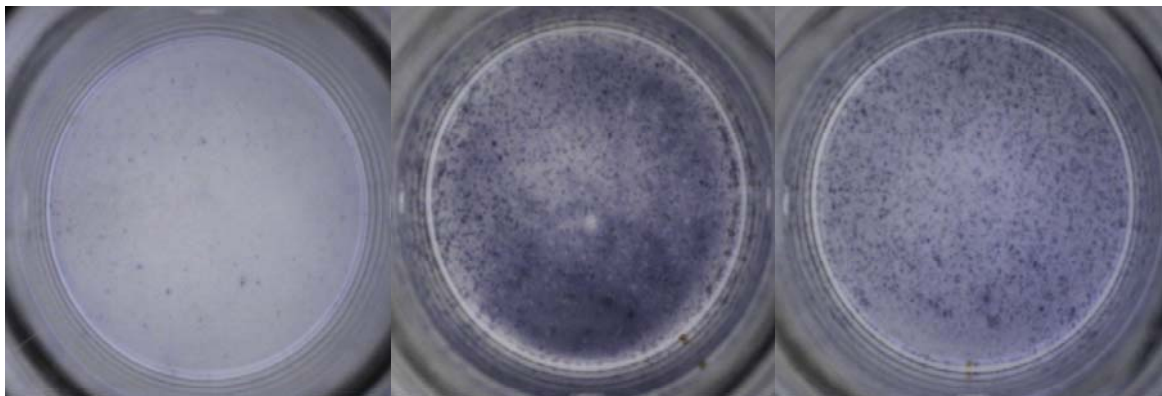


Abbildung 3-2: Exemplarisch fotografierte Wells einer Elispot-Platte. Zu sehen von links nach rechts Negativkontrolle (Medium), Positivkontrolle (Pokweed-Mitogen), Milzzellkultur. Jeder einzelne Spot steht für eine Interferon γ sezernierende (aktivierte) Zelle. Mittlere Abbildung zeigt die Positivkontrolle mit allen aktivierbaren T-Zellen einer Milzzellkultur.

3.6.6 GST Capture ELISA [Sehr et al., 2001]

PBS-T

124	mM	NaCl (72 g/l)
22	mM	Na ₂ HPO ₄ (31,4 g/l bzw. 39,2 g/l Dihydrat)
10	mM	KH ₂ PO ₄ (14,2 g/l)
0,05	% (v/v)	Tween20 (z.B. 5 ml in 10 l-Kanister: 2 x 30 sek stark schütteln)

Lagerung, Haltbarkeit: max. 1 Woche bei R, da Tween als Nahrungsquelle für Mikroorganismen dient, Kanister (nur die zwei 8L-Kanister!) vor jeder neuen Befüllung ausspülen, Auslaufhahn abbauen und autoklavieren.

Casein-Blockpuffer

PBS-T + 0,2 % (w/v) Casein (purified powder, Sigma C-5890), z.B. 2 g/l
 Lösen des Caseins:
 Möglichkeit a) 2,5 h bei 37°C mit Magnetrührer
 Möglichkeit b) 1 min 45 sek (für 1 l-Ansatz) auf Stufe 9 in Mikrowelle, anschließend 10 min bei RT auf Magnetrührer

Lagerung, Haltbarkeit: bei 4 °C max. über Nacht, besser jeden Tag frisch ansetzen

Substratpuffer

100 mM NaAcetat pH 6.0 (mit Essigsäure einstellen)

Lagerung, Haltbarkeit: bei 4°C mehrere Wochen

Coating-Puffer

50 mM Carbonatpuffer pH 9,6
 1 Teil 50 mM Na₂CO₃ + 4 Teile 50 mM NaHCO₃

Lagerung, Haltbarkeit: In dicht abschließender Flasche bei 4°C mehrere Wochen

TMB-Stocklösung

10 mg/ml in DMSO

Lagerung, Haltbarkeit: Lichtgeschützt bei -20 °C mehrere Monate

Nach der Vorbereitung der Puffer, wird zunächst ein Glutathion-Casein Aliquot aufgetaut (Stocklösung: 2 µg/µl) und auf 2 ng/µl in Coating-Puffer verdünnen, z.B. 10 µl Glutathion-Casein / 10 ml Coating-Puffer. Das Glutathion-Casein Aliquot sofort wieder bei -20°C einfrieren. Anschließend werden 96-Lochplatten (Nunc Polysorp) mit 100 µl/Loch beschichtet ⇒ 9,6 ml/Platte und die Platten mit Deckel verschließen und über Nacht waagrecht stehend bei 4°C inkubieren (Alternative: 1 Stunde bei 37°C).

Im nächsten Schritt werden die Platten geblockt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Der Coating-Puffer wird ausgeschüttet und der in der ELISA-Platte verbleibende Flüssigkeitsreste auf einem Papierhandtuchstapel 1x ausklopft, anschließend 180 µl Casein

Blockpuffer pro Loch zupipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach werden die ELISA-Platten mit dem Antigen (GST-HPV16E7) inkubiert und die Seren verdünnt und vorinkubiert. Zu diesem Zweck wird der Casein Blockpuffer ausgeschüttet, spaltenweise Antigenlösung (in der Regel 0.25 µg/µl Bakterienlysat in Casein Blockpuffer verdünnt) zupipettiert (100 µl/Loch) und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Seren werden 1:50 mit GST-Blockpuffer (0.25 µg/µl Lysat von GSTtag exprimierenden Bakterien in Casein Blockpuffer, es werden 100 µl Serumverdünnung pro Loch benötigt) in Costar-Röhrchen verdünnt, die Röhrchen mit Deckelstreifen verschlossen und die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Auftrag z.B.

	GSTx tag1	GSTx tag2	GSTx tag3	GSTx tag4	GSTx tag5	GST- tag	GSTx tag1	GSTx tag2	GSTx tag3	GSTx tag4	GSTx tag5	GST- tag
ELISA- Platte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Serum 1					▶	Serum 9					▶
B	Serum 2					▶	Serum 10					▶
C	Serum 3					▶	Serum 11					▶
D	Serum 4					▶	Serum 12					▶
E	Serum 5					▶	Serum 13					▶
F	Serum 6					▶	Serum 14					▶
G	Serum 7					▶	Serum 15					▶
H	Serum 8					▶	Serum 16					▶

Im folgenden Schritt werden die ELISA-Platten mit den verdünnten und vorinkubierten Seren inkubiert. Die Antigenlösung wird ausgeschüttet und die in der ELISA-Platte verbliebenen Flüssigkeitsreste auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Zum Waschen werden die ELISA-Platte mittels 8-Kanal-Kamm mit PBS-T 1x komplett gefüllt und anschließend ins Waschbecken geschüttet, dann werden die Platten 5x in eine Glaswanne mit PBS-T eingetaucht und anschließend wieder ausgeschüttet (zurück in die Glaswanne). Die in der ELISA-Platte verbliebenen Flüssigkeitsreste werden wiederum auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft und dann mit 100 µl/Loch der verdünnten Seren für 1 Stunde bei RT inkubiert.

Anschließend werden die verdünnten Seren ausgeschüttet, die ELISA-Platten werden abermals auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft und gewaschen wie oben beschrieben. Danach werden 100 µl/Loch Ziege anti-Mouse IgG-Peroxidasekonjugat (1:10000 in Casein

Blockpuffer verdünnt) zupipettiert und 1 Stunde bei RT inkubiert. Wichtig: neues Aliquot immer einen Tag vor erster Verwendung im Kühlschrank auftauen lassen).

Im anschließenden Schritt findet die Substratreaktion statt. Zunächst wird der Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper ausgeschüttet, in ELISA-Platte verbliebene Flüssigkeitsreste auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft und die Platte gewaschen wie oben beschrieben. WICHTIG: Um Blasen durch das Detergenz Tween im PBS-T zu vermeiden werden verbleibende Flüssigkeitsreste auf Papierhandtuchstapel direkt vor der Substratzugabe kräftig ausgeklopft. Jetzt werden 100 µl/Loch Substratlösung (0.1 mg/ml TMB (Stocklösung: 10 mg/ml in DMSO) in 100 mM NaAcetat pH 6.0, 0,003 % H₂O₂ = 1 µl 30 % H₂O₂ und 100 µl TMB-Stocklösung pro 10 ml Substratlösung) zupipettiert.

Nach 8 Minuten wird die Farbreaktion durch die Zugabe von 50 µl/Loch 1M Schwefelsäure gestoppt (Farbumschlag von Blau nach Gelb). Vorhandene Luftblasen werden mit einer gelber Spitze zerstochen. Die Messung der Absorption sollte innerhalb 1 Stunde erfolgen.

Nach dem Abtrocknen der Bodens der ELISA-Platte mit einem Papierhandtuch wird die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen (entsprechenden Filter einbauen).

3.6.7 Statistische Auswertungen

In der Elispot-Analyse wurden die positiven Mäuse einer Gruppe mit dem Mittelwert zusammengefasst und anschließend die Mittelabweichung bestimmt.

Mittelabweichung: Liefert die durchschnittliche absolute Abweichung einer Reihe von Merkmalsausprägungen und ihrem Mittelwert. MITTELABW ist ein Maß für die Streuung innerhalb einer Datengruppe.

Bei den Tumorregressions-und Protektions-Experimenten wurden die Daten ebenfalls mit dem Mittelwert zusammengefasst und die Streuung der Ergebnisse mit der Standardabweichung und dem Standard Error of the Mean (S.E.M) ermittelt.

Standardabweichung: Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung von Werten bezüglich deren Mittelwert (dem Durchschnitt).

S.E.M Hier wird die Standardabweichung der Gruppe durch die Quadratwurzel der Anzahl der Tiere einer Gruppe dividiert.

Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test (t-test) gemacht, mit Hilfe der SigmaStat-Software, Version 3.0.

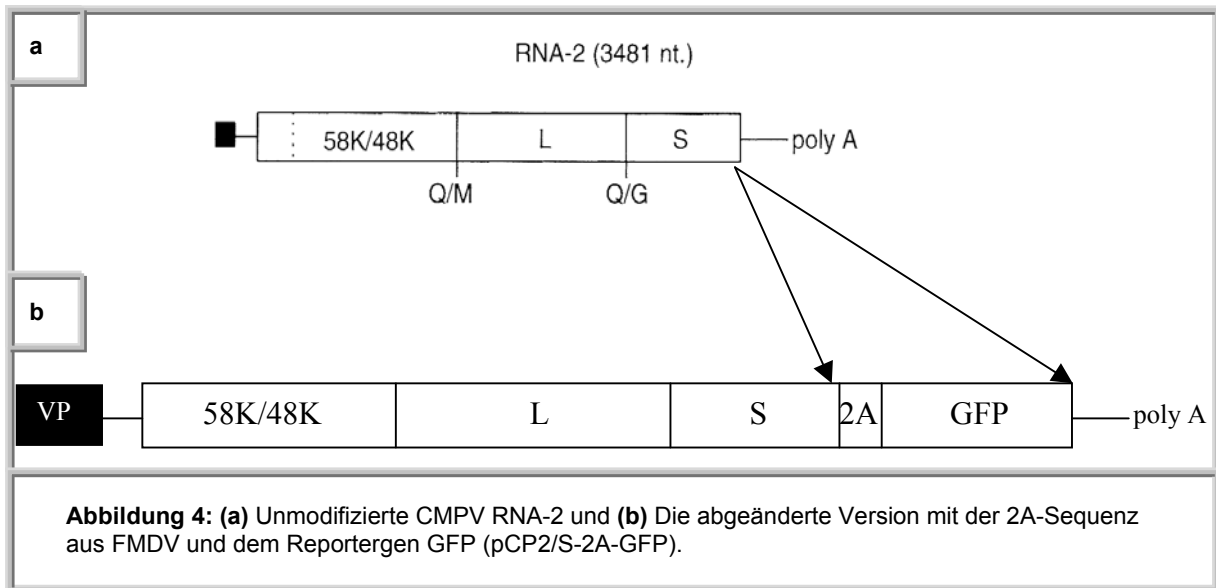
4.0 Ergebnisse: Herstellung rekombinanter Pflanzenviren

4.1 Herstellung rekombinanter CPMVs

Die gegenwärtigen Methoden der Vakzinproduktion für einen Impfstoff gegen eine Infektion mit humanpathogenen Papillomaviren sind nicht in allen Fällen den Bedürfnissen angemessen. Das Zervixkarzinom ist die häufigste bösartige Krebsform bei Frauen in den Dritte Welt Ländern. Die bisher verwendeten aufwendigen Produktionsverfahren und die laufenden Vakzinierungs-Strategien machen jedoch einen breiten Einsatz der bisher verfügbaren Vakzine in diesen Ländern unwahrscheinlich. Mit der Herstellung von rekombinanten CPMVs (cowpea mosaic virus) sollte in dieser Arbeit ein kostengünstigeres Verfahren zur Vakzinproduktion entwickelt werden. Zu diesem Zweck sollten VLPs (virus-like particles) und CVLPs (chimeric virus-like particles) durch Expression der HPV16-Proteine L1 bzw. L1/E7 in Pflanzen (*Vigna unguiculata*), mit Hilfe von rekombinanten CPMVs hergestellt werden.

4.1.1 Klonierung von HPV-16 Genen in pCP2/S-2A-GFP

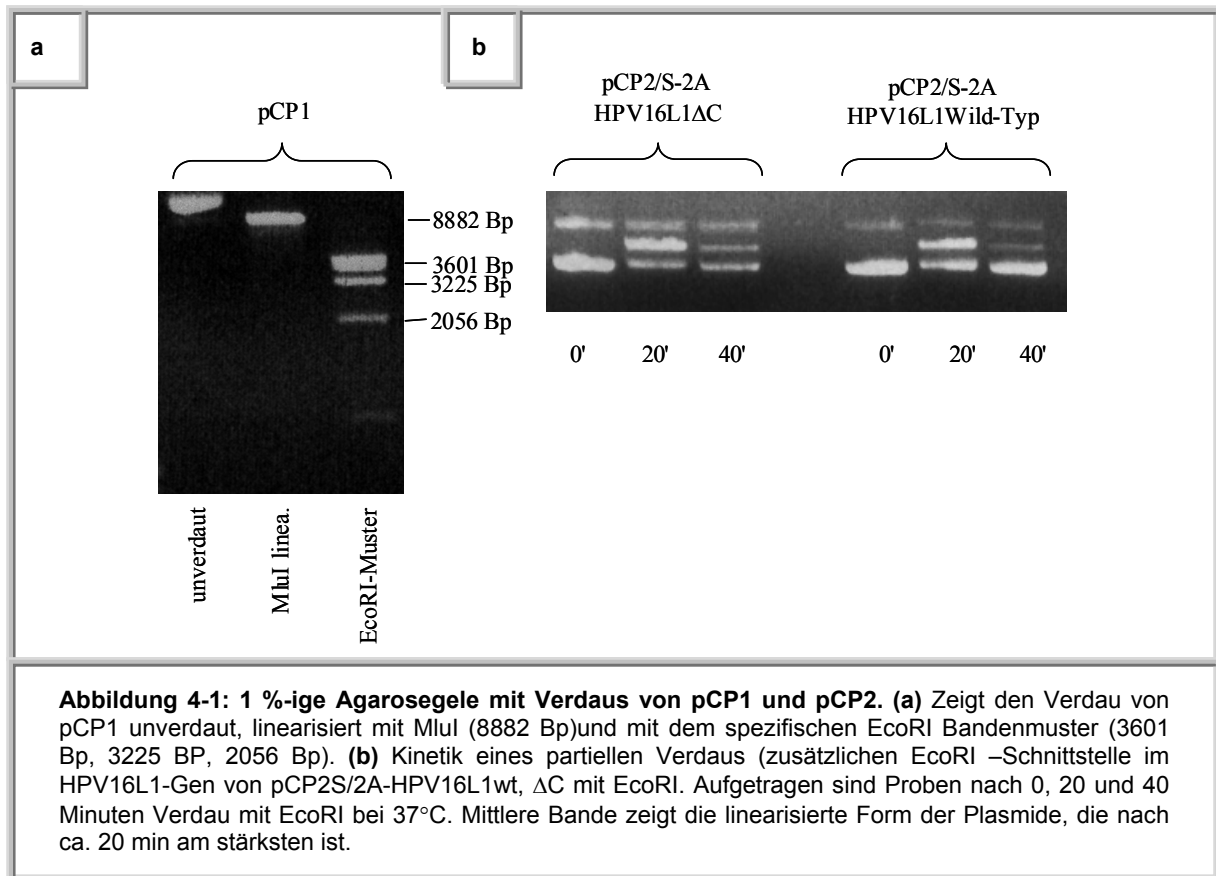
RNA-2 von CPMV (cowpea mosaic virus) wurde als Vektorsystem benutzt, um Proteine von HPV-16 in Pflanzen zu exprimieren. Aus der authentischen RNA-2 wurden cDNA-Klone hergestellt, die anschließend entsprechend modifiziert wurden (siehe Abb. 4b). Zur besseren Abspaltung des Fremdproteins vom CPMV-Polyprotein (ein open reading frame resultiert in einem Polyprotein, welches postranslational gespalten wird) wurde die autokatalytische 2A-Sequenz von FMDV (*foot and mouth disease virus*) am C-Terminus des kleinen Kapsidproteins (S) angefügt [Gopinath et al., 2000]. Als Insertionsstelle für die Sequenzen ist der C-Terminus der 2A-Sequenz vorgesehen, an welchen über *ApaI* und *StuI* die Fremd-Sequenzen angefügt werden können (siehe 2.8.1). Als Ausgangskonstrukt für die weiteren Klonierungsschritte diente pCP2/S-2A-GFP (Erhalten von George Lomonosoff, John Innes Centre, Norwich UK) (siehe Abb. 4).



An Stelle von GFP in pCP2/S-2A-GFP wurden über die Restriktionsschnittstellen *Apa*I und *Stu*I die Gene HPV-16L1, das C-terminal trunkeerte L1ΔC, sowie das L1pl-Gen mit den in Pflanzen gebräuchlichen Kodons einkloniert. Zunächst wurden die Gene mittels PCR aus Plasmiden (# 713, #191, 2.8.1) heraus amplifiziert und mit den entsprechenden Schnittstellen versehen (*Apa*I, *Stu*I). Mittels Elektroporation (siehe 3.1.3) wurden die Plasmide (pCP2/S-2A-HPV-16L1, L1ΔC, L1pl) in DH5α-Bakterien (siehe 2.11.1.2) eingeschleust, auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und anschließend die gewachsenen Klone in einer Übernacht-Kultur expandiert. In der folgenden DNA-Minipräparation (siehe 3.3.1) wurde die DNA aus den Bakterien aufgearbeitet und mit den Restriktionsenzymen *Apa*I und *Stu*I verdaut, um die Fragmentgrößen in einem 1 %-igen Agarosegel (siehe 3.3.4) zu analysieren. Die verdauten DNA-Klone mit der richtigen Bandengröße (HPV-16L1 1640 Bp, L1ΔC 1424 Bp, L1pl 1521 Bp) wurden in einer DNA-Maxipräparation (siehe 3.3.2) aufgearbeitet, die DNA in TE-Puffer gelöst und bis zum Gebrauch bei –20°C aufbewahrt.

4.1.2 Vorbereitung von pCP1 und pCP2/S-2A-HPV-16 für die Inokulation in Pflanzen

Zur Vorbereitung auf die Infektion von Pflanzen (*Cowpea*, *Vigna unguiculata*) wurde eine Glycerinkultur von pCP1 positiven Bakterien (Bakterien mit der cDNA von RNA-1 transformiert) in einer großen Übernachtskultur expandiert und anschließend das Plasmid mittels einer DNA-Maxipräparation aufgearbeitet. Die aufgereinigte DNA wurde durch den Kontrollverdau mit *Mlu*I und *Eco*RI (Restriktionsschnittstellen) analysiert (siehe Abb. 4-1a).



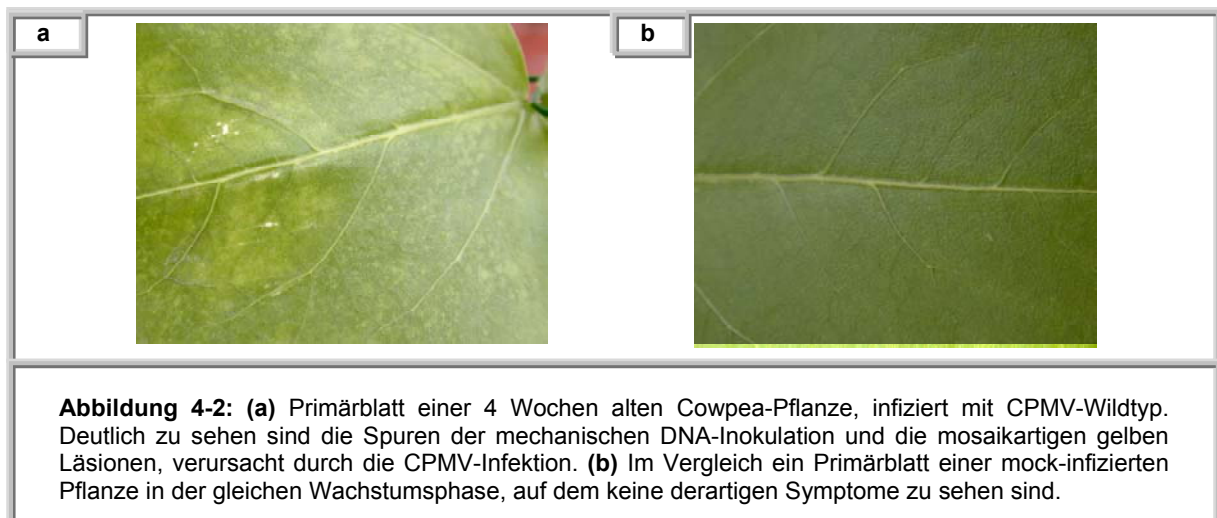
Nach der Überprüfung von pCP1 wurde ein präparativer Verdau (siehe 3.3.3) mit MluI angesetzt, um ca. 200 µg DNA für die Inokulation in Blätter zu linearisieren. In gleicher Weise wurde mit pCP2/S2A-HPV16L1wt/ΔC verfahren. Die Plasmide wurden durch EcoRI Verdau linearisiert (siehe Abb. 4-1b). Durch eine zweite EcoRI-Schnittstelle wurde eine Restriktionskinetik notwendig, um den partiellen Verdau der Plasmide zu optimieren. In dieser Kinetik konnte man zeigen, dass nach ca. 20 min die größte Menge der Plasmide in ihrer linearisierten Form vorlagen (siehe Abb. 4-1b). Man kann allerdings keine Aussage darüber treffen, an welcher EcoRI-Schnittstelle präferentiell geschnitten wurde und zu welchem Anteil das Volllänge-Konstrukt vorliegt. Auf der Basis dieser Kinetik wurde ein präparativer EcoRI-Verdau (ca. 100 µg) angesetzt und nach ca. 20 min im 37°C Wasserbad auf Trockeneis abgestoppt. Im weiteren Verlauf wurden die linearisierten Plasmide (pCP2/S2A-HPV16L1wt/ΔC und pCP1) durch eine Phenol/Chloroformextraktion (siehe 3.3.9) gereinigt und anschließend in einer Alkoholfällung präzipitiert. Die so gewonnene DNA wurde in Wasser aufgenommen in einer Konzentration von 20 µg/50 µl, linearisierter pCP1 und pCP2S-2A- HPV16L1wt/ΔC DNA zu gleichen Teilen gemischt und zu je 50 µl auf die Pflanzenblätter gegeben. Als Kontrollkonstrukte wurden pCP2/S-2A-GFP und pCP2/S-2A bei jedem Inokulationsexperiment in gleicher Weise mitbehandelt, um eine Kontrolle für eine

CPMV-Infektion in Pflanzen an Hand der GFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 4-3) oder der sich entwickelnden Wild-Typ-Symptome zu haben (siehe Abb. 4-2).

4.1.3 DNA-Inokulation in Blätter von *Vigna unguiculata* (Cowpea)

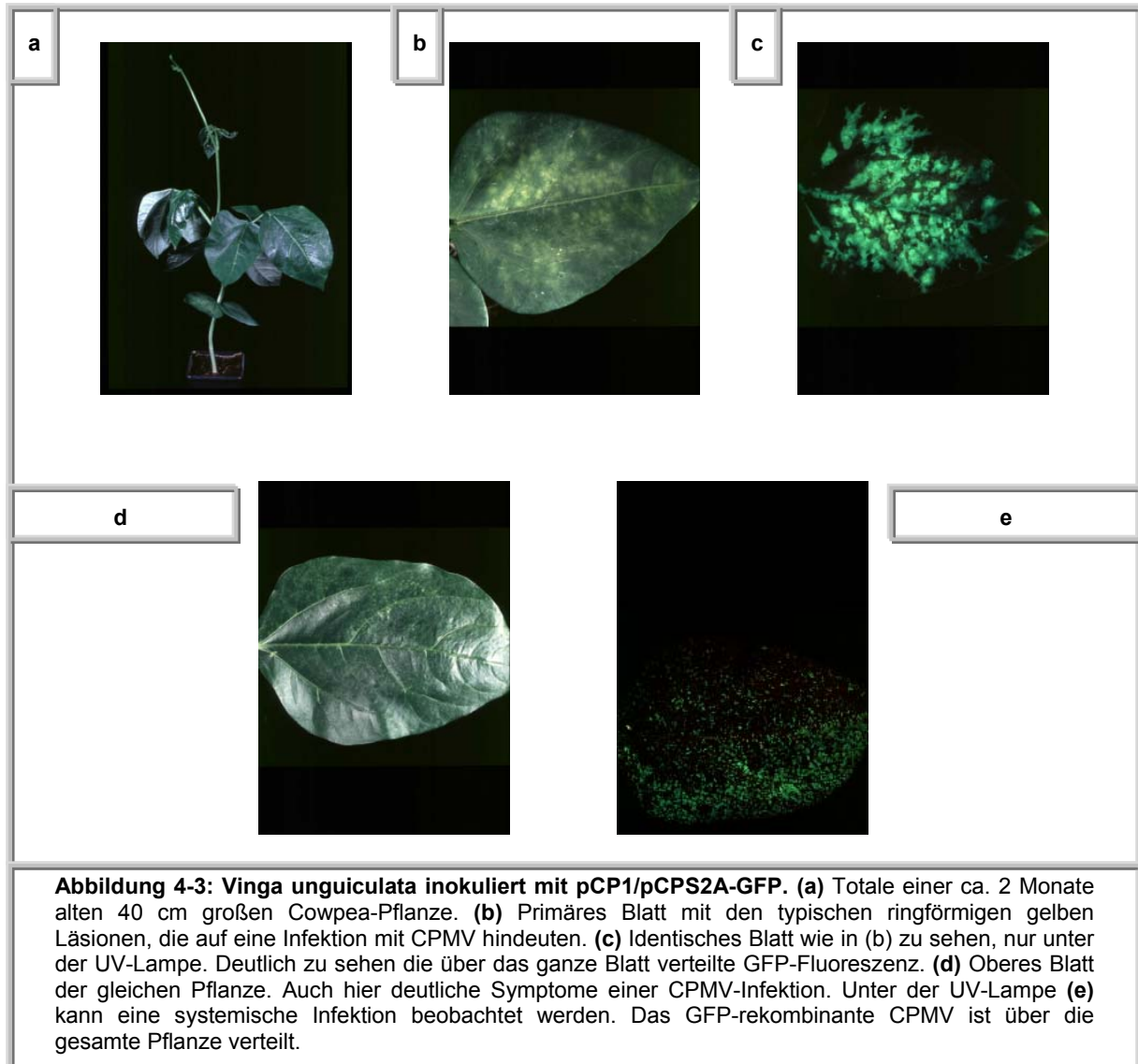
Cowpea-Pflanzen, die für eine DNA-Inokulation ausgewählt wurden, sollten ca. 10 cm hoch und die Primärblätter zwischen 4 und 5 cm groß sein. Bis zu diesem Stadium benötigen die Pflanzen, je nach Jahreszeit, eine Wachstumsphase von 3-4 Wochen.

Zu Beginn des Experiments werden die Blätter mit einem sehr feinen Glaspuder bestäubt, anschließend die DNA-Lösung aufpipettiert und vorsichtig in die Blattoberfläche einmassiert. Durch das Glaspuder wird die Kutikula (Wachsschicht) der Blätter verletzt und die DNA kann in die darunterliegenden Pflanzenzellen eindringen. Es ist notwendig, dass cDNA-1- und cDNA-2 (rekombinant)-Moleküle in ein und dieselbe Zelle gelangen, um einen erfolgreichen CPMV Replikationszyklus zu starten. In den Experimenten wurden in der Regel für jedes Konstrukt 5 Pflanzen mit DNA inokuliert; zwei bis drei Pflanzen wurden nur mit Wasser in gleicher Weise behandelt (Mock-Infektionen). Diese Pflanzen dienen als Negativkontrolle, da oftmals die mechanische Verletzung der Blattoberfläche als virusbedingte Symptome fehlgedeutet werden. Auf diese Weise kann man uninfizierte und infizierte Blätter innerhalb eines Experiments direkt miteinander vergleichen (siehe Abb. 4-2).



Im Anschluss an die Inokulationsprozedur wurden die behandelten Pflanzen mit Wasser besprenkelt und für ca. 8 Stunden abgedunkelt im Gewächshaus kultiviert, da die Blätter sonst möglicherweise vergilben und absterben. Erste Symptome wurden nach 4-5 Tagen auf den CPMVwt-infizierten Pflanzen beobachtet.

Im ersten Experiment wurden je 5 Pflanzen mit den Konstrukten pCP2/S-2A-HPV16L1wt, Δ C inokuliert. Als Kontrollkonstrukte wurden parallel pCP2/S-2A-GFP und pCP2/S-2A verwendet. Im Falle der HPV16L1-Konstrukte wurden allerdings frühestens nach 14 Tagen erste Symptome erwartet (George Lomonosoff, John Innes Centre, Norwich, UK, persönliche Mitteilung).



Ab dem 3. Tag wurden die Pflanzen täglich auf Virussympptome untersucht. Die ersten Symptome wurden wie erwartet nach 3 Tagen auf den primären Blättern der mit CPMVwt-infizierten (gereinigte CPMV-Partikel) Pflanzen beobachtet. Nach einer weiteren Woche waren die gelben Läsionen auch auf den oberen Blättern zu sehen, was eine systemische Infektion bestätigt. Die Pflanzen, die mit dem GFP-Konstrukt infiziert wurden zeigten nach 5 Tagen die ersten schwachen GFP-Fluoreszenzen unter der UV-Lampe. Diese Signale intensivierten sich innerhalb der nächsten Tage (siehe Abb. 4-3c), bis ca. nach 10 Tagen auch die oberen Blätter einer infizierten Cowpea-Pflanze in Folge einer verstärkten GFP-

Expression grüne fluoreszierende Spots zeigten (siehe Abb. 4-3e). Demnach beansprucht die DNA-Inokulation einen längeren Zeitraum für die erfolgreiche Virusproduktion und Vermehrung als die Infektion mit gereinigten Virus-Partikeln (systemisch Symptome ca. 1 Woche nach der Infektion). Im gleichen Zeitraum, wie bei den mit pCP2/S-2A-GFP-inokulierten Pflanzen, wurden auch die ersten Symptome auf den Pflanzen erwartet, die parallel mit pCP2/S-2A HPV16L1wt, L1 Δ C, L1pl (Kodons von der Kartoffel, Material 2.8.1 #713) inokuliert worden waren. Allerdings konnten auch nach einer Beobachtungsphase von mehreren Wochen keine Symptome festgestellt werden. Als mögliche Ursache wurde die zusätzliche EcoRI-Restriktionsschnittstelle im HPV16L1-Gen vermutet, die nur einen partiellen Verdau erlaubt und somit die Ausbeute an DNA, die an der richtigen Stelle außerhalb des L1-Gens linearisiert wurde, limitiert. Über eine ortsspezifische Mutagenese „site-direkted mutagenesis“ wurde die zusätzliche EcoRI-Schnittstelle eliminiert (siehe Tab. 4 Experiment Nr. 4), was in einer vollständigen Linearisierung der zu verdauenden DNA-Menge resultierte.

Experiment Nr.	linearisiertes Konstrukt pCP1+	Pflanzenzahl	Symptome (gelbe Läsionen)
1	pCP2/S-2A wt	5	4+
	pCP2/S-2A-GFP	5	3+
	pCP2/S-2A-HPV16L1wt	5	-
	pCP2/S-2A HPV16L1 Δ C	5	-
2	CPMVwt-Partikel	5	5+
	pCP2/S-2A-GFP	5	3+
	pCP2/S-2A-HPV16L1wt	5	-
	pCP2/S-2A HPV16L1 Δ C	5	-
	pCP2/S-2A HPV16L1pl (Kartoffel)	5	-
3	pCP2/S-2A wt	5	3+
	pCP2/S-2A-GFP	5	2+
	pCP2/S-2A-HPV16L1wt	5	-
	pCP2/S-2A HPV16L1 Δ C	5	-
4	pCP2/S-2A wt	5	4+
	pCP2/S-2A-GFP	5	4+
	pCP2/S-2A-HPV16L1wt (-EcoRI)	5	-
	pCP2/S-2A HPV16L1 Δ C (-EcoRI)	5	-

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Inokulation in *Vigna unguiculata* aus 4 Experimenten.

Die DNA-Inokulationsmethode wurde mehrfach wiederholt (siehe Tab. 4) und nur die Infektionen mit den verschiedenen Positivkontrollen waren reproduzierbar. Auch nach der Eliminierung der zusätzliche EcoRI-Schnittstelle konnten keine virusähnlichen Symptome detektiert werden. Um eine effizientere Einschleusung fremder DNA in die Pflanze zu gewährleisten, wurde eine neues Inokulationssystem etabliert.

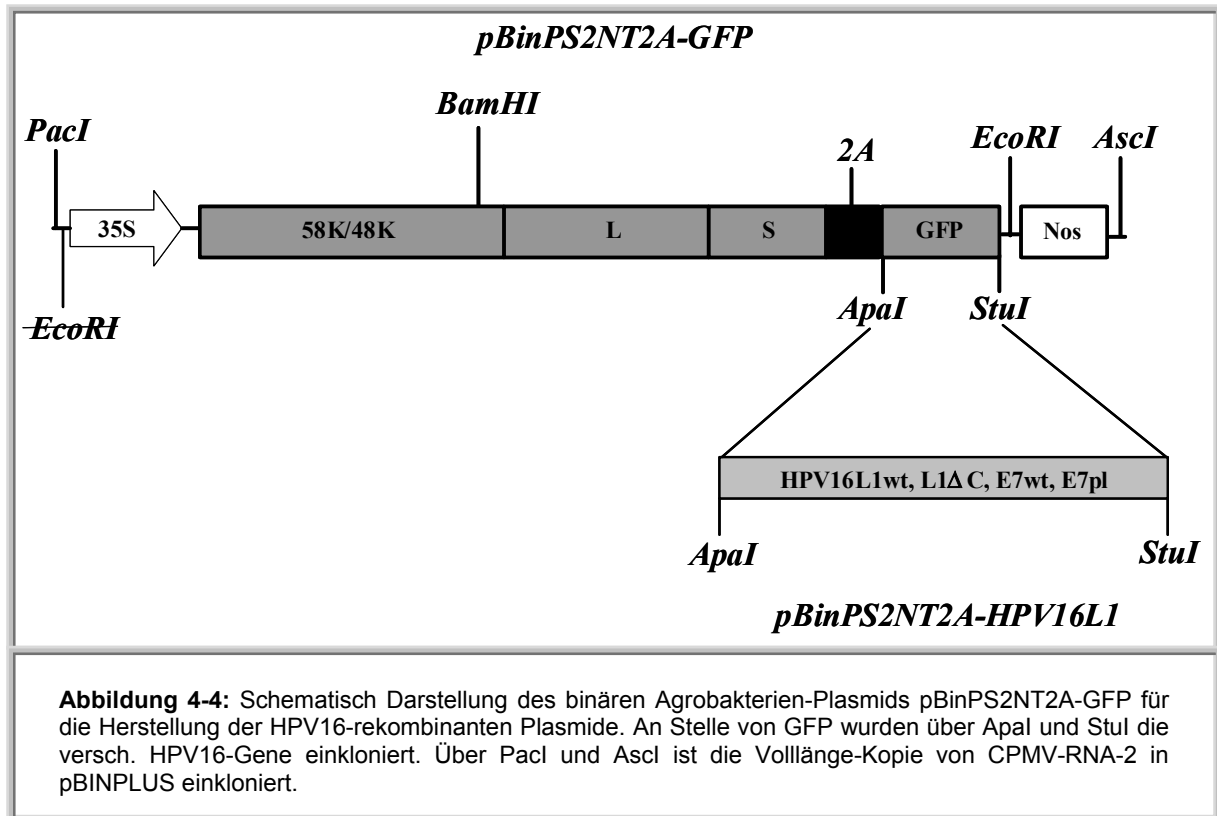
4.2 Herstellung rekombinanter *A.tumefaciens*-Plasmide

Die DNA-Inokulationsmethode hat den Nachteil, dass relativ große Mengen an Plasmid-DNA gereinigt und linearisiert werden müssen, bevor mit den Infektions-Experimenten begonnen werden kann. Auch die Infektions-Effizienz war relativ uneinheitlich, was darauf zurückzuführen ist, dass beide linearisierten Plasmide pCP1 und pCP2/S2A in eine Zelle gelangen müssen, um den Replikationszyklus von CPMV zu starten. Das kann dazu führen, dass einige Pflanzen in einem Experiment erst überhaupt nicht infiziert werden (siehe Tab. 4). Um die Inokulations-Effizienz zu erhöhen und um auf die Aufreinigung von Plasmid-DNA ganz verzichten zu können, wurde eine Inokulations-Methode entwickelt, in der mit Hilfe von Agrobakterien-Infektionen, rekombinante CPMVs in Pflanzen propagiert werden können. Durch die Infiltration von *Agrobacterium tumefaciens*-Suspensionen in Blätter von *N.benthamiana* wird eine CPMV-Infektion ausgelöst. Die Agrobakterien sind mit Plasmiden transformiert, die mit einer Volllänge-Kopie von CPMV-RNA-1 oder RNA-2 ausgestattet sind. Mit Hilfe der neuen Infiltrations-Methode konnte die Infektions-Effizienz gesteigert werden und die Experimente wurden reproduzierbarer (vgl. Tab. 4 und 4-1).

4.2.1 Klonierung von HPV16L1wt, L1ΔC in binäres Agrobakterien-Plasmid

Als Ausgangsplasmide dienten pN81S1NT (RNA-1) und pN81S2NT-GFP (RNA-2) (siehe 2.8.1 erhalten von George Lomonosoff, John Innes Centre, Norwich UK). Diese Plasmide basieren auf dem kommerziellen Vektor pBluescript SKII (Stratagene, La Jolla, USA). Um die relevanten Sequenzen (siehe Abb. 4-4) in das *A. tumefaciens*-Plasmid (Binäres Plasmid, beinhaltet Volllänge-Kopie von RNA-2) einzuschleusen, wurden die Ausgangskonstrukte mit den Restriktionsenzymen PacI und AscI verdaut (siehe pN81S2NT-2A-GFP, 2.8.1), in einem präparativen 1 %-igen Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit dem gleichermaßen verdauten binären Plasmid pBINPLUS ligiert (siehe pBINPLUS, 2.8.1). Die so entstandenen Konstrukte wurden mittels Elektroporation (siehe 3.1.3.1) in *E.coli* (GM 2163, siehe 2.11.1.2) eingeschleust, die Bakteriensuspension auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Bakterienkolonien wurden anschließend in einer Übernacht-Kultur expandiert, die DNA in einer DNA-Mini-Präparation (siehe 3.3.1) aufgearbeitet und mit dem Restriktionsverdau (siehe 3.3.3) PacI und AscI kontrolliert. Die Klone, die sich in einem 1 %-igen Agarosegel (siehe 3.3.4) durch die entsprechende Fragmentgröße als richtig erwiesen, wurden in einer großen Übernacht-Kultur weiter expandiert und die DNA in einer DNA-Maxi-Präparation (siehe 3.3.2.) aufgearbeitet. Die hergestellten Konstrukte pBinPS1NT und

pBinPS2NT2AGFP (siehe Abb. 4-5) wurden in einem ersten Inokulations-Experiment analysiert (siehe Abb. 4-6). Zur Herstellung der HPV16-rekombinanten binären Plasmide (siehe 2.8.1) wurde im weiteren Verlauf pBinPS2NT2AGFP verwendet (siehe Abb. 4-4). Das GFP-Gen ist in pBinPS2NT2AGFP über *ApaI* und *StuI* eingeschleust worden.



Dieses Konstrukt wurde in einem präparativen Verdau mittels *ApaI* und *StuI* geschnitten und in einem 1 %-igen Agarosegel die GFP-Bande von der Plasmid-Bande getrennt. Das linearisierte Plasmid wurde in einer Gel-Elution (siehe 3.3.5) aufgereinigt und in entsprechender Konzentration in der anschließenden Ligation eingesetzt (siehe 3.3.8). Die HPV16-Gene (L1, L1ΔC) wurden in einer PCR (siehe 3.3.10) mit den entsprechenden Oligonukleotid-Primern für die Einklonierung in pBinPS2NT2A vorbereitet. Die Primer wurden so gewählt, dass am 5'-Ende eine *ApaI*- und am 3'-Ende eine *StuI*-Restriktionsschnittstelle entsteht. Die PCR-Fragmente wurden ebenfalls in einer Gel-Elution aufgereinigt, anschließend mit den Enzymen *ApaI* und *StuI* verdaut, eine Phenol/CIA-Reinigung (siehe 3.3.9) durchgeführt und mit einer Alkoholfällung die DNA präzipitiert. Die vorbereiteten HPV16L1-PCR-Fragmente wurden zusammen mit dem linearisierten pBinPS2NT2A in der Ligation eingesetzt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

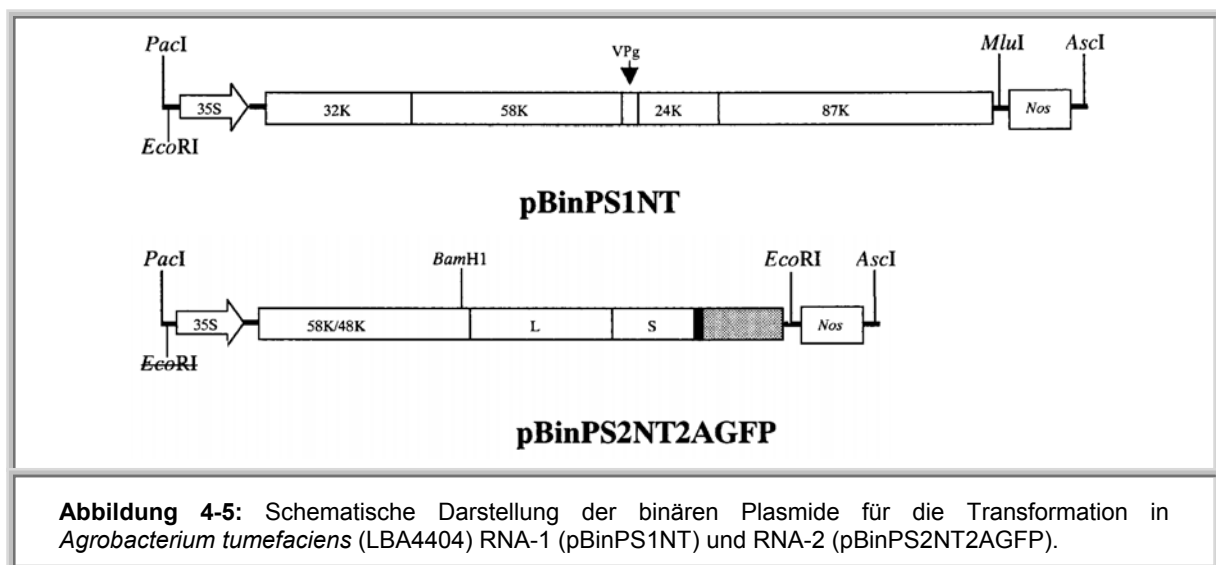
4.2.2 Inokulation von rekombinanten Agrobakterien in Blätter von *N.benthamiana*

Die Methode macht sich die natürliche Eigenschaft von *Agrobacterium tumefaciens* zu Nutze, Fremd-DNA in das Genom der Pflanzenzelle stabil zu integrieren. In diesem Ansatz wurden Tabak-Pflanzen (*Nicotiana benthamiana*, Wild-Tabak) verwendet, da sie aufgrund ihres feineren Blattaufbaus für diese Art von Inokulation empfänglicher sind.

Zu Beginn wurden die mit pBinPS1NT (RNA-1) und pBinPS2NT2A (RNA-2, rekombinant) transformierten Agrobakterien (LBA4404) unter Kanamyzinselektion für 48 Std. expandiert, abzentrifugiert und anschließend in einem speziell supplementierten Nährmedium (Acetosyringone als Induktor für *vir*-Gene) aufgenommen und für die Inokulation in die Blätter vorbereitet (siehe 3.2.2).

Ausgangsmaterial sind zwei Agrobakterien-Populationen:

- 1) Agrobakterien transformiert mit pBinPS1NT (siehe Abb. 4-5).
- 2) Agrobakterien transformiert mit pBinPS2NT2AGFP, HPV16L1wt, L1ΔC (siehe Abb. 4-5)



Für die Inokulation in die Blätter von *Nicotiana benthamiana* wurden die Bakterienpopulationen zu gleichen Teilen (pBinPS1NT/pBinPS2NT2A-rekombinant 1:1) gemischt, in einer 1 ml Spritze aufgezogen und an verschiedenen Stellen der Blattoberfläche inokuliert.

Bei einer Infiltration mit dem CPMVwt-Konstrukt (pBinPS2NT2A) wurden erste Symptome 4-6 Tage nach der Inokulation beobachtet. Bei der Infiltration von pBinPS2NT2AGFP konnte man allerdings erst nach 17 Tagen deutliche GFP-Fluoreszenzen unter der UV-Lampe erkennen. (siehe Abb. 4-6). Sie strahlten von den Inokulationsstellen aus und bewegten sich in

Richtung Blattadern, was auf eine Virus-Infektion mit CPMV-GFP und nicht nur auf eine lokale GFP-Expression schließen lässt. Man kann aufgrund der verzögerten Entwicklung der typischen CPMV-Symptome schließen, dass die Insertion von Fremd-Sequenzen einen deutlichen Einfluß auf die Infektiosität des Virus hat. Parallel wurden Tabak-Pflanzen mit rekombinanten Agrobakterien (pBinPS2NT2AHPV16L1wt, L1ΔC) inokuliert. Nach ca. 14 Tagen wurden kleine gelbe Punkte auf der Blattoberfläche einiger Pflanzen sichtbar. Für weitere Analysen wurde Pflanzenmaterial gesammelt und molekularbiologisch analysiert (siehe Abb. 4-7). Vom Aussäen der Pflanzensamen bis zur Analyse der möglichen Symptome auf den Blättern vergehen je nach Jahreszeit bis zu 8 Wochen.



Abbildung 4-6: (a) Gleichaltrige (ca. 8 Wochen alte) Pflanzen (*Nicotiana benthamiana*) mit unterschiedlichem Wachstum in Folge einer Virus-Infektion (pBinPS2NT2A links, pBinPS2NT2A-HPV16L1wt mitte und rechts). (b) Mit pBinPS2NT2A -GFP-inokuliertes Blatt mit Symptomen einer Virusinfektion (leichte Kräuselung am Blattrand mit gelblichen Flecken). (c) Identisches Blatt wie in (b) mit deutlicher GFP-Fluoreszenz, resultierend aus der Inokulation mit RNA-1 und RNA-2-GFP. (d) Starke Kräuselung der oberen Blätter, die sich teilweise einrollen in Folge einer Infektion mit Cowpea Mosaic Virus.

Wie in Abbildung 4-6a gezeigt inhibiert eine starke Infektion mit CPMVwt das Wachstum der Tabak-Pflanzen im Vergleich zu Pflanzen, die mit rekombinantem Konstrukt (pBinPS2NT2AHPV16L1wt) inokuliert wurden. Weitere Merkmale für eine Virusinfektion mit CPMV sind die starke Kräuselung und das Einrollen der oberen Blätter (siehe Abb. 4-6d).

4.2.3 Analyse von Pflanzenproben im Westernblot

Die vermeintlich mit rekombinantem CPMV (pBinPS2NT2A-HPV16L1wt) infizierten Blattsegmente wurden mit einem Stanzwerkzeug aus den Blättern entnommen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit Puffer und einem Stempel, der exakt in ein Eppendorftube passt, zerkleinert. Das so aufgeschlossene Pflanzenmaterial wurde aufgeköcht, abzentrifugiert und der Überstand in einer Proteingel-Elektrophorese (siehe 3.3.16) aufgetrennt und anschließend im Westernblot (siehe 3.3.17) analysiert. Mit den analysierten Pflanzenextrakten konnten keine HPV16L1-Signale detektiert werden. Nur der Extrakt aus einer Pflanze, die mit CPMVwt inokuliert war, konnte ein Signal bei ca. 48 kDa detektiert werden. Erkannt wurde möglicherweise ein Pflanzenprotein aufgrund einer Kreuzreaktion mit dem monoklonalen Maus-Anti-HPV16L1-Antiserum (siehe Abb. 4-7b, Spur 3). Zum Vergleich dazu sind die spezifischen Signale für das L-Protein 37 kDa und das S-Protein 23 kDa (CPMV) in einem Kontroll-Westernblot (siehe Abb. 4-7a) gezeigt, detektiert mit dem polyklonalen Kaninchen-Anti-CPMV-Antiserum. In einem weiteren Experiment wurde die Inokulation mit Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2-HPV16L1wt wiederholt (siehe Abb. 4-7c/d Spur 1). Eine Probe aus diesem Experiment wurde zusammen mit den entsprechenden Kontrollen (Spur 3. HPV16L1 Δ C-VLPs 55kDa mit Degradation [Volpers et al., 1994], kleinere Banden. Spur 4. Extrakt einer unbehandelten Pflanze) mit unterschiedlichen Antikörpern analysiert (Anti-CPMV-Antiserum, Anti-HPV16L1-Antiserum, siehe 2.7.1). Im einen WB wurde der Pflanzenextrakt mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-CPMV-Antiserum (siehe Abb. 4-7c, Spur 1) und im anderen mit dem monoklonalen Maus-Anti-HPV16L1-Antiserum (siehe Abb. 4-7d, Spur 1) analysiert. Wenn man in Abbildung 4-6c die Spuren 1 und 2 miteinander vergleicht, kann man im analysierten Extrakt eine CPMVwt-Infektion nachweisen. Die Banden vom Extrakt aus Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2-HPV16L1wt-Inokulation (Spur 1) sind auf gleicher Höhe mit den Signalen eines Extraktes aus einer mit CPMVwt-infizierten Pflanze (mit Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2 inokuliert, Spur 2).

In beiden Extrakten wurde das L-Protein 37 kDa und das S-Protein 23 kDa detektiert.

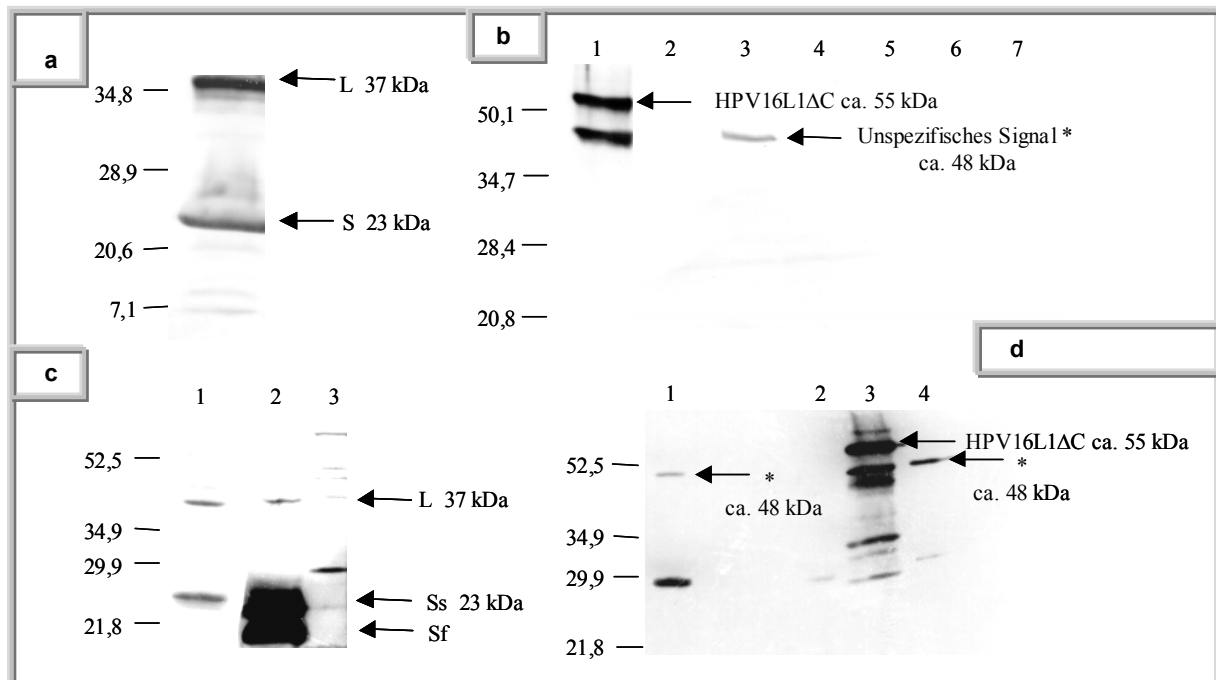


Abbildung 4-7: Autoradiogramm von ECL-Westernblots mit Pflanzenextrakten von *N. benthamiana*. Inokuliert wurden Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2-HPV16L1wt. Der Proteinmarker wurde in kDa angegeben (siehe 2.9.2). Von den Pflanzenextrakten wurden jeweils 30 μ l auf ein Gel aufgetragen. **(a)** Kontrolle für das spezifische Bandenmuster der Kapsidproteine von CPMVwt. Aufgetragen wurden 10 μ l gereinigte CPMV-Partikel (200 ng/ μ l) detektiert mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-CPMV-Antiserum (siehe 2.7.1). Die Bande bei 37 kDa zeigt das L-Protein und bei 23 kDa das S-Protein (Ss, ungespaltene Form, Sf, gespaltene Form (siehe Pfeile in Abb. c)). **(b)** Pflanzenextrakte detektiert mit einem monoklonalen Maus-Anti-HPV16L1-Antiserum (siehe 2.7.1). Spur 1: zeigt 10 μ l gereinigte HPV16L1 Δ C-Partikel (50 ng/ μ l) als Positivkontrolle. Die Hauptbande läuft bei 55 kDa, die untere Bande detektiert ein Degradationsprodukt [Volpers et al., 1994]. Spuren 2,4,5: Aufgetragen sind Pflanzenextrakte von passagierten Pflanzen (mit Überstand von primär-infizierten Pflanzen inokuliert). Keine Banden detektierbar. Spur 6: Aufgetragen ist ein Pflanzenextrakt einer primär-infizierten Pflanze. Kein HPV16L1-Signal detektierbar. Spur 3: Aufgetragen ist ein Pflanzenextrakt einer CPMVwt-infizierten (Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2A) Pflanze. Signal bei ca. 48 kDa. Vermutlich ein ubiquitäres Pflanzenprotein (vermutlich eine unspezifische Reaktion mit dem monoklonalen anti-HPV16L1-Antiserum, CamVir). **(c)** Detektiert mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-CPMV-Antiserum Spur 1): Pflanzenextrakt aus einem weiteren Experiment (Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2-HPV16L1wt). Signale bei ca. 37 kDa und ca. 23 kDa (siehe Pfeile in Abb. c). Detektiert wurden die L/S-Proteine von CPMVwt (siehe Spur 2, CPMVwt-Extrakt) Zum Vergleich (siehe Abb. a). Spur 3 zeigt Signale einer uninfizierten Pflanzen (Mock-Infektion). **(d)** Detektiert mit einem monoklonalen Maus-Anti-HPV16L1-Antiserum. Spur 1: Signale bei ca. 48 kDa und ca. 28 kDa (pflanzeigenes Proteine). Spur 2: CPMVwt-Extrakt. Spur 3: gereinigte HPV16L1 Δ C-VLPs, spezifische Bande bei 55 kDa (untere Bande Degradation). Spur 4: Pflanzenextrakt von einer uninfizierten Pflanze (identisches Bandenmuster wie Spur 1). Kein HPV16L1-Signal in analysierten Pflanzenextrakten.

In der Spur 2 sind allerdings im Vergleich zu Spur 1 zwei Banden in Höhe des S-Proteins zu sehen, wobei die obere Bande die ungespaltene langsame Form (Ss) - und die untere die gespaltene schnelle Form (Sf) des S-Proteins darstellt [Gopinath et al., 2000]. Zum Vergleich siehe Abbildung 4-7d mit den identischen Extrakten aus Abbildung 4-7c. Es wurden wiederum zwei Signale sichtbar, allerdings mit einer anderen Laufhöhe (ca. 48 kDa, 28 kDa). Es wurde kein spezifische Signal für HPV16L1 detektiert, wenn man es mit der Positivkontrolle (gereinigte HPV16L1 Δ C-VLPs, 55kDa) vergleicht (siehe Abb. 4-7c, Spur 3). Der gleiche WB Spur 4 (siehe Abb. 4-7d) zeigt das Bandenmuster eines Pflanzenextraktes aus

einer unbehandelten Pflanze, welches mit den Signalen aus Spur 1 übereinstimmt. Es wurde demnach mit dem monoklonalen Maus-Anti-HPV16L1-Antiserum ein pflanzeigenes Protein detektiert (Kreuzreaktivität). Diese Experimente wurden mehrfach mit dem gleichen negativen Ergebnis wiederholt (siehe Tab. 4-1). Nach dem gleichen Schema wurde mit den inokulierten Pflanzen verfahren, die mit den Konstrukten Agro-pBinPS2NT2-HPV16L1 Δ C, E7wt, E7pl behandelt wurden (siehe Tab. 4-1, Exp. 5, 6). Auch aus den Extrakten dieser Pflanzen konnte kein HPV16-Protein nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt).

Experiment Nr.	Konstrukt Agro-pBinPS1NT+	Pflanzenzahl	Symptome	Westernblot-Analyse
1	Agro-pBinPS2NT2AGFP	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1wt	10	3+	-
2	Agro-pBinPS2NT2AGFP	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1wt	3	1+	-
3	Agro-pBinPS2NT2AGFP	5	5+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	5	5+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1wt	5	-	-
4	Agro-pBinPS2NT2AGFP	5	5+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	5	5+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1wt	5	-	-
5	Agro-pBinPS2NT2AGFP	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7wt	5	-	-
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7pl	5	-	-
6	Agro-pBinPS2NT2AGFP	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2A	3	3+	+
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7wt	3	-	-
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7pl	3	-	-
	Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1 Δ C	3	-	-

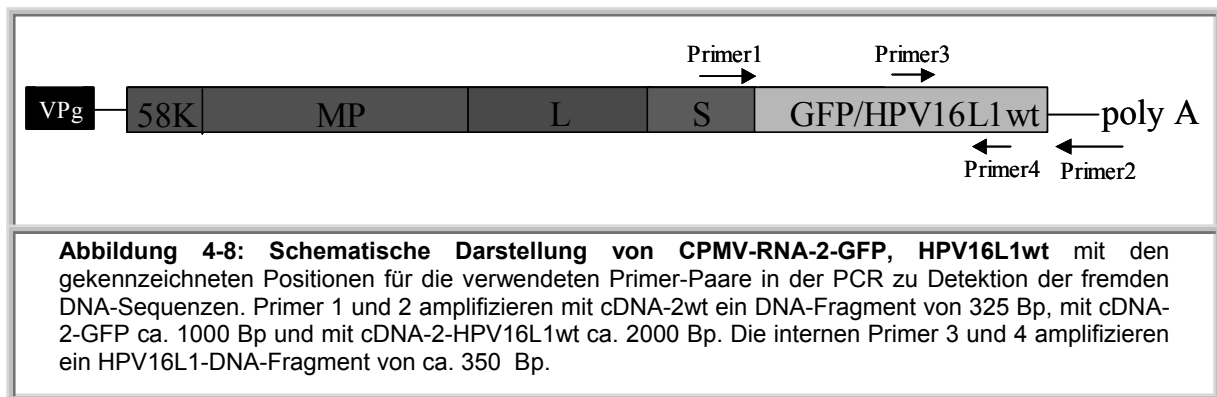
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Agro-Infiltrations-Methode in *Nicotiana benthamiana* aus 6 Experimenten.

Zur genaueren Analyse wurden nochmals Pflanzenproben aufgearbeitet, die RNA isoliert (siehe 3.3.12) und mittels RT-PCR (siehe 3.3.13) untersucht. Mit dieser Methode lässt sich zeigen, ob die RNA-2 gebildet wurde und man kann eine Aussage machen, ob das Fremd-Gen (HPV16L1, L1 Δ C) aus dem Plasmid verloren ging (siehe 6.1.1) und es deshalb eventuell nur zu einer schwachen CPMVwt-Infektion kommt (siehe Abb. 4-7c, Spur 1/2).

4.2.4 RT-PCR-Analyse von mit rekombinanten Agrobakterien inokulierten Pflanzen

Die geernteten Blätter aus den Inokulations-Experimenten wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, zur Extraktion der RNA mit flüssigem Stickstoff behandelt und im Mörser zerkleinert. Das so erhaltene Pflanzenpulver wurde in einem RNA-Extraktions-Kit (siehe 3.3.12) über Säulen und

die entsprechenden Puffer aufgearbeitet und die RNA aus den Pflanzenzellen isoliert. Mit Hilfe der Reversen Transkription (siehe 3.3.13) wurde aus der Pflanzen-RNA die entsprechende cDNA synthetisiert. Mit dem cDNA-Pool aus den aufgearbeiteten Pflanzenblättern wurde mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) (siehe 2.8.2), die den C-Terminus des S-Gens einschließen (siehe Abb. 4-8), eine PCR (Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt (siehe 3.3.10). Die analysierten Proben stammten von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen, die mit Agro-pBinPS1NT/Agro-pBinPS2NT2A, GFP, HPV16L1wt, L1ΔC inokuliert wurden.



Der cDNA-Pool aus den Pflanzenproben wurde jeweils mit drei Primer-Paaren analysiert. Das erste Primer-Paar detektiert und amplifiziert ein 200 Bp-Fragment (siehe 2.8.2) auf der cDNA-1 und bestätigt somit die Anwesenheit von RNA-1-Transkripten in den analysierten Blättern. Das zweite Primer-Paar (siehe Abb. 4-8 Primer1/2) schließt den C-Terminus der S-Sequenz ein und somit auch die integrierten Fremd-DNA-Sequenzen, wenn als Matrize cDNA-2-GFP, bzw. HPV16L1wt im cDNA-Pool der zu analysierenden Pflanzen zur Verfügung steht. Dient cDNA-2wt als Matrize wird ein 325 Bp-Fragment (siehe 2.8.2) amplifiziert. Im Falle von cDNA-2-GFP, bzw.-HPV16L1wt, L1ΔC entsteht ein ca. 1100 Bp- bzw. ca. 1900 Bp-Fragment. Das dritte Primer-Paar (siehe Abb. 4-8 Primer3/4) erkennt eine interne Sequenz von HPV16L1wt und amplifiziert ein 350 Bp-Fragment (siehe 2.8.2), was aufgrund seiner Länge eine effizientere Amplifikation zulässt. Aus der RT-PCR und der sich anschließenden spezifischen PCR-Analyse konnte man deutlich ableiten, dass in keinem der getesteten rekombinanten Pflanzenextrakte RNA-2-HPV16L1wt (pBinPS2NT2AHPV16L1) detektiert werden konnte (siehe Abb. 4-9b, Spure 2,5,7). Das Signal für eine Infektion mit rekombinantem CPMV-HPV16L1 wurde bei ca. 1900 Basenpaaren und für eine CPMVwt-Infektion bei 325 Bp erwartet.

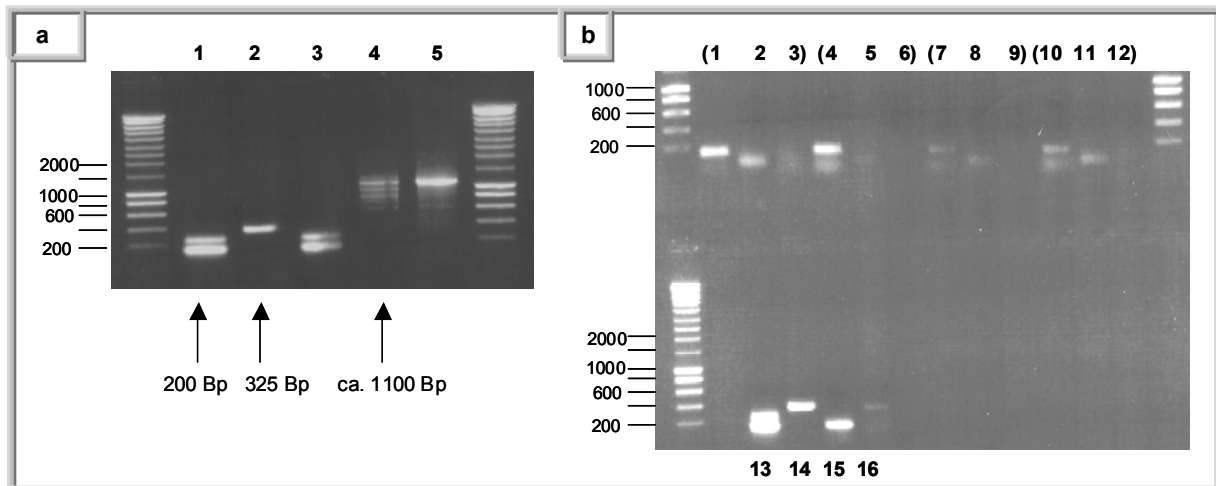


Abbildung 4-9: 1 %-ige Agarosegele von PCR-Ansätzen zur Analyse von rekombinanten Pflanzenextrakten. Als Größenstandard wurde der Smart-Ladder (Eurogentec), (siehe 2.9.1) benutzt. RNA meint hier jeweils die Amplifikation der entsprechenden cDNA mit spezifischen Primern (siehe Abb. 4-8).

(a) Spuren 1-4: zeigen den RNA-Nachweis aus gereinigten CPMV-Partikeln. Analysiert wurde die von gereinigten CPMV-Partikeln extrahierte RNA mit den spezifischen Primern für RNA-1 und dem Primer-Paar 1/2 für RNA-2. Spur 1: zeigt die erwartete Bande bei ca. 200 Bp von RNA 1 und eine etwas höher laufende Spleißvariante von CPMVwt. Spur 2: zeigt das Fragment bei 325 Bp der RNA 2 von CPMVwt. Spur 3: 200 Bp-Fragment von RNA-1 von CPMV-GFP. Spur 4: ca. 1100 Bp-Fragment CPMV-GFP amplifiziert mit Primer-Paar 1/2 (kleinere distinkte Banden, repetitive Sequenzen in Primern könne zu weiteren PCR-Produkten führen). Spur 5: Plasmidkontrolle pCP2/S-2A-GFP, amplifiziert mit Primer-Paar 1/2 ca. 1100 Bp-Fragment (auch hier kleinere zusätzliche PCR-Produkte, (siehe Spur 4).

(b) Analysiert wurden Pflanzenextrakte aus den Agro-Inokulations-Experimenten mit Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1. Spuren 1,4,7: zeigen das PCR-Produkt ca. 200 BP aus der Amplifikation von RNA-1 (Agro-pBinPS1NT). Spur 2,5,8: zeigen außer einer schwachen Primer-Bande kein spezifisches Signal bei ca. 1900 Bp für die Detektion von RNA-2-HPV16L1wt (Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1wt) durch das Primer-Paar 1/2 (siehe Abb. 4-8). Spur 3,6,9: kein Signal bei 350 Bp detektiert durch das interne Primer-Paar 3/4 (siehe Abb. 4-8). Spur 10-12: Verwendung der identischen Primer-Paare für die Detektion von RNA-2-HPV16L1ΔC (Agro-pBinPS2NT2AHPV16L1ΔC). Spur 10) 200 Bp-Fragment, positiv für RNA-1 (Agro-pBinPS1NT). Spur 11+12) Negativ für RNA-2-HPV16L1ΔC, außer einer Oligobande in Spur 11. Spur 13: Signale für RNA-1 aus CPMVwt-Partikeln (siehe Abb. 4-9a, Spur 1). Spur 14) Plasmidkontrolle für die internen Primer 3/4 zur Amplifikation eines 350 Bp-Fragments (siehe Abb. 3-7). Spur 15+16: zeigt die Signale für RNA-1 (200 BP) und RNA-2 (325 Bp) aus Pflanzen, die mit Agro-pBinPS1NT und Agro-pBinPS2NT2A inokuliert wurden (Positivkontrolle).

Das schwache Signal bei ca. 100 Bp (siehe Abb. 4-9, Spuren 2, 4, 7, 8, 10, 12) wird durch die im Ansatz verbliebenen Primer verursacht. Auch mit dem internen Primer-Paar 3/4 (siehe Abb. 4-8) wurde keine Bande bei 350 Bp detektiert. Als entsprechende Positivkontrolle wurde das Plasmid pCP2/S-2A-HPV16L1wt mit den internen Primern 3/4 nachgewiesen (siehe Abb. 4-9b, Spur 14 ca. 350 Bp). Dagegen war das Signal für RNA-1 (200 Bp) in allen Ansätzen sichtbar und könnte eine mögliche Erklärung für eine schwache CPMVwt-Infektion sein, die zu vereinzelten Symptomen auf den inokulierten Blättern geführt haben könnte (siehe 6.1.1). Aus Abbildung 4-9a Spur 4 wird deutlich, dass im Ansatz Agro-pBinPS2NT2AGFP es zusätzliche kleinere Banden im Gel gibt, die vermutlich durch weitere Hybridisierungs-Regionen der Primer mit dem Template entstehen. Um die CPMV-Spezifität der in Abbildung 4-8 gezeigten Signale zu bestätigen wurde aus den CPMV/cDNA-1- und cDNA-2-Sequenzen

je eine ^{32}P -markierte Sonde hergestellt (siehe 3.3.14) und mit den Agarosegelen (siehe Abb. 4-8) eine DNA-DNA-Hybridisierung durchgeführt (siehe 3.3.15). Auf dem darauf resultierenden Blot (Röntgenfilm) wurden die identischen Signale, wie nach der Gelelektrophorese (siehe 3.3.4) detektiert (Abbildung nicht gezeigt).

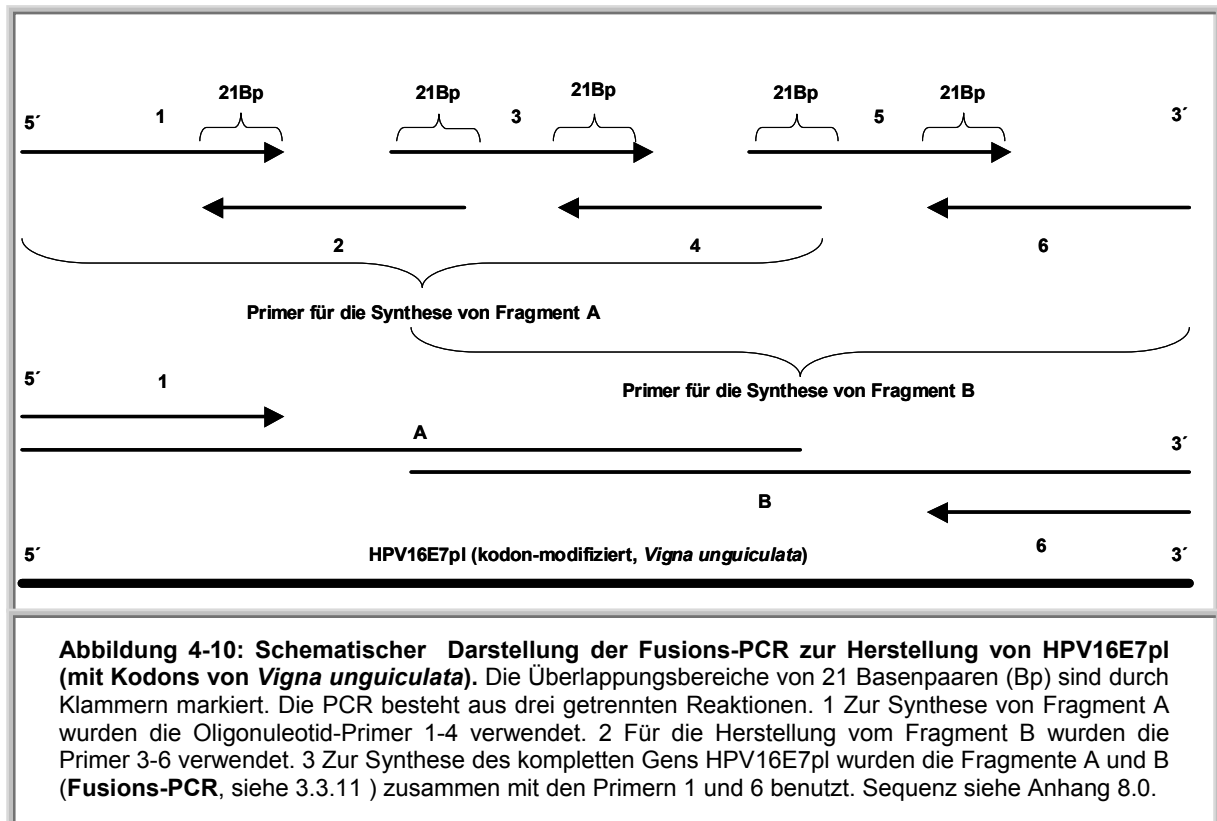
Um die großen HPV16-DNA-Sequenzen als Ursache für die fehlende Infektiosität von RNA-2 auszuschließen, wurden kleinere Sequenzen von HPV16 in die RNA-2 integriert. Zu diesem Zweck wurde HPV16E7wt und ein neusynthetisiertes HPV16E7 mit modifizierten Kodons (Cowpea-adaptierten Kodons) inkloniert.

4.2.5 Herstellung von HPV16E7 aus Pflanzen-Kodons (E7pl) mittels Fusions-PCR

Im ersten Schritt wurden die viralen Kodons von HPV16E7wt in Pflanzen-Kodons (*Vigna unguiculata*) auf dem Papier umgeschrieben. Als Grundlage diente eine Kodon-Datenbank (www.kazusa.or.jp), die alle bisher entschlüsselten kodierenden Sequenzen einer Spezies ihrer Häufigkeit nach auflistet. Falls die Einschleusung von HPV16E7wt in pBinPS2NT2A keinen negativen Einfluss auf die Transkription der rekombinanten RNA-2 haben sollte, könnte durch die Kodon-Modifikation die Expression von HPV16E7 gesteigert werden [Leder et al., 2001]. Andererseits kann natürlich die geänderte Primärsequenz der RNA, deren Stabilität ändern. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Kodonmodifizierung von den viralen zu humanen Kodons, abgesehen von der effizienten Translation auch die Stabilität der HPV16E7 mRNA beträchtlich verbessert [Cid-Arregui et al., 2003]. Betrachtet man z.B die Verwendung des Kodons GTT, welches für die Aminosäure Valin kodiert, so kommt es im Genom von HPV16 mit einer Frequenz von 12,45/1000 Kodons vor. Im Vergleich dazu kommt dieses Kodon in den kodierenden Sequenzen von *Vigna unguiculata* mit einer Frequenz von 31,34/1000 Kodons vor. Auf der Basis dieser Unterschiede in der Kodon-Verwendung von verschiedenen Spezies, wurde das neue HPV16E7pl-Gen hergestellt. Es wurden 6 Oligonukleotid-Primer synthetisiert, wobei die Primer an den gekennzeichneten Stellen mit jeweils 21 Basenpaaren überlappten (siehe Abb. 4-10).

Die endständigen Oligonukleotid-Primer wurden so synthetisiert, dass mehrere Sequenzen für Restriktionsschnittstellen berücksichtigt wurden (siehe 2.8.2), um die Insertion in verschiedene Plasmide zu ermöglichen. Die hier verwendete Fusions-PCR besteht aus 3 unabhängigen Reaktionen (siehe 3.3.11). In den ersten beiden Reaktionen entstehen die Subfragmente A und B, die in einer dritten Reaktion anschließend fusioniert werden (siehe Abb. 4-10). Subfragment A wird mit den Primern 1-4 und Subfragment B mit den Primern 3-

6 synthetisiert (siehe Abb. 4-10). Die Fragmente A und B werden anschließend in einer dritten PCR-Reaktion mit den Primern 1 und 6 zum kompletten HPV16E7pl-Gen verbunden. Durch den großen Überlappungsbereich der Fragmente (siehe Abb. 4-10), hybridisieren sie an den komplementären Bereichen und die endständigen Primer 1+6 schließen von beiden Seiten die Lücke und amplifizieren das Gen.



Das so entstandene synthetische HPV16E7pl wird in einer Gel-Elution (siehe 3.3.5) aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (ApaI, StuI) verdaut, Phenol/CIA-gereinigt und mittels einer Alkoholfällung präzipitiert. HPV16E7wt wird ebenfalls mit einer PCR mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen (ApaI, StuI) ausgestattet (siehe 2.8.2) und in gleicher Weise wie HPV16E7pl für die Ligation in pBinPS2NT2A vorbereitet. Beide E7-Gene wurden über ApaI und StuI anstatt des GFP-Gens in pBinPS2NT2A eingeschleust und wie unter 4.2.1 weiterbehandelt.

4.2.6 Agro-Inokulation von pBinPS2NT2AHPV16E7wt, E7pl und Analyse

Die hergestellten rekombinanten Plasmide pBinPS2NT2AHPV16E7wt, E7pl werden ebenfalls mittels Elektroporation in Agrobakterien (LBA4404) eingeschleust und wie unter 4.2.2 für die Inokulation in primäre Blätter von *Nicotiana benthamiana* vorbereitet. Es wurden mehrere Experimente durchgeführt mit einer unterschiedlichen Anzahl an Pflanzen (siehe Tab. 4-1, Exp. 5+6). In keinem der Experimente konnten gelbe Läsionen (CPMV-Symptome) entdeckt werden und auch die anschließende Analyse im Westernblot und RT-PCR brachten kein positives Ergebnis für die Produktion von E7-Protein oder die Transkription von HPV16E7, bzw. E7pl in Pflanzen. In der Westernblot-Analyse wurde mit einem monoklonalen anti-HPV16E7-Antiserum wie in Abbildung 4-7d ein pflanzeneigenes Protein detektiert, allerdings mit einer geringeren Laufhöhe. Das Signal war in allen inokulierten und unbehandelten Pflanzen (Mock-Infektionen) zu sehen (Abbildung nicht gezeigt). Die RT-PCR-Analyse ergab, dass ebenfalls, wie in den vorangegangenen Experimenten (siehe Abb. 4-9) nur RNA-1 und nicht RNA-2 in den inokulierten Pflanzen detektiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung könnte das sog. „silencing“ sein, mit dem Pflanzen sich gegen virale Infektionen verteidigen (siehe 6.1.2).

5.0 Ergebnisse: Optimierung der HPV16 - DNA - Vakzinierung

5.1 Herstellung eines kodonoptimierten (humanisierten) HPV16E7-Gens

In den unter 4.2 beschriebenen Pflanzen-Experimenten konnte die Modifizierung der viralen HPV16E7-Kodons in die pflanzeneigenen HPV16E7pl (Cowpea-Kodons) aufgrund der negativen Ergebnisse nicht verifiziert werden. Es wurde erfolglos versucht HPV16E7-rekombinante Cowpea Mosaic Viren herzustellen und die Transfektions-Experimente mit dem kodonmodifizierten HPV16E7pl erbrachten im Westernblot im Vergleich zum authentischen HPV16E7 keine erhöhte Expression (Abbildung nicht gezeigt). In den folgenden Experimenten wird der Einfluss der Adaptierung der viralen Kodons auf die Verwendung in Säugerzellen (durchgeführt am Beispiel von menschlichen Zellen → "Humanisierung") zur Steigerung der Immunogenität *in vivo* untersucht. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass die intramuskuläre oder intradermale Immunisierung mit einer HPV16E7wt-DNA-Vakzine immunogen ist [Han et al., 1999; Shi et al., 1999]. Allerdings ist die zytotoxische T-Zell-Antwort auf diese Vakzine nicht sehr stark ausgeprägt [Michel et al., 2002]. Es wurden inzwischen verschiedene Strategien verfolgt, um die Potenz einer E7-DNA-Vakzine zu erhöhen. Diese beinhalten die Einbindung von Antigenen in Prozessierung und in den Präsentationsweg durch die Fusion von Genen, die für Proteine kodieren, die die Proteinverbreitung von Zelle zu Zelle verstärken [Hung et al., 2000a]. Alternativ wurde der Einfluss des „Codon-Usage“ auf die Immunogenität einer E7-DNA-Vakzine untersucht und festgestellt, dass die Kodon-Modifikation die CTL-Antwort deutlich verstärkt, was vermutlich aus einer verbesserten Translation der E7 mRNA resultiert [Zhou et al., 1999; Haas et al., 1996]. Die Kodon-Modifikation bezog sich auf die Veränderung des „Codon-Usage“ einer E7-DNA-Vakzine von der viralen zu der säugerspezifischen Konsensus-Sequenz. Diese resultiert wiederum in einer besseren Expression *in vitro* und einer verbesserten CTL-Antwort und Tumorprotektion *in vivo* [Liu et al., 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, ob die Kodonmodifikation (Humanisierung) des HPV16E7 Gens direkten Einfluss auf die Immunogenität des Proteins im Versuchstier hat. Zu diesem Zweck wurden die im HPV16E7-Gen vorkommenden Kodons entsprechend den in menschlichen Zellen häufig gebrauchten geändert, ("humanisiert") auf der Basis einer Codon-Usage-Datenbank (www.kazusa.or.jp/codon/). Die HPV16E7-Kodons wurden mittels PCR (siehe 3.3.11) in humane Kodons umgewandelt. In Tabelle 5 wurden

beide Sequenzen von HPV16E7wt (Wild-Typ) und HPV16E7opt (humanisiert) miteinander verglichen, um die Unterschiede in der Kodon-Verwendung deutlich zu machen.

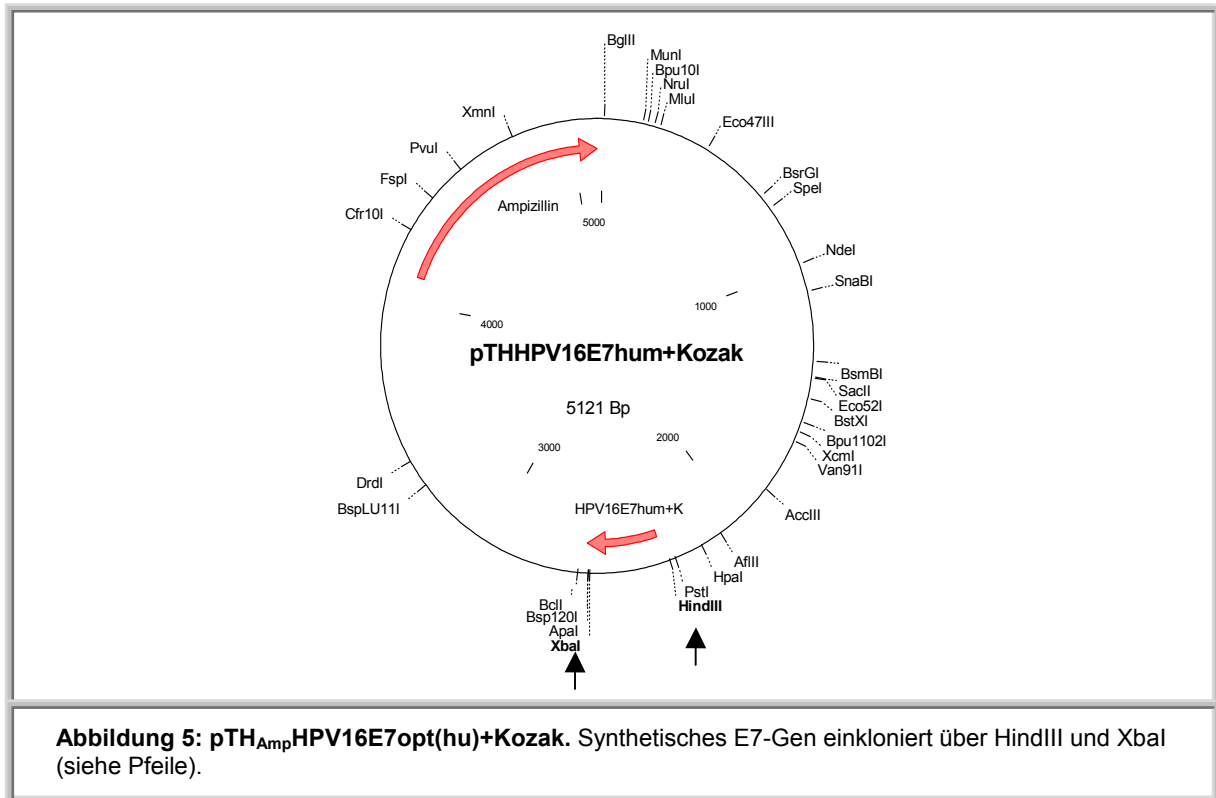
		E7wt		E7opt				E7wt		E7opt	
AS	Kodon	Anzahl	RSCU	Anzahl	RSCU	AS	Kodon	Anzahl	RSCU	Anzahl	RSCU
Ala	GCG	0.00	0.00	0.00	0.00	Leu	TTG	4.00	2.18	11.00	6.00
Ala	GCA	1.00	1.33	0.00	0.00	Leu	TTA	3.00	1.64	0.00	0.00
Ala	GCT	1.00	1.33	1.00	0.33	Leu	CTG	1.00	0.55	0.00	0.00
Ala	GCC	1.00	1.33	2.00	2.67	Leu	CTA	1.00	0.55	0.00	0.00
						Leu	CTT	1.00	0.55	0.00	0.00
Arg	AGG	0.00	0.00	0.00	0.00	Leu	CTC	1.00	0.55	0.00	0.00
Arg	AGA	1.00	2.00	0.00	0.00						
Arg	CGG	1.00	2.00	3.00	6.00	Lys	AAG	1.00	1.00	1.00	1.00
Arg	CGA	0.00	0.00	0.00	0.00	Lys	AAA	1.00	1.00	1.00	1.00
Arg	CGT	1.00	2.00	0.00	0.00						
Arg	CGC	0.00	0.00	0.00	0.00	Met	ATG	3.00	1.00	3.00	1.00
Asn	AAT	2.00	2.00	0.00	0.00	Phe	TTT	1.00	2.00	0.00	0.00
Asn	AAC	0.00	0.00	2.00	2.00	Phe	TTC	0.00	0.00	1.00	2.00
Asp	GAT	5.00	1.00	1.00	0.20	Pro	CCG	1.00	0.67	0.00	0.00
Asp	GAC	5.00	1.00	9.00	1.80	Pro	CCA	3.00	2.00	0.00	0.00
						Pro	CCT	1.00	0.67	0.00	0.00
Cys	TGT	4.00	1.14	0.00	0.00	Pro	CCC	1.00	0.67	6.00	4.00
Cys	TGC	3.00	0.86	7.00	2.00						
End	TAG	0.00	0.00	0.00	0.00	Ser	AGT	0.00	0.00	0.00	0.00
End	TAA	1.00	2.00	1.00	2.00	Ser	AGC	2.00	2.40	5.00	6.00
						Ser	TCG	0.00	0.00	0.00	0.00
Gln	CAG	1.00	0.40	5.00	2.00	Ser	TCA	1.00	1.20	0.00	0.00
Gln	CAA	4.00	1.60	0.00	0.00	Ser	TCT	2.00	2.40	0.00	0.00
						Ser	TCC	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu	GAG	5.00	1.11	9.00	2.00	Thr	ACG	1.00	0.44	0.00	0.00
Glu	GAA	4.00	0.89	0.00	0.00	Thr	ACA	5.00	2.22	0.00	0.00
						Thr	ACT	2.00	0.89	0.00	0.00
Gly	GGG	0.00	0.00	0.00	0.00	Thr	ACC	1.00	0.44	9.00	4.00
Gly	GGA	3.00	2.40	0.00	0.00						
Gly	GGT	1.00	0.80	0.00	0.00	Trp	TGG	0.00	0.00	0.00	0.00
Gly	GGC	1.00	0.80	5.00	4.00						
His	CAT	3.00	1.50	0.00	0.00	Tyr	TAT	2.00	1.00	0.00	0.00
His	CAC	1.00	0.50	4.00	2.00	Tyr	TAC	2.00	1.00	4.00	2.00
Ile	ATA	1.00	0.60	0.00	0.00	Val	GTG	1.00	1.00	4.00	4.00
Ile	ATT	3.00	1.80	0.00	0.00	Val	GTA	3.00	3.00	0.00	0.00
Ile	ATC	1.00	0.20	5.00	3.00	Val	GTT	0.00	0.00	0.00	0.00
						Val	GTC	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabelle 5: Kodon-Verwendung im synthetischen humanisierten (opt) HPV16E7-Gen im Vergleich zum authentischen HPV16E7wt-Gen. Aufgelistet ist die Anzahl der Kodons für die einzelnen Aminosäuren innerhalb des Gens und die RSCU-Werte (Relative Synonymous Codon Usage). Die RSCU-Werte beschreiben die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Kodon vorkommt relativ zu der Häufigkeit aller möglichen Kodons für diese Aminosäure. Daher ergeben sich bei Kodon-optimierten Genen stets höhere oder gleiche RSCU Werte als bei den entsprechenden wt Genen ($RSCU_{opt} \geq RSCU_{wt}$).

Die Humanisierung eines Gens hat natürlich auch Einfluss auf den GC-Gehalt, was wiederum bei der Abstimmung der Parameter (Annealing-Temperatur der Primer, siehe 3.3.11) für die Fusions-PCR von Bedeutung ist. Die HPV16E7 Wild-Typ Sequenz hat einen GC-Gehalt von ca. 43 % im Vergleich zu der humanisierten Sequenz, die einen GC-Gehalt von 65 % hat. Die Unterschiede in der Kodonverwendung wurden in RSCU-Werten (Relative Synonymous Codon Usage) angegeben (siehe Tab. 5). Sie lassen eine Aussage über die Häufigkeit eines bestimmten Kodons zu. Per Definition ergeben sich die RSCU-Werte aus der beobachteten Frequenz eines Kodons, dividiert durch die Frequenz der erwarteten, wenn alle synonyme Kodons für diese bestimmte Aminosäure in gleicher Weise verwendet würden. So deuten hohe RSCU-Werte >1.00 auf den Gebrauch von wenigen Kodons für eine bestimmte Aminosäure hin (siehe Tab. 5). Komplette Sequenz siehe Anhang 8.0.

5.1.1 Fusions-PCR mit überlappenden Oligonukleotid-Primern

Das synthetische humanisierte HPV16E7-Gen wurde nach dem gleichen Schema hergestellt, wie unter 4.2.5 beschrieben (siehe Abb. 4-10). Mit überlappenden Oligonukleotid-Primern wurden zunächst zwei Subfragmente hergestellt (A und B, siehe Abb. 4-10), die in einer weiteren PCR (Fusions-PCR) zu einem vollständigen E7-Gen zusammengefügt wurden. Für die anschließende Klonierung in den pTH_{Amp} -Vektor (siehe 3.3.11) wurde über die entständigen Primer (siehe 2.8.2) das 5'-Ende (Einführung der Kozak-Sequenz) mit einer HindIII-Restriktionsschnittstelle und das 3'-Ende mit einer XbaI-Schnittstelle versehen. Das PCR-Fragment wurde mit einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, mittels Gel-Elution aus dem Gel eluiert, mit HindIII und XbaI verdaut und anschließend mit Phenol/CIA gereinigt. Gleichzeitig wurde der pTH_{Amp} -Vektor mit den Enzymen HindIII und XbaI linearisiert, im Gel aufgetrennt und ebenfalls daraus aufgereinigt. In einem weiteren 1 %-igen Kontrollgel wurden die Konzentration von Insert (HPV16E7hu) und Vektor (pTH_{Amp} -Vektor) bestimmt und anschließend beide zur Ligation in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt. Etwa 30 % des Ansatzes wurden für die Elektroporation in E.coli (GM 2163) eingesetzt, auf LB_{Amp} -Platten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und gewachsene Kolonien in einer kleinen Übernacht-Kultur unter Ampizillin-Selektionsdruck expandiert. Anschließend wurde die DNA aus den Kulturen aufgearbeitet (siehe 3.3.1), mit HindIII und XbaI kontrollverdaut (siehe 3.3.3) und die richtigen Klone in einer großen Übernacht-Kultur expandiert und die DNA durch Maxipräparation (siehe 3.3.2) aufgereinigt.



5.1.2 Klonierung modifizierter HPV16E7-Gene in Expressionsvektoren

Mittels PCR wurde eine Serie von verschiedenen HPV16E7-Konstrukten hergestellt. Dabei sollte untersucht werden, welche DNA-Modifikationen sich in der Immunogenität *in vivo* bemerkbar machen oder ob überhaupt Unterschiede in der CTL-Antwort feststellbar sind.

Folgende E7-Konstrukte wurden hergestellt:

Vektor	Gen	Modifikation	Klonierung
pTH _{Amp}	HPV16E7	opt + Kozak	(HindIII/XbaI)
pTH _{Amp}	HPV16E7	opt – Kozak	(HindIII/XbaI)
pTH _{Amp}	HPV16E7	wt + Kozak	(HindIII/XbaI)
pTH _{Amp}	HPV16E7	wt – Kozak	(HindIII/XbaI)
pcDNA3.1	HPV16E7	wt + Kozak	(HindIII/BamH)
pcDNA3.1	HPV16E7	wt + Kozak (ACC)	(HindIII/BamH)
pcDNA3.1	HPV16E7	wt – Kozak	(HindIII/BamHI)

Tabelle 5-1: Aufgelistet sind die in den Immunisierungsexperimenten verwendeten HPV16E7-Konstrukte. Kodonoptimierung mittels Fusions-PCR und Anfügen der Kozak-Sequenz mit den 5' Primern (siehe 5.1.1, 2.8.2, 3.3.11). Das ACC-Kodon steht für die verkürzte Kozak-Sequenz, welches als essentiell für eine optimale Initiation der eukaryontischen Translation gilt [Kozak et al., 1986]. Die vollständige Kozak-Sequenz lautet CCC GCC GCC ACC [Kozak et al., 1987].

Verwendet wurden zwei verschiedene Expressionsplasmide pcDNA3.1(+) und pTH_{Amp} (siehe 2.8.1), um - neben Kodon-Modifizierung und Kozak-Sequenz - durch einen weiteren Parameter den Einfluss auf die Immunogenität zu untersuchen. Alle E7-Gene (\pm Kozak-Sequenz) wurden über PCR mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen ausgestattet (siehe 2.8.2). Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden wie unter 5.1.1 beschrieben, in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel eluiert (siehe 3.3.5) mit den entsprechenden Enzymen verdaut und durch Phenol/CIA aufgereinigt. Die Plasmide wurden in einem präparativen Verdau (siehe 3.3.3) linearisiert (pcDNA3.1 HindIII/BamHI, pTH_{Amp} HindIII/XbaI) und ansonsten in gleicher Weise wie die PCR-Fragmente behandelt. Nachdem alle Klonierungs-Komponenten (Vektor und Insert) vorbereitet waren, wurde jeweils 1 μ l zur Mengenabschätzung auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und an Hand eines Markers ("Smartladder", siehe 2.9.1) die DNA-Konzentration abgeschätzt. Für die Ligation wurden äquimolare Mengen eingesetzt (siehe 3.3.8). Mit den Ligationsansätzen wurde wie unter 5.1.1 weiterverfahren. Alle Konstrukte wurden vor der Applikation in die Versuchstiere mittels Sequenzierung auf Mutationen überprüft (Medigenomix, München).

5.2 DNA-Immunisierung

5.2.1 DNA-Immunisierung mit HPV16E7-Konstrukten in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Die modifizierten HPV16E7-Konstrukte sollten in den folgenden DNA-Immunisierungen analysiert werden. Es galt zu überprüfen, ob die eingeführten DNA-Modifikationen Einfluss auf die Immunogenität dieser Konstrukte haben. Zu diesem Zweck wurden folgende E7-Konstrukte für eine intramuskuläre DNA-Immunisierung in C57BL/6-Mäusen verwendet:

pTH_{Amp} HPV16E7wt-K
pTH_{Amp} HPV16E7wt+K
pTH_{Amp} HPV16E7opt+k
pTH_{Amp} HPV16E7opt-K
pTH_{Amp} Leervektor
pcDNA3.1HPV16E7wt+K
pcDNA3.1HPV16E7wt+K(ACC)
pcDNA3.1HPV16E7wt-K
pcDNA3.1Leervektor

Es wurden jeweils 5 Tiere pro Konstrukt immunisiert nach einem Standardprotokoll für DNA-Immunsierungen. Die Kardiotoxin-Applikation (siehe 3.5.2) wurde fünf Tage vor der DNA-Vakzinierung vorgenommen (1 µg/µl in PBS, 100 µl/Maus, siehe 3.5.3), nach weiteren 10 Tagen erfolgte die Milzentnahme (siehe 3.6.1) und das Anlegen der Milzzellkulturen (siehe 3.6.1), sowie die ersten immunologischen Untersuchungen (*ex vivo* Elispot, siehe 3.6.5)

5.2.2 Elispot-Analyse nach DNA-Immunsierung

Bei der Auswertung der ELISPOTs gibt es zwei Möglichkeiten: eine Variante bezieht die Positivkontrolle (alle T-Zellen einer Milzzellkultur aktiviert durch Pokweed-Mitogen) mit ein (siehe Abb. 5-8, 5-10), in der anderen Variante wird die Zahl der aktivierten Zellen in Relation zu den insgesamt eingesetzten Zellen (Lymphozyten) gesetzt (siehe Abb. 5-2, 5-4). Beide Verfahren wurden nach dem im Folgenden beschriebenen Immunisierungsexperiment miteinander verglichen.



Es wurden jeweils 5 Mäuse pro Gruppe mit verschiedenen HPV 16 E7 Expressionsvektoren (siehe 5.2.1) immunisiert. Als Negativkontrolle für die DNA-Immunsierung wurden parallel Tiere mit dem Leervektor pTH_{Amp} oder pcDNA3.1 immunisiert, um den Einfluss der Plasmid-DNA (CpG-Motive) [Corr et al, 1997; Roman et al., 1997; Leclerc et al., 1997] auf die Immunogenität eines E7-Konstruktes zu berücksichtigen. Am Tag der Milzentnahme wurde mit den aufgearbeiteten Milzzellen der immunisierten Tiere (C57BL/6) ein *ex vivo* Elispot durchgeführt, der eine Aussage über eine E7-spezifische zelluläre *in vivo* Immunantwort zulässt und die Population von aktivierten T-Zellen an Hand der Positivkontrolle (siehe Abb. 5-1, Mitte) ermittelt. Durch nachfolgende *in vitro* Restimulierungen der Milzzellkulturen mit E7-Transfektanten (2F11-Zellen, präsentieren E7-Epitop₄₉₋₅₇, siehe 2.11.1.4) wurden die

vorhandenen E7-spezifischen T-Zellen weiter amplifiziert. Im Elispot wird die Anzahl der Zytokin-freisetzenden Zellen gemessen, die als dunkle Spots auf einem hellen Hintergrund erscheinen (siehe Abb. 5-1). Eine Vakzine kann als besonders immunogen betrachtet werden, wenn schon im *ex vivo* Elispot ohne zusätzliche *in vitro* Restimulierungen eine spezifische Aktivierung gezeigt werden kann. Dies ist für die verwendeten E7-Konstrukte pTHHPV16E7wt+K und pTHHPV16E7opt+K eindeutig der Fall (siehe Abb. 5-2), wenn auch nicht bei allen immunisierten Tieren ($n = 5$) eine positive Reaktion gemessen werden konnte. Der Mittelwert der Milzzellkulturen aus den E7-immunisierten Tieren liegt für das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K bei 17 % (± 5 %) und für pTHHPV16E7wt+K bei 12 % (± 6 %). Für die beiden E7-Konstrukte konnte hier kein signifikanter Unterschied in ihrer Immunogenität gezeigt werden (siehe Mittelabweichung Abb. 5-2). Sogar für das unmodifizierte Konstrukt (pTHHPV16E7wt-K) konnte eine schwache Immunantwort im *ex vivo* Elispot detektiert werden (7 % $\pm 0,6$ %; siehe Abb. 5-2 orange Säulen). In Abbildung 5-2 wurde die Auszählung der Spots unter Berücksichtigung der Positivkontrolle (Pokweed-Mitogen, siehe Abb. 5-1) vorgenommen (siehe 3.6.5).

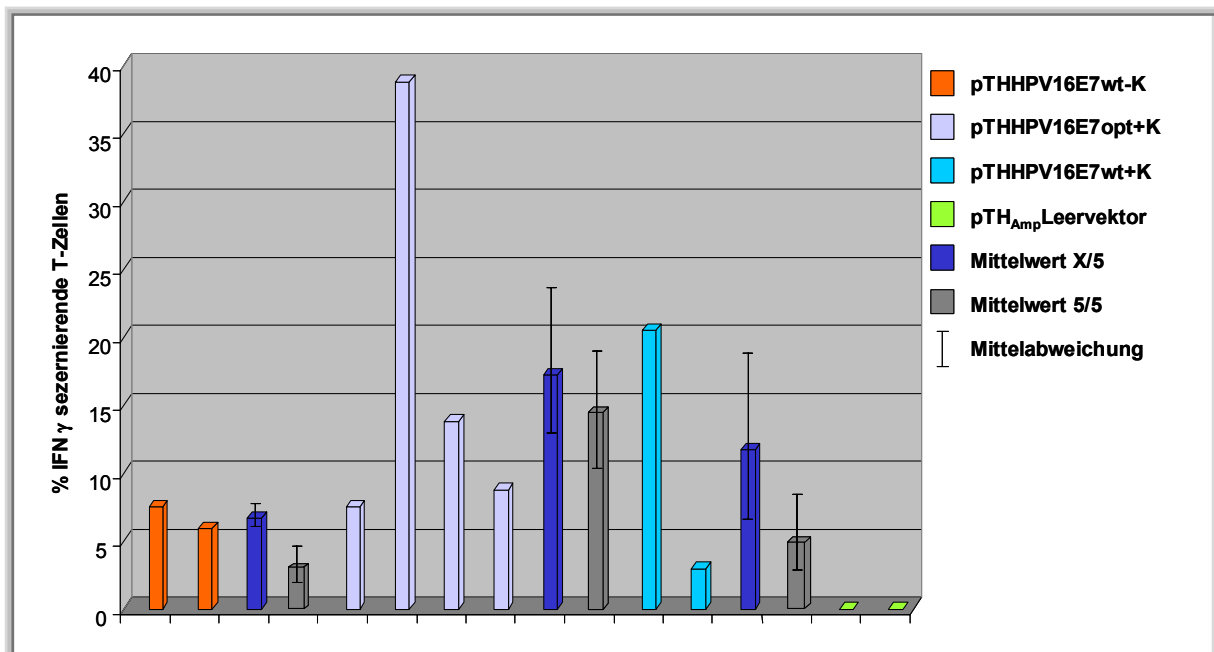
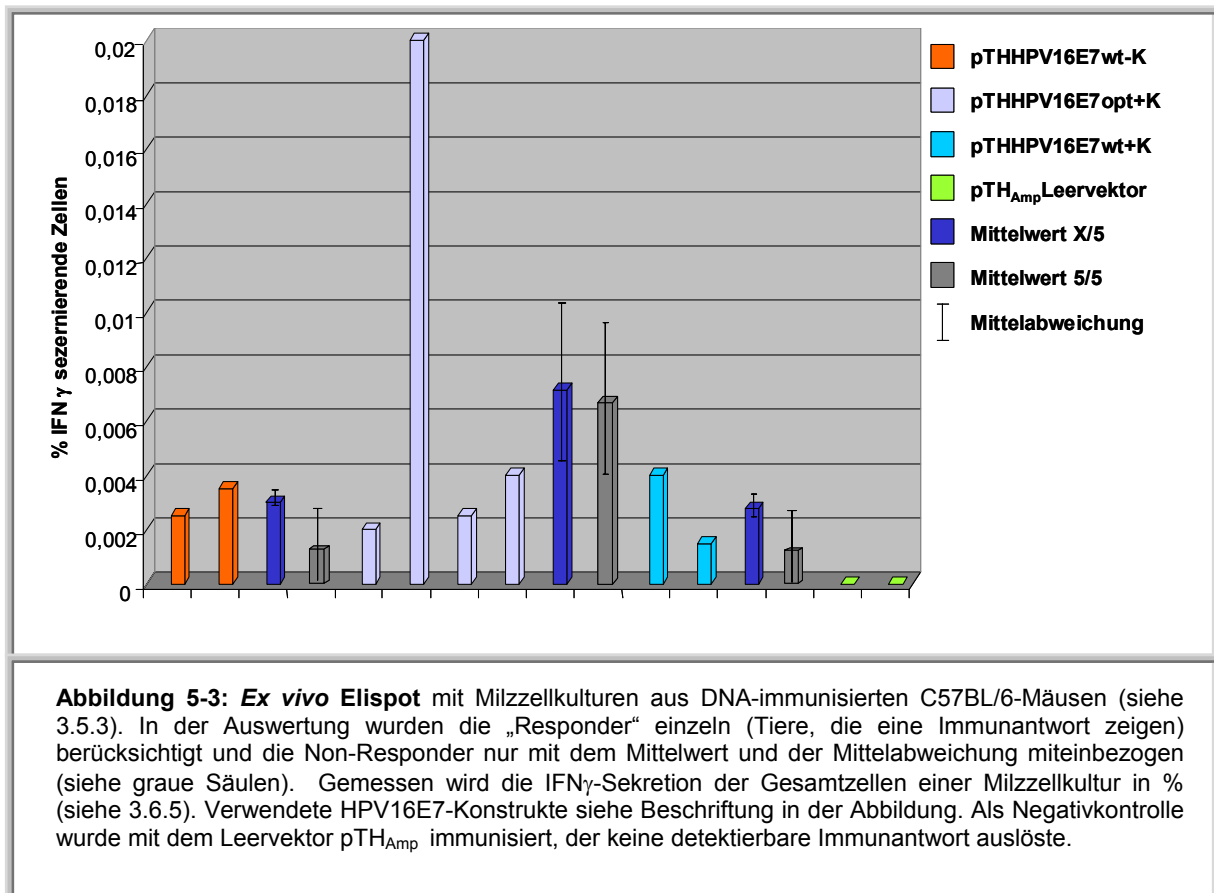


Abbildung 5-2: Ex vivo Elispot mit Milzzellkulturen aus DNA-immunisierten C57BL/6-Mäusen (siehe 3.5.3). In der Auswertung wurden die „Responder“ einzeln (Tiere, die eine Immunantwort zeigen) berücksichtigt und die Non-Responder nur mit dem Mittelwert und der Mittelabweichung miteinbezogen (siehe graue Säulen). Gemessen wird die IFN γ -Sekretion von aktivierten T-Zellen angegeben als Anteil [%] der insgesamt aktivierbaren T Zellen (siehe 3.6.5). Verwendete HPV16E7-Konstrukte siehe Beschriftung in der Abbildung. Als Negativkontrolle wurde mit dem Leervektor pTH_{Amp} immunisiert, der keine detektierbare Immunantwort auslöste.

Bei einer anderen Möglichkeit der Auswertung wurde die Anzahl der $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen (aktivierte Zellen) in Relation zu den insgesamt eingesetzten Zellen (Lymphozyten) gesetzt (siehe Abb. 5-3) und nicht nur die durch Pokweed-Mitogen (siehe 3.6.5) unspezifisch stimulierten T-Zellen betrachtet (siehe Abb. 5-2).



Auch bei dieser Art der Darstellung lässt sich eine ähnliche Verteilung der Immunogenität der verschiedenen HPV 16 E7 Expressionsplasmide beobachten (vgl. Abb. 5-2 und 5-3), mit dem Unterschied, dass mit dem Konstrukt pTHHPV16E7opt+K eine signifikant (keine Überlappung der Mittelabweichung) höhere Immunantwort (Mittelwert 0,071 % +/- 0,003 %) im Vergleich zu pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 0,0026 % +/- 0,0009 %) und pTHHPV16E7wt-K (Mittelwert 0,003 % +/- 0,00035 %) detektiert wurde.

Am Tag der Milzentnahme wurden die Milzzellen mit E7-Transfektanten (2F11-Zellen, siehe 2.11.1.4) zum ersten mal restimuliert (siehe 3.6.3) und für weitere fünf Tage inkubiert bis zu den nächsten immunologischen Experimenten (Elispot nach 1. Restimulierung, 1. Zytotoxizitätstest). Nach der ersten Restimulierung konnte man eine deutliche Erhöhung der $\text{IFN}\gamma$ -sezernierenden Zellen (Spots) im Elispot erkennen (siehe Abb. 5-4).

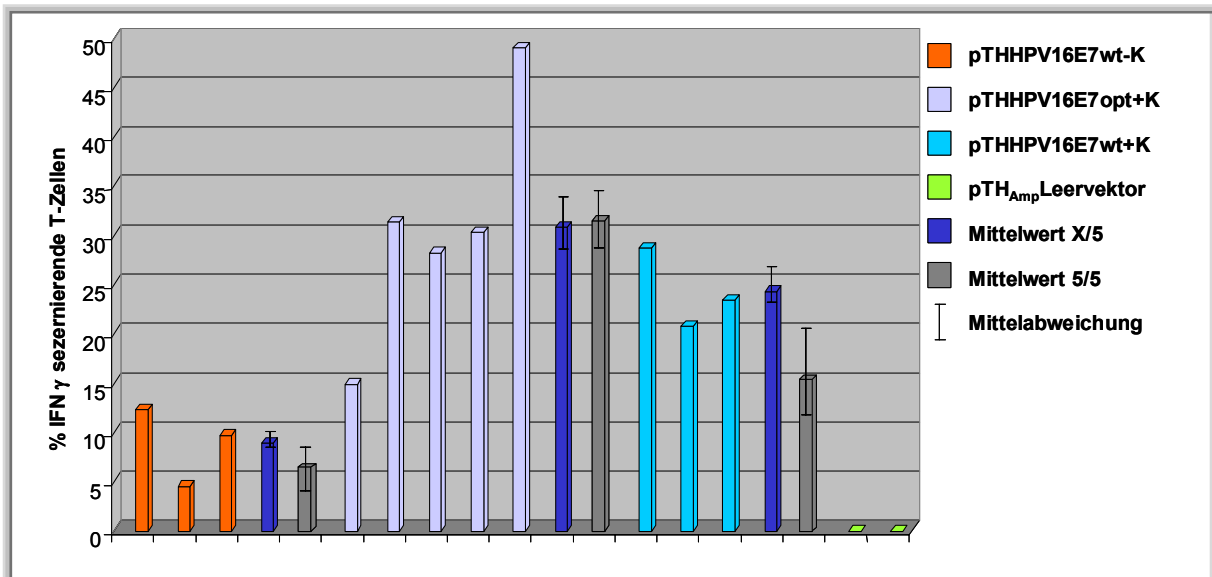
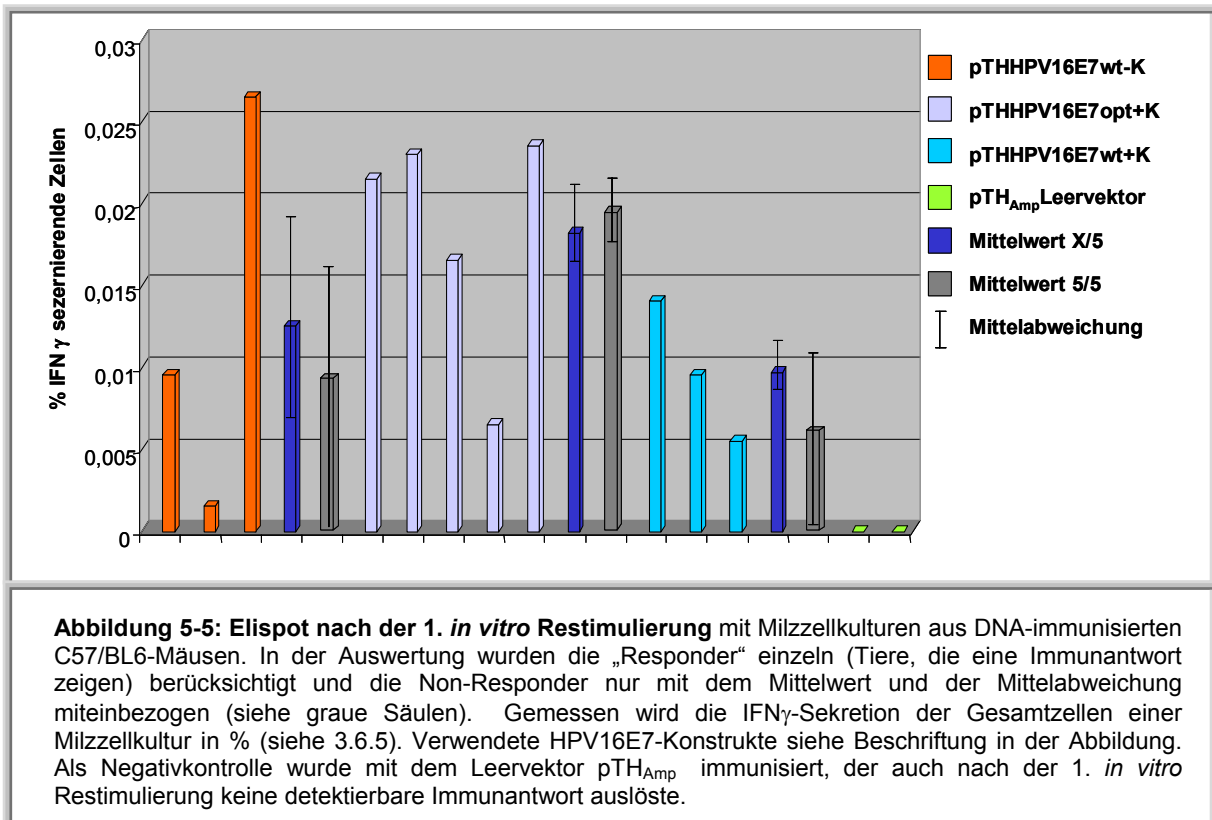


Abbildung 5-4: Elispot nach der 1. *in vitro* Restimulierung mit Milzzellkulturen aus DNA-immunisierten C57BL/6-Mäusen (siehe 3.5.3. In der Auswertung wurden die „Responder“ einzeln (Tiere, die eine Immunantwort zeigen) berücksichtigt und die Non-Responder nur mit dem Mittelwert und der Mittelabweichung miteinbezogen (siehe graue Säulen). Gemessen wird die IFN γ -Sekretion von aktivierten T-Zellen angegeben als Anteil [%] der insgesamt aktivierbaren T Zellen (siehe 3.6.5). Verwendete HPV16E7-Konstrukte siehe Beschriftung in der Abbildung. Als Negativkontrolle wurde mit dem Leervektor pTH_{Amp} immunisiert, der auch nach der 1. *in vitro* Restimulierung keine detektierbare Immunantwort auslöste.

Im Vergleich mit dem *ex vivo* Elispot (siehe Abb. 5-2) kann man eine Erhöhung der zellulären Immunantwort für die Konstrukte pTHHPV16E7opt+K (Mittelwert 30,7 % +/- 3,4 %) und pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 24,2 % +/- 1,7 %) feststellen. Die Immunantwort mit dem Konstrukt pTHHPV16E7wt-K bewegt sich allerdings weiterhin nur um die 8 % (siehe Abb. 5-4). Es ergibt sich nach den ersten Immunisierungen ein eindeutiges Bild für die Immunogenität der verschiedenen E7-Konstrukte. So induziert die DNA-Immunisierung mit pTHHPV16E7opt+K die stärkste Immunantwort, gefolgt von pTHHPV16E7wt+K und pTHHPV16E7wt-K mit der niedrigsten Anzahl an aktivierten IFN γ - sezernierenden T-Zellen (siehe Abb. 5-4). Für die verwendeten E7-Konstrukte (siehe Legende Abb. 5-4) ergibt sich aus der Auswertungs-Methode, die sich auf die aktivierten T-Zellen bezieht, ein signifikanter Unterschied in der induzierten Immunantwort (keine Überlappung der Mittelabweichung, siehe Abb. 5-4).

Mit der alternativen Auswertungsvariante, die sich auf die Gesamtzellzahl bezieht (siehe Abb. 5-5), ergibt sich kein so deutliches Bild der unterschiedlichen Immunogenität der verwendeten E7-Konstrukte (siehe Legende, Abb. 5-4).



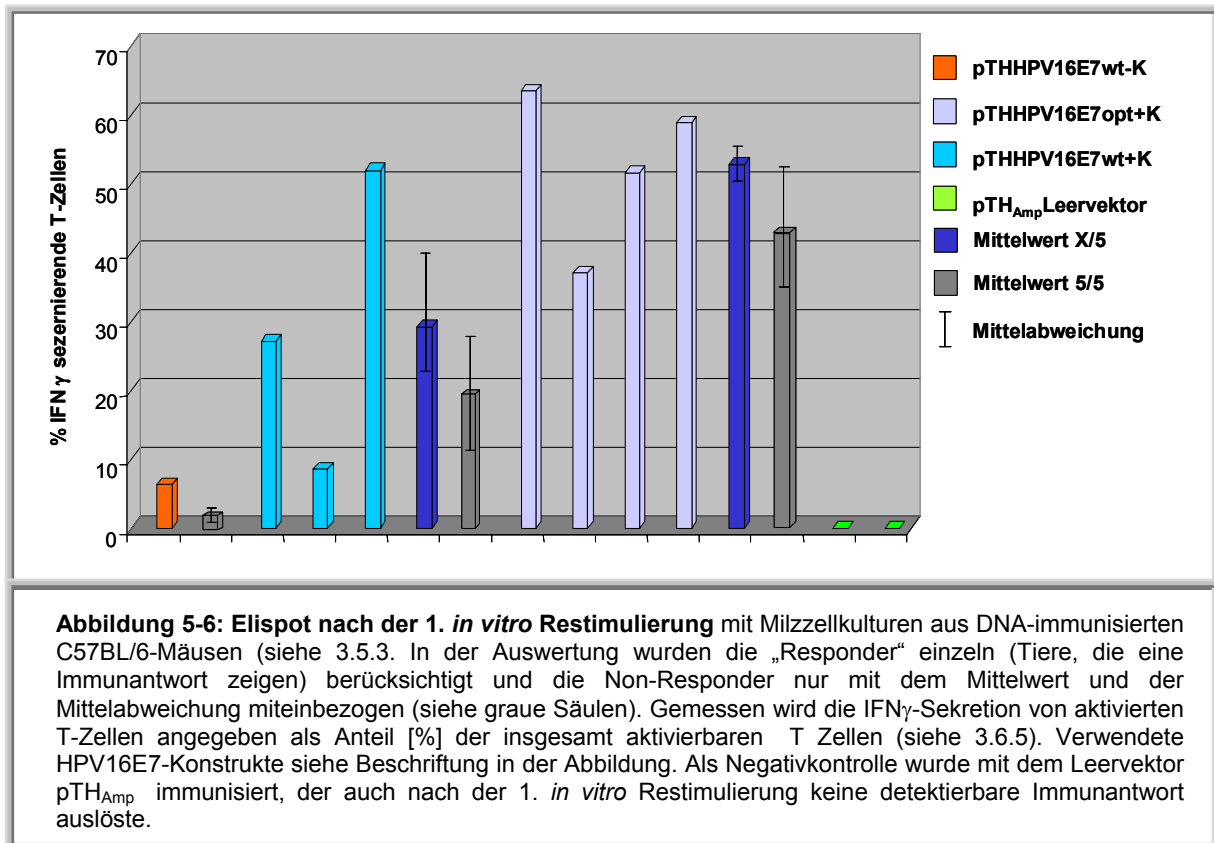
Im Vergleich mit dem *ex vivo* Elispot (siehe Abb. 5-3) lässt sich auch mit dieser Auswertung eine Erhöhung der Anzahl an IFN γ -sezernierenden Zellen feststellen. Auch hier zeigt das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K die stärkste (Mittelwert 0,018 % +/- 0,002 %) und auch eine signifikant höhere Immunantwort im Vergleich zu pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 0,0096 % +/- 0,002 %), wobei allerdings das Konstrukt pTHHPV16E7wt-K (Mittelwert 0,013 % +/- 0,0054 %) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den anderen Konstrukten (pTHHPV16E7opt+K, pTHHPV16E7wt+K) erkennen lässt (siehe Abb. 5-5).

Im weiteren Verlauf der Elispot-Experimente wurde die Auswertungs-Methode mit Bezug auf die aktivierbare T-Zell-Population einer Milzzellkultur verwendet. Sie erlaubt eine bessere Quantifizierung der zellulären Immunantwort, da so die Positivkontrolle (durch Pokweed-Mitogen aktivierte T-Zellen) in die Auswertung mit einbezogen werden kann (siehe 3.6.5), die eine direkte Aussage über die aktivierten T-Zellen einer Milzzellkultur zulässt.

5.2.3 Evaluation der Immunogenität der HPV16E7-Konstrukte im Elispot

In den folgenden Elispot-Analysen wurden die verschiedenen HPV16E7-Konstrukte in unterschiedlichen Kombinationen gegenübergestellt und die T-Zell-Populationen der einzelnen Milzzellkulturen aus den immunisierten Versuchstieren analysiert. Verglichen

wurde in diesen Experimenten die Immunogenität der E7-Konstrukte nach der 1. *in vitro* Restimulierung. In Abbildung 5-6 wurden pTHHPV16E7wt-K, pTHHPV16E7wt+K und pTHHPV16E7opt+K in einem Immunisierungs-Experiment gegenübergestellt.



Aus dieser Elispot-Analyse ergab sich folgender Zusammenhang der Immunogenität der miteinander verglichenen Konstrukte:

$$\text{opt} + \text{K} > \text{wt} + \text{K} > \text{wt} - \text{K}$$

Das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K zeigt die stärkste Immunogenität (Mittelwert 52,8 % +/- 4,2 %), das nächst schwächere Konstrukt ist pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 29,3 % +/- 8,7 %) und das Konstrukt mit den schwächsten immunogenen Eigenschaften ist pTHHPV16E7wt-K (1/5 mit Immunantwort, 6,4 %). Die hier aufgezählten Konstrukte (siehe Abb. 5-6) unterscheiden sich alle durch eine signifikant unterschiedliche Immunantwort (keine Überlappung der Mittelabweichungen, siehe Abb. 5-6).

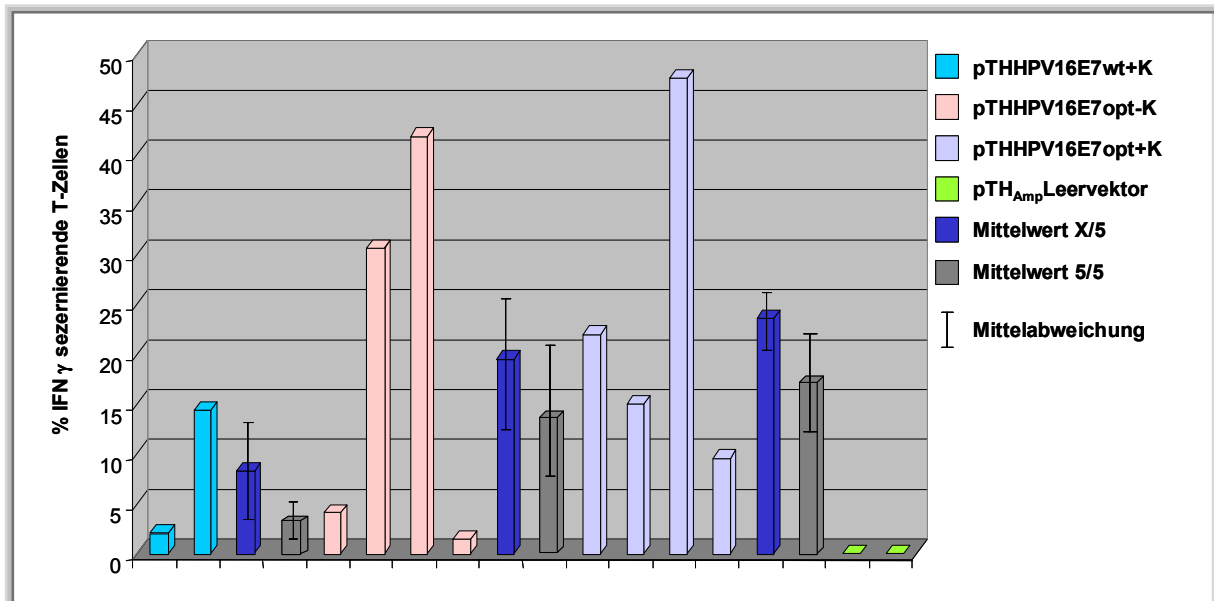


Abbildung 5-7: Elispot nach der 1. *in vitro* Restimulierung mit Milzzellkulturen aus DNA-immunisierten C57BL/6-Mäusen (siehe 3.5.3. In der Auswertung wurden die „Responder“ einzeln (Tiere, die eine Immunantwort zeigen) berücksichtigt und die Non-Responder nur mit dem Mittelwert und der Mittelabweichung miteinbezogen (siehe graue Säulen). Gemessen wird die IFN γ -Sekretion von aktivierten T-Zellen angegeben als Anteil [%] der insgesamt aktivierbaren T Zellen (siehe 3.6.5). Verwendete HPV16E7-Konstrukte siehe Beschriftung in der Abbildung. Als Negativkontrolle wurde mit dem Leervektor pTH_{Amp} immunisiert, der auch nach der 1. *in vitro* Restimulierung keine detektierbare Immunantwort auslöste.

In Abbildung 5-7 wurde die Immunogenität der Konstrukte pTHHPV16E7wt+K, pTHHPV16E7opt-K und pTHHPV16E7opt+K miteinander verglichen. Auch in diesem Experiment zeigt das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K die größte Anzahl an aktivierten T-Zellen (Mittelwert 23,6 % +/- 6 %), allerdings nur geringfügig größer als die Aktivierung durch die Immunisierung mit pTHHPV16E7opt-K (Mittelwert 19,5 % +/- 8,4 %). Das schwächste Konstrukt war in diesem Ansatz pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 8,25 % +/- 4,3 %). Dieses Ergebnis lässt sich wie folgt zusammenfassen:

$$\text{wt + K} < \text{opt - K} \approx \text{opt + K}$$

Eine signifikant stärkere Immunantwort konnte in diesem Experiment nur zwischen den Konstrukten pTHHPV16E7wt+K und pTHHPV16E7opt+K gezeigt werden (vergleiche Mittelabweichungen Abb. 5-7). Die Immunogenität von pTHHPV16E7opt-K und pTHHPV16E7opt+K ist sehr ähnlich (Mittelwert 19,5 % +/- 8,4 %, Mittelwert 23,6 % +/- 6 %), der Unterschied zwischen pTHHPV16E7opt-K und pTHHPV16E7wt+K ist nicht eindeutig. Die Immunogenität der HPV16E7-Konstrukte wurde mehrfach reproduziert. In allen Elispot-Analysen nach der 1. *in vitro* Restimulierung mit 2F11-Zellen (siehe 3.6.3) wurden die gleichen Tendenzen gezeigt (siehe Abb. 5-6, 5-7). Als Zusammenfassung der

Immunisierungs-Experimente mit pTH_{Amp}-E7-Konstrukten lässt sich folgender Zusammenhang aufstellen:

$$\text{wt} - \text{K} < \text{wt} + \text{K} < \text{opt} - \text{K} \approx \text{opt} + \text{K}$$

pTHHPV16E7wt-K zeigte immer die geringste zelluläre Immunantwort. Das nächst immunogenere Konstrukt war pTHHPV16E7wt+K und die beiden effizientesten Konstrukte waren pTHHPV16E7opt-K und pTHHPV16E7opt+K, die eine ähnlich große Anzahl an IFN γ -sezernierenden T-Zellen induzierten. Zusammenfassend kann man sagen, dass in den Immunisierungs-Experimenten die Kodonoptimierung (Humanisierung) den größten Einfluss auf die Immunogenität einer DNA-Vakzine hat. Die Kozak-Sequenz beeinflusst die Immunogenität in geringerer Weise.

In den folgenden DNA-Immunisierungen mit den pcDNA3.1-E7-Konstrukten wurde nur der Einfluss der Kozak-Sequenz auf die Immunantwort untersucht.

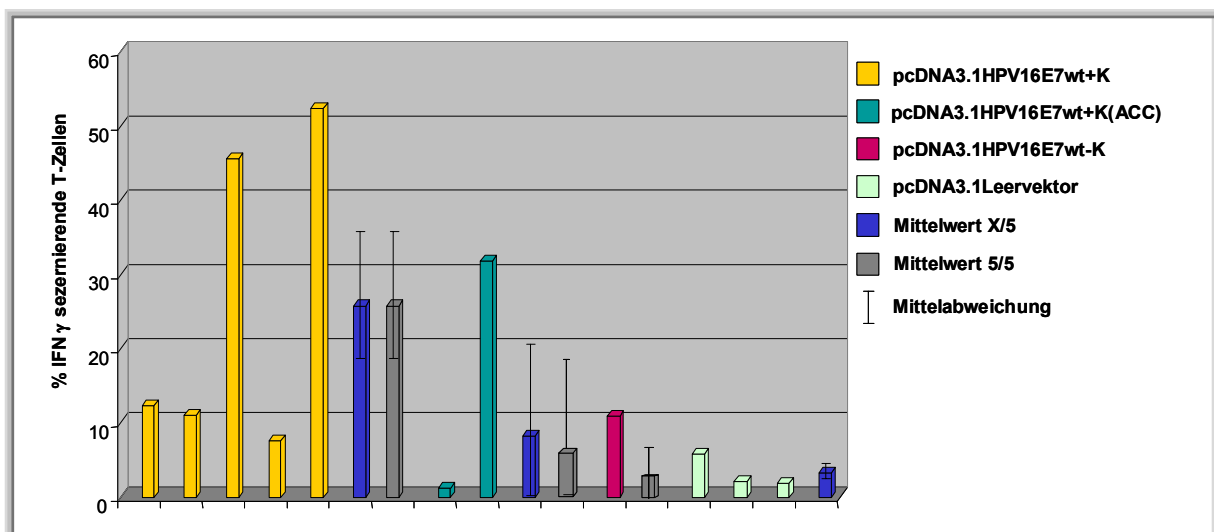


Abbildung 5-8: Elispot nach der 1. *in vitro* Restimulierung mit Milzzellkulturen aus DNA-immunisierten C57BL/6-Mäusen (siehe 3.5.3). In der Auswertung wurden die „Responder“ einzeln (Tiere, die eine Immunantwort zeigen) berücksichtigt und die Non-Responder nur mit dem Mittelwert und der Mittelabweichung miteinbezogen (siehe graue Säulen). Gemessen wird die IFN γ -Sekretion von aktivierten T-Zellen angegeben als Anteil [%] der insgesamt aktivierbaren T-Zellen (siehe 3.6.5). Verwendete HPV16E7-Konstrukte siehe Beschriftung in der Abbildung. Als Negativkontrolle wurde mit dem pcDNA3.1-Leervektor immunisiert, der nach der 1. *in vitro* Restimulierung eine schwache zelluläre Immunantwort induzierte.

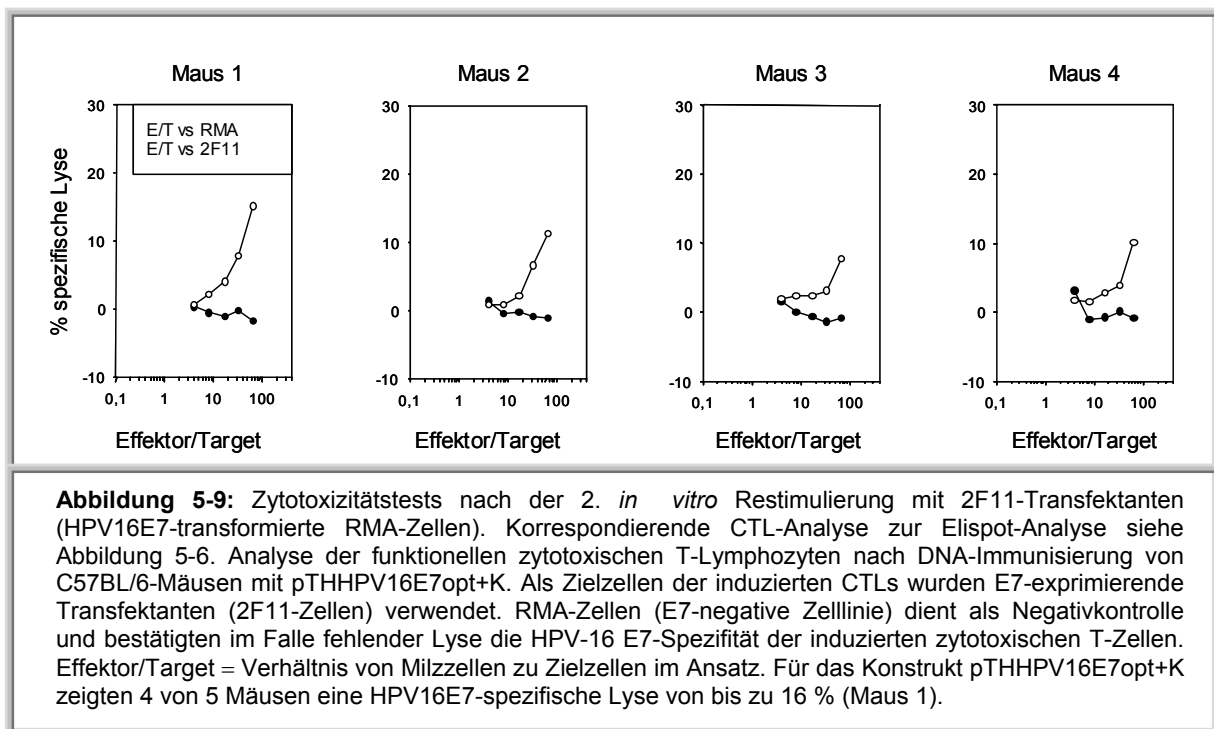
Das Konstrukt pcDNA3.1HPV16E7wt+K induziert eine stärkere Immunantwort (Mittelwert 25,8 % +/- 8,3 %) als pcDNA3.1HPV16E7wt-K (11%). Die Verwendung einer verkürzten Kozak-Sequenz (ACC) bringt keine Steigerung der Immunogenität. Bei diesem Experiment ist anzufügen, dass auch die DNA-Immunisierung mit dem Leervektor (siehe Abb. 5-8) eine

schwache Immunantwort induziert (Mittelwert 3,3 % +/- 1 %). Als Zusammenfassung der Immunisierungs-Experimente mit pcDNA3.1-E7-Konstrukten lässt sich folgender Zusammenhang aufstellen:

$$\text{wt - K} < \text{wt + K} \approx \text{wt + K(ACC)}$$

5.2.4 Analyse von funktionellen E7-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten

In den vorangegangenen Elispot-Analysen wurde gezeigt, dass eine HPV16E7-spezifische Aktivierung des zellulären Immunsystems in Folge einer HPV16E7-DNA-Immunisierung stattfindet. Allerdings kann mit dieser Methode nicht die Funktionalität der T-Zellen gezeigt werden d.h, es bleibt unklar, ob die aktivierten T-Zellen in der Lage sind, eine Zelle, die das HPV16E7-Epitop₄₉₋₅₇ auf ihrer Oberfläche präsentiert, zu lysieren. Dies sollte mit Hilfe des Zytotoxizitätstestes (siehe ⁵¹Cr Freisetzungssassay 3.6.4) gezeigt werden. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass der Zytotoxizitätstest nicht so sensitiv ist, wie der Elispot und zumeist erst nach mehreren Runden von *in vitro* Restimulierungen ein positives Ergebnis liefert [Michel et al., 2002].

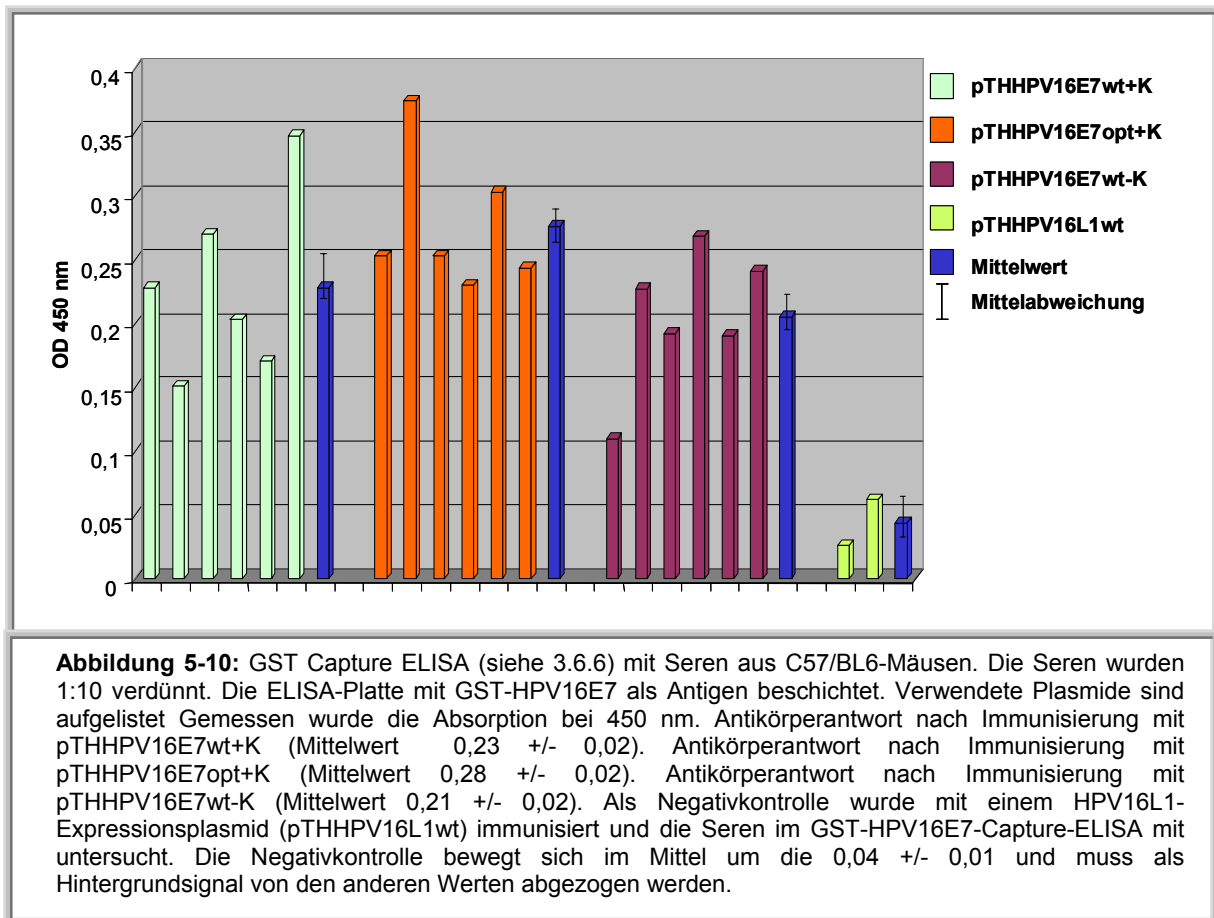


Zusätzlich zu der Elispot-Analyse der Milzzellkulturen nach DNA-Immunisierung wurde ab der 1. *in vitro* Restimulierung ein korrespondierender Zytotoxizitätstest durchgeführt. Aufgrund der unsensitiveren Methode im Vergleich zum Elispot wurde *ex vivo* nach DNA-Immunisierung ohne Adjuvants keine Lyse erwartet. Alle durchgeführten Zytotoxizitätstests waren negativ mit Ausnahme der analysierten CTLs aus Milzen (nach 2. *in vitro* Restimulierung), die aus DNA-immunisierten Tieren stammten, die mit pTHHPV16E7opt+K behandelt wurden (siehe Abb. 5-9). Es wurde in 4 von 5 Tieren eine HPV16E7-spezifische Lyse (maximal 16 %, Maus 1) der Target-Zellen (2F11-Zellen) beobachtet, wobei die E7-negativen RMA-Zellen keine Lyse zeigten und somit die HPV-16 E7-Spezifität der induzierten zytotoxischen T-Zellen bestätigten (siehe Abb. 5-9). Nach einer weiteren *in vitro* Restimulierungs-Runde, zeigten die Negativkontrollen (E7-negative RMA-Zellen) sog. „*in vitro*-priming“, d.h., die Milzzellen der Versuchstiere erkennen zuerst spezifisch das Antigen E7. Nach weiteren *in vitro* Restimulierungen werden schließlich weitere Antigene erkannt (Daten nicht gezeigt), was dazu führt, dass auch die RMA-Zellen lysiert werden. Die Induktion von E7-spezifischen CTLs nach DNA-Immunisierung mit weiteren E7-Konstrukten (siehe Tab. 5-1) ist vermutlich zu gering, um in dem unempfindlichen Zytotoxizitätstest Lyse zu zeigen.

5.2.5 Detektion von HPV16E7-spezifischen Antikörpern mittels GST Capture ELISA

Neben der Aktivierung der T-Zellen nach Immunisierung mit verschiedenen HPV 16 E7 Expressionsplasmiden sollte auch die humorale Immunantwort gemessen werden. Für den Nachweis von HPV16E7-spezifischen Antikörpern aus dem Serum von C57BL/6-oder BALB/c-Mäusen wurden die Versuchstiere mit verschiedenen pTHHPV16E7-Konstrukten immunisiert (siehe 3.5.3). Es wurden pro Gruppe jeweils 6 Tiere zweimal im Abstand von 4 Wochen mit je 100 µg E7-DNA immunisiert. Nach abermals 4 Wochen wurde den Versuchstieren mittels Herzpunktion (siehe 3.5.4) das Blut entnommen. Das gewonnene Serum wurde anschließend in verschiedenen Verdünnungen in einem GST-Capture-ELISA analysiert (siehe 3.6.6). In einem ersten GST-Capture-ELISA wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt, was allerdings zu keinem positiven Signal im Vergleich zur Negativkontrolle (pTHHPV16L1wt) führte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Seren 1:10 Verdünnt und in einem weiteren ELISA analysiert (siehe Abb. 5-10). Die OD 450nm-Werte sind alle sehr niedrig mit einem maximalen OD 450nm Wert von 0,35 (Abb. 5-10). Dies steht im Widerspruch zu der effizienten Induktion der zellulären Immunantwort

(siehe 5.2.3). Ebenso wenig konnten Unterschiede bei der Verwendung der verschiedenen Expressionsplasmide gefunden werden, was wiederum im Gegensatz zu den Daten der zellulären Immunantwort steht (Daten nicht gezeigt).



Die Sensitivität der Methode zeigt sich vor dem Hintergrund, dass das als Positivkontrolle mituntersuchte monoklonale Anti-HPV16E7-Antiserum (siehe 2.7.1) eine maximale OD 450 nm von 2,47 bei einer Verdünnung von 1:1000 zeigt (siehe Abb. 5-11) und sogar noch bei einer Verdünnung von 1:128000 eine OD 450 nm von 0,15 erreicht. In einem weiteren Immunisierungs-Experiment wurden BALB/c-Mäuse verwendet, die aufgrund ihres genetischen Hintergrundes [Gieni et al., 1996] höhere Antikörperantworten im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen erwarten lassen.

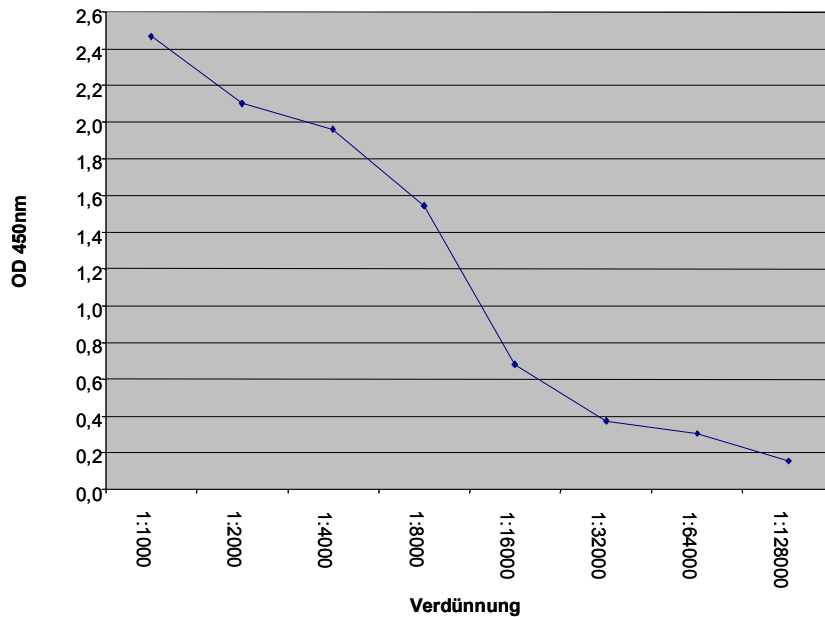


Abbildung 5-11: Standardkurve mit einem Positivserum (monoklonales Anti-HPV16E7-Antiserum) im GST-HPV16E7-Capture-ELISA. Gemessen wurde die OD (Absorption) bei 450 nm. Das Positivserum wurde von 1:1000 bis 1:128000 verdünnt und zeigt bei der höchsten Verdünnung von 1:128000 noch eine OD 450 nm von 0,15. Maximale OD 450 nm bei einer Verdünnung von 1:1000 bei 2,47.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse zur humoralen Immunantwort nach DNA-Immunisierung wurden in einem neuen Experiment jeweils 6 Versuchstiere (BALB/c-Mäuse) mit einem pTHHPV16E7-Konstrukt immunisiert.

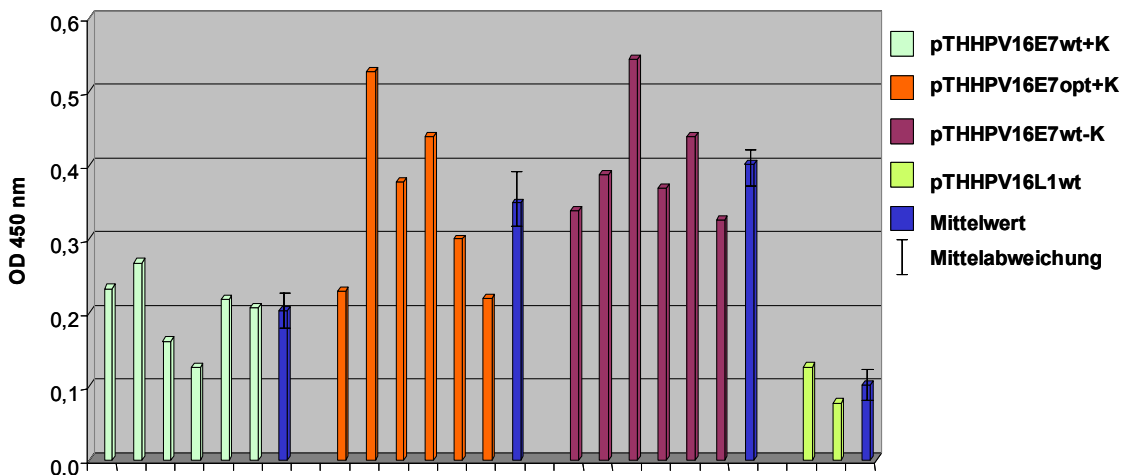


Abbildung 5-12: GST Capture ELISA (siehe 3.6.6) mit Seren aus BALB/c-Mäusen. Die Seren wurden 1:10 verdünnt. Die ELISA-Platte mit GST-HPV16E7 als Antigen beschichtet. Verwendete Plasmide sind aufgelistet. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm. Antikörperantwort nach Immunisierung mit pTHHPV16E7wt+K (Mittelwert 0,2 +/- 0,016). Antikörperantwort nach Immunisierung mit pTHHPV16E7opt+K (Mittelwert 0,35 +/- 0,04). Antikörperantwort nach Immunisierung mit pTHHPV16E7wt-K (Mittelwert 0,4 +/- 0,02). Als Negativkontrolle wurde mit einem HPV16L1-Expressionsplasmid (pTHHPV16L1wt) immunisiert und die Seren im GST-HPV16E7-Capture-ELISA mit untersucht. Die Negativkontrolle bewegt sich im Mittel um die 0,1 +/- 0,017 und muss als Hintergrundsignal von den anderen Werten abgezogen werden.

Appliziert wurde nach dem identischen Protokoll wie bei der Immunisierung der C57BL/6-Mäuse (siehe 5.2.5). Erwartet wurden höhere Antikörperantworten bei einer Serum-Verdünnung von 1:50 ca. 1,4 OD [Liu et al., 2001]. Allerdings konnten auch in diesem Immunisierungs-Experiment keine deutlich höheren Antikörper-Antworten erzielt werden (siehe Abb. 5-12). Auch die erwarteten Unterschiede nach Applikation der verschiedenen E7-Konstrukte (siehe Legende Abb. 5-12) wurden nicht beobachtet (siehe 6.2.2).

5.2.6 Tumorprotektions-Experiment

Im Tumorprotektions-Experiment sollte überprüft werden, in wie weit die DNA-Modifikationen Einfluss auf die Protektion der Mäuse gegenüber inokulierten HPV 16 E7 positiven Tumorzellen (C3-Zellen) haben. Für das Tumorprotektions-Experiment (siehe 3.5.6) wurden vier Gruppen mit jeweils 10 Versuchstieren (C57BL/6-Mäuse) pro E7-Konstrukt bereitgestellt. Die Tiere wurden zweimal im Abstand von 14 Tagen mit jeweils 100 µg DNA intramuskulär immunisiert und nach weiteren 16 Tagen wurden $0,5 \times 10^6$ C3-Zellen/Maus subkutan in die rechte Flanke inokuliert (siehe 3.6.5). Alle 3-4 Tage wurde mit einem Lineal die Tumorgroße gemessen. Die erhaltenen Daten wurden in einem Dot Plot aufgetragen (siehe Abb. 5-13) und statistisch (siehe Tab. 5-2) ausgewertet (Mann-Whitney Rank Sum Test, SigmaStat, Version 3.0).

Aus dem Tumorprotektions-Experiment ergab sich ein deutliches Bild (siehe Abb. 5-13). Die DNA-Immunisierung mit dem Konstrukt pTHHPV16E7wt-K (Mittelwert $199,3 \text{ mm}^2 \pm 48,4 \text{ mm}^2$) bewirkte im Vergleich zum Leervektor (pTH_{Amp}, Mittelwert $273,9 \text{ mm}^2 \pm 36 \text{ mm}^2$) keine signifikant erhöhte Protektion gegenüber E7-exprimierenden Tumorzellen (C3-Zellen). Durch die Immunisierung mit pTHHPV16E7+K (Mittelwert $140,6 \text{ mm}^2 \pm 36,3 \text{ mm}^2$) blieben immerhin zwei Mäuse tumorfrei (aber auch bei wt-K, was an der experimentellen Streuung liegt) und bei den anderen Tieren dieser Gruppe war das Tumorwachstum deutlich verzögert. Das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K (Mittelwert $24,3 \text{ mm}^2 \pm 12,9 \text{ mm}^2$) zeigte wie erwartet den größten Einfluss und beinahe alle Tiere aus der Gruppe blieben tumorfrei (7/10).

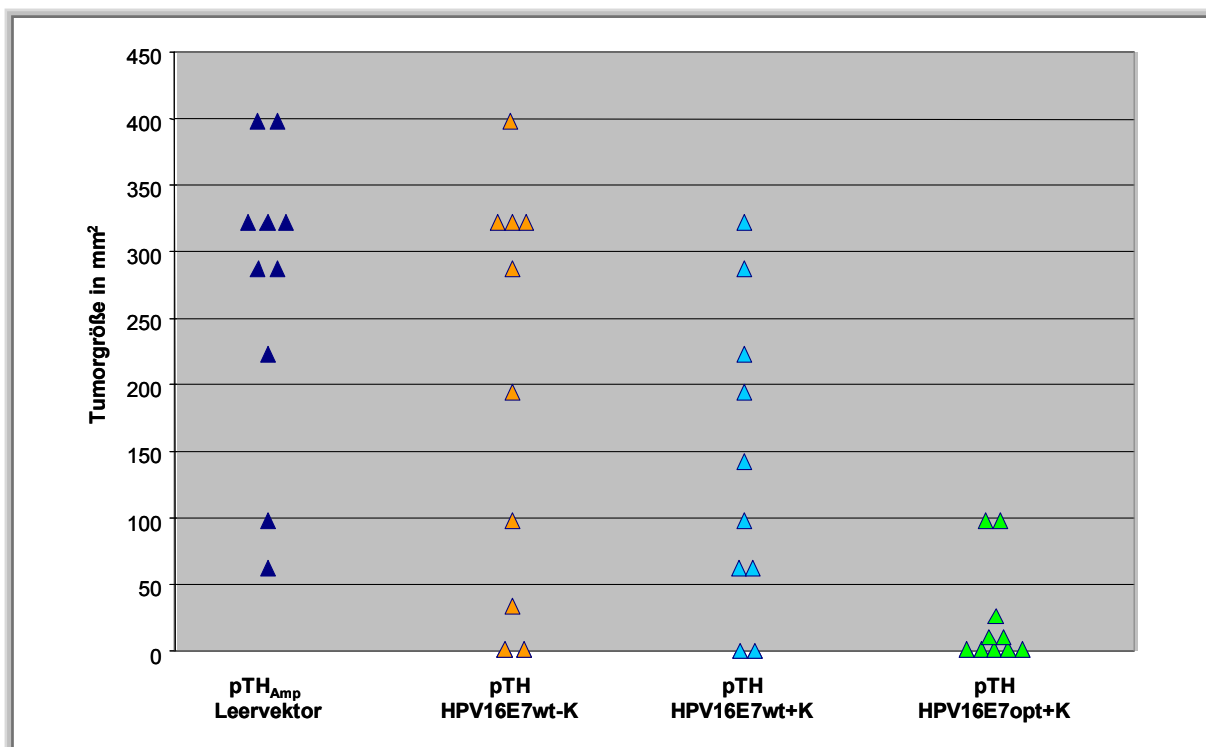


Abbildung 5-13: Dot Plot Tumorprotektions-Experiment. Dargestellt ist die Verteilung der Tumorgößen der einzelnen Versuchstiere in mm². Jeweils 10 C57BL/6-Mäuse wurden mit dem Leervektor pTH_{Amp} (Negativkontrolle), pTHHPV16E7wt-K, pTHHPV16E7+K und pTHHPV16E7opt+K intramuskulär immunisiert (siehe 3.5.3). Anschließende Tumor-Induktion mit C3-Zellen (siehe 2.11.1.4). Statistische Auswertung siehe Tabelle 5-3.

HPV16E7-Konstrukt/ Gruppe	Verteilung der Tumorgößen in mm ²	Mittelwert S.E.M	Median	Statistische Signifikanz im Vergleich zu Gruppe 1 Mann-Whitney Rank Sum Test	Statistische Signifikanz im Vergleich zu Gruppe 2 Mann-Whitney Rank Sum Test	Statistische Signifikanz im Vergleich zu Gruppe 3 Mann-Whitney Rank Sum Test
1.pTH _{Amp} Leervektor	225-400 mm ² 8/10 64-100 mm ² 2/10	274 +/- 36	306,5	* /	* /	* /
2. pTH HPV16 E7 wt-K	196-400 mm ² 6/10 36-100 mm ² 2/10 <u>tumor-frei 2/10</u>	199,3 +/- 48,4	242,5	*P = 0,232 keine Signifikanz	* /	* /
3. pTH HPV16 E7wt+K	144-324 mm ² 5/10 64-100 mm ² 3/10 <u>tumor-frei 2/10</u>	140,6 +/- 36,3	122	*P = 0,018 statistische Signifikanz zw. Gruppe 1 u. 3	*P = 0,345 keine Signifikanz	* /
4. pTH HPV16 E7opt+K	9-100 mm ² 2/10 <u>tumor-frei 7/10</u>	24,3 +/- 12,9	4,5	*P = < 0,001 statistische Signifikanz zw. Gruppe 1 u. 4	*P = 0,017 statistische Signifikanz zw. Gruppe 2 u. 4	*P = 0,026 statistische Signifikanz zw. Gruppe 3 u. 4

Tabelle 5-2: Tumorprotektions-Experiment nach DNA-Immunsierung und anschließender C3-Zellen-Inokulation aus Abb. 5-13. Gelistet sind die Versuchstiergruppen 1-5, Verteilung der Tumorgößen in mm², Mittelwert, Standardabweichung, Median und die Ergebnisse aus dem Mann-Whitney Rank Sum Test (siehe 3.6.7). Die Tumorsubgruppen wurden eingeteilt in tumor-freie Tiere, Tiere mit einer Tumorgöße von 9-100 mm² und von 100-400 mm².

Das Tumorprotektions-Experiment hat gezeigt, dass sowohl die Kozak-Sequenz, als auch die Kodonoptimierung des HPV16E7-Gens einen Einfluss auf die E7-spezifische Immunität *in vivo* haben (siehe Abb. 5-13). Statistische Signifikanz erreicht allerdings nur der Vergleich

zwischen wt und Kodon-optimierten E7 Plasmiden (Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 2+3: $P = 0,017$ bzw. $0,026$, siehe Tab. 5-2).

Im Vergleich zur Negativkontrolle (Gruppe 1, pTH_{Amp}) zeigten Gruppen 3 und 4 einen signifikanten Unterschied (siehe Tab. 5-2). Die Kodonoptimierung im Zusammenspiel mit dem Effekt der Kozak-Sequenz (pTHHPV16E7opt+K) hat den stärksten Einfluss auf die zelluläre Immunantwort, was sich in einer starken T-Zell-Aktivierung (siehe Elispotanalyse 5.2.5) und einer effizienten Tumorprotektion (siehe Abb. 5-13) *in vivo* widerspiegelt. Um die E7-Spezifität der Immunantwort zu untermauern, wurde aus den Gruppen 3 und 4 bei jeweils 3 Tieren nach der Beobachtungsphase die Milzen entnommen und mittels Elispot die T-Zellantwort analysiert. Beide Gruppen (Teil-Responder, 3/Responder, 4) zeigten eine E7-spezifische zelluläre Immunantwort, wobei die Gruppe 4 (siehe Tab. 5-2) wie erwartet die stärkste T-Zelle-Aktivierung zeigte (Abbildung nicht gezeigt).

5.2.7 Tumorregressions-Experiment

Um die gefundene Aktivierung von T-Zellen nach DNA-Immunisierung mit modifizierten pTHHPV16E7-Konstrukten in einem stringenteren und der klinischen Situation besser entsprechenden experimentellen Ansatz zu überprüfen, wurde die Regression bereits existierender Tumore untersucht.

Zu Beginn des Experimentes wurden jeweils 10 Versuchstiere (C57BL/6-Mäuse) pro Gruppe mit $0,5 \times 10^6$ Zellen/Maus einer HPV 16 E7 positiven Tumorzelllinie (C3-Zellen, siehe 2.11.1.4), inokuliert (siehe 3.5.5). Die ersten tastbaren Tumore wurden nach 5-6 Tagen erwartet, deshalb wurde am Tag der Zell-Inokulation auch die Kardiotoxin-Vorbehandlung durchgeführt. Nach ca. 6-8 Tagen hatten die Tumore eine Größe von 9-25 mm² und die Tiere erhielten die erste DNA-Immunisierung (siehe 3.5.3). Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde die Tumorgöße bei allen Versuchstieren alle 3-4 Tage mit einem Lineal ermittelt (siehe 3.5.5). Nach weiteren 14 Tagen wurde die zweite DNA-Dosis appliziert. Die erhaltenen Daten wurden in einem Dot Plot aufgetragen (siehe Abb. 5-14) und statistisch (siehe Tab. 5-3) ausgewertet (Mann-Whitney Rank Sum Test, SigmaStat, Version 3.0).

Der Einfluss der DNA-Modifikationen wurde im Tumorregressions-Experiment nicht so deutlich, wie in der Elispot-Analyse oder dem Tumorprotektions-Experiment. So zeigt sich eine große Streuung der Tumorgößen innerhalb der verschiedenen Versuchstier-Gruppen (siehe Abb. 5-14). Der Leervektor (pTHamp) zeigte kaum einen Einfluss auf das Tumorstadium (Mittelwert 322,6 mm² +/- 34,5 mm²) im Vergleich zu den Tieren, die nach

der Inokulation mit C3-Zellen nur mit PBS behandelt wurden (Daten nicht gezeigt). Bei den mit pTHHPV16E7wt-K immunisierten Mäusen wuchsen die Tumore ebenfalls innerhalb von 4 Wochen (Mittelwert $358,2 \text{ mm}^2 \pm 19,8 \text{ mm}^2$), so dass die Tiere getötet werden mussten. In der Gruppe pTHHPV16E7+K zeigten zwei Tiere eine deutliche Stagnation im Tumorwachstum (Mittelwert $280,5 \text{ mm}^2 \pm 39,2 \text{ mm}^2$). Im Vergleich mit der Leervektor-Gruppe war dieser Unterschied allerdings statistisch nicht signifikant ($P = 0,405$ Mann-Whitney Rank Sum Test, siehe Tab. 5-3). Den deutlichsten Einfluss zeigt die Gruppe 4, die zweimal mit pTHHPV16E7opt+K immunisiert wurde (siehe Abb. 5-14). Bei fünf Tieren war eine fast vollständige Regression der angewachsenen Tumore zu beobachten (Mittelwert $161,2 \text{ mm}^2 \pm 50,6 \text{ mm}^2$) und die Gruppe als ganzes zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zu Gruppe 1 ($P = 0,017$ siehe Tab. 5-3). Einen weiteren signifikanten Unterschied konnte nur noch zwischen den Gruppen 2 und 4 ermittelt werden ($P = 0,014$ nicht aufgelistet in Tab. 5-3).

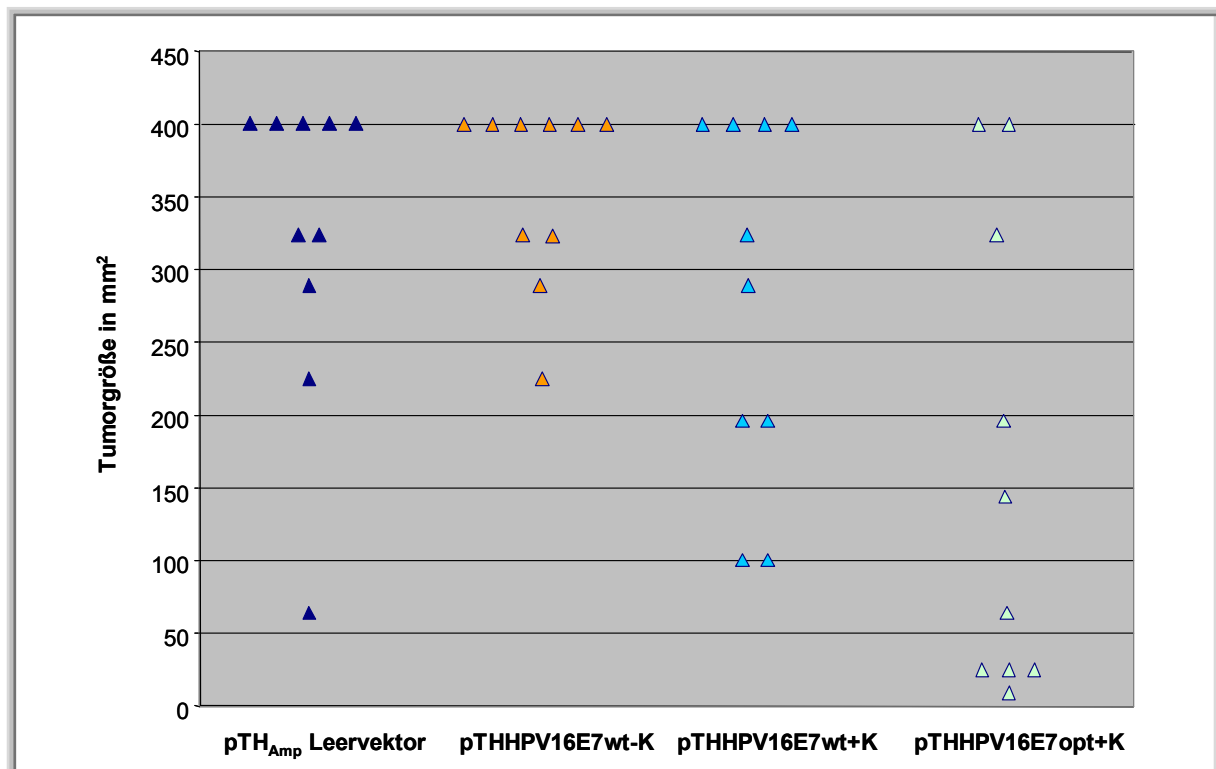


Abbildung 5-14: Tumorregression nach Inokulation von C3 Zellen und Immunisierung mit verschiedenen HPV 16 E7 Expressionsplasmiden (siehe Beschriftung). Dargestellt sind die Tumorgrößen der einzelnen Versuchstiere in mm^2 nach einer Beobachtungsphase von 4 Wochen. Jeweils 10 C57BL/6-Mäuse wurden mit dem Leervektor pTH_{Amp} (Negativkontrolle), pTHHPV16E7wt-K, pTHHPV16E7+K und pTHHPV16E7opt+K intramuskulär immunisiert (siehe 3.5.3). Statistische Auswertung siehe Tabelle 5-3.

HPV16E7-Konstrukt/ Gruppe	Verteilung der Tumorgößen in mm ²		Mittelwert S.E.M	Median	Statistische Signifikanz im Vergleich zu Gruppe 1 Mann-Whitney Rank Sum Test
1. pTH _{Amp} Leervektor	225-400 mm ² 64 mm ²	9/10 1/10	322,6 +/- 34,5	362	* /
2. pTH HPV16 E7 wt-K	225-400 mm ²	10/10	358,2 +/- 19,8	400	*P = 0,791 keine Signifikanz
3. pTH HPV16 E7wt+K	196-400 mm ² 100 mm ²	8/10 2/10	280,5 +/- 39,2	306,5	*P = 0,405 keine Signifikanz
4. pTH HPV16 E7opt+K	144-400 mm ² 9 - 64 mm ²	5/10 5/10	161,2 +/- 50,6	64	*P = 0,017 statistische Signifikanz zw. Gruppe 1 u. 4

Tabelle 5-3: Tumorregression nach Inokulation von C3 Zellen und Immunisierung mit verschiedenen HPV 16 E7 Expressionsplasmiden (siehe Beschriftung und Abb. 5-14). Gelistet sind die durchschnittlichen Tumorgößen (in mm²) innerhalb der einzelnen Gruppen 1-4 Mittelwert, Standardabweichung, Median und die Ergebnisse aus dem Mann-Whitney Rank Sum Test (siehe 3.6.7). Die Tumorsubgruppen wurden eingeteilt in die Tiere mit einer Tumorgöße von 9-100 mm² und von 100-400 mm².

Als Schlussfolgerung aus diesem Experiment kann man sagen, dass die Kodonoptimierung (Humanisierung) auch bei der *in vivo* Analyse den größten Einfluss auf das Tumorwachstum hat (gilt für Tumorprotektion und Tumorregression, siehe Abb. 5-13, 5-14). Allerdings waren die Unterschiede zu den anderen Gruppen (siehe Tab. 5-3) nicht so eindeutig wie in den vorangegangenen Elispot-Analysen, in welchen die Kodonoptimierung wie auch die Verwendung der Kozak-Sequenz einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu einer unmodifizierten E7-DNA-Vakzine (pTHHPV16E7wt-K) erkennen ließen.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Elispot und den Tumor-Experimenten, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die unterschiedliche Immunogenität der einzelnen E7-Plasmide *in vivo* mit der Höhe der Expression von E7 nach Transfektion in Zellen in Kultur korreliert.

5.3 Expression von HPV16E7-Konstrukten *in vitro*

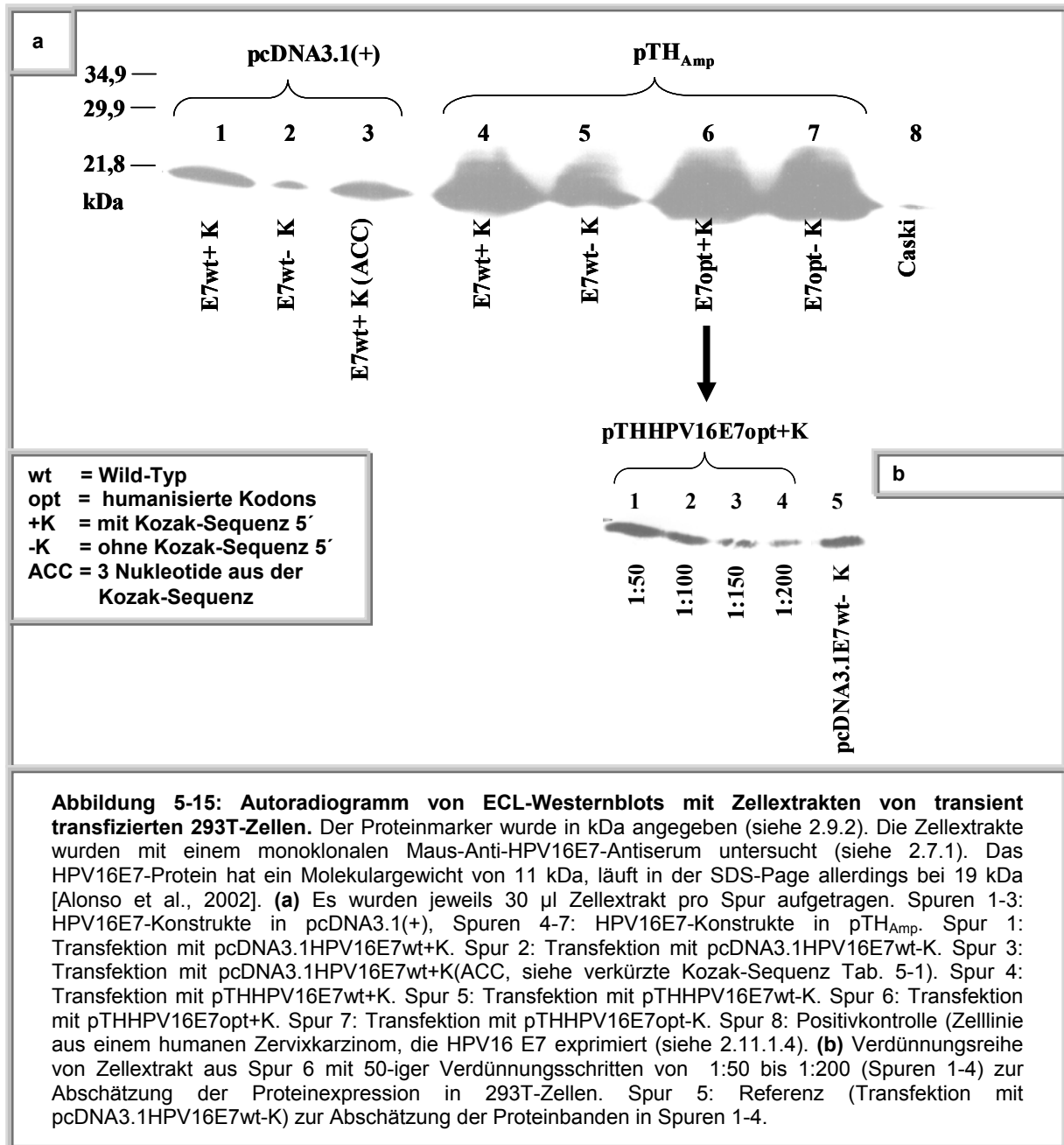
5.3.1 Einfluss des Codon-Usage und der Kozak-Sequenz auf die HPV16E7-Protein Expression

In den folgenden Transfektions-Experimenten sollte die Hypothese untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der variierenden Immunogenität der E7-Konstrukte (in Abhängigkeit von der Humanisierung und dem Vorliegen der Kozak-Sequenz) und ihrer Expressionsstärke in Zellkultur gibt. Zu diesem Zweck wurde die Expression des HPV 16 E7 Proteins nach Kotransfektionen (E7-Konstrukt + GFP-Plasmid) der einzelnen E7-Plasmide

(siehe Tab. 5-1) in den gut transfizierbaren 293T-Zellen (humane epitheliale Nierenzellen) analysiert. Die Zellextrakte wurden im Westernblot untersucht und parallel die GFP-Fluoreszenz im FACS vermessen.

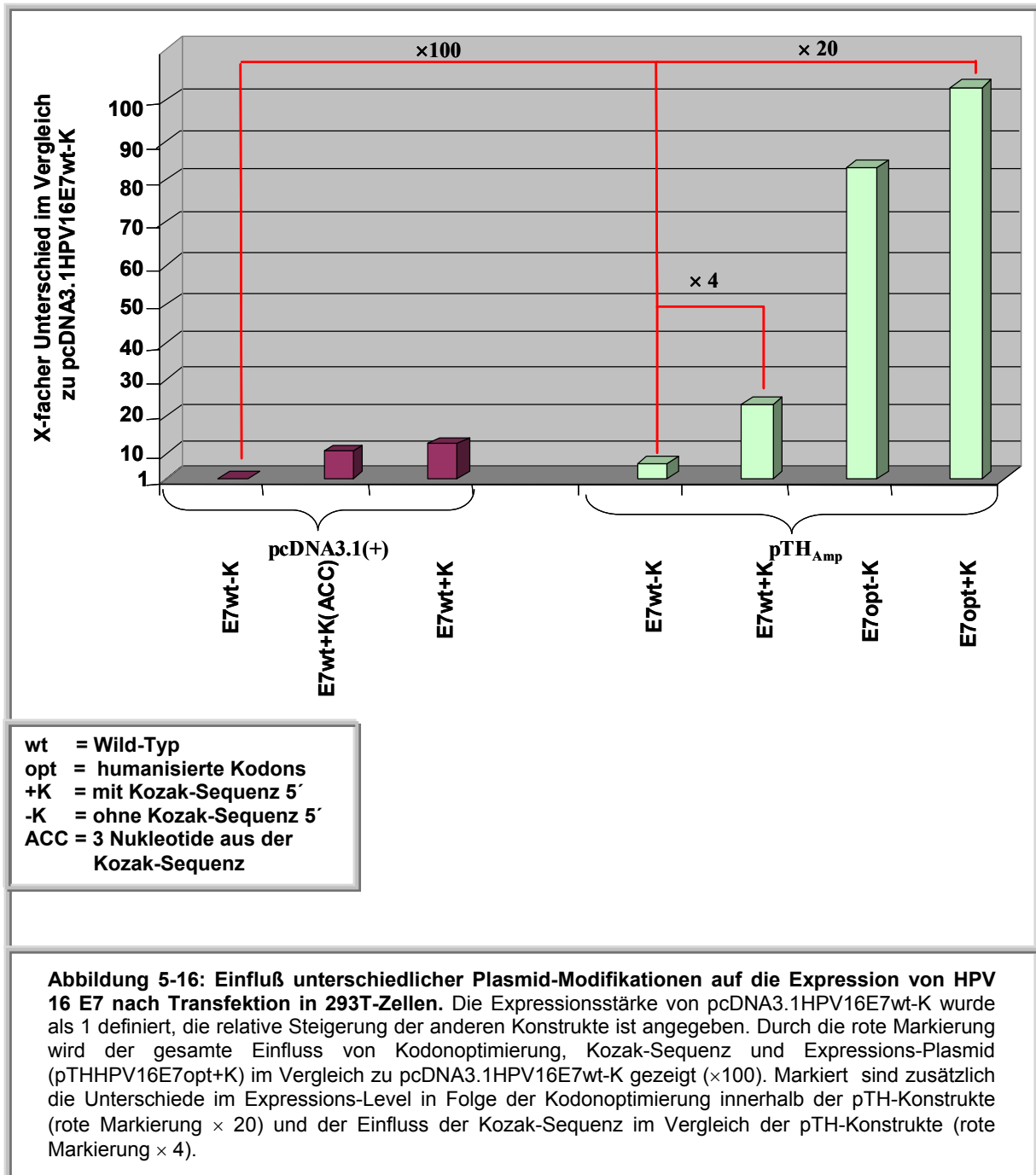
5.3.2 Transfektion von HPV16E7-Konstrukten in 293T-Zellen (humane Nierenzellen)

Die unter 5.1.2 aufgeführten E7-Konstrukte wurden in transienten Transfektions-Experimenten untersucht. Für jeden Transfektionsansatz wurde in Petrischalen 2×10^6 293T-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit einem E7-Konstrukt (siehe Tab. 5-1) und dem GFP-Plasmid (pGreenLantern) im molaren Verhältnis von 10:1 kotransfiziert (siehe 3.4.3). Das GFP Plasmid wurde eingeführt, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen bei verschiedenen Experimenten kontrollieren zu können. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und 1:1 aufgeteilt. Eine Hälfte wurde in PBS aufgenommen und die GFP-Fluoreszenz der Zellen sofort im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) vermessen (siehe 3.4.4), die andere Hälfte wurde nach Herstellung eines Extraktes (siehe 3.4.5) für die anschließende Analyse im Westernblot (siehe 3.3.16 und 3.3.17) verwendet. Die 293T-Zellextrakte wurden in einem 15 %-igen SDS-Page aufgetrennt (siehe 3.3.16) und anschließend mit einem monoklonalen Maus-Anti-HPV16E7-Antiserum im Westernblot analysiert (siehe 3.3.16). Die HPV16E7-Proteinbande wird bei 11 kDa im Gel erwartet, läuft aber aufgrund seines veränderten Laufverhaltens bei 19 kDa [Alonso et al., 2002]. Die Transfektionsansätze mit den verschiedenen HPV16E7-Konstrukten zeigen im Westernblot unterschiedliche Signalstärken (siehe Abb. 5-15). Aus der Intensität der Banden lässt sich deutlich der Einfluss der verschiedenen DNA-Modifikationen ablesen. Vergleicht man in Abbildung 5-15 die Spuren 2 (pcDNA3.1HPV16E7wt-K) und 5 (pTHHPV16E7wt-K) miteinander kann man den Einfluss der unterschiedlichen Expressionsplasmide (pcDNA3.1 und pTH_{Amp}) deutlich erkennen. Beim Vergleich der Spuren 1 zu 2 bzw. 4 zu 5 (siehe Abb. 5-15) kann man an Hand der Signalintensität den Einfluss der Kozak-Sequenz [Kozak et al., 1987] auf die Proteinexpression in 293T-Zellen ablesen. Den größten Einfluss hat allerdings die Kodonoptimierung (Humanisierung, siehe Abb. 5-15a; vgl. die Spuren 4 mit 6 bzw. 5 mit 7). Aufgrund der sehr starken Bandensignale in den Spuren 4, 6 und 7 ließen sich die Mengen des E7 Proteins nach Westernblot-Analyse nicht vergleichend abschätzen (siehe Abb. 5-15).



Aus diesem Grund wurden die Zellextrakte aus den Spuren 4, 6 und 7 verdünnt (1:50, 1:100, 1:150, 1:200) und in einem Westernblot zusammen mit dem Referenzkonstrukt (pcDNA3.1HPV16E7wt-K) analysiert, um die Bandenintensität des Referenzkonstruktes mit den Zellextrakt-Verdünnungen (siehe Abb. 5-15b) zu vergleichen. Wie in Abbildung 5-15b gezeigt, sind die Signalstärken in Spur 5 (Referenzkonstrukt, unverdünnt) und Spur 2 (Verdünnung 1:100) annähernd gleich. Daher kann man festlegen, dass das Konstrukt pTHHPV16E7opt+K ca. 100 mal stärker in 293T-Zellen exprimiert wird als das Konstrukt pcDNA3.1HPV16E7wt-K. Mit den Zellextrakten aus den Spuren 5/7 (siehe Abb. 5-15a) wurde in gleicher Weise verfahren. Abbildung 5-16 zeigt die Zusammenfassung der Transfektionsexperimente in 293T-Zellen mit den unter 5.1.2 beschriebenen HPV16E7-

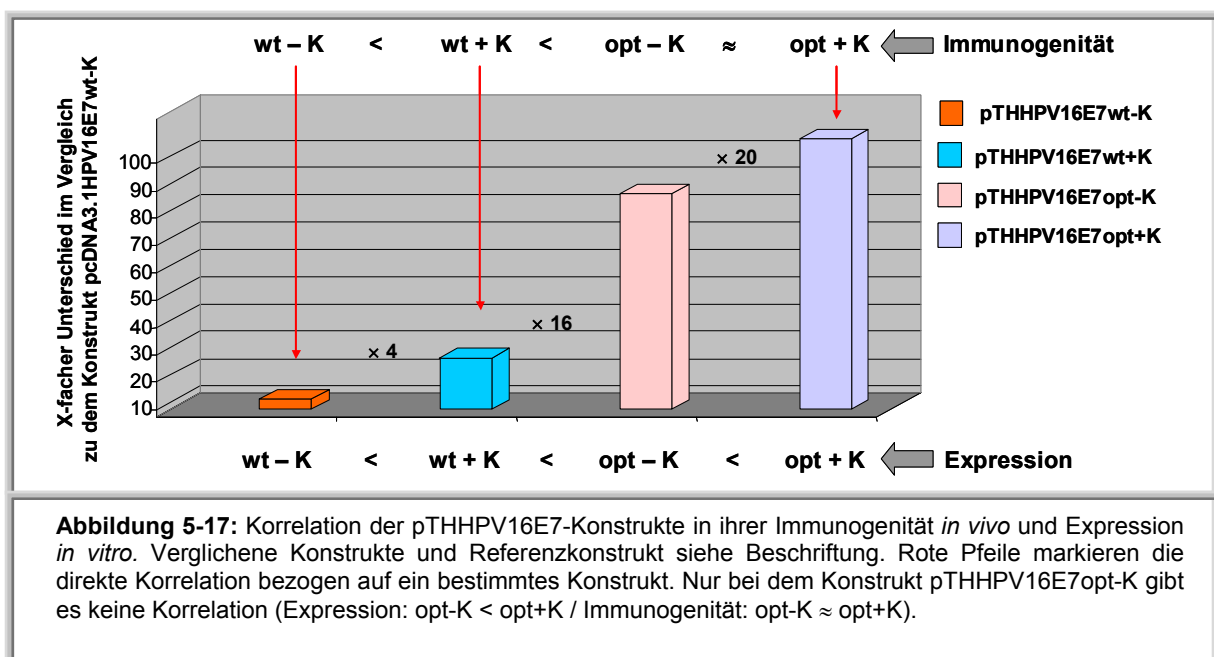
Konstrukten. Es wird deutlich, dass auch hier die Kodonoptimierung (siehe Tab. 5) den größten Einfluss auf die E7-Proteinexpression *in vitro* hat (ca. 100-fach stärkere Expression in der Addition der DNA-Modifikationen, Humanisierung + Kozak-Sequenz + Plasmid, von pTHHPV16E7opt+K gegenüber pcDNA3.1HPV16E7wt-K, siehe Abb. 5-16).



Auch die Kozak-Sequenz beeinflusst die Proteinexpression, allerdings zu einem geringeren Ausmaß (ca. 4-fach stärkere Expression von pTHHPV16E7wt+K gegenüber pTHHPV16E7wt-K, siehe Abb. 5-16); weiterhin schlägt sich auch die Verwendung von unterschiedlichen Expressionsplasmiden auf die Stärke der Proteinexpression nieder (ca. 2-

fach stärkere Expression von pTHHPV16E7wt+K gegenüber pcDNA3.1HPV16E7wt+K, siehe Abb. 5-16).

Die ersten Transfektionen wurden mit 293T-Zellen durchgeführt, da bekannt ist, dass sie sich äußerst gut transfizieren lassen [Takagi et al., 2001], was aus der FACS-Analyse eindeutig hervorgeht (siehe 5.1.5). Da die Transfektionseffizienz in den verschiedenen Experimenten sehr ähnlich war (ausführlich beschrieben in 5.3.4) konnte auf einen Abgleich bei den verschiedenen Transfektionen verzichtet werden und die erhaltenen E7 Werte wurden direkt verglichen. Aus den obigen Transfektions-Experimenten lässt sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Immunogenität der pTHHPV16E7-Konstrukte *in vivo* und der Protein-Expression *in vitro* ableiten (siehe Abb. 5-17). Es wird deutlich, dass die DNA-Modulationen des HPV16E7-Gens, die in den Immunisierungs-Studien mit C57BL/6-Mäusen einen signifikanten Unterschied erkennen ließen, auf die E7-Protein-Expression in gleicher Weise Einfluss nehmen. Im Detail lässt sich sagen, dass die Humanisierung des E7-Gens auf die Immunogenität und die Expression den größten Einfluss ausübt. Die Kozak-Sequenz alleine hat ebenfalls einen Einfluss *in vivo* als auch *in vitro*, allerdings nicht mit der Deutlichkeit im Vergleich zu dem humanisierten E7-Gen (siehe Abb. 5-7, 5-15).



Die unterschiedlichen Mengen an E7 Protein wurden über Verdünnungsreihen im WB abgeschätzt. Zur Bestätigung dieser Schätzung wurde mit Hilfe einer Computer Software (Image Quant) der entsprechende Blot (siehe Abb. 5-15) eingelesen und die Bandenintensität im Vergleich zum Blot-Hintergrund ermittelt (siehe Tab. 5-4). Die Kontroll-Analyse

bestätigte die unter Abbildung 5-16 zusammengefassten Protein-Expressions-Daten. In weiteren Transfektions-Experimenten sollte herausgefunden werden, ob diese unterschiedlich starken E7-Expressions-Level auch in Mauszellen gefunden werden. Aufgrund der gezeigten variierenden Immunogenität (siehe 5.2.3) der verschiedenen pTH-E7-Konstrukte wurde eine ebenso unterschiedliche E7-Protein-Expression in NIH3T3-Zellen (siehe 2.11.1.4) erwartet, die in humanen 293T-Zellen schon gezeigt wurde (siehe Abb. 5-15).

HPV16E7-Konstrukt	Expressionsstärke in % bezogen auf den Blot- Hintergrund	Expressions- bezogen auf pcDNA3.1 HPV16E7wt-K	Abschätzung siehe Abb. 5-15
pcDNA3.1HPV16E7wt-K	1,01	/	/
pcDNA3.1HPV16E7wt+K(ACC)	7,21	7,14 ×	8 ×
pcDNA3.1HPV16E7wt+K	9,81	9,71 ×	10 ×
pTHHPV16E7wt-K	6,58	6,51 ×	5 ×
pTHHPV16E7wt+K	21,56	21,35 ×	20 ×
pTHHPV16E7opt-K	75,57	74,82 ×	80 ×
pTHHPV16E7opt+K	90,26	89,36 ×	100 ×

Tabelle 5-4: Aufgelistet wurden die Abschätzungen der Expressions-Level aus den Transfektions-Experimenten mit 293T-Zellen (siehe Abb. 5-15) und die Kontroll-Analyse mit der Computer-Software Image Quant. Der Vergleich der beiden Auswertungen zeigt nur relativ geringe Unterschiede und bestätigt die Abschätzung der E7-Protein-Expression mittels Endpunkt-Verdünnung (siehe Abb. 5-15).

5.3.3 Transfektion der HPV16E7-Konstrukte in NIH3T3-Zellen (Mausfibroblasten)

Die Transfektion von NIH3T3-Zellen (siehe 2.11.1.4) wurde in gleicher Weise, wie unter 5.3.2 beschrieben, durchgeführt. Transfiziert wurden jeweils 2×10^6 Zellen mittels eines Lipidtransfektions-Kits (Effectene® Transfection Reagent, Qiagen in Hilden, siehe 3.4.4) mit pTH-Konstrukten, die in der WB-Analyse mit 293T-Zellextrakten die deutlich stärkere Proteinexpression zeigten. (siehe Abb. 5-15a). Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion geerntet und für FACS- und Westernblot-Analyse aufgesplittet. Die NIH3T3-Zellextrakte wurden im WB mit einem monoklonalen Maus-Anti-HPV16E7-Antiserum analysiert (siehe Abb. 5-18). Auch hier waren die Transfektionseffizienzen bei den verschiedenen Experimenten ähnlich (Streuung ca. 10 %) und die E7 Werte konnten direkt verglichen werden (siehe 5.3.4).

Im Vergleich zu den 293T-Zellen (siehe Abb. 5-15), war nach Transfektion der pTH-Konstrukte in NIH3T3-Zellen die E7-Proteinexpression viel geringer (siehe Abb. 5-18, Spuren 1-4). Bezogen auf das Konstrukt pTHHPV16E7wt-K war die E7-Protein-Expression in NIH3T3-Zellen nur halb so stark wie in 293T-Zellen (siehe Tab. 5-5). Auch die durch

DNA-Modifikationen bewirkten Unterschiede bei der Proteinexpression (siehe Abb. 5-15a, Spuren 4-7) konnten in den Transfektions-Experimenten mit NIH3T3-Zellen nicht reproduziert werden (siehe Tab. 5-5).

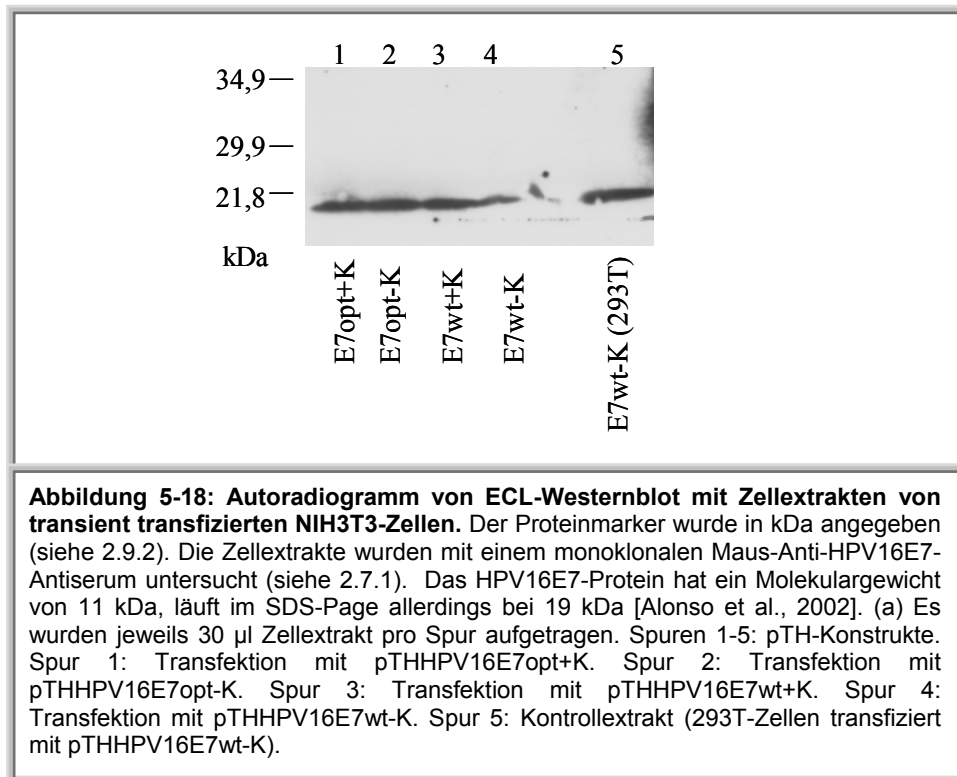


Abbildung 5-18: Autoradiogramm von ECL-Westernblot mit Zellextrakten von transient transfizierten NIH3T3-Zellen. Der Proteinmarker wurde in kDa angegeben (siehe 2.9.2). Die Zellextrakte wurden mit einem monoklonalen Maus-Anti-HPV16E7-Antiserum untersucht (siehe 2.7.1). Das HPV16E7-Protein hat ein Molekulargewicht von 11 kDa, läuft im SDS-Page allerdings bei 19 kDa [Alonso et al., 2002]. (a) Es wurden jeweils 30 µl Zellextrakt pro Spur aufgetragen. Spuren 1-5: pTH-Konstrukte. Spur 1: Transfektion mit pTHHPV16E7opt+K. Spur 2: Transfektion mit pTHHPV16E7opt-K. Spur 3: Transfektion mit pTHHPV16E7wt+K. Spur 4: Transfektion mit pTHHPV16E7wt-K. Spur 5: Kontrolleextrakt (293T-Zellen transfiziert mit pTHHPV16E7wt-K).

Lediglich zwischen den Konstrukten pTHHPV16E7opt+K und pTHHPV16E7wt-K zeigten sich geringe Unterschiede (siehe Abb. 5-18, Spur 4, Signal etwas schwächer). Demnach kommen die DNA-Modifikationen (Kodonoptimierung, Kozak-Sequenz) in NIH3T3-Zellen nicht so zum Tragen, wie in 293T-Zellen, was möglicherweise mit der unterschiedlichen Transfektions-Effizienz (siehe Tab. 5-6) zusammenhängt (Qiagen online, www.qiagen.com/transfectiontools/cell_list/), die allerdings nicht alleine für einen so großen Unterschied in der Protein-Expression im Vergleich mit den 293T-Zell-Experimenten verantwortlich sein kann.

Um die nur schwachen Unterschiede in der E7-Protein-Expression deutlich zu machen, wurde der Blot eingescannt und mit Hilfe einer Computer-Software (Image Quant 5.0) analysiert (siehe Tab. 5-5), die auch kleine Unterschiede in der Banden-Intensität erkennt. Bezogen auf das unmodifizierte E7-Konstrukt (pTHHPV16E7wt-K) erreichen die modifizierten E7-Konstrukte (pTHHPV16E7+K, pTHHPV16E7opt-K und pTHHPV16E7opt+K) maximal eine Verdopplung (siehe Tab. 5-5) der E7-Protein-Expression nach Transfektion mit NIH3T3-Zellen.

HPV16E7-Konstrukt	Expressionsstärke in % bezogen auf den Blot-Hintergrund	X-facher Unterschied bezogen auf den pTHHPV16E7wt-K
pTHHPV16E7wt-K (in 293T)	12,12	/
pTHHPV16E7wt-K	6,22	/
pTHHPV16E7wt+K	12,94	1,9
pTHHPV16E7opt+K	14,02	2,3
pTHHPV16E7opt-K	14,42	2,3

Tabelle 5-5: Aufgelistet wurden die transfizierten E7-Konstrukte in NIH3T3-Zellen. Expressions-Level wurden analysiert mit einer Computer-Software (ImageQuant 5.0). Werte wurden in % angegeben, bezogen auf den Blot-Hintergrund (siehe Abb. 5-18). Vergleich mit pTHHPV16E7wt-K (Werte kalkuliert als X-facher Unterschied). Verbesserung der E7-Protein-Expression maximal um den Faktor 2,3.

5.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Kotransfektionen

Um für die Abschätzung der Expressionsstärke mögliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz mit den verschiedenen Expressionsplasmiden innerhalb eines Experimentes ausgleichen zu können wurde gleichzeitig ein GFP-Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert und die GFP-Expression bei einem Teil der Zellen gemessen. Die Transfektions-Ansätze wurden - wie unter 5.3.2 und 5.3.3 beschrieben - 1:1 für die Analyse im Westernblot und im FACS aufgeteilt. Bei einem Transfektions-Ansatz wurde die Kulturschale mit kleinen Deckgläschen ausgelegt, anschließend die Zellen ausgesät und kotransfiziert. Für die Analyse der transfizierten 293T-Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit Paraformaldehyd fixiert (siehe 3.4.6), um die GFP-Fluoreszenz *in situ* zu dokumentieren (siehe Abb. 5-19). Für eine Quantifizierung wurde die GFP-Aktivität im FACScan gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen trypsinisiert, abzentrifugiert und in PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch „Zellsorting“ im FACSsort (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) analysiert.

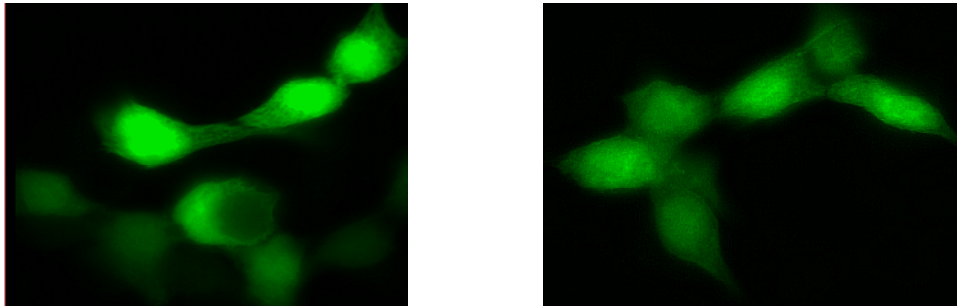


Abbildung 5-19: 293T-Zellen kotransfiziert mit einem GFP-Plasmid (pGreenLantern, Life Technologies, Eragny, France) und einem HPV16E7-Konstrukt (Im Verhältnis 1:10). Deutlich sichtbare grüne GFP-Fluoreszenz 48 Stunden nach der Transfektion unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.

Die FACS-Vermessung der transfizierten Zellen ergab für 293T-Zellen (siehe 2.11.1.4) eine Transfektionseffizienz von maximal 70 %, wobei die Schwankung innerhalb des Experimentes ca. 10 % betrug. Für die Durchführung des Transfektionsprotokolls (Effectene® Transfection Reagent, Qiagen, Hilden) wurden die Experimente mit 293T-Zellen mehrmals wiederholt mit den gleichen Parametern (Zellzahl, DNA-Menge, Inkubations-Dauer bei 37°C für 72 Stunden). Die Auswertung dieser Experimente ergab eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von ca. 65 % (siehe Tab. 5-6). Aufgrund der ähnlichen Transfektions-Effizienzen in allen Experimenten wurde eine Standardisierung der Transfektionen nicht notwendig und die E7 Expression in den verschiedenen Experimenten konnte direkt miteinander verglichen werden (gleiches gilt für die Transfektions-Experimente mit NIH3T3-Zellen und den murinen dendritischen Zellen, siehe Tab. 5-6).

Für die Reproduzierbarkeit der E7-Proteinexpression im Mausmodell wurden Transfektionsexperimente mit NIH3T3-Zellen (Mausfibroblastenzelllinie, siehe 2.11.1.4) in gleicher Weise durchgeführt wie für 293T-Zellen. Aus der FACS-Analyse ergab sich eine durchschnittlich geringere Transfektionseffizienz von ca. 49 % im Vergleich zu 65 % bei 293T-Zellen. Die maximale Transfektionseffizienz wurde mit den Mausfibroblasten schon mit 53 % erreicht, wobei auch in diesen Experimenten die Effizienz um ca. 10 % schwankte. Im Durchschnitt ist demnach die Transfektionseffizienz von NIH3T3-Zellen um ca. 16 % niedriger, was sich möglicherweise auch in einer geringeren E7-Proteinexpression *in vitro* niederschlägt (siehe Abb. 5-18, NIH3T3 und 5-15, 293T). Dieser Unterschied kann allerdings die geringere E7-Expression in NIH3T3-Zellen nicht vollständig erklären. Für die Höhe der Expression spielt es natürlich auch eine Rolle, wie viele E7-Plasmide durch Transfektion in eine Zelle gelangen.

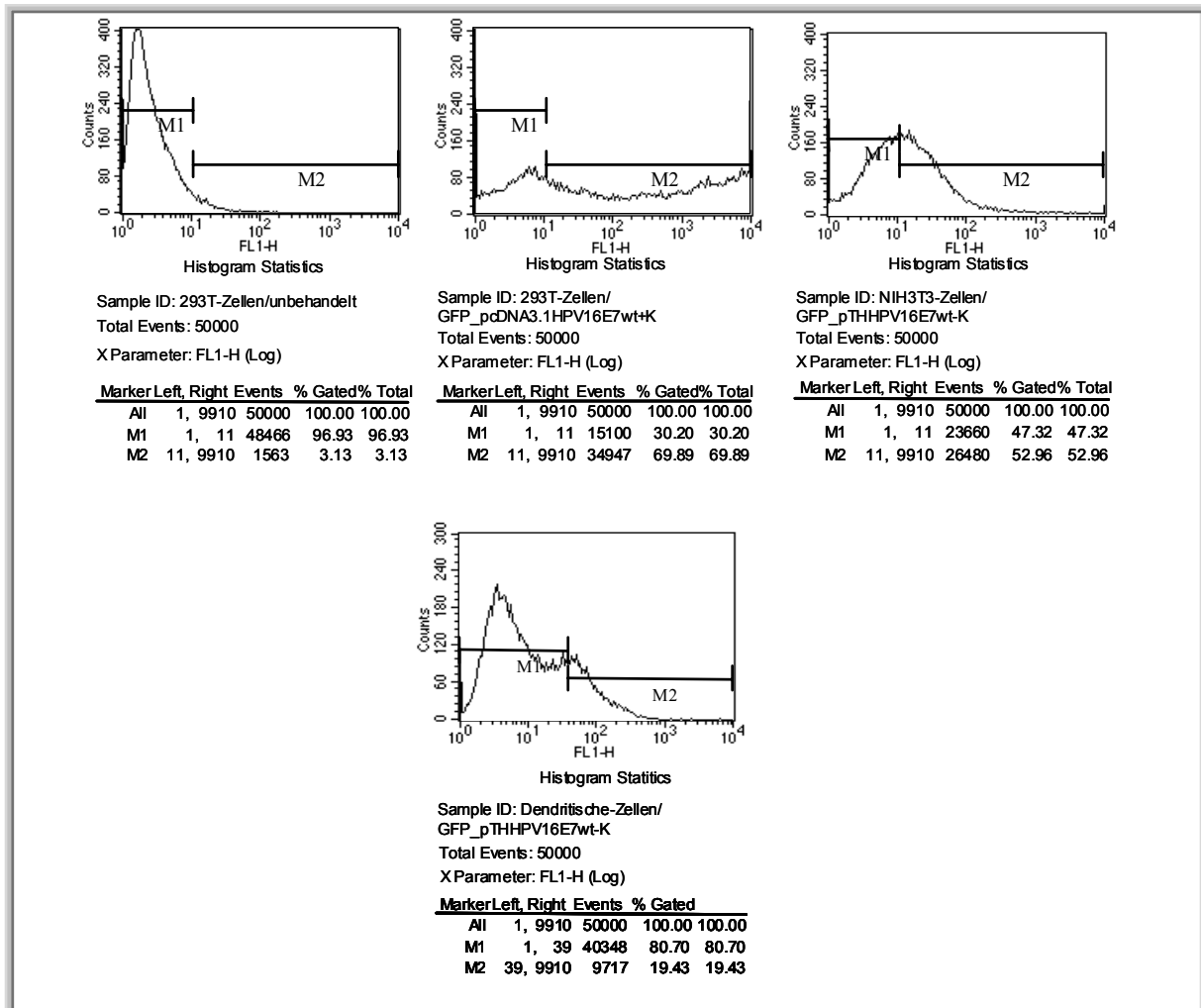


Abbildung 5-20: FACS-Analyse (Durchflußzytometrie, siehe 3.4.4) von Transfektions-Ansätzen (siehe 3.4.3) in 293T-Zellen, NIH3T3-Zellen und in primären dendritischen Zellen (siehe 2.11.1.4). Die Kotransfektionen wurden mit GFP-DNA (pGreenLantern, Life Technologies, Eragny, France) und HPV16E7-Konstrukten (siehe Tab. 5-1) durchgeführt (eingesetzt im Verhältnis 1:10, 0,2 µg : 2 µg). Es wurden zwei Marker gesetzt (M1 und M2) und die gezählten Zellpopulationen eingefügt (verwendete Software, CellQuest). M1 zeigt die untransfizierten, nicht-fluoreszierenden Zellen und M2 die unterschiedlich stark fluoreszierenden Zellen. Gezeigt wird jeweils die Probe mit der maximalen Fluoreszenz aus einem Transfektions-Ansatz. Histogramm 1: untransfizierte 293T-Zellen zur Eingrenzung der negativen Zellpopulation (gilt für alle analysierten Zellen). Histogramm 2: Kotransfektion in 293T-Zellen mit GFP-Plasmid und pcDNA3.1HPV16E7wt+K. M2 zeigt eine Transfektionseffizienz von ca. 70 %. Histogramm 3: Kotransfektion in NIH3T3-Zellen mit GFP-Plasmid und pTHHPV16E7wt-K. M2 zeigt eine Transfektionseffizienz von ca. 53 %. Histogramm 4: Kotransfektion von primären dendritischen Zellen mit GFP-Plasmid und pTHHPV16E7wt-K. M2 zeigt eine Transfektionseffizienz von ca. 19,5 %. **Transfektionseffizienz schwankt innerhalb eines Experimentes um ca. 10 %. Zusammenfassung der FACS-Experimente siehe Tab. 5-6.**

Betrachtet man die FACS-Histogramme der 293T- und NIH3T3-Zellen im Vergleich, so kann man einen deutlichen Unterschied in der durchschnittlichen mittleren Fluoreszenz (siehe Geometrical Mean Tab. 5-6) der beiden Zelllinien beobachten (siehe höhere und breitere Population fluoreszierender Zellen unter dem Marker M2 bei dem Histogramm für 293T-Zellen als für NIH3T3-Zellen; Abb. 5-20). Diese Verteilung spricht dafür, dass die einzelnen NIH3T3-Zellen auch mit erheblich weniger E7-Plasmiden transfiziert wurden als die 293T-Zellen, was den großen Unterschied in der E7-Expression erklären könnte (siehe Abb. 5-18).

Zelllinie	Durchschnittliche Transfektions-Effizienz	Durchschnittliche Mittlere GFP-Fluoreszenz (Geometrical Mean)
293T	65 %	328
NIH3T3	49 %	18,5
Primäre Dendritische Zellen (BMDCs)	17 %	57,8

Tabelle 5-6: Auflistung der durchschnittlichen Transfektions-Effizienz und der durchschnittlichen mittleren GFP-Fluoreszenz (Geometrical Mean) der verwendeten Zellen. Gezeigt sind die Werte aus 6 Experimenten. Höchste Transfektions-Effizienz in 293T-Zellen, gefolgt von NIH3T3-Zellen und BMDCs.

Zusätzlich wurden in einem weiteren Experiment primäre murine dendritische Zellen transfiziert, um die wahrscheinlich relevanten Zielzellen für die DNA-Immunisierung in Mäusen auf ihre Transfizierbarkeit hin zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden aus einer C57BL/6-Maus aus dem Knochenmark von Tibia und Femur "bone marrow derived dendritic cells" (BMDCs) isoliert; 2×10^6 Zellen wurden in einer 100 mm Petrischale und für 6 Tage unter Zusatz von GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) kultiviert (Erhalten von Eva-Jasmin Freyschmidt, DKFZ-Heidelberg). Die dendritischen Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll transfiziert wie die 293T- und NIH3T3-Zellen (siehe 3.4.3). Die Westernblot-Analyse zeigte keine spezifischen HPV16E7-Signale (Abbildung nicht gezeigt). Die Menge an exprimiertem Protein lag also unter der Nachweisgrenze für diese Methode. In der FACS-Analyse konnte allerdings gezeigt werden, dass primäre dendritische Zellen sehr wohl transfizierbar sind, wenn auch nur mit einer Transfektionseffizienz von maximal 19 % (siehe Abb. 5-20).

5.4 DNA-Immunisierung mit HPV16L1-DNA-Konstrukten

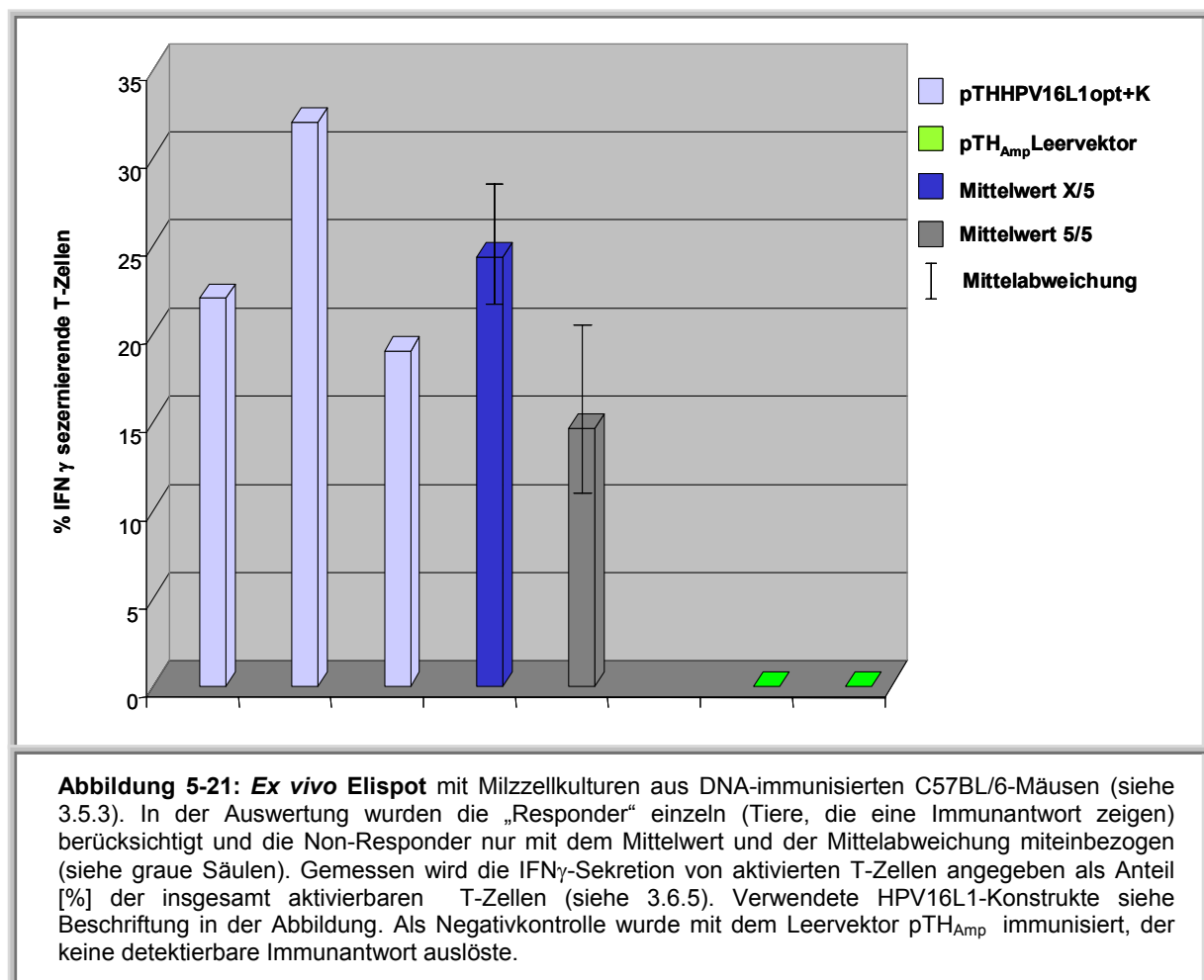
5.4.1 Unterschiedliche Immunogenität von modifizierten L1-Konstrukten analog zu den E7-DNA-Immunisierungen (siehe 5.2)

In den folgenden DNA-Immunisierungen wurde untersucht, ob die beobachteten Unterschiede in der Immunogenität von verschiedenen modifizierten E7-DNA-Konstrukten (Humanisierung, +/- Kozak-Sequenz) auch mit einem weiteren HPV16-Gen (L1, humanisiert) zu beobachten sind. Die Konstrukte wurden mittels PCR (wie unter 5.1.2 beschrieben) hergestellt. Es wurden

wie unter 5.2.1 beschrieben jeweils 5 Tiere (C57BL/6-Mäuse) mit jeweils 100 µg DNA intramuskulär immunisiert. Für die Analyse wurden folgende HPV16L1-Konstrukte verwendet:

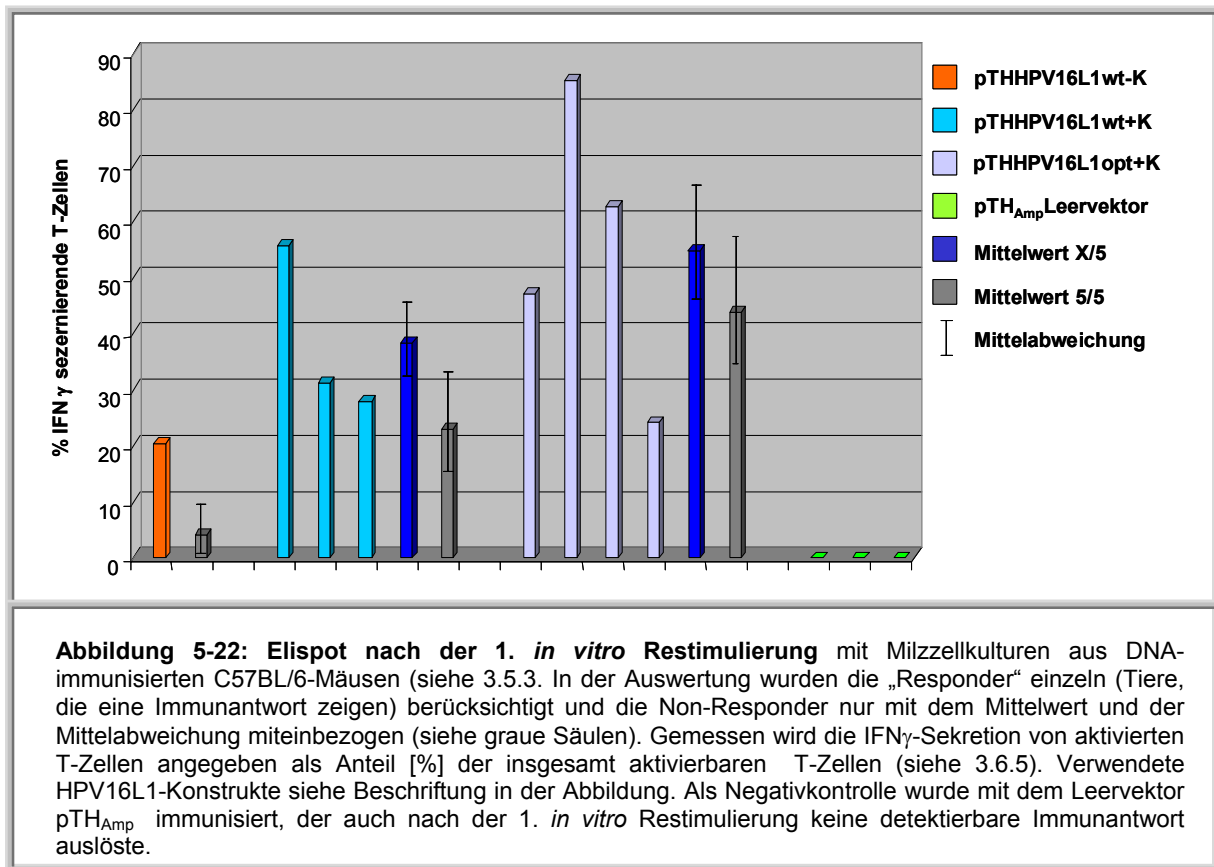
pTHHPV16L1wt-K
 pTHHPV16Lwt+K
 pTHHPV16L1opt+K (Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Müller, DKFZ, Sequenz siehe Anhang 8.0)
 pTH_{Amp}Leervektor

10 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen entnommen und Milzzellkulturen angelegt (siehe 3.6.1). Am gleichen Tag wurde der erste Elispot (ex vivo, siehe Abb. 5-21) durchgeführt und anschließend die Milzzellkulturen restimuliert (mit L1₁₆₅₋₁₇₃-Peptid-beladene RMA-S-Zellen).



Der ex vivo Elispot zeigt nur für das Konstrukt pTHHPV16L1opt+K eine Aktivierung von T-Lymphozyten (siehe Abb. 5-21). Mit den anderen Konstrukten (siehe oben) konnte keine IFN γ -Sekretion induziert werden (siehe Abb. 5-21, nicht extra aufgeführt). Die Humanisierung hat demnach auch auf die Immunogenität des HPV16L1-Konstruktes den größten Einfluss und erreicht ex vivo immerhin eine T-Zell-Aktivierung von maximal 32 %

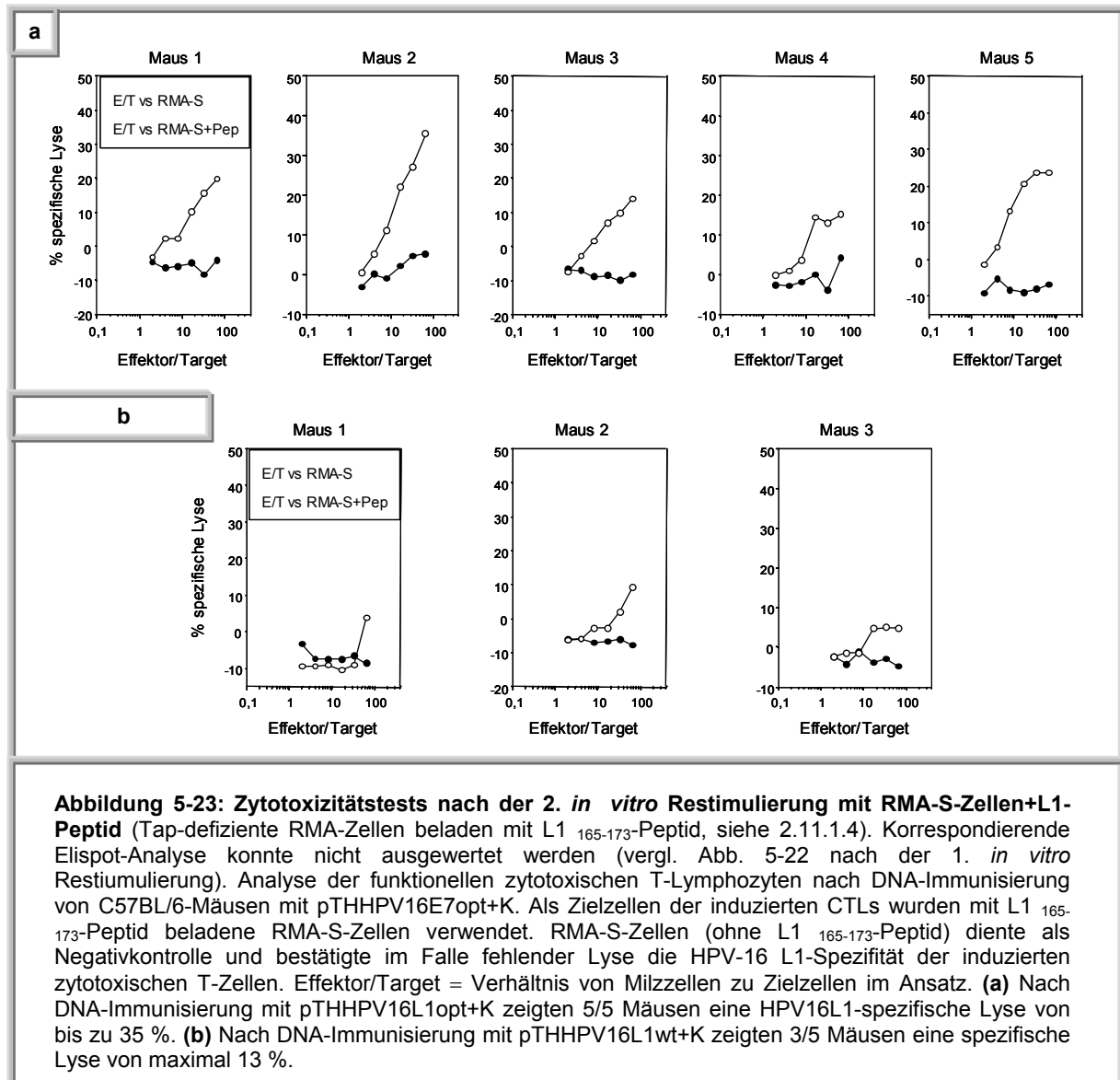
(Mittelwert 24,3 % +/- 3 %). Für weitergehende Analysen wurden die Milzzellkulturen weiter restimuliert (1. + 2. *in vitro* Restimulierung) und mittels Elispot und Zytotoxizitätstest untersucht.



Die Elispot-Analyse nach der 1. *in vitro* Restimulierung ergab ein ähnliches Bild, wie in den Immunisierungs-Experimenten mit den HPV16E7-Konstrukten (siehe Abb. 5-6). Das Konstrukt pTHHPV16L1opt+K zeigte die stärkste Aktivierung (Mittelwert 54,7 % +/- 9,6 %), gefolgt von pTHHPV16L1wt+K (Mittelwert 34,2 % +/- 6,7 %) und die geringste Immunogenität mit der niedrigsten Aktivierung von T-Lymphozyten zeigte das Konstrukt pTHHPV16L1wt-K (nur eine Maus zeigt eine Immunantwort, 20,4 %). Die Unterschiede in der Immunogenität der verwendeten HPV16L1-Konstrukte sind in diesem Experiment allerdings nicht so deutlich ausgeprägt, wie in den E7-DNA-Immunisierungen (siehe 5.2.3). Durch die großen Mittelabweichungen (siehe Abb. 5-22) sind diese Daten mit Vorsicht zu interpretieren. Einen signifikanten Unterschied in der Immunogenität wird nur zwischen den Konstrukten pTHHPV16L1wt-K und L1wt+K, sowie pTHHPV16L1wt-K und L1opt+K erkennbar (siehe Abb. 5-22). Dieses Ergebnis lässt sich wie folgt zusammenfassen:

$$\text{opt} + \text{K} > \text{wt} + \text{K} > \text{wt} - \text{K}$$

Auch für die Untersuchung der HPV16L1-induzierten Immunantwort wurde zusätzlich zur Elispot-Analyse, die Aufschluss über die Aktivierung (IFN γ -Sekretion) von T-Lymphozyten gibt, ein Zytotoxizitätstest (siehe 3.6.4) durchgeführt. In diesem Experiment wurde die Funktionalität der CTLs überprüft, ob sie in der Lage sind Zellen (Targetzellen, RMA-S+L1-Peptid), die das L1₁₆₅₋₁₇₃-Peptid an der Oberfläche präsentieren zu lysieren. Aus Gründen der geringeren Sensitivität dieser Methode wurde der erste ⁵¹Cr Freisetzungssay (Zytotoxizitätstest) nach der 1. *in vitro* Restimulierung (siehe 3.6.3) durchgeführt.



In diesem Experiment konnte allerdings erst nach der 2. *in vitro* Restimulierung HPV16L1-spezifische Lyse gezeigt werden (siehe Abb. 5-23). Die Auswertung ergab für das Konstrukt pTHHPV16L1opt+K eine L1-induzierte Immunantwort von maximal 35 % spezifischer Lyse (siehe Abb. 5-23a, Maus 2). Insgesamt zeigten 5/5 Versuchstieren Lyse. Für das Konstrukt pTHHPV16L1wt+K konnte ebenfalls eine L1-spezifische Lyse gezeigt werden, allerdings

reagierten insgesamt nur 3/5 Versuchstieren im Vergleich zu der Gruppe die mit pTHHPV16L1opt+K immunisiert wurden (5/5, siehe Abb. 5-23a+b). Auch die spezifische Lyse war deutlich geringer und erreicht nur einen maximalen Wert von 13 % (siehe Abb. 5-23b, Maus 2). Anzumerken ist, dass die verwendete Negativ-Zelllinie (RMA-S ohne L1-Peptid) keine Lyse zeigt und bestätigt somit die HPV16L1-Spezifität der induzierten zytotoxischen T-Zellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Humanisierung des HPV16L1-Gens in der Elispot-Analyse, sowie im Zytotoxizitätstest in einer deutlich gesteigerten Immunogenität resultiert und damit mit den HPV16E7-DNA-Immunisierungs-Experimenten korreliert. Als Einschränkung muss man allerdings hinzufügen, dass die verschiedenen DNA-Modifikationen (Humanisierung, Kozak-Sequenz) bezüglich des HPV16L1-Gens in der Elispot-Analyse nicht so deutlich zum Tragen kommen, wie im Vergleich mit den E7-Experimenten. Zuvor konnte schon gezeigt werden, dass nach DNA-Immunisierung mit dem humanisierten HPV16L1-Gen die humorale Immunantwort im Vergleich mit dem HPV16L1wt-Gen deutlich gesteigert werden konnte [Leder et al., 2001]. Für die verbesserte L1-Protein-Expression *in vitro* gilt allerdings ähnliches, wie für die Expression von HPV16E7 (ca. 100-fach stärkere Expression von HPV16L1hu im Vergleich zu HPV16L1wt in 293T-Zellen) [Leder et al., 2001].

6.0 Diskussion

6.1 Herstellung von HPV16L1-rekombinanten CPMVs

Im ersten Teil dieser Arbeit war es das Ziel, ein alternatives Produktions-Verfahren für eine orale Vakzine gegen eine HPV16-Infektion zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten HPV16-rekombinante Cowpea Mosaic Viren (CPMV) hergestellt werden. Als Basis für diese Methode stand ein zweigeteiltes Vektorsystem zur Verfügung (zur Verfügung gestellt von G. Lomonosoff, John Innes Centre, Norwich, UK), mit dessen Hilfe HPV16-Sequenzen in das virale Genom (CPMV) integriert werden sollten. Dieses Vektorsystem besteht aus der cDNA-1 (RNA-1 von CPMV) und cDNA-2 (RNA-2 von CPMV, siehe Abb. 4). Durch das integrierte 2A-Peptid (von FMDV), welches am C-Terminus des S-Proteins von CPMV angefügt wurde (siehe Abb. 1-8), sollte das HPV16L1-Polypeptid posttranslational autokatalytisch abgespaltet werden und zu VLPs assemblieren (siehe 1.9.2). Etabliert wurde das Vektorsystem mit einem cDNA Volllänge-Klon von CPMV und der in RNA-2 integrierten Sequenz des Reporter-Gens GFP (siehe Abb. 4) [Gopinath et al., 2000]. Ursprünglich wurde das Cowpea Mosaic Virus als Epitop-Präsentations-System entwickelt [Usha et al., 2000]. In dieser Arbeit wurde allerdings das Polypeptid-Expressions-System verwendet, welches die Integration von vollständigen Genen in die RNA-2 von CPMV erlaubt. Zunächst wurden verschieden modifizierte HPV16L1-Gene (siehe Tab. 4) in das Vektorsystem eingeschleust (siehe Abb. 4-4) und mittels einer mechanischen Inokulation in die Blattoberfläche von Cowpeas (*Vigna unguiculata*) einmassiert. Die Methode machte es erforderlich, dass die Plasmide zuvor linearisiert werden, um sie als Mixtur, bestehend aus cDNA-1 und rekombinanter cDNA-2 zu inokulieren. Aufgrund einer zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle im HPV16L1-Gen wurde ein Partialverdau notwendig (siehe Abb. 4-1), die den Anteil der linearisierten DNA verminderte (ca. nur 60 % der DNA liegen linearisiert vor) und somit auch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen CPMV-Infektion limitierte. In den verschiedenen Experimenten, die mit der mechanischen Inokulations-Methode durchgeführt wurden, konnten keine rekombinanten CPMVs hergestellt werden. Es wurden keine CPMV-typischen Symptome sichtbar (siehe Abb. 4-2), abgesehen von den Pflanzen, die mit dem Wild-Typ-Konstrukt oder dem GFP-Konstrukt inokuliert wurden (siehe Abb. 4-3). Auch nach Eliminierung der zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle aus dem HPV16L1-Gen, wodurch ein partieller Verdau hinfällig wurde, führte zu keinem positiven Ergebnis (siehe Tab. 4).

Für eine effizientere Infektion durch rekombinante CPMVs wurde ein weiteres Inokulations-System mit Hilfe eines bereits getesteten GFP-Konstruktes (siehe Abb. 4-6) etabliert. Die Grundlage dieser Methode war die Ausnutzung der natürlichen Eigenschaft von *Agrobacterium tumefaciens*, DNA-Sequenzen in das pflanzliche Genom zu integrieren [Hoekema et al., 1984]. Zu diesem Zweck wurden die viralen Volllänge-Klone von CPMV (RNA-1, RNA-2-rekombinant, siehe Abb. 4-4) in ein binäres Plasmid inseriert (pBINPLUS, siehe 2.8.1), in Agrobakterien transformiert und als Suspension in die Blätter von *Nicotiana benthamiana* inokuliert (siehe 4.2.2). Mit dieser Agro-Inokulations-Methode wurde eine Reihe von verschiedenen CPMV/HPV16-Konstrukten getestet (siehe Tab. 4-1). Allerdings wurde auch in diesen Experimenten deutlich, dass nur das Konstrukt mit der integrierten GFP-Sequenz reproduzierbare positive Ergebnisse zeigte (siehe Abb. 4-6 und Tab. 4-1). Alle mit CPMV/HPV16-inokulierten Pflanzen zeigten keine CPMV-typischen Symptome (siehe Abb. 1-8) und erbrachten in der Westernblot-Analyse und in RT-PCR-Experimenten keine HPV16-spezifischen Signale (siehe Abb. 4-7, 4-9).

In den folgenden Kapiteln sollen mögliche Gründe für die fehlende Expression der HPV16-Gene in den CPMV-infizierten Pflanzen diskutiert werden.

6.1.1 Homologe Rekombination

Eine mögliche Erklärung für die negativen Ergebnisse in diesen Experimenten könnte homologe Rekombination zwischen eingeschleusten viralen HPV-Sequenzen und pflanzeigenen Sequenzen sein, welche die Reversion zum Wild-Typ-Virus favorisieren. Die weit verbreitete und akzeptierte Definition der Rekombination, basierend auf der Sequenzhomologie der rekombinierenden RNA Moleküle, wurde von Lai (1992) aufgestellt. Die Definition stellt die homologe Rekombination der heterologen Rekombination gegenüber. Die homologe Rekombination findet zwischen gleichen oder zumindest ähnlichen Sequenzen statt, die heterologe Rekombination hingegen tritt zwischen RNA Molekülen auf, die keine Homologie und keine Beziehung zueinander aufweisen.

In früheren Untersuchungen wurde schon auf die Möglichkeit der homologen Rekombination (Verlust des Inserts) in dem Ausgangs-Vektor-System (siehe Abb. 1-8) hingewiesen, die allerdings erst nach mehreren Infektions-Passagen auftritt [Gopinath et al., 2000]. Durch die Verwendung eines weiterentwickelten RNA-2-Konstruktes (pCP2/S2A-GFP), welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte die Rekombinations-Häufigkeit deutlich verringert

werden [Mattion et al., 1996]. Welchen Einfluss die Einschleusung von HPV16-Sequenzen auf die Stabilität (Rekombinations-Häufigkeit) des RNA-2-Konstruktes hat, kann aufgrund der negativen Ergebnisse in den Infektions-Experimenten nur gemutmaßt werden. Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint, dass innerhalb der RNA-Viren die Rekombination für die Genomreparaturmechanismen, Erzeugung von Diversität, Adaption und virale Evolution eine wichtige Rolle spielt [Lai et al., 1992; Dolja et al., 1992]. Es gilt weiterhin zu bedenken, dass die Replikation viraler RNA durch eine hohe Fehlerrate, bedingt durch die fehlende Fehlerkorrektur (“proofreading”) der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase (RdRp), gekennzeichnet ist. Diese Eigenschaft, in Zusammenhang mit einer sehr hohen Replikationsrate, führt zu einer dynamischen Viruspopulation (Quasi-Spezies) mit vielen Sequenzvarianten, die unter dem Selektionsdruck stehen, ein funktionelles Genom beizubehalten [Holland., 1998]. Dies spricht unter Umständen dafür, dass die in das virale Genom eingeschleuste Fremdsequenz (HPV16L1) während der Virus-Replikation verloren geht und es deshalb nur zu einer schwachen CPMV-Wild-Typ-Infektion kommt (in einem Experiment bestätigt, siehe 4.2.3 Abb. 4-7c).

6.1.2 Silencing

Ein in letzter Zeit häufig diskutierter Mechanismus ist das sog. „gene silencing“, ein natürlicher Abwehrmechanismus, mit dem sich Pflanzen gegen Virus-Infektionen verteidigen. Von Baulcombe (1996) wurde ein genereller Mechanismus postuliert, der als “posttranscriptional-gene-silencing” (PTGS) bezeichnet wird. Er führt zur sequenz-spezifischen Degradation der viralen RNA [“RNA-mediated virus resistance” (RmVR)]. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei eine zur mRNA des Transgens (durch T-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* in das Pflanzen-Genom eingeschleuste Sequenzen) homologe antisense (as)-RNA, die zwei unterschiedliche Prozesse einleitet. Der eine Prozeß führt zu einer Verhinderung der Akkumulation der Transgen-spezifischen mRNA (PTGS: post-transcriptional gene silencing), während der andere den eigentlichen Resistenzeffekt zur Folge hat, indem die Akkumulation der viralen RNA unterbunden wird (HDR: homology-dependent resistance). Für die Beteiligung der asRNA an der Auslösung des PTGS und der HDR sind mehrere Wirkungsweisen denkbar, die allerdings alle auf der Bildung einer RNA/RNA-Duplex zwischen asRNA und homologen Bereichen in der mRNA des Transgens bzw. der viralen RNA beruhen. Nach einem von Nicholson (1996) vorgeschlagenen Mechanismus

könnte die Bildung der RNA/RNA-Duplex zu einem Abbau der jeweiligen RNA durch Doppelstrang-spezifische RNasen führen. Ebenso kann es durch die Anlagerung der asRNA zu einer Blockierung der Translation des Transgens oder der viralen RNA kommen, wodurch nicht nur die Entstehung von Protein unterbunden wird, sondern auch eine Destabilisierung der jeweiligen RNA bewirkt werden kann [Green et al., 1993]. Eine weitere Möglichkeit, in der eine RNA-Akkumulation auf indirektem Wege beeinflusst werden kann, besteht dagegen nur für die virale RNA. So könnten durch die Anlagerung der asRNA in *cis*-wirkende Elemente des viralen Genoms verdeckt werden, so dass eine Interaktion mit einem viruskodierten Protein nicht mehr möglich ist. Diese Interaktion könnte für verschiedene Prozesse des Infektionsverlaufs, wie der Virusreplikation oder der Virusausbreitung, essentiell sein, so dass eine Inhibition der Interaktion indirekt einen entscheidenden Einfluss auf die Virusakkumulation in der Pflanze haben könnte. Alle diese Faktoren könnten sich auch auf den natürlichen Infektions-Verlauf des CPMVs auswirken, was innerhalb dieser Arbeit allerdings nicht zum Tragen kam. Alle CPMV-Wild-Typ- und GFP-Inokulationen resultierten in einer systemischen Infektion, die sich durch deutliche Symptome (GFP-Fluoreszenz) auf den Blättern infizierter Pflanzen bemerkbar machten (siehe Abb. 4-3, 4-6). Die meisten Untersuchungen über RNA-abhängiges Silencing wurden mit transgenen Pflanzen durchgeführt. Mittlerweile existieren aber auch Arbeiten, die Silencing unabhängig von Transgenen beschreiben und in deren Untersuchungen Silencing durch ein Agrobakterien-vermitteltes transientes System induziert wird [Lisa et al., 2001]. Dieses System wurde auch in dieser Arbeit als verbesserte Inokulations-Methode angewendet, allerdings mit geringem Erfolg. Nur bei Tabak-Pflanzen (*Nicotiana benthamiana*), die mit dem Konstrukt AgropBinPS2NT2AGFP inokuliert wurden, konnten Symptome (GFP-Fluoreszenzen) detektiert werden. Die GFP-Expression in den oberen Pflanzenblättern war allerdings sehr schwach ausgeprägt (siehe Abb. 4.6) und kam im Vergleich mit den CPMVwt-infizierten Pflanzen mit einer großen Verzögerung zum Vorschein (ca. 10 Tage später) und auf den inokulierten Blättern wurden keinerlei Symptome sichtbar. Möglicherweise deuten diese Faktoren auf lokales Silencing hin, das sich später zu einem systemischen Silencing ausweitet, da die GFP-Symptome auch auf den oberen Blättern wieder verschwinden. Begründet ist diese Annahme durch die Untersuchungen von Baulcombe (1999), der die Entstehung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) für die effiziente Induktion von RNA-Silencing verantwortlich macht. Diese Tatsache könnte erklären, warum viele Pflanzenviren (u.a. CPMV) RNA-Silencing induzieren: sie bilden während ihrem Replikationszyklus in einem Zwischenschritt dsRNA. Diese dsRNA wird anschließend durch eine ds-spezifische RNA-Nuklease erkannt und in

kleine RNA-Fragmente gespalten (21-23 Nukleotide) [Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000]. Es wird vermutet, dass die kleinen RNA-Fragmente mit einem oder mehreren nuklease-artigen Proteinen assoziieren und diese zu den Ziel-mRNAs (z.B. virale RNA oder Transgen-mRNA) rekrutieren [Bass et al., 2000]. Die ersten Experimente wurden ausschließlich mit CPMV-HPV16L1-Konstrukten durchgeführt (siehe Tab 4.).

6.1.3 Herstellung von HPV16E7-rekombinanten CPMVs

Aufgrund der oben geschilderten Probleme in der Herstellung von infektiösen rekombinanten CPMVs und den beschriebenen Ursachen, sollte durch die Verwendung einer kürzeren HPV16-Sequenz (E7) getestet werden, ob eine andere in das CPMV-Genom (Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7wt, siehe Tab. 4-1) integrierte Sequenz die oben beschriebenen Mechanismen übersteht und infektiöse HPV16E7-rekombinante CPMVs generiert werden können. In einem weiteren Konstrukt wurde das HPV16E7-Gen kodonmodifiziert, indem die viralen in pflanzeigene Kodons (Cowpea-adaptiert) umgeschrieben wurden (siehe 4.2.5, Abb. 4-10). Aufgrund der modifizierten E7-Sequenz wurde in der späteren Analyse der Pflanzenextrakte (inokuliert mit Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7pl) eine höhere E7-Proteinmenge erwartet, als von Pflanzenextrakten, die mit dem E7-Wild-Typ-Konstrukt (Agro-pBinPS2NT2AHPV16E7wt) inokuliert wurden. Diese Erwartung beruht auf einer Untersuchung, in der das HPV16L1-Gen, wenn es für pflanzliche Zellen Kodon-adaptiert wurde, eine deutlich höhere Expression nach Transfektion in 293T-Zellen, als das unmodifizierte Gen aufweist [Leder et al., 2001].

Diese Aussage konnte allerdings für das HPV16E7-Gen aufgrund der fehlgeschlagenen Infektionen (siehe 4.2.6) in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die durchgeführten Transfektions-Experimente von HPV16E7wt und E7pl (Cowpea Kodons) mit 293T-Zellen zeigten in der Westernblot-Analyse keine sichtbaren Unterschiede in der E7-Proteinmenge (Abbildung nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das in dieser Arbeit verwendete Vektor-System, basierend auf der modifizierten RNA-2 von CPMV (Cowpea Mosaic Virus), für die Expression von HPV16-Proteinen ungeeignet erscheint. Auch die verbesserte Inokulations-Methode (Agro-Inokulation) erbrachte kein positives Ergebnis. Möglicherweise sind die eingeführten viralen Sequenzen (HPV16) für die Auslösung der unter 6.1.1 und 6.1.2 beschriebenen Mechanismen verantwortlich oder die Kombination der CPMV- und HPV16-

Sequenzen spielen gemeinsam eine Rolle. In einem neuen experimentellen Ansatz könnte eventuell durch die Verwendung eines dritten Agro-Konstruktes (neben Agro-RNA-1 und Agro-RNA-2) die Sequenz für ein Silencing-Suppressor (P1/HC-Pro, aus Tobacco Etch Virus) mit eingebracht werden, um das virus-induzierte RNA-abhängige Silencing zu kompensieren.

6.2 DNA-Immunisierung von kodonoptimierten HPV16E7-Konstrukten

Die Modifizierung von HPV16E7 mit Pflanzenkodons, konnte wegen der negativen Resultate in der Herstellung von HPV16E7-rekombinanten CPMVs nicht untersucht werden. In einem weiteren Ansatz im Rahmen dieser Arbeit, sollte der Einfluss von DNA-Modifikationen des HPV16E7-Gens (Humanisierung, +/- Kozak-Sequenz, siehe Tab. 5-1) auf die Immunogenität nach Immunisierung von C57BL/6-Mäusen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde das HPV16E7-Gen von der viralen in die humane Konsensus-Sequenz umgeschrieben (siehe Tab. 5) und als Translations-Verstärker zusätzlich die Kozak-Sequenz vorgeschaltet. In diesem Zusammenhang sollte die Hypothese überprüft werden, ob eine verstärkte Translation der E7-mRNA aufgrund der entsprechenden Verfügbarkeit der spezie-spezifischen tRNAs [Zhou et al., 1999] in einer erhöhten Protein-Expression *in vivo* resultiert und damit im Vergleich mit den unmodifizierten E7-Konstrukten zu einer gesteigerten Immunantwort führt. In früheren Untersuchungen wurde schon gezeigt, dass die unterschiedliche Expression von Genen, die verschiedene Kodons benutzen, um das selbe Protein zu exprimieren, die unterschiedliche Effizienz der Gen-Translation widerspiegelt [Zhou et al., 1999]. Offensichtlich ist die tRNA-Verfügbarkeit der limitierende Faktor für die Translation, wenn Gene Kodons verwenden, die von Genen ihres exprimierenden Wirts nur selten benutzt werden [Zhou et al., 1999]. Verglichen mit den humanen kodierenden Sequenzen unterscheidet sich das HPV-Genom in mindestens zwei Aspekten. 1: Der GC-Gehalt von HPV16 ist bedeutend geringer als der in humanen Genen (siehe 5.1). 2: Das HPV16E7-Gen beinhaltet ein A (Adenin) oder T (Thymin) an der dritten Position in zwei Drittel ihrer Kodons (siehe Tab. 5). So verwendet das HPV16E7-Gen vorzugsweise Kodons, die eher selten in humanen Genen zu finden sind (siehe Tab. 5). Diese Faktoren könnten erklären, warum trotz großer Mengen an viraler mRNA nur geringe Mengen an viralem Protein in HPV-positiven Tumoren und Zelllinien zu finden sind [Cid-Arregui et al., 2003]. Weitere Hinweise auf den Einfluss der Kodon-Modifikation von HPV-Genen geben HPV-Varianten, die durch Mutationen gekennzeichnet sind, welche das Codon-Usage optimieren [Bible et al., 2000; Fujinaga et al., 1994].

6.2.1 Variation der zellulären Immunantwort nach Kodonoptimierung

Die Modulation des HPV16E7-Gens (siehe Tab. 5-1) wurde in DNA-Immunisierungs-Experimenten untersucht und die zelluläre Immunantwort mittels Elispot (siehe 5.2.2) analysiert. Der Einfluss der Humanisierung des HPV16E7wt-Gens auf die Immunantwort wurden schon im *ex vivo* Elispot deutlich (siehe Abb. 5-2). Im Vergleich zu dem unmodifizierten E7-Konstrukt konnte eine deutliche E7-spezifische T-Zell-Aktivierung gezeigt werden. In Analysen von allen auswertbaren Elispots konnte diese Tendenz gezeigt werden (siehe 5.2.2, 5.2.3), wobei der größte Unterschied in der Immunogenität in Abbildung 5-6 gezeigt werden konnte. Vergleicht man die Elispot-Analysen fällt, eine gewisse Variation der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Immunisierungs-Experimenten auf (siehe Abb. 5-4, 5-6). Bei der Immunisierung mit nackter DNA kann es immer zu variierenden Ergebnissen kommen, weil die verwendete DNA nicht immer in der gleichen Qualität vorliegt. Damit eine gleichbleibende Qualität garantiert werden kann, muss die DNA unter standardisierten Bedingungen hergestellt werden (sog. Research Grade, www.plasmidfactory.com). Dabei wird die Reinheit und vor allem der Gehalt an superhelikaler DNA (supercoiled) kontrolliert und garantiert. Normalerweise liegt die DNA in einer Präparation (siehe 3.3.2) immer in mehreren Formen vor (superhelikal, entspannte Form oder nach Degradation linearisiert), wobei die superhelikale Form für einen effizienten Gentransfer am vorteilhaftesten ist [Prazeres et al., 1999]. Damit DNA-Immunisierungs-Experimente exakt miteinander vergleichbar sind, sollten diese Parameter (Reinheit, DNA-Form) innerhalb einer Experiment-Reihe gleich sein. In dieser Arbeit konnte nur darauf geachtet werden, dass die zu vergleichenden Immunisierungen mit der gleichen DNA-Präparation durchgeführt wurden. Im Bezug auf eine spätere klinische Applikation ist die Spezifikation der Plasmid-DNA und eine genaue Definition (GMP-Standard) absolut notwendig [Marquet et al., 1997]. Die DNA-Stabilität ist ein weiterer Parameter, der in die Immunisierungs-Studien mit einfließt. Hierbei spielt die Langzeit-Lagerung der DNA eine entscheidende Rolle [Walther et al., 2002]. Untersuchungen haben gezeigt, dass bei -80°C DNA bis zu 13 Monaten stabil bleibt, wobei schon bei $+4^{\circ}\text{C}$ die DNA-Topologie sich auf dramatische Weise verändert. Liegt zu Beginn die Plasmid-DNA überwiegend in der ccc-Form (superhelikal) vor, so findet man nach ca. 1 Jahr fast ausschließlich noch die oc-Form (ringförmig, offene), was für eine zunehmende Degradation der gelagerten Plasmid-DNA unter diesen Lagerungs-Bedingungen spricht [Walther et al., 2002]. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen DNA-Präparationen nicht explizit auf ihren Gehalt an der ccc-Form analysiert. Es liegt allerdings nahe, dass die DNA-Qualität in den DNA-Immunisierungen Schwankungen unterlag.

6.2.2 Applikation und Modifikation bestimmt die Art der Immunantwort (TH1/TH2)

Wie schon aus anderen Untersuchungen bekannt ist, hat die Applikations-Methode (intramuskulär, subkutan, Gene-Gun) entscheidenden Einfluss auf die Art der Immunantwort [Aberle et al., 1999]. So konnte gezeigt werden, dass nach i.m Applikation einer DNA-Vakzine, nur geringe Mengen an IL-4 und IL-5 im Vergleich zu hohen Mengen IFN γ detektiert werden konnten, wogegen nach Gene-Gun-Applikation deutlich höhere Mengen an IL-4/IL-5 feststellbar waren. Dies spricht für eine TH2-gerichtete (humorale) Immunantwort nach Gene-Gun-Immunsierung, wogegen hohe Mengen an IFN γ nach i.m Immunsierung auf eine TH1-gerichtete (zelluläre) Immunantwort hinweisen [Aberle et al., 1999]. In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen HPV16E7-Konstrukte ausschließlich intramuskulär appliziert, wobei die verstärkte zelluläre Immunantwort im Elispot (siehe Abb. 5-6) im Vergleich zu einer sehr schwachen Antikörperantwort im ELISA (siehe Abb. 5-10, 5-12), die oben diskutierten Beobachtungen bestätigen. Diese Arbeit basiert auf der Hypothese, dass durch DNA-Immunsierung einer kodonoptimierten HPV16E7-DNA-Vakzine eine an sich schwache CTL-Antwort [Michel et al., 2002] bedeutend gesteigert werden kann [Haas et al., 1996; Zhou et al., 1999]. Der Mechanismus, der für die Induktion nach i.m DNA-Immunsierung verantwortlich ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die i.m Applikation zu einer schwachen Transfektion von Myozyten führt [Wolff et al., 1991]. Myozyten exprimieren allerdings nur wenige MHC-KlasseI-Moleküle auf ihrer Oberfläche, wogegen MHC-KlasseII- und kostimulatorische Moleküle (B7.1) nicht exprimiert werden. Deshalb kommen Myozyten für eine direkte Induktion einer CTL-Antwort nicht in Frage [Jefferey et al., 1997]. Genauere Untersuchungen lassen vermuten, dass die CTL-Induktion durch direkte Transfektion von APCs (antigen-präsentierenden Zellen) nach i.m DNA-Immunsierung ausgelöst wird [Doe et al., 1996; Corr et al., 1996] oder durch den sog. „Cross-Priming-Mechanismus“ [Cho et al., 2001], in dem das Antigen von Myozyten auf APCs (z.B dendritische Zellen) übertragen wird. Dendritische Zellen (DC) können dann zwei Arten von Immunantworten auslösen. Th1 und Th2 Zellen werden von verschiedenen Faktoren der Immunantwort induziert. Interferon γ (IFN γ) kann als Marker einer Th1 Antwort und Interleukin-4 (IL-4) als Marker einer Th2 Antwort verwendet werden. IFN γ unterstützt die Expression von Rezeptoren auf Th1 Zellen und inhibiert die Th2 Entwicklung. IL-4 wiederum inhibiert die Th1 Entwicklung und senkt die IFN γ Synthese [Janeway et al., 1994; Carter et al., 1996, Abbas et al., 1996, London et al., 1998].

Nach DNA-Vakzinierung kann weder „Priming“ noch „Cross-Priming“ der exklusive Mechanismus für die Induktion einer starken CTL-Antwort sein [Whitton et al., 1999]. Deshalb kann nur spekuliert werden, auf welche Weise das kodonoptimierte (humanisierten) E7-Gen die Immunantwort verbessert. Möglicherweise ist die erhöhte Expression aufgrund einer verbesserten Translation des E7-Gens ausschlaggebend für eine stärkere Immunogenität. Auf der anderen Seite könnte die Kodon-Modifikation von E7-Konstrukten auch eine höhere Stabilität (längere Halbwertszeit) und die erhöhte *de novo* Synthese des Proteins im Vergleich mit den unmodifizierten Konstrukten bewirken (siehe Abb. 5-15). In dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, welchen enormen Einfluss Kodonoptimierung und die Verwendung der Kozak-Sequenz auf die E7-Protein-Expression haben. Ein denkbarer Mechanismus für die effizientere Induktion einer zellulären Immunantwort durch Kodonoptimierung, könnte die starke E7-Protein-Expression in den durch DNA-Immunisierung transfizierten Myozyten sein. Die oben beschriebene längere Halbwertszeit (höhere Stabilität durch Kodonoptimierung) führt zu einer Ansammlung des Proteins in der Zelle, was wiederum den durch Apoptose oder Nekrose verursachten Transfer des Proteins zu APCs unterstützt [Michel et al., 2002]. Vermutlich ist das Zusammenwirken von direkt transfizierten APCs und die Proteinansammlung in Myozyten und die dadurch induzierte Nekrose oder Apoptose dafür verantwortlich, dass es zu einem verstärkten E7-Protein-Transfer zu APCs führt, was wiederum die Immunantwort deutlich erhöhen könnte. Auf der anderen Seite erklärt die längere Protein-Halbwertszeit nicht unbedingt eine verbesserte Immunogenität. Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, in denen Proteine an Ubiquitin fusioniert und somit die Halbwertszeit durch beschleunigte Degradation verkürzt wurde. Infolgedessen konnte die CTL-Antwort bedeutend gesteigert werden [Rodriguez et al., 1997].

Betrachtet man die Elisa-Daten zur Antikörperdetektion nach DNA-Immunisierung, so fällt in dieser Arbeit auf, dass es zu einer ähnlichen Antikörperantwort kommt, unabhängig davon, ob mit dem kodonoptimierten oder mit dem authentischen HPV16E7-Wild-Typ-Gen immunisiert wurde (siehe Abb. 5-10, 5-12). So scheint die Kodonmodifizierung von HPV16E7, die mit einer erhöhten E7-Protein-Expression assoziiert ist (siehe Abb. 5-15a), spezifisch die CTL-Antwort gegen E7 zu verstärken. Möglicherweise sind höhere Level an Antigen-Expression eher für eine starke T-Zell-vermittelte Immunität, als für eine Antikörperantwort notwendig. Diese Beobachtung steht im Kontrast zu anderen Untersuchungen, die Kodonmodifizierung von anderen Genen in direkten Zusammenhang mit einer verbesserten Antikörperantwort bringen [Andre et al., 1998; Leder et al., 2001]. Der Mechanismus, der für die Induktion einer Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung verantwortlich ist, ist noch nicht vollständig

geklärt. Wo intrazelluläre Antigene nur schwach sezerniert werden, wie es für HPV16E7 der Fall ist [Liu et al., 2002], könnte die Induktion einer Antikörperantwort durch die Lyse der E7-exprimierenden Zellen durch die spezifisch induzierte zelluläre Immunantwort ausgelöst werden [Griesenbach et al., 1998]. Dies erklärt jedoch nicht die schwache Antikörperantwort der Versuchstiergruppe, die mit dem optimierten E7-Konstrukt immunisiert wurden. Durch die starke Expression sollte auch mehr E7-Protein im Umlauf kommen und damit auch mehr Protein an B-Zellen gebunden sein, die zuvor durch eine entsprechende T-Helfer-Antwort in den ableitenden Lymphknoten „geprimed“ wurden.

6.2.3 Transfektions-Experimente mit 293T- und NIH3T3-Zellen

Die unterschiedliche Immunogenität der verschieden modifizierten HPV16E7-Konstrukte sollten in transienten Transfektions-Experimenten reproduziert werden. Ziel war es, eine direkte Korrelation zwischen der Immunogenität und der Expressionsstärke eines Konstruktes zu überprüfen. Zunächst wurden 293T-Zellen (siehe 2.11.1.4) mit modifizierten HPV16E7-DNA-Konstrukten (siehe Tab. 5-1) transfiziert und die Proteinexpression im Westernblot analysiert. Die Experimente zeigten deutlich die unterschiedlichen Einflüsse von DNA-Modifikationen im E7-Gen. So konnte gezeigt werden, dass die Kodonoptimierung (Humanisierung) die stärkste Proteinexpression vermittelt, gefolgt von der 5'-fusionierten Kozak-Sequenz, die ebenfalls noch eine deutliche Steigerung der Expression im Vergleich zum unmodifizierten E7-Wild-Typ-Gen zeigt (siehe Abb. 5-15). Bei 293T-Zellen handelt es sich um eine humane epitheliale Nierenzelllinie, die durch das Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert wurden. Sie exprimieren zusätzlich das große SV40 T-Antigen (293T-Zellen), was die episomale Replikation von Plasmiden erlaubt, die einen SV40 ori und eine frühe Promotorregion enthalten. Aus diesem Grund exprimieren sie gut nach transienter Transfektion [Takagi et al., 2000]. Für das transfizierte humanisierte E7-Konstrukt wurde daher in einer humanen Zelllinie auch die höchste Protein-Expression erwartet, weil die verwendeten Kodons auf die Verfügbarkeit der tRNAs abgestimmt ist (siehe Abb. 5-15a, Spuren 6+7). Um die unterschiedliche Expression auch in Mauszellen unter Beweis zu stellen, wurden nach der gleichen Methode NIH3T3-Zellen (siehe 2.11.1.4) mit den modifizierten E7-Konstrukten transfiziert (siehe Abb. 5-18). Überraschenderweise konnten die deutlichen Expressions-Unterschiede in 293T-Zellen in den Mauszellen nicht reproduziert werden. Mit einer Computer-Software (ImageQuant 5.0) konnte ermittelt werden, dass die humanisierten pTHHPV16E7-Konstrukte im Vergleich zum E7-Wild-Typ-Konstrukt (pTHHPV16E7wt-K)

lediglich eine 2,3-fach höhere Expression zeigten (siehe Tab. 5-5). Da sich das „Codon-Usage“ im murinen und humanen System nur um wenige Prozent (8%) unterscheidet, kann dieser Unterschied nicht als Erklärung für die viel geringere E7-Proteinexpression in NIH3T3-Zellen sein. Für eine weitere Untersuchung der Diskrepanz, wurden die Histogramme aus der FACS-Analyse (Transfektions-Effizienz, siehe Abb. 5-20) verglichen. Deutlich wurde, dass nach Kotransfektion (siehe 5.3.4) von 293T- und NIH3T3-Zellen es zu einer unterschiedlichen Verteilung der GFP-Fluoreszenz kommt. Dies lässt sich damit erklären, dass nicht so viele NIH3T3-Zellen transfiziert wurden im Vergleich zu 293T-Zellen und dass die Zellen wahrscheinlich von unterschiedlich vielen Plasmiden transfiziert wurden, wodurch es zu Unterschieden in der Fluoreszenz kommt (siehe Tab. 5-6). Vergleicht man die durchschnittliche mittlere GFP-Fluoreszenz in Tabelle 5-6, so erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen 293T-Zellen (328) und NIH3T3-Zellen (18,5). Dieser Unterschied, zusammen mit der niedrigeren Transfektions-Effizienz, könnte die große Diskrepanz zu den Ergebnissen in der E7-Protein-Expression mit 293T-Zellen erklären. Im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Transfektions-Experimenten mit NIH3T3-Zellen, stehen die im Mausmodell erhaltenen Immunisierungs-Daten, die eine klare Korrelation zwischen der gesteigerten E7-Protein-Expression *in vitro* (293T-Zellen) und der verstärkten Immunogenität der humanisierten E7-Konstrukte *in vivo* zeigen. Einer der Unsicherheitsfaktoren bei der *in vivo* DNA-Immunisierung bleibt, dass man nur vermuten kann, welche Zellen durch die Immunisierung direkt transfiziert werden. Möglicherweise werden die durch die ausgelöste Entzündung im Muskel (siehe Kardiotoxin-Vorbehandlung, 3.5.2) eingewanderten APCs (z.B. dendritische Zellen) zu einem großen Teil direkt transfiziert und induzieren wiederum durch eine verstärkte E7-Proteinexpression (Präsentation über MHC-Klasse I) direkt CD8⁺-CTLs [Porgador et al., 1998]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass murine primäre dendritische Zellen zwar mit einer Effizienz von maximal 19% transfizierbar sind, allerdings im Westernblot keine E7-Proteinexpression nachweisbar war. Also gibt es möglicherweise einen Unterschied in der *in vitro* bzw. *in vivo* Expression in DCs, oder die Immunogenität beruht auf cross-priming nach Expression in anderen Zellen, die in dem *in vitro* Ansatz nicht getestet wurden.

7.0 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde versucht basierend auf einem Pflanzen-Virus-Vektorsystem verschiedene HPV16 rekombinante Viren herzustellen. Als Träger der HPV16-Sequenzen wurde die RNA-2 des Cowpea Mosaic Virus verwendet (siehe Abb. 4a). Ziel war die billige Herstellungsweise einer anti-HPV16-Vakzine in Pflanzen (*Vigna unguiculata*) im großen Maßstab. Zu diesem Zweck wurden die HPV16-Gene L1 und E7 in das CPMV-Vektorsystem inkloniert und mit zwei unterschiedlichen Methoden in Pflanzen appliziert. Die ersten Experimente wurden mit pCP2/S-2A-HPV16L1 (RNA-2) mittels der mechanischen Inokulation durchgeführt (siehe 3.2.1). Mit dieser Methode konnte allerdings nur mit den Kontroll-Konstrukten (pCP2/S-2A, pCP2/S-2A-GFP) eine systemische CPMV-Infektion an Hand der Symptome beobachtet werden (siehe Abb. 4-2, 4-3). Alle anderen Experimente mit den rekombinanten Konstrukten (HPV16L1) schlugen fehl (siehe Tab. 4). Auch ein effektiveres Inokulationssystem (Agrobakterien-Inokulation, siehe 3.2.2) resultierte abgesehen von den Kontroll-Konstrukten in keinem positiven Ergebnis (siehe Tab. 4-1). Innerhalb der oben beschriebenen Experimente sollte der Einfluss des Pflanzen-Kodon-optimierten HPV16E7 auf die Protein-Expression untersucht werden. Dies konnte allerdings aufgrund der negativen Ergebnisse in den Pflanzen nicht analysiert werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des „Codon Usage“, allerdings mit den humanisierten HPV16-Genen E7 und L1 in DNA-Immunisierungs-Experimenten weiterverfolgt. Unterschiedlich modifizierte HPV16-DNA-Konstrukte (siehe Tab. 5-1, 5.4.1) wurden als DNA-Vakzine i.m in Mäuse appliziert und mittels Elispot und Zytotoxizitätstest die zelluläre Immunantwort analysiert. In allen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Humanisierung der HPV16-Gene den größten Einfluss auf die Immunogenität hat und dass die zusätzliche Fusion der Kozak-Sequenz am 5'-Ende der HPV16E7-Sequenzen eher einen geringen Einfluss ausübte (siehe Abb. 5-5, 5-6, 5-7). Als Hauptursache für die verbesserte Immunogenität der humanisierten E7-Konstrukte, im Vergleich mit dem unmodifizierten E7-Wild-Typ-Gen, wurde die erhöhte Translation und damit die verstärkte E7-Protein-Expression vermutet. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die modifizierten E7-Konstrukte in transienten Transfektion-Experimenten (293T-Zellen) analysiert (siehe 5.3.2). Vergleicht man nun die Daten aus den DNA-Immunisierungen und den Transfektionen, so erkennt man eine direkte Korrelation der verstärkten Expression *in vitro* (siehe Abb. 5-15) und einer ebenso verbesserten Immunogenität *in vivo* (siehe Abb. 5-4, 5-6, 5-7). Dies gilt allerdings nur für die zelluläre Immunantwort und nicht für die humorale (ähnliche niedrige Antikörperantworten).

8.0 Anhang

Sequenz von HPV16E7opt (humanisiert, siehe Tab. 5)

```

      ATGCACGGCGACACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCCCGAGACCACC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TACGTGCCGCTGTGGGGTGGGACGTGCTCATGTACGACCTGGACGTCGGGCTCTGGTGG

a      M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T -

      GACCTGTACTGCTACGAGCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAGGAGGATGAGATCGACGGC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CTGGACATGACGATGCTCGTCGACTTGCTGTGTCGTCGCTCCTCCTCCTACTCTAGCTGCCG

a      D L Y C Y E Q L N D S S E E E D E I D G -

      CCCGCCGGCCAGGCTGAGCCCCGACCGGGCCCACTACAACATCGTGACCTTCTGCTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GGGCGGCCGGTCCGACTCGGGCTGGCCCCGGGTGATGTTGTAGCACTGGAAGACGACGTTC

a      P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K -

      TGCGACAGCACCTGCGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATCCGGACCCCTGGAG
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
      ACGCTGTGCTGGGACGCCGACACGCACGTCTCGTGGGTGCACCTGTAGGCCTGGGACCTC

a      C D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E -

      GACCTGCTGATGGGCACCCTGGGCATCGTGTGCCCCATCTGCAGCCAGAAACCCTAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 297
      CTGGACGACTACCCGTGGGACCCGTAGCACACGGGGTAGACGTCGGTCTTTGGGATT

a      D L L M G T L G I V C P I C S Q K P * -

```


Sequenz von HPV16E7pI (Cowpea-Kodon-adaptiert, siehe 4.2.5)

```

      ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TACGTACCTCTATGTGGATGTAACGTACTTATATACAATCTAAACGTTGGTCTCTGTTGA
a      M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T -

      GATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CTAGAGATGACAATACTCGTTAATTTACTGTGCGAGTCTCCTCCTCCTACTTTATCTACCA
a      D L Y C Y E Q L N D S S E E E D E I D G -

      CCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GGTCGACCTGTTTCGTCTTGGCCTGTCTCGGGTAATGTTATAACATTGGAAAACAACGTT
a      P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K -

      TGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      ACACTGAGATGCGAAGCCAACACGCATGTTTCGTGTGTGCATCTGTAAGCATGAAACCTT
a      C D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E -

      GACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 297
      CTGGACAATTACCCGTGTGATCCTTAACACACGGGGTAGACAAGAGTCTTTGGTATT
a      D L L M G T L G I V C P I C S Q K P *

```

Wild-Typ-Sequenz von HPV16E7

```

      ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TACGTACCTCTATGTGGATGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAACGTAAC
a      M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T -

      GATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
      CTAGAGATGACAATACTCGTTAATTTACTGTGCGAGTCTCCTCCTCCTACTTTATCTACCA
a      D L Y C Y E Q L N D S S E E E D E I D G -

      CCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GGTCGACCTGTTTCGTCTTGGCCTGTCTCGGGTAATGTTATAACATTGGAAAACAACGTT
a      P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K -

      TGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTTAGACATTCGTACTTTGGAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
      ACACTGAGATGCGAAGCCAACACGCATGTTTCGTGTGTGCATCTGTAAGCATGAAACCTT
a      C D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E -

      GACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 297
      CTGGACAATTACCCGTGTGATCCTTAACACACGGGGTAGACAAGAGTCTTTGGTATT
a      D L L M G T L G I V C P I C S Q K P * -

```

Sequenz von HPV16L1h (humanisiert, siehe 5.4.1) [Leder et al., 2001]

```

ATGAGCCTGTGGCTGCCCAGCGAGGCCACCGTGTACCTGCCCCCGTGCCCGTGAGCAAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTCGGACACCGACGGGTCGCTCCGGTGGCACATGGACGGGGGGCACGGGCACTCGTTC

a  M S L W L P S E A T V Y L P P V P V S K -

GTGGTGAGCACCGACGAGTACGTGGCCAGGACCAACATCTACTACCACGCCGGCACCAGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CACCACCTCGTGGCTGCTCATGCACCGGTCCTGGTTGTAGATGATGGTGCGGCCGTGGTTCG

a  V V S T D E Y V A R T N I Y Y H A G T S -

AGGCTGCTGGCCGTGGGCCACCCCTACTTCCCCATCAAGAAGCCCAACAACAACAAGATC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCCGACGACCGGCACCCGGTGGGGATGAAGGGGTAGTTCTTCGGGTTGTTGTTGTTCTAG

a  R L L A V G H P Y F P I K K P N N N K I -

CTGGTGCCCAAGGTGAGCGGCCTGCAGTACAGGGTGTTCAGGATCCACCTGCCCGACCCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GACCACGGGTTCCACTCGCCGGACGTCATGTCCACAAAGTCTAGGTGGACGGGCTGGGG

a  L V P K V S G L Q Y R V F R I H L P D P -

AACAAAGTTTCGGCTTCCCCGACACCAGCTTCTACAACCCCGACACCCAGAGGCTGGTGTTGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTGTTCAAGCCGAAGGGGCTGTGGTTCGAAGATGTTGGGGCTGTGGGTCTCCGACCACACC

a  N K F G F P D T S F Y N P D T Q R L V W -

GCCTGCGTGGGCGTGGAGGTGGGCAGGGGCCAGCCCCTGGGCGTGGGCATCAGCGGCCAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CGGACGCACCCGCACCTCCACCCGTCCCCGGTTCGGGGACCCCGCACCCGTAGTCGCCGGTG

a  A C V G V E V G R G Q P L G V G I S G H -

CCCCTGCTGAACAAGCTGGACGACACCCGAGAACGCCAGCGCCTACGCCCAACGCCGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GGGGACGACTTGTTTCGACCTGCTGTGGCTCTTGCGGTCGCGGATGCGGCGGTTGCGGCCG

a  P L L N K L D D T E N A S A Y A A N A G -

GTGGACAACAGGGAGTGCATCAGCATGGACTACAAGCAGACCCAGCTGTGCCTGATCGGGC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CACCTGTTGTCCCTCACGTAGTCGTACCTGATGTTTCGTCTGGGTTCGACACGGACTAGCCC

a  V D N R E C I S M D Y K Q T Q L C L I G -

TGCAAGCCCCCATCGGCGAGCACTGGGGCAAGGGCAGCCCCTGCACCAACGTGGCCGTG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ACGTTTCGGGGGGTAGCCGCTCGTGACCCCGTTCCCGTTCGGGGACGTGGTTGCACCCGGCAC

a  C K P P I G E H W G K G S P C T N V A V -

AACCCCGGGCGACTGCCCCCCCCTGGAGCTGATCAACACCGTGATCCAGGACGGCGACATG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TTGGGGCCGCTGACGGGGGGGACCTCGACTAGTTGTGGCACTAGGTCTCCGCTGTAC

a  N P G D C P P L E L I N T V I Q D G D M -

```

GTGGACACCGGCTTCGGCGCCATGGACTTCACCACCCTGCAGGCCAACAAAGAGCGAGGTG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 CACCTGTGGCCGAAGCCGCGGTACCTGAAGTGGTGGGACGTCCGGTTGTTCTCGCTCCAC
 a V D T G F G A M D F T T L Q A N K S E V -
 CCCCTGGACATCTGCACCAGCATCTGCAAGTACCCCGACTACATCAAGATGGTGAGCGAG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 GGGGACCTGTAGACGTGGTTCGTAGACGTTTCATGGGGCTGATGTAGTTCTACCACTCGCTC
 a P L D I C T S I C K Y P D Y I K M V S E -
 CCCTACGGCGACAGCCTGTTCTTCTACCTGAGGAGGGAGCAGATGTTCTGTGAGGCACCTG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 GGGATGCCGCTGTTCGGACAAGAAGATGGACTCCTCCCTCGTCTACAAGCACTCCGTGGAC
 a P Y G D S L F F Y L R R E Q M F V R H L -
 TTCAACAGGGCCGGCGCCGTGGGCGAGAACGTGCCCGACGACCTGTACATCAAGGGCAGC
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 AAGTTGTCCCGGCCGCGGCACCCGCTCTTGCACGGGCTGCTGGACATGTAGTTCCCGTGC
 a F N R A G A V G E N V P D D L Y I K G S -
 GGCAGCACCGCCAACCTGGCCAGCAGCAACTACTTCCCCACCCCAAGCGGCAGCATGGTG
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 CCGTTCGTGGCGGTTGGACCGGTCGTCGTTGATGAAGGGGTGGGGTTCGCCGTCGTACCAC
 a G S T A N L A S S N Y F P T P S G S M V -
 ACCAGCGACGCCAGATCTTCAACAAGCCCTACTGGCTGCAGAGGGCCAGGGCCACAAC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 TGGTTCGCTGCGGGTCTAGAAGTTGTTCCGGATGACCGACGTCTCCCGGGTCCCGGTGTTG
 a T S D A Q I F N K P Y W L Q R A Q G H N -
 AACGGCATCTGCTGGGGCAACCAGCTGTTTCGTGACCGTGGTGGACACCACCAGGAGCACC
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 TTGCCGTAGACGACCCCGTTGGTCGACAAGCACTGGCACCACCTGTGGTGGTCCCTCGTGG
 a N G I C W G N Q L F V T V V D T T R S T -
 AACATGAGCCTGTGCGCCGCCATCAGCACCAGCGAGACCACCTACAAGAACACCAACTTC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 TTGTAICTCGGACACGCGCGGTAGTCGTGGTTCGCTCTGGTGGATGTTCTTGTGGTTGAAG
 a N M S L C A A I S T S E T T Y K N T N F -
 AAGGAGTACCTGAGGCACGGCGAGGAGTACGACCTGCAGTTCATCTTCCAGCTGTGCAAG
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 TTCCTCATGGACTCCGTGCCGCTCCTCATGCTGGACGTCAAGTAGAAGGTGCACACGTTCC
 a K E Y L R H G E E Y D L Q F I F Q L C K -
 ATCACCTGACCGCCGACGTGATGACCTACATCCACAGCATGAACAGCACCATCCTGGAG
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 TAGTGGGACTGGCGGCTGCACTACTGGATGTAGGTGTCGTAATTGTCGTGGTAGGACCTC
 a I T L T A D V M T Y I H S M N S T I L E -
 GACTGGAACCTTCGGCCTGCAGCCCCCCCCGGCGGCACCCTGGAGGACACCTACAGGTTCC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 CTGACCTTGAAGCCGGACGTTCGGGGGGGGCCGCCGTGGGACCTCCTGTGGATGTCCAAG

a D W N F G L Q P P P G G T L E D T Y R F -
 GTGACCAGCCAGGCCATCGCCTGCCAGAAGCACACCCCCCGCCCCAAGGAGGACCCC
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 CACTGGTCCGGTCCGGTAGCGGACGGTCTTCGTGTGGGGGGGCGGGGGTTCTCTGGGG

a V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D P -
 CTGAAGAAGTACACCTTCTGGGAGGTGAACCTGAAGGAGAAGTTCAGCGCCGACCTGGAC
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 GACTTCTTCATGTGGAAGACCCTCCACTTGGACTTCTCTTCAAGTCGCGGCTGGACCTG

a L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D -
 CAGTTCCTCCCTGGGCAGGAAGTTCCTGCTGCAGGCCGGCCTGAAGGCCAAGCCCAAGTTC
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 GTCAAGGGGGACCCGTCCTTCAAGGACGACGTCCGGCCGGACTTCCGGTTCGGGTTCAAG

a Q F P L G R K F L L Q A G L K A K P K F -
 ACCCTGGGCAAGAGGAAGGCCACCCCCACCACCAGCAGCACCAGCACCACCGCCAAGAGG
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 TGGGACCCGTTCTCCTTCCGGTGGGGGTGGTGGTCGTGGTGGTGGTGGCGGTTCTCC

a T L G K R K A T P T T S S T S T T A K R -
 AAGAAGAGGAAGCTGTGA
1501 -----+----- 1518
 TTCTTCTCCTTCGACACT

a K K R K L * -

9.0 Referenzen

- ALCAMI, A., and KOSZINOWSKI, U. H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol* **8**(9), 410-8.
- ALEXANDER, M., SALGALLER, M. L., CELIS, E., SETTE, A., BARNES, W. A., ROSENBERG, S. A., and STELLER, M. A. (1996). Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope. *Am J Obstet Gynecol* **175**(6), 1586-93.
- ALONSO, L. G., GARCIA-ALAI, M. M., NADRA, A. D., LAPENA, A. N., ALMEIDA, F. L., GUALFETTI, P., and PRAT-GAY, G. D. (2002). High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners. *Biochemistry* **41**(33), 10510-8.
- ALVAREZ-SALAS, L. M., CULLINAN, A. E., SIWKOWSKI, A., HAMPEL, A., and DIPAOLO, J. A. (1998). Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3), 1189-94.
- ANDRE, S., SEED, B., EBERLE, J., SCHRAUT, W., BULTMANN, A., and HAAS, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* **72**(2), 1497-503.
- ANKENBAUER, RG AND EW NESTER (1990). Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *Journal of Bacteriology* **172**: 6442-6446.
- ARENDS, M. J., DONALDSON, Y. K., DUVALL, E., WYLLIE, A. H., and BIRD, C. C. (1993). Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum Pathol* **24**(4), 432-7.
- BAGCHI, S., RAYCHAUDHURI, P., and NEVINS, J. R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**(4), 659-69.
- BALL, J. M., GRAHAM, D. Y., OPEKUN, A. R., GILGER, M. A., GUERRERO, R. A., and ESTES, M. K. (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* **117**(1), 40-8.
- BANDARA, L. R., ADAMCZEWSKI, J. P., HUNT, T., and LA THANGUE, N. B. (1991). Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* **352**(6332), 249-51.
- BARBOSA, M. S. (1996). The oncogenic role of human papillomavirus proteins. *Crit Rev Oncog* **7**(1-2), 1-18.
- 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**(1), 153-60.
- BARNARD, P., and MCMILLAN, N. A. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* **259**(2), 305-13.
- BARNES, W., DELGADO, G., KURMAN, R. J., PETRILLI, E. S., SMITH, D. M., AHMED, S., LORINCZ, A. T., TEMPLE, G. F., JENSON, A. B., and LANCASTER, W. D. (1988). Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol Oncol* **29**(3), 267-73.
- BEDELL, M. A., JONES, K. H., GROSSMAN, S. R., and LAIMINS, L. A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol* **63**(3), 1247-55.
-

- BELNAP, D. M., OLSON, N. H., CLADEL, N. M., NEWCOMB, W. W., BROWN, J. C., KREIDER, J. W., CHRISTENSEN, N. D., and BAKER, T. S. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol* **259**(2), 249-63.
- BEVAN, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**(22), 8711-21.
- 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.
- BOUVARD, V., STOREY, A., PIM, D., and BANKS, L. (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo J* **13**(22), 5451-9.
- BOYER, S. N., WAZER, D. E., and BAND, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**(20), 4620-4.
- BULLER, C. R., and MOXLEY, R. A. (1988). Natural infection of porcine ileal dome M cells with rotavirus and enteric adenovirus. *Vet Pathol* **25**(6), 516-7.
- BUTZ, K., DENK, C., ULLMANN, A., SCHEFFNER, M., and HOPPE-SEYLER, F. (2000). Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12), 6693-7.
- CANO, F., LILJEQVIST, S., NGUYEN, T. N., SAMUELSON, P., BONNEFOY, J. Y., STAHL, S., and ROBERT, A. (1999). A surface-displayed cholera toxin B peptide improves antibody responses using food-grade staphylococci for mucosal subunit vaccine delivery. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**(3), 289-98.
- CHATTERJI, A., BURNS, L. L., TAYLOR, S. S., LOMONOSSOFF, G. P., JOHNSON, J. E., LIN, T., and PORTA, C. (2002). Cowpea mosaic virus: from the presentation of antigenic peptides to the display of active biomaterials. *Intervirology* **45**(4-6), 362-70.
- CHIANG, C. M., USTAV, M., STENLUND, A., HO, T. F., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13), 5799-803.
- CHIRGWIN, K. D., FELDMAN, J., AUGENBRAUN, M., LANDESMAN, S., and MINKOFF, H. (1995). Incidence of venereal warts in human immunodeficiency virus-infected and uninfected women. *J Infect Dis* **172**(1), 235-8.
- CHO, J. H., YOUN, J. W., and SUNG, Y. C. (2001). Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J Immunol* **167**(10), 5549-57.
- CHU, N. R., WU, H. B., WU, T., BOUX, L. J., SIEGEL, M. I., and MIZZEN, L. A. (2000). Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* **121**(2), 216-25.
- CID-ARREGUI, A., JUAREZ, V., and ZUR HAUSEN, H. (2003). A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J Virol* **77**(8), 4928-37.
- COPELAND, N. G., ZELENETZ, A. D., and COOPER, G. M. (1979). Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell* **17**(4), 993-1002.
- CORR, M., TIGHE, H., LEE, D., DUDLER, J., TRIEU, M., BRINSON, D. C., and CARSON, D. A. (1997). Costimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J Immunol* **159**(10), 4999-5004.
-

- CRIFE, T. P., HAUGEN, T. H., TURK, J. P., TABATABAI, F., SCHMID, P. G., 3RD, DURST, M., GISSMANN, L., ROMAN, A., and TUREK, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *Embo J* **6**(12), 3745-53.
- CROOK, T., MORGENSTERN, J. P., CRAWFORD, L., and BANKS, L. (1989). Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ- ras. *Embo J* **8**(2), 513-9.
- CRUZ, S. S., CHAPMAN, S., ROBERTS, A. G., ROBERTS, I. M., PRIOR, D. A., and OPARKA, K. J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13), 6286-90.
- DA SILVA, D. M., VELDEERS, M. P., NIELAND, J. D., SCHILLER, J. T., NICKOLOFF, B. J., and KAST, W. M. (2001). Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* **13**(5), 633-41.
- DANKO, I., FRITZ, J. D., JIAO, S., HOGAN, K., LATENDRESSE, J. S., and WOLFF, J. A. (1994). Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* **1**(2), 114-21.
- DAVIS, H. L., DEMENEIX, B. A., QUANTIN, B., COULOMBE, J., and 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.
- DE VILLIERS, E. M. (1997). Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* **15**(2), 199-206.
- DEL VECCHIO, A. M., ROMANCZUK, H., HOWLEY, P. M., and BAKER, C. C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* **66**(10), 5949-58.
- DEML, L., BOJAK, A., STECK, S., GRAF, M., WILD, J., SCHIRMBECK, R., WOLF, H., and WAGNER, R. (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol* **75**(22), 10991-1001.
- DESSENS, J. T., and LOMONOSSOFF, G. P. (1993). Cauliflower mosaic virus 35S promoter-controlled DNA copies of cowpea mosaic virus RNAs are infectious on plants. *J Gen Virol* **74** (Pt 5), 889-92.
- DIORENZO, T. P., TAMSEN, A., ABRAMSON, A. L., and STEINBERG, B. M. (1992). Human papillomavirus type 6a DNA in the lung carcinoma of a patient with recurrent laryngeal papillomatosis is characterized by a partial duplication. *J Gen Virol* **73**(Pt 2), 423-8.
- DOLJA, V. V., HERNDON, K. L., PIRONE, T. P., and CARRINGTON, J. C. (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J Virol* **67**(10), 5968-75.
- DONNELLY, M. L., GANI, D., FLINT, M., MONAGHAN, S., and RYAN, M. D. (1997). The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J Gen Virol* **78** (Pt 1), 13-21.
- DUARTE, E. A., NOVELLA, I. S., LEDESMA, S., CLARKE, D. K., MOYA, A., ELENA, S. F., DOMINGO, E., and HOLLAND, J. J. (1994). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol* **68**(7), 4295-301.
- DUGGAN, M. A., MCGREGOR, S. E., STUART, G. C., MORRIS, S., CHANG-POON, V., SCHEPANSKY, A., and HONORE, L. (1998). The natural history of CIN I lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* **19**(4), 338-44.
- DURST, M., KLEINHEINZ, A., HOTZ, M., and GISSMAN, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* **66**(Pt 7), 1515-22.
- DYSON, N., GUIDA, P., MUNGER, K., and HARLOW, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**(12), 6893-902.
-

- EGGEN, R., VERVER, J., WELLINK, J., PLEIJ, K., VAN KAMMEN, A., and GOLDBACH, R. (1989). Analysis of sequences involved in cowpea mosaic virus RNA replication using site-specific mutants. *Virology* **173**(2), 456-64.
- ENGERS, H. D., THOMAS, K., CEROTTINI, J. C., and BRUNNER, K. T. (1975). Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. V. Response of normal and immune spleen cells to subcellular alloantigens. *J Immunol* **115**(2), 356-60.
- EVANDER, M., FRAZER, I. H., PAYNE, E., QI, Y. M., HENGST, K., and MCMILLAN, N. A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**(3), 2449-56.
- FELTKAMP, M. C., SMITS, H. L., VIERBOOM, M. P., MINNAAR, R. P., DE JONGH, B. M., DRIJFHOUT, J. W., TER SCHEGGET, J., MELIEF, C. J., and KAST, W. M. (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**(9), 2242-9.
- FENNEMA, J. S., VAN AMEIJDEN, E. J., COUTINHO, R. A., and VAN DEN HOEK, A. A. (1995). HIV, sexually transmitted diseases and gynaecologic disorders in women: increased risk for genital herpes and warts among HIV-infected prostitutes in Amsterdam. *Aids* **9**(9), 1071-8.
- FRANCIS, D. A., SCHMID, S. I., and HOWLEY, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol* **74**(6), 2679-86.
- FRATTINI, M. G., and LAIMINS, L. A. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26), 12398-402.
- FRUCHTER, R. G., MAIMAN, M., SEDLIS, A., BARTLEY, L., CAMILIEN, L., and ARRASTIA, C. D. (1996). Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* **87**(3), 338-44.
- FRUH, K., and YANG, Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* **11**(1), 76-81.
- GARCIA, A. M., ORTIZ-NAVARRETE, V. F., MORA-GARCIA, M. L., FLORES-BORJA, F., DIAZ-QUINONEZ, A., ISIBASI-ARAUJO, A., TREJO-BECERRIL, C., CHACON-SALINAS, R., HERNANDEZ-MONTES, J., GRANADOS-ARREOLA, J., DE LEO, C., and WEISS-STEIDER, B. (1999). Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection. *Immunol Lett* **67**(3), 167-77.
- GIENI, R. S., FANG, Y., TRINCHIERI, G., UMETSU, D. T., and DEKRUYFF, R. H. (1996). Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int Immunol* **8**(10), 1511-20.
- GLOSS, B., YEO-GLOSS, M., MEISTERENST, M., ROGGE, L., WINNACKER, E. L., and BERNARD, H. U. (1989). Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res* **17**(9), 3519-33.
- GOPINATH, K., WELLINK, J., PORTA, C., TAYLOR, K. M., LOMONOSSOFF, G. P., and VAN KAMMEN, A. (2000). "Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants." *Virology*, 267.
- GREENFIELD, I., NICKERSON, J., PENMAN, S., and STANLEY, M. (1991). Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24), 11217-21.
- 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 U S A* **95**(4), 1800-5.
-

- GRIESENBACH, U., CHONN, A., CASSADY, R., HANNAM, V., ACKERLEY, C., POST, M., TANSWELL, A. K., OLEK, K., O'BRODOVICH, H., and TSUI, L. C. (1998). Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. *Gene Ther* **5**(2), 181-8.
- GRIMSLEY, N. (1995). Agroinfection. *Methods Mol Biol* **44**, 325-42.
- GRIMSLEY, N., HOHN, B., RAMOS, C., KADO, C., and ROGOWSKY, P. (1989). DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or Brassica by agroinfection is dependent on bacterial virulence functions. *Mol Gen Genet* **217**(2-3), 309-16.
- HAAS, J., PARK, E. C., and SEED, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* **6**(3), 315-24.
- HAGENSEE, M. E., YAEGASHI, N., and 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), 315-22.
- HAN, R., CLADEL, N. M., REED, C. A., PENG, X., and CHRISTENSEN, N. D. (1999). Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *J Virol* **73**(8), 7039-43.
- HANKE, T., SCHNEIDER, J., GILBERT, S. C., HILL, A. V., and MCMICHAEL, A. (1998). DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine* **16**(4), 426-35.
- HAWLEY-NELSON, P., VOUSDEN, K. H., HUBBERT, N. L., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J* **8**(12), 3905-10.
- HIETANEN, S., LAIN, S., KRAUSZ, E., BLATTNER, C., and LANE, D. P. (2000). Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15), 8501-6.
- HO, G. Y., BURK, R. D., KLEIN, S., KADISH, A. S., CHANG, C. J., PALAN, P., BASU, J., TACHEZY, R., LEWIS, R., and ROMNEY, S. (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* **87**(18), 1365-71.
- HOEKEMA, A., HOOYKAAS, P. J., and SCHILPEROORT, R. A. (1984). Transfer of the octopine T-DNA segment to plant cells mediated by different types of *Agrobacterium* tumor- or root-inducing plasmids: generality of virulence systems. *J Bacteriol* **158**(1), 383-5.
- HOOYKAAS, P.J.J. AND SHILPEROORT, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**:15-38.
- 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), 5733-40.
- INMAN, L. R., and CANTEY, J. R. (1983). Specific adherence of *Escherichia coli* (strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J Clin Invest* **71**(1), 1-8.
- JACOBS, N., GIANNINI, S. L., DOYEN, J., BAPTISTA, A., MOUTSCHEN, M., BONIVER, J., and DELVENNE, P. (1998). Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Immunol* **111**(1), 219-24.
- JI, H., WANG, T. L., CHEN, C. H., PAI, S. I., HUNG, C. F., LIN, K. Y., KURMAN, R. J., PARDOLL, D. M., and 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**(17), 2727-40.
-

- JOYCE, J. G., TUNG, J. S., PRZYSIECKI, C. T., COOK, J. C., LEHMAN, E. D., SANDS, J. A., JANSEN, K. U., and KELLER, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**(9), 5810-22.
- KASTEEL, D., WELLINK, J., VERVER, J., VAN LENT, J., GOLDBACH, R., and VAN KAMMEN, A. (1993). The involvement of cowpea mosaic virus M RNA-encoded proteins in tubule formation. *J Gen Virol* **74** (Pt 8), 1721-4.
- KAWANA, Y., KAWANA, K., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y., YOSHIIKE, K., and KANDA, T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* **75**(5), 2331-6.
- KIRNBAUER, R., CHANDRACHUD, L. M., O'NEIL, B. W., WAGNER, E. R., GRINDLAY, G. J., ARMSTRONG, A., MCGARVIE, G. M., SCHILLER, J. T., LOWY, D. R., and CAMPO, M. S. (1996). Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* **219**(1), 37-44.
- KIRNBAUER, R., TAUB, J., GREENSTONE, H., RODEN, R., DURST, M., GISSMANN, L., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* **67**(12), 6929-36.
- KONYA, J., and DILLNER, J. (2001). Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res* **82**, 205-38.
- KONYA, J., VERESS, G., JUHASZ, A., SZARKA, K., SAPY, T., HERNADI, Z., and GERGELY, L. (2000). Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J Clin Microbiol* **38**(1), 408-11.
- KOZAK, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**(2), 283-92.
- KOZAK, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**(20), 8125-48.
- LAI, M. M. (1992). Genetic recombination in RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 21-32.
- LALVANI, A., BROOKES, R., HAMBLETON, S., BRITTON, W. J., HILL, A. V., and MCMICHAEL, A. J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* **186**(6), 859-65.
- LANGEVELD, J. P., BRENNAN, F. R., MARTINEZ-TORRECUIADRADA, J. L., JONES, T. D., BOSHUIZEN, R. S., VELA, C., CASAL, J. I., KAMSTRUP, S., DALSGAARD, K., MELOEN, R. H., BENDIG, M. M., and HAMILTON, W. D. (2001). Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* **19**(27), 3661-70.
- LECLERC, C., DERIAUD, E., ROJAS, M., and WHALEN, R. G. (1997). The preferential induction of a Th1 immune response by DNA-based immunization is mediated by the immunostimulatory effect of plasmid DNA. *Cell Immunol* **179**(2), 97-106.
- LEDER, C., KLEINSCHMIDT, J. A., WIETHE, C., and MULLER, 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), 9201-9.
- LIU, W. J., GAO, F., ZHAO, K. N., ZHAO, W., FERNANDO, G. J., THOMAS, R., and FRAZER, I. H. (2002). Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity. *Virology* **301**(1), 43-52.
- LIU, W. J., ZHAO, K. N., GAO, F. G., LEGGATT, G. R., FERNANDO, G. J., and FRAZER, I. H. (2001). Polynucleotide viral vaccines: codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy. *Vaccine* **20**(5-6), 862-9.
-

- LJUNGGREN, B., SONESSON, B., SAVELAND, H., and BRANDT, L. (1985). Cognitive impairment and adjustment in patients without neurological deficits after aneurysmal SAH and early operation. *J Neurosurg* **62**(5), 673-9.
- LOMONOSSOFF, G. P., and JOHNSON, J. E. (1991). The synthesis and structure of comovirus capsids. *Prog Biophys Mol Biol* **55**(2), 107-37.
- LOMONOSSOFF, G. P., and JOHNSON, J. E. (1996). Use of macromolecular assemblies as expression systems for peptides and synthetic vaccines. *Curr Opin Struct Biol* **6**(2), 176-82.
- MARTIN, L. G., DEMERS, G. W., and GALLOWAY, D. A. (1998). Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7- expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol* **72**(2), 975-85.
- MASTERSON, P. J., STANLEY, M. A., LEWIS, A. P., and ROMANOS, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**(9), 7407-19.
- MATLASHEWSKI, G., SCHNEIDER, J., BANKS, L., JONES, N., MURRAY, A., and CRAWFORD, L. (1987). Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *Embo J* **6**(6), 1741-6.
- MATTION, N. M., HARNISH, E. C., CROWLEY, J. C., and REILLY, P. A. (1996). Foot-and-mouth disease virus 2A protease mediates cleavage in attenuated Sabin 3 poliovirus vectors engineered for delivery of foreign antigens. *J Virol* **70**(11), 8124-7.
- MCGLENNEN, R. C., GHAI, J., OSTROW, R. S., LABRESH, K., SCHNEIDER, J. F., and FARAS, A. J. (1992). Cellular transformation by a unique isolate of human papillomavirus type 11. *Cancer Res* **52**(21), 5872-8.
- 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), 3142-50.
- MCLAIN, L., DURRANI, Z., WISNIEWSKI, L. A., PORTA, C., LOMONOSSOFF, G. P., and DIMMOCK, N. J. (1996). Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine* **14**(8), 799-810.
- MCLEAN, C. S., CHURCHER, M. J., MEINKE, J., SMITH, G. L., HIGGINS, G., STANLEY, M., and MINSON, A. C. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* **43**(6), 488-92.
- MICHEL, N., OSEN, W., GISSMANN, L., SCHUMACHER, T. N., ZENTGRAF, H., and MULLER, M. (2002). Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology* **294**(1), 47-59.
- MOHR, I. J., CLARK, R., SUN, S., ANDROPHY, E. J., MACPHERSON, P., and BOTCHAN, M. R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**(4988), 1694-9.
- MOTA, F., RAYMENT, N., CHONG, S., SINGER, A., and CHAIN, B. (1999). The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* **116**(1), 33-40.
- MULLER, M., ZHOU, J., REED, T. D., RITTMULLER, C., BURGER, A., GABELSBERGER, J., BRASPENNING, J., and GISSMANN, L. (1997). Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* **234**(1), 93-111.
- MUNGER, K., PHELPS, W. C., BUBB, V., HOWLEY, P. M., and SCHLEGEL, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**(10), 4417-21.
-

- NARDELLI-HAEFLIGER, D., RODEN, R. B., BENYACOU, J., SAHLI, R., KRAEHNBUHL, 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**(8), 3328-36.
- NESTER, E.W., GORDON, M.P., AMASINO, R.M. AND YANOFSKY, M.F. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology* **35**:387-413.
- NISHIMURA, A., ONO, T., ISHIMOTO, A., DOWHANICK, J. J., FRIZZELL, M. A., HOWLEY, P. M., and SAKAI, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* **74**(8), 3752-60.
- O'BRIEN, PM., CAMPO, MS. (2002). Evasion of host immunity by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* **88**, 103-117.
- OHLSCHLAGER, P., OSEN, W., DELL, K., FAATH, S., GARCEA, R. L., JOCHMUS, I., MULLER, M., PAWLITA, M., SCHAFFER, K., SEHR, P., STAIB, C., SUTTER, G., and GISSMANN, L. (2003). Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol* **77**(8), 4635-45.
- PAINTSIL, J., MULLER, M., PICKEN, M., GISSMANN, L., and ZHOU, J. (1996). Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology* **223**(1), 238-44.
- PALEFSKY, J. M., MINKOFF, H., KALISH, L. A., LEVINE, A., SACKS, H. S., GARCIA, P., YOUNG, M., MELNICK, S., MIOTTI, P., and BURK, R. (1999). Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* **91**(3), 226-36.
- PARK, J. S., KIM, E. J., KWON, H. J., HWANG, E. S., NAMKOONG, S. E., and UM, S. J. (2000). Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* **275**(10), 6764-9.
- PARK, P., COPELAND, W., YANG, L., WANG, T., BOTCHAN, M. R., and MOHR, I. J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18), 8700-4.
- PATTILLO, R. A., HUSSA, R. O., STORY, M. T., RUCKERT, A. C., SHALABY, M. R., and MATTINGLY, R. F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* **196**(4297), 1456-8.
- PETRY, K. U., SCHEFFEL, D., BODE, U., GABRYSIK, T., KOCHER, H., KUPSCH, E., GLAUBITZ, M., NIESERT, S., KUHNLE, H., and SCHEDEL, I. (1994). Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* **57**(6), 836-40.
- PFISTER, H. (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol* **3**(5), 263-71.
- PHELPS, W. C., YEE, C. L., MUNGER, K., and HOWLEY, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**(4), 539-47.
- PISANI, P., PARKIN, D. M., and FERLAY, J. (1993). Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* **55**(6), 891-903.
- PORGADOR, A., IRVINE, K. R., IWASAKI, A., BARBER, B. H., RESTIFO, N. P., and GERMAIN, R. N. (1998). Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* **188**(6), 1075-82.
- PORTA, C., and LOMONOSSOFF, G. P. (1996). Use of viral replicons for the expression of genes in plants. *Mol Biotechnol* **5**(3), 209-21.
-

- PORTA, C., SPALL, V. E., LOVELAND, J., JOHNSON, J. E., BARKER, P. J., and LOMONOSSOFF, G. P. (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* **202**(2), 949-55.
- RANDO, R. F., LANCASTER, W. D., HAN, P., and LOPEZ, C. (1986). The noncoding region of HPV-6vc contains two distinct transcriptional enhancing elements. *Virology* **155**(2), 545-56.
- REMMINK, A. J., WALBOOMERS, J. M., HELMERHORST, T. J., VOORHORST, F. J., ROZENDAAL, L., RISSE, E. K., MEIJER, C. J., and KENEMANS, P. (1995). The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* **61**(3), 306-11.
- RESSING, M. E., SETTE, A., BRANDT, R. M., RUPPERT, J., WENTWORTH, P. A., HARTMAN, M., OSEROFF, C., GREY, H. M., MELIEF, C. J., 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**(11), 5934-43.
- ROCK, K. L., FLEISCHACKER, C., and GAMBLE, S. (1993). Peptide-priming of cytolytic T cell immunity in vivo using beta 2- microglobulin as an adjuvant. *J Immunol* **150**(4), 1244-52.
- ROMAN, M., MARTIN-OROZCO, 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**(8), 849-54.
- RUDOLF, M. P., FAUSCH, S. C., DA SILVA, D. M., and KAST, W. M. (2001). Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J Immunol* **166**(10), 5917-24.
- RYAN, M. D., and DREW, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *Embo J* **13**(4), 928-33.
- RYAN, M. D., KING, A. M., and THOMAS, G. P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* **72** (Pt 11), 2727-32.
- SALES, K. J., KATZ, A. A., DAVIS, M., HINZ, S., SOETERS, R. P., HOFMEYR, M. D., MILLAR, R. P., and JABBOUR, H. N. (2001). Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5), 2243-9.
- SCHAFER, K., MULLER, M., FAATH, S., HENN, A., OSEN, W., ZENTGRAF, H., BENNER, A., GISSMANN, L., and JOCHMUS, I. (1999). Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer* **81**(6), 881-8.
- SCHILLER, J. T., VASS, W. C., VOUSDEN, K. H., and LOWY, D. R. (1986). E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* **57**(1), 1-6.
- SCHWARZ, E., FREESE, U. K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A., and ZUR HAUSEN, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**(6006), 111-4.
- SEHR, P., ZUMBACH, K., and PAWLITA, M. (2001). A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods* **253**(1-2), 153-62.
- SHAH, K. V. (1992). Biology of genital tract human papillomaviruses. *Urol Clin North Am* **19**(1), 63-9.
- SHEN, X., WONG, S. B., BUCK, C. B., ZHANG, J., and SILICIANO, R. F. (2002). Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J Immunol* **169**(8), 4222-9.
-

- 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), 7877-81.
- SMOTKIN, D., and WETTSTEIN, F. O. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13), 4680-4.
- SPEIDEL, K., OSEN, W., FAATH, S., HILGERT, I., OBST, R., BRASPENNING, J., MOMBURG, F., HAMMERLING, G. J., and 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**(9), 2391-9.
- STANLEY, M. A. (2001). Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* **52**(1-2), 45-59.
- STAUSS, H. J., DAVIES, H., SADOVNIKOVA, E., CHAIN, B., HOROWITZ, N., and SINCLAIR, C. (1992). Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: identification of candidate T-cell epitopes in human papilloma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17), 7871-5.
- STUBENRAUCH, F., and LAIMINS, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **9**(6), 379-86.
- SUNDBERG, J. P. (1987). Diagnostic exercise: multiple white masses in the mouth of beagles. *Lab Anim Sci* **37**(3), 339-40.
- SYRJANEN, K. J. (1996). Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **65**(1), 45-53.
- TAKAGI, J., BEGLOVA, N., YALAMANCHILI, P., BLACKLOW, S. C., and SPRINGER, T. A. (2001). Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20), 11175-80.
- THOMAS, J. T., HUBERT, W. G., RUESCH, M. N., and LAIMINS, L. A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15), 8449-54.
- TILSTON, P. (1997). Anal human papillomavirus and anal cancer. *J Clin Pathol* **50**(8), 625-34.
- TINDLE, R. W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* **8**(5), 643-50.
- TRUS, B. L., RODEN, R. B., GREENSTONE, H. L., VRHEL, M., SCHILLER, J. T., and BOOY, F. P. (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* **4**(5), 413-20.
- TUTING, T., GAMBOTTO, A., DELEO, A., LOTZE, M. T., ROBBINS, P. D., and STORKUS, W. J. (1999). Induction of tumor antigen-specific immunity using plasmid DNA immunization in mice. *Cancer Gene Ther* **6**(1), 73-80.
- USHA, R., ROHLL, J. B., SPALL, V. E., SHANKS, M., MAULE, A. J., JOHNSON, J. E., and LOMONOSSOFF, G. P. (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* **197**(1), 366-74.
- VAN DER BURG, S. H., DE JONG, A., WELTERS, M. J., OFFRINGA, R., and MELIEF, C. J. (2002). The status of HPV16-specific T-cell reactivity in health and disease as a guide to HPV vaccine development. *Virus Res* **89**(2), 275-84.
- VAN ENGELEN, F. A., MOLTHOFF, J. W., CONNER, A. J., NAP, J. P., PEREIRA, A., and STIEKEMA, W. J. (1995). pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* **4**(4), 288-90.
-

- VAN LENT, J., STORMS, M., VAN DER MEER, F., WELLINK, J., and GOLDBACH, R. (1991). Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J Gen Virol* **72** (Pt 11), 2615-23.
- VAN REGENMORTEL, M. H. (2001). Perspectives on binomial names of virus species. *Arch Virol* **146**(8), 1637-40.
- VERVER, J., WELLINK, J., VAN LENT, J., GOPINATH, K., and VAN KAMMEN, A. (1998). Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology* **242**(1), 22-7.
- VINNER, L., NIELSEN, H. V., BRYDER, K., CORBET, S., NIELSEN, C., and FOMSGAARD, A. (1999). Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine* **17**(17), 2166-75.
- VOLPERS, C., SCHIRMACHER, P., STREECK, R. E., and SAPP, M. (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* **200**(2), 504-12.
- WALBOOMERS, J. M., JACOBS, M. V., MANOS, M. M., BOSCH, F. X., KUMMER, J. A., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., PETO, J., MEIJER, C. J., and MUNOZ, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**(1), 12-9.
- WELLINK, J., VAN LENT, J. W., VERVER, J., SIJEN, T., GOLDBACH, R. W., and VAN KAMMEN, A. (1993). The cowpea mosaic virus M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. *J Virol* **67**(6), 3660-4.
- WHERRY, E. J., PUORRO, K. A., PORGADOR, A., and EISENLOHR, L. C. (1999). The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol* **163**(7), 3735-45.
- WINANS, S.C. (1992). Two-way chemical signaling in Agrobacterium-plant interactions. *Microbiology Reviews* **56**:12-31.
- WOLF, J. L., RUBIN, D. H., FINBERG, R., KAUFFMAN, R. S., SHARPE, A. H., TRIER, J. S., and FIELDS, B. N. (1981). Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science* **212**(4493), 471-2.
- YLITALO, N., SORENSEN, P., JOSEFSSON, A. M., MAGNUSSON, P. K., ANDERSEN, P. K., PONTEN, J., ADAMI, H. O., GYLLENSTEN, U. B., and MELBYE, M. (2000). Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* **355**(9222), 2194-8.
- YOON, H., CHUNG, M. K., MIN, S. S., LEE, H. G., YOO, W. D., CHUNG, K. T., JUNG, N. P., and PARK, S. N. (1998). Synthetic peptides of human papillomavirus type 18 E6 harboring HLA- A2.1 motif can induce peptide-specific cytotoxic T-cells from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. *Virus Res* **54**(1), 23-9.
- ZATSEPINA, O., BRASPENNING, J., ROBBERSON, D., HAJIBAGHERI, M. A., BLIGHT, K. J., ELY, S., HIBMA, M., SPITKOVSKY, D., TRENDELENBURG, M., CRAWFORD, L., and TOMMASINO, M. (1997). The human papillomavirus type 16 E7 protein is associated with the nucleolus in mammalian and yeast cells. *Oncogene* **14**(10), 1137-45.
- ZERFASS, K., SPITKOVSKY, D., SCHULZE, A., JOSWIG, S., HENGLEIN, B., and JANSEN-DURR, P. (1996). Adenovirus E1A activates cyclin A gene transcription in the absence of growth factors through interaction with p107. *J Virol* **70**(4), 2637-42.
- ZHAO, K. N., SUN, X. Y., FRAZER, I. H., and ZHOU, J. (1998). DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* **243**(2), 482-91.
-

- ZHOU, J., LIU, W. J., PENG, S. W., SUN, X. Y., and FRAZER, I. (1999). Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol* **73**(6), 4972-82.
- ZHOU, J., SUN, X. Y., LOUIS, K., and FRAZER, I. H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* **68**(2), 619-25.
- ZUR MEGEDE, J., CHEN, M. C., DOE, B., SCHAEFER, M., GREER, C. E., SELBY, M., OTTEN, G. R., and BARNETT, S. W. (2000). Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* **74**(6), 2628-35.
-