

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Heidrun Guthöhrlein

aus: Marburg an der Lahn

Tag der mündlichen Prüfung:

HPV 16 Strukturproteine als Vehikel zur Immunisierung

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann
Prof. Dr. Ingrid Haas

meinen Eltern

Danksagung

Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich für die Übernahme des Gutachtens, die Überlassung des Themas, die wertvolle Betreuung bei der Planung, Durchführung und Abfassung dieser Arbeit, die jederzeit gewährte Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Ingrid Haas danke ich für ihr Interesse und ihre Bereitschaft, das Gutachten zu erstellen.

Dr. Michael Pawlita und Dr. Martin Müller danke ich für hilfreiche Diskussionen und Lösungsvorschläge im Rahmen meines Doktorandenkomitees.

Dr. Martin Müller danke ich außerdem für die Bereitstellung der Baculovirusvorräte.

Birgit Aengeneyndt danke ich ganz herzlich für die Produktion und Analyse virus-ähnlicher Partikel.

Thomas Holz danke ich für die prompte Hilfe bei allen die Arbeit am Computer betreffenden Fragen und Problemen.

Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf danke ich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Freunden aus der ATV, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank für die vielfältige Unterstützung aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1 HPV allgemein	1
2 Struktur des Kapsids	2
3 Genomstruktur	2
3.1 Die frühen Gene E1-E5	3
3.2 Die frühen Gene E6 und E7	3
3.3 Die späten Gene L1 und L2	4
4 Lebenszyklus	5
5 HPV und Immunantwort	6
6 Vakzinierungsstrategien	7
6.1 Prophylaktische Vakzine	7
6.2 Therapeutische Vakzine	7
7 DNA-Immunisierung	8
8 Zielsetzung der Arbeit	11
8.1 Pseudovirionen	11
8.1.1 <i>Rekombinante Vacciniaviren</i>	11
8.1.2 <i>in vitro Konstruktion von Pseudovirionen</i>	12
8.1.3 <i>Pseudovirionen aus Hefe</i>	12
8.2 Kopplung von DNA an Partikel	13
8.3 Kopplung von DNA an ein HPV 16 L2-Peptid	13
8.4 Spezifische Fragestellung	14
B Material	15
1 Chemikalien	15
2 Radiochemikalien	15
3 Kits	15
4 Enzyme	15
5 Größen- und Konzentrationsstandards	15
6 Antikörper	15
6.1 Primärantikörper	15
6.2 Sekundärantikörper	16
7 DNA und Peptide	16
7.1 Plasmide	16
7.2 Oligonukleotidprimer	17
7.3 Peptide	17
8 Biologische Materialien	17
8.1 Bakterienstämme	17
8.2 Hefestämme	17
8.3 Eukaryontische Zelllinien	18
8.3.1 <i>Insektenzellen</i>	18
8.3.2 <i>Säugerzellen</i>	18
8.4 Mauslinien	18
8.5 Bakulovirusstocks	18
9 Medien	18
9.1 Medien für die Bakterienkultur	18
9.2 Medien für die Hefekultur	18
9.3 Medien für die Zellkultur	19

10 Puffer und Lösungen	20
C Methoden	21
1. Mikrobiologische Methoden	21
1.1 Aufbewahrung und Kultur von Bakterien	21
1.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien	21
1.3 Elektrotransformation kompetenter Bakterien	22
2 Arbeiten mit DNA	22
2.1 Fällung von DNA	22
2.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA	22
2.3 Großpräparation von Plasmid-DNA	23
2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wäßrigen Lösungen	24
2.5 Restriktionsverdau von DNA	24
2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	25
2.7 Ligation von DNA	25
2.8 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen	25
2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen	26
2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.11 3'-Endmarkierung von DNA	28
2.12 Herstellung einer ³² P-markierten DNA-Sonde	29
2.13 DNA-DNA-Hybridisierung	30
2.14 Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3 Arbeiten mit Zellkultur	31
3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	31
3.2 T-Zell Kultivierung	32
3.3 Bestimmung der Zellzahl	32
3.4 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	33
3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen	33
4 Arbeiten mit Hefen	34
4.1 Aufbewahrung und Kultur von Hefen	34
4.2 Herstellung kompetenter Hefezellen	34
4.3 Transformation der Hefezellen	34
4.4 Nachweis der Proteinexpression in Hefe-Transformanden	35
4.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe	36
5 Arbeiten mit Proteinen	36
5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	37
5.3 Herstellung virus-ähnlicher HPV 16 L1-Partikel (VLPs)	37
5.3.1 Vermehrung rekombinanter <i>Bekulovirusstocks</i>	37
5.3.2 Infektion von <i>TN high five</i> Insektenzellen	38
5.3.3 Aufschluß der Zellen	38
5.3.4 Aufreinigung durch Gradientenzentrifugation	38
5.4 Transmissionselektronenmikroskopie	39
5.5 Zerfall und Zusammenlagerung von VLPs (Dis- und Reassembly)	39
5.6 Kopplung von DNA an Protein oder Peptid	40
5.7 Isolation von pseudovirionen aus Hefe	41
6 Immunologische Experimente	42
6.1 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern aus Serum	42
6.2 Immunpräzipitation	43
6.3 Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blot	43
6.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	44

6.5 ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay)	45
6.6 Intrazelluläre IFN γ -Färbung	46
6.7 Durchflußzytometrie	47
6.8 Zytotoxizitätstest	48
7 Tierexperimentelle Methoden	48
7.1 Anästhesie der Versuchstiere	48
7.2 Immunisierung	49
D Ergebnisse	50
1 Klonierungen der für die Vehikelpräparationen notwendigen Plasmide	50
1.1 Klonierung des Ovalbumingens (OVA) in pcDNA3.1+	50
1.2 Klonierung des Ovalbumingens (OVA) in pYes2*-VP22-E7(1-66)	51
1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Herstellung eines exprimierbaren DNA-Fragments (PCR ^{B/N})	52
2 Expressionskontrolle der verschiedenen DNA-Konstrukte	53
3 Herstellung der Vehikel zur immunisierung	54
3.1 Pseudovirionen	54
3.1.1 <i>Pseudovirionen im Hefesystem</i>	54
3.1.1.1 <i>Transformation des Hefestammes #1699 mit dem Targetplasmid</i>	55
3.1.1.2 <i>Überprüfung der Expression der Strukturproteine in den Hefezellen</i>	55
3.1.1.3 <i>Überprüfung des Vorhandenseins des Targetplasmids in den Hefezellen</i>	56
3.1.1.4 <i>Aufreinigung von ψ-VLPs im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten</i>	57
3.1.2 <i>Herstellung von Pseudovirionen durch in vitro Dis- und Reassembly</i>	59
3.1.2.1 <i>Verifikation des Dis- und Reassembly</i>	60
3.1.2.2 <i>Analyse der ψ-VLPs im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten</i>	60
3.2 Kopplung von DNA	63
3.2.1 <i>Kopplung von DNA an VLPs</i>	63
3.2.1.1 <i>Überprüfung der Kopplung</i>	63
3.2.2 <i>Kopplung von DNA an HPV 16 L2₁₀₈₋₁₂₆</i>	65
3.2.2.1 <i>Überprüfung der Kopplung</i>	65
4 Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden	70
4.1 DNA-Immunisierung	70
4.2 Adjuvante Wirkung von VLPs	72
5 Immunisierung mit Vehikelpräparationen	74
E Diskussion	76
1 Klonierung und Expression des Reportergens	76
2 Pseudovirionen in Hefe	77
3 Dis- und Reassembly von HPV 16 VLPs zur Herstellung von Pseudovirionen	79
4 Kopplung von DNA an HPV 16 VLPs	80
5 HPV 16 L2 als Shuttlevektor	81
6 DNA-Immunisierung	85
F Zusammenfassung	88
G Abkürzungen	89
H Literatur	92

A Einleitung

A.1 HPV allgemein

Schätzungsweise 15-20 % aller humanen Krebserkrankungen sind ursächlich mit Virusinfektionen verbunden. Zu den Vertretern dieser Tumoviren gehören die Papillomviren, die neben gutartigen Warzenerkrankungen auch Karzinome, vor allem in der Genitalschleimhaut, und verschiedene maligne Hauttumoren verursachen. Die Gruppe der Papillomviren zählt etwa 130 Mitglieder (De Villiers, 1997), davon 85 humanpathogene, die alle streng spezie- und gewebespezifisch sind.

Man teilt die humanpathogenen Papillomviren (HPV) aufgrund ihres Tropismus in haut- und schleimhautinfizierende Typen ein (Zusammenstellung in Tabelle A.1).

Tabelle A.1: Die häufigsten HPV-Typen in gutartigen und malignen Erkrankungen

Krankheitsbild	assoziierter HPV-Typ
Hautwarzen	
plantare Warzen	1
gemeine Warzen	2, 4
flache Warzen	3, 10, 28, 41
Epidermodysplasia Verruciformis (EV)	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 47, 49
Genitalwarzen	
subklinisch	alle den Genitaltrakt infizierenden HPVs
flache Warzen	6, 11, 16, 18
Zervixkarzinom	
starke Assoziation	16, 18, 31, 45
moderate Assoziation	33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68
respiratorische Papillome	6, 11

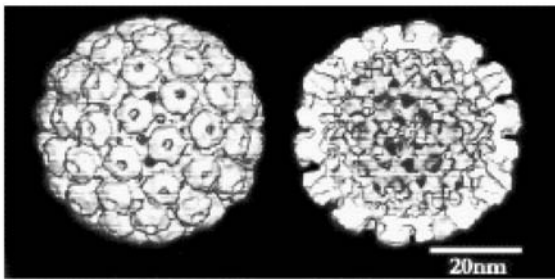
nach Fields, 1996

In beiden Gruppen finden sich sogenannte „low risk“ und „high risk“ HPV-Typen, die entweder mit gutartigen Wucherungen, z.B. Warzen und Kondylomen, bzw. mit prämaligen und malignen Läsionen wie dem Zervixkarzinom, das die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen darstellt (Boyle, 1997), assoziiert sind. So konnte in über 94 % aller untersuchten Zervixkarzinome HPV-DNA gefunden werden, wobei die Typen 16 und 18 am häufigsten detektiert wurden (Bosch et al., 1993; zur Hausen, 1996; Walboomers et al., 1999). Die Entwicklung zum Zervixkarzinom erfolgt über mehrere Stufen zellulärer Veränderungen, die je nach Proliferationsgrad in CIN (zervikale intraepitheliale Neoplasie) I, II und III eingeteilt werden. In den wenigsten Fällen führt eine Infektion mit HPV jedoch zu einem

Karzinom. So bilden sich bei etwa 60-80 % der Frauen mit CIN I die Läsionen spontan zurück (Ostor, 1993; Riethmuller et al., 2002), und bei weiteren 20–30 % verbleibt der Zustand unverändert (Ostor, 1993). Eine andauernde Infektion mit „high risk“ HPV-Typen scheint der wichtigste Faktor zu sein, ob sich eine Infektion in Richtung eines invasiven Karzinoms entwickelt.

A.2 Struktur des Kapsids

Papillomviren sind kleine, hüllenlose DNA-Viren, deren Kapsiddurchmesser 52-55 nm beträgt. Ein Virus setzt sich aus 72 pentameren Kapsomeren zusammen, die in einem T=7



Gitter (Baker et al., 1991) auf der Virusoberfläche arrangiert sind. Es besteht aus zwei Strukturproteinen: Dem Hauptstrukturprotein L1 (~ 55 kDa), und dem Nebenstrukturprotein L2 (~ 70 kDa), wobei das Verhältnis etwa 30:1 beträgt (Hagensee et al., 1993; Kirnbauer et al., 1993).

Abbildung A.1: Kapsidmodell von HPV 16
www.uchsc.edu/sm/molbiol/rgarcea.html

A.3 Genomstruktur

Die Struktur des Genoms verschiedener Papillomviren ist sehr einheitlich. Alle besitzen ein etwa 8 kbp großes, zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom, das sich in drei Regionen einteilen läßt: Die regulatorische Region (upstream regulatory region, URR oder long control region, LCR), die frühe Region (early Region, E) und die späte Region (late, L). Die URR enthält alle cis-regulatorischen Elemente, die für die Transkription benötigt werden, inklusive des frühen Promotors und des Replikationsursprungs.

Die frühe Region kodiert die Proteine E1 bis E7, die für die virale Replikation und Transkription und die Zellzykluskontrolle verantwortlich sind. Die späte Region kodiert die Strukturproteine L1 und L2, die für die Kapsidproduktion benötigt werden, welche im späten viralen Lebenszyklus stattfindet. Ein linearisiertes Genom ist in Abbildung A.2 dargestellt.

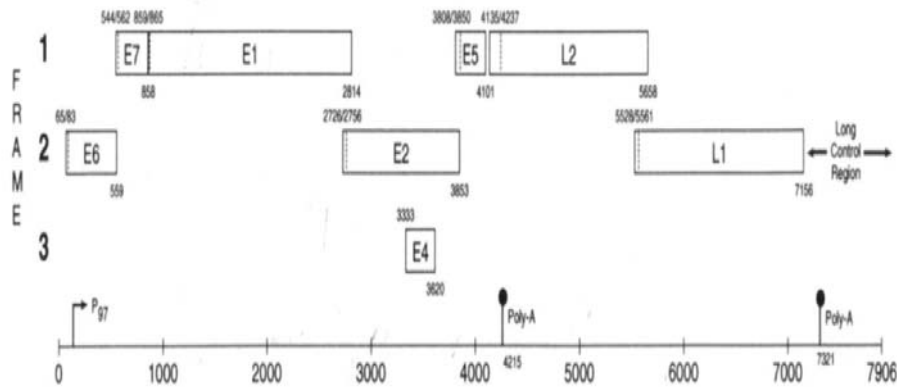


Abbildung A.2: Genomaufbau von HPV 16

www.cinvestax.mx/genetica/MyFiles/Papillomavirus/PAPexp.html

A.3.1 Die frühen Gene E1 – E5

Das frühe Protein E1 ist mit der DNA-Replikation assoziiert und besitzt ATPase- und Helikaseaktivität (Liu et al., 1995; Conger et al., 1999; Swindle et al., 1999). Es interagiert mit dem E2-Protein und hat hohe Bindungsaffinität an den Replikationsursprung in der URR (Chiang et al., 1992; Kuo et al., 1994).

E2 besitzt eine C-terminale DNA-bindende und eine N-terminale transaktivierende Domäne. Es bildet zusammen mit E1 einen Initiationskomplex und bindet als Dimer an pallindromische Sequenzen in der URR, was eine Aktivierung oder Repression der viralen Aktivierung zur Folge haben kann (McBride et al., 1991).

E4 kann zu den späten Genen gerechnet werden. Das Protein destabilisiert die Keratinfilamente, was zur Auflösung des Keratinnetzwerks führt und die Freisetzung der Viren erleichtert (Doorbar et al., 1991; Roberts et al., 1993).

Bei bovinen Papillomviren ist das membranassoziierte E5 Protein hauptverantwortlich für die zelluläre Transformation (Burkhardt et al., 1987), wohingegen diese Eigenschaft bei HPV E5 von untergeordneter Bedeutung ist. Hier aktiviert E5 Wachstumsfaktoren und blockiert die Regulation des Rezeptorabbaus (Straight et al., 1993; Hwang et al., 1995).

A.3.2 Die frühen Gene E6 und E7

Die frühen Proteine E6 und E7 spielen bei der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle, da sie für die Transformation der Zellen verantwortlich sind. So haben sogenannte „low risk“-Typen eine weit geringere Fähigkeit, maligne Transformation einzuleiten, als „high risk“-

Typen, was an den funktionellen Unterschieden zwischen den jeweiligen E6 und E7 Proteinen liegt.

Das E6 Protein der „high risk“ HPV-Typen 16 und 18 interagiert mit dem antionkogenen Regulator p53 und dem Protein E6AP des Ubiquitin-Abbaus, was zur Degradation von p53 führt (Werness et al., 1990; Huibregtse et al., 1991; Hubbert et al., 1992). Im Gegensatz dazu wird bei den „low risk“ HPV-Typen 6 und 11 keine p53 Degradation ausgelöst (Gage et al., 1990; Barbosa et al., 1991; Halbert et al., 1992). Das Fehlen eines funktionellen p53 Proteins macht die Zellen anfällig für Schäden der DNA und verhindert die Aktivierung der p53-vermittelten Apoptose (Crook et al., 1991; Crook et al., 1992). HPV 16 E6 hat zwei Spleißprodukte, von denen aber nur das Volllänge E6 zur Interaktion mit p53 in der Lage und somit klinisch relevant ist. Des Weiteren besitzt es vier Zinkfingerstrukturen (Cys-X-X-Cys) wie verschiedene Transkriptionsfaktoren (Grossman & Laimins, 1989; Barbosa et al., 1989), wobei eine Rolle in der Transkription noch nicht klar nachgewiesen wurde.

E7 enthält zwei Zinkfinger motive und besitzt transformierende und transkriptionelle regulatorische Funktionen (Phelps et al., 1988; Barbosa et al., 1989; Phelps et al., 1991). Auch wenn E7 *in vitro* allein in der Lage ist, Zellen zu transformieren, benötigt es E6, um durch HPV die volle Transformation und Immortalisierung der Zellen zu erreichen (Barbosa & Schlegel, 1989; Sedman et al., 1991). E7 kontrolliert den Zellzyklus durch Interaktion mit pRB (Dyson et al., 1989; Munger et al., 1989) und anderen RB-assoziierten Proteinen wie P107 und P130, indem es den Transkriptionsfaktor E2F ersetzt (Chellappan et al., 1992), was zu unregulierter Aktivierung des Zellzyklus in der infizierten Zelle führt (Morozov et al., 1997; Ruesch & Laimins, 1997).

A.3.3 Die späten Gene L1 und L2

Das L1-Gen ist das stärkste Antigen der Papillomvirusproteine: Während der natürlichen Infektion, vor allem aber nach Immunisierung mit HPV-Kapsiden werden hohe Titer von Antikörpern gemessen. Es ist schwach phosphoryliert und besitzt keine DNA-bindenden Eigenschaften (Kirnbauer et al., 1992; Kirnbauer et al., 1993). L1 ist bei allen Papillomviren ein stark konserviertes Protein, das sich selbständig zu virus-ähnlichen Partikeln (virus-like particles, VLPs) zusammenlagern kann (Kirnbauer et al., 1993; Christensen et al., 1994). Das L2-Protein ist stark phosphoryliert und bindet an DNA. Im Gegensatz zu L1 ist L2 nicht in der Lage, sich zu Partikeln zusammen zu lagern.

A.4 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus aller Papillomviren ist vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängig (Laimins, 1993) (Abbildung A.3). Die initiale Infektion mit HPV erfolgt in undifferenzierten Epithelzellen im Stratum basale, in das die Viren durch kleinste Verletzungen der Haut gelangen. Im Nukleus der infizierten Zelle wird die Zahl der HPV-Genome, welche extrachromosomal vorliegen (Terhune et al., 1999), auf 50-100 erhöht (Stubenrauch & Laimins, 1999). Bei der Zellteilung wird die virale DNA auf beide Tochterzellen verteilt, von denen die eine aus der Basalschicht wandert und den Differenzierungsprozess durchläuft (Watt, 1998), während die andere weitere Zellteilungen in der Basalschicht durchläuft und so ein Reservoir für virale DNA darstellt. Im Stratum spinosum werden die virale DNA amplifiziert und die frühen Gene transkribiert. Die Synthese der Kapside findet schließlich in ausdifferenzierten Keratinozyten im Stratum granulosum statt (Baker & Howley, 1987; Hummel et al., 1995) und das reife Virus wird von den distalen Zellen nach außen abgegeben (Tindle, 1996).

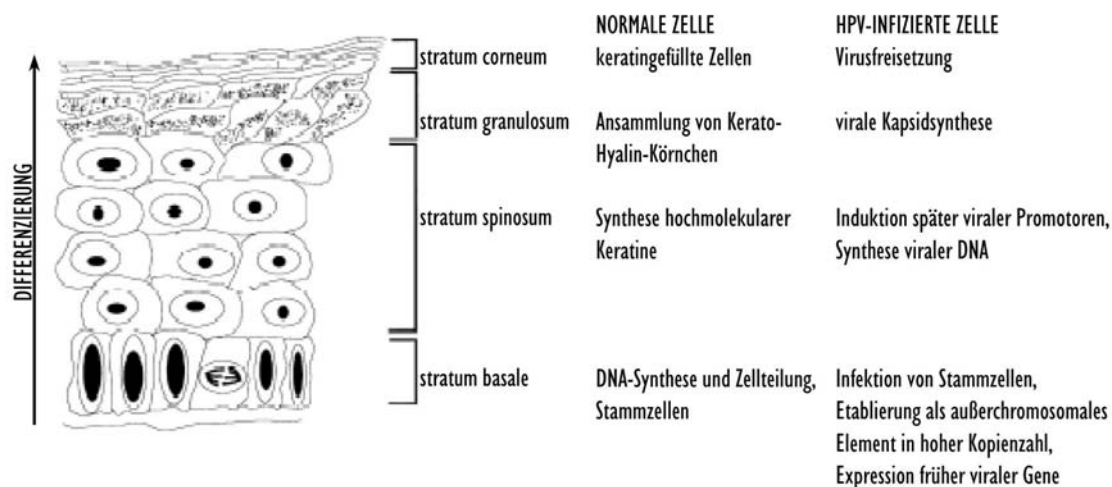


Abbildung A.3: Differenzierungsabhängige Funktionen in normalen und HPV-infizierten Epithelzellen;
aus Stubenrauch et al., 1999

A.5 HPV und Immunantwort

Eine Infektion mit HPV wird in fast allen Fällen durch die Aktivierung des Immunsystems erfolgreich bekämpft (Laga et al., 1992; Petry et al., 1994; Garzetti et al., 1995). Im Falle einer nicht hinreichenden Immunantwort kann es jedoch als Folge einer persistierenden viralen Infektion zur Entstehung einer Neoplasie kommen (Remmink et al., 1995; Stern et al., 2001; O'Brien & Campo, 2002). PV persistieren für eine längere Zeitspanne, bevor das Immunsystem aktiviert wird, wobei die Antwort auf die viralen Antigene erstaunlich niedrig ist. So findet man nur geringe oder keine humoralen oder zellulären Antworten bei der Virusproduktion, die in CIN I und II-Läsionen stattfindet (Laimins, 1993). Antikörper hauptsächlich gegen frühe HPV-Proteine werden in Patienten mit CIN III und Tumoren gefunden (Di Leonardo et al., 1994; Carter & Galloway, 1997) und CD4 und CD8 T-Lymphozyten werden in sich rückbildenden Warzen (Coleman et al., 1994; Knowles et al., 1996) und in Tumoren der Zervix beobachtet (Evans et al., 1997; Hohn et al., 1999). Das Scheitern des Immunsystems bei der Beseitigung der Virusinfektion kann eventuell durch den Lebenszyklus der Viren erklärt werden. So sind die Kapsidproteine, obwohl bei systemischer Applikation immunogen (Kirnbauer et al., 1996), aufgrund der Expression im Stratum granulosum für die Immunzellen fast unzugänglich (de Gruijl et al., 1999). Helfer-T-Zell-Antworten werden zwar bei CIN-Patientinnen, jedoch nur selten bei Patientinnen mit Zervixkarzinom beobachtet. Das könnte einen Defekt bei der korrekten E7-Präsentation zur Aufrechterhaltung der E7-spezifischen T-Zellen widerspiegeln (Nakagawa et al., 1996; Tsukui et al., 1996; Kadish et al., 1997; Luxton et al., 1997; de Gruijl et al., 1998). Des weiteren ist die Häufigkeit von Langerhans Zellen, den epithelialen Dendritischen Zellen, umgekehrt proportional zur Schwere der Erkrankung (Viac et al., 1990; Morelli et al., 1992; Lehtinen et al., 1993); in Kondylomen und CIN wurde eine signifikante Abnahme von Langerhans Zellen im Vergleich zu „normalen“ Gewebeproben der selben Patienten beobachtet, was nahe legt, daß dadurch die immunologische Überwachung nachläßt (Viac et al., 1990; Lehtinen et al., 1993). HPVs sind also in der Lage, das Immunsystem zu umgehen und einen Status der Immuntoleranz her zu stellen (Tindle & Frazer, 1994; O'Brien & Campo, 2002).

Einige Vakzinierungsstrategien sind entwickelt worden, um eine verstärkte Immunantwort gegen HPV auszulösen.

A.6 Vakzinierungsstrategien

A.6.1 Prophylaktische Vakzine

Prophylaktische Vakzine dienen dazu, eine Infektion zu verhindern, wobei die ausgelöste Immunantwort gegen die späten Strukturproteine wie L1 gerichtet ist, aus denen das Viruskapsid besteht. Die häufigste prophylaktische Vakzine besteht aus virus-ähnlichen Partikeln (VLPs), die einen idealen Untereinheiten-Impfstoff darstellen, der weder DNA noch onkogene Proteine enthält (Berry & Palefsky, 2003).

A.6.2 Therapeutische Vakzine

Diese Vakzine sind in der Regel gegen die E6 und E7 Proteine gerichtet, da sie in den meisten hochgradigen Läsionen und im Karzinom vermehrt exprimiert werden (Stern, 2001). Idealerweise wird dadurch eine zelluläre Immunantwort erzeugt, die HPV-spezifische zytotoxische T-Zellen induziert (Stern, 2001; Berry & Palefsky, 2003).

Beide Arten von Impfstoffen sind erfolgreich in präklinischen Studien an Tiermodellen getestet worden, wo sie vor Neuinfektionen schützten oder bestehende Tumore beseitigen konnten (Tabelle A.3) und werden inzwischen in klinischen Studien getestet (Tabelle A.2).

Tabelle A.2: Klinische Studien von HPV Vakzinen

Pharmakonzern	prophylaktisch / therapeutisch	Antigen	Art der Vakzine	HPV-Typ
Merck	P	L1	VLP	6, 11, 16, 18
NCI	P	L1	VLP	16
Merck	P	L1	VLP	16
Merck	P	L1	VLP	11
Stressgen	T	E7	Fusionsprotein (HspE7)	16
Xenova	T	E6, E7	Vacciniavirus (TA-HPV)	16, 18
Zykos	T	E7	verkapselte Plasmid-DNA	
Xenova	P, T	L2, E6, E7	Fusionsprotein (TA-CIN)	16
GlaxoSmithKline	T	E7	Fusionsprotein (D16E7)	16
NCI	P, T	L1, L2, mutated E2, mutated E7	CVLP	16
Not Available	T	E7	Peptide	16

aus Berry and Palefsky, 2003

Tabelle A.3: Verschiedene Modelle einer HPV-Vakzine

Impfstoff	Struktur	prophylaktisch / therapeutisch	Art der relevanten Immunantwort	Referenzen
VLPs	PV-Kapside aus den Strukturproteinen L1 oder L1/L2	P	humoral: neutralisierende Antikörper gegen L1 /L2	Kirnbauer et al., 1992 Brown et al., 2001 Evans et al., 2001 Emeny et al., 2002
Kapsomere	L1-Pentamere	P, T	humoral: neutralisierende Antikörper gegen L1 zellulär: zytotoxische T-Lymphozyten gegen L1	Rose et al., 1998 Ohlschlager et al., 2001
CVLPs (chimäre VLPs)	VLPs aus Fusion von Strukturproteinen und Peptiden früher Proteine	T (P)	zellulär: zytotoxische T-Lymphozyten gegen E7 (humoral: neutralisierende Antikörper gegen L1 /L2)	Greenstone et al., 1998 Peng et al., 1998 Schäfer et al., 1999 Wakabayashi et al., 2002
(Fusions-) Proteine	E7 hsp65+E7 Fusion aus L2, E6 + E7 (TA- CIN) Haemophilus influenzae Protein D + E7 (D16E7)	P, T	humoral: neutralisierende Antikörper gegen L2 zellulär: zytotoxische T-Lymphozyten gegen E6 / E7	Hariharan et al., 1998 Chu et al., 2000 van der Burg et al., 2001 Gerard et al., 2001 Kim et al., 2002
Peptide	synthetisch hergestellt Peptide von L2 / E6 /E7	P, T	humoral: neutralisierende Antikörper gegen L2 zellulär: zytotoxische T-Lymphozyten gegen E7	Kawana et al., 2001 Castellanos et al., 2001 Kadish et al., 2002 Zwaveling et al., 2002
DNA-Vakzine	Plasmid-DNA, die für L1 / E7 codiert	P, T	humoral: neutralisierende Antikörper gegen L1 zellulär: zytotoxische T-Lymphozyten gegen E7	Osen et al., 2001 Rocha-Zavaleta et al., 2002 Cheng et al., 2002 Sheets et al., 2003 De Marco et al., 2003

A.7 DNA-Immunisierung

DNA-Vakzine stellen einen neuen Ansatz der Immunisierung dar, bei dem statt eines abgetöteten oder attenuierten Krankheitserregers oder einer Untereinheit davon, ein oder mehrere Gene, die für Proteine des Pathogens kodieren, verimpft werden. Ziel dieses Ansatzes ist es, sowohl zelluläre als auch humorale Immunität gegen z.B. Krebserkrankungen, Allergien oder Autoimmunkrankheiten zu erzeugen (Tabelle A.4).

Tabelle A.4: Möglich Ziele für eine DNA-Vakzine

Erkrankung	Referenzen
Krebserkrankungen	
Prostatakrebs	Bhattachary et al., 2002 Steiner et al., 2002 Kuratsukuri et al., 2002
Zervixkarzinom	Osen et al., 2001 Rocha-Zavaleta et al., 2002 Cheng et al., 2002 Sheets et al., 2003 De Marco et al., 2003
Allergien	
Hausstaubmilbe	Hsu et al., 1996a Hsu et al., 1996b Jaquet et al., 2003
Birkenpollen	Hartl et al., 1993
Autoimmunkrankheiten	
Typ I Diabetes	Li & Escher, 2003
Multiple Sklerose (Tiermodell: experimentelle Autoimmunencephalomyelitis, EAE)	Baker & Hankey, 2003

Bei der DNA-Vakzinierung werden meist Plasmide verwendet, die für ein spezifisches Antigen unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors kodieren. Das dann endogen synthetisierte Immunogen besitzt eine natürliche Konformation und durchläuft posttranslationale Modifikationen und Signalwege der Immunerkennung, die sich nicht von denen natürlicher Antigene unterscheiden. Plasmid-DNA kann eine große Anzahl verschiedener Zellen transfizieren und scheint bereitwillig von verschiedenen Zellen des reticuloendothelialen Systems aufgenommen zu werden, darunter auch Makrophagen und Dendritische Zellen (Condon et al., 1996; Parker et al., 1999; Lunsford et al., 2000).

DNA-Vakzine vereinen die optimalen Charakteristika der konventionellen Impfstoffe: Sie sind nicht infektiös, produzieren aber die Antigene *in vivo* und können sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort auslösen (Abbildung A.4, Tabelle A.5). Außerdem erleichtern sie die Verwendung kombinatorischer Impfstoffe und sind auch ohne Kühlung stabil.

Tabelle A.5: Immunogenität und Effizienz von DNA-Vakzinen, die erfolgreich in Tiermodellen getestet wurden

Pathogen	Protein(e)	Antikörper	CTL	Schutz	Referenzen
VIREN					
Cytomegalovirus	pp89	+	+	+	Armas et al., 1996
Encephalitis Virus	prM/E	+	ND	+	Philpotts et al., 1996
Hepatitis B Virus	HbsAg HbcAG	+	+	+	Davis et al., 1993 Michel et al., 1995 Kuhöber et al., 1996 Davis et al., 1996
Herpes Virus, bovin	gD	+	ND	+	Cox et al., 1993
Herpes simplex virus 1,2	gB, gD	+	fragwürdig	+	McClemens et al., 1996 Kriesel et al., 1996 Bourne et al., 19996
Affen Immundefizienz Viren und Affen / Human Immundefizienz Virus-Chimeren	Gag, Pol, Env, Vif, Vpr Vpu, Rev, Tat, Nef	+	+	+	Wang et al., 1993 Lu et al., 1996 Boyer et al., 1996 Letvin et al., 1998
Influenza	HA, NP	+	+	+	Fynan et al., 1993 Donnelly et al., 1995 Robinson et al., 1997
lymphocytäres Choriomeningitisvirus	NP	+	+	+	Yokoyama et al., 1995
Masern	HA, F, NP	+	+	ND	Cardoso et al., 1996
Tollwut	G	+	+	+	Xiang et al., 1994
Rotaviren	VP6	+	ND	+	Herrmann et al., 1996
BAKTERIEN					
Mycoplasma pulmonis	library	+	ND	+	Barry et al., 1995
Mycobacterium tuberculosis	Ag85, hsp65	+	+	+	Tascon et al., 1996 Huygen et al., 1996
PARASITEN					
Malaria	CSP, HEP17	+	+	+	Sedegah et al., 1994 Doolan et al., 1996

ND: nicht durchgeführt

[http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/docfilename/0000003769/dnareprt\[1\].pdf](http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/docfilename/0000003769/dnareprt[1].pdf)

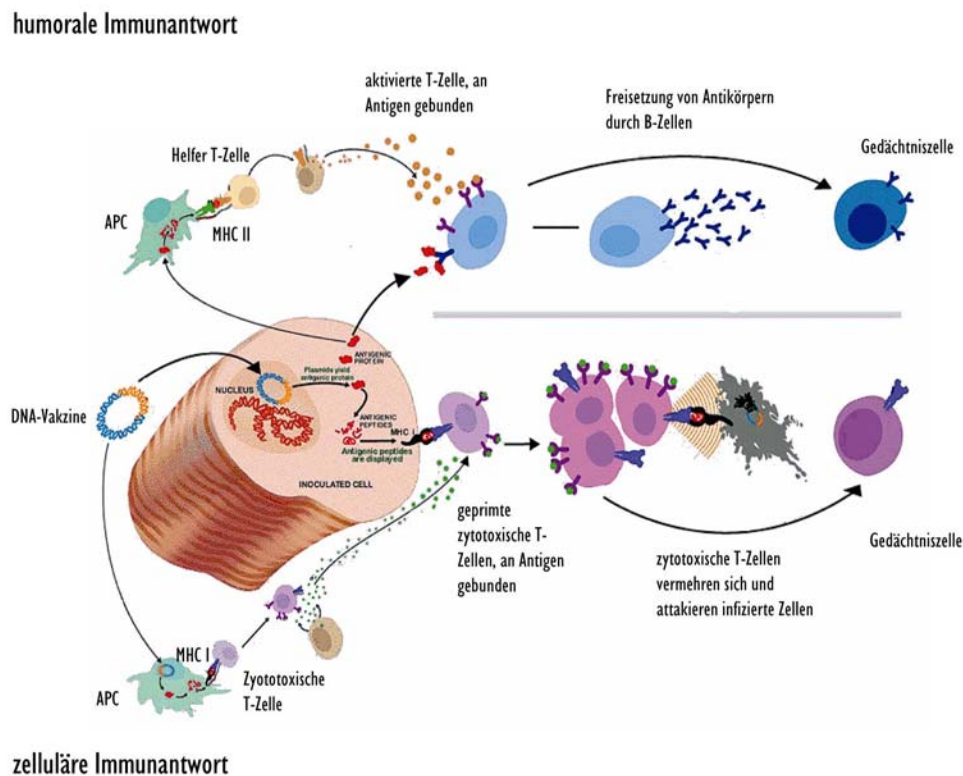


Abbildung A.4: Immunmechanismen, die durch Impfung mit nackter DNA induziert werden.
Aus Scientific American, Juli 1999

A.8 Zielsetzung der Arbeit

Es sollte untersucht werden, ob sich die Strukturproteine L1 und L2 von HPV 16 als Vehikel zur Immunisierung eignen. HPV-Partikel und auch VLPs werden von Zellen verschiedener Spezies sehr gut aufgenommen (Müller et al., 1995). Diese Eigenschaft sollte genutzt werden, um DNA in Zellen einzuschleusen, die eine Immunantwort auf das kodierte Antigen hervorrufen soll.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um DNA mit Papillomvirusproteinen zu assoziieren, von denen einige hier kurz vorgestellt werden.

A.8.1 Pseudovirionen

A.8.1.1 Rekombinante Vacciniaviren

Beim Vacciniavirus-System wurden die Strukturproteine L1 und L2 von BPV (Zhao et al., 1998), HPV 33 (Unckell et al., 1997) oder HPV 18 (Stauffer et al., 1998) in Cos-Zellen

(Unckell et al., 1997; Zhao et al., 1998) oder 293T-Zellen (Stauffer et al., 1998) mittels rekombinanter Viren exprimiert. Die Zellen wurden vorher mit einem für β -Gal kodierenden Plasmid (3,5 bis 10,2 kb) transfiziert, das verpackt werden sollte. Episomale Kopien des Plasmids konnten erfolgreich in Abwesenheit eines HPV-Verpackungssignals eingepackt und dann in Zellen transduziert werden.

A.8.1.2 in vitro Konstruktion von Pseudovirionen

Hierfür werden VLPs bestehend aus HPV 16 L1 (Touze & Coursaget, 1998) oder L1 und L2 (Kawana et al., 1998) im Bakulovirussystem hergestellt. Das Disassemblieren der Partikel erfolgt durch Zugabe von Calcium-Chelatbildnern wie EGTA zusammen mit DTT (Touze & Coursaget, 1998) oder durch Reduktion der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol (Kawana et al., 1998). Das Zusammensetzen der Partikel durch Zugabe von 25 mM CaCl_2 oder Dialyse gegen PBS mit physiologischer NaCl-Konzentration findet in Gegenwart von Plasmid-DNA statt, die für verschiedene Reportergene kodiert (β -Gal oder GFP). Die so entstandenen Pseudovirionen wurden mit DNaseI behandelt, um nicht verpackte DNA zu entfernen, und für Transduktionsexperimente eingesetzt, in denen das Reporterplasmid erfolgreich in die Zielzellen eingeschleust wurde (Kawana et al., 1998; Touze & Coursaget, 1998). Die Rolle von L2 wurde von den Gruppen unterschiedlich bewertet: Im Gegensatz zu Kawana et al. sind Touze & Coursaget der Auffassung, daß L2 für die Verpackung und die Infektion nicht nötig ist.

A.8.1.3 Pseudovirionen aus Hefe

Bei dieser Methode wurde ein *saccharomyces cerevisiae*-Stamm mit zwei Plasmiden transfiziert: Eines kodiert für die Strukturproteine L1 und L2 von HPV 16, das andere enthält das Reportergen (GFP), HPV 16 E2 und die URR, wobei das E2-Protein durch Interaktion mit der URR bei der Verpackung des Plasmids in die Partikel eine Rolle spielt. Aufgrund von ebenfalls kodierten Selektionsmarkern auf beiden Plasmiden kann auf doppelt positive Hefeklonen selektiert werden. Etwa 30 % der produzierten Partikel enthalten DNA. Nach Behandlung mit DNaseI wurden ID13-Zellen erfolgreich mit den Pseudovirionen transduziert, wie die Expression des Reportergens zeigte (Rossi et al., 2000).

A.8.2 Kopplung von DNA an Partikel

Diesem Ansatz liegt die Überlegung zu Grunde, daß DNA nicht in Partikel verpackt sein muß, um in Zellen zu gelangen, sondern daß externe Bindung an VLPs dafür ausreichend ist. An VLPs aus sowohl L1 als auch L1 und L2 von HPV 6, -11, -16 und -18 (Müller et al., 1995, Yeager et al., 2000), die entweder im Bakulovirussystem (Müller et al., 1995) oder in Hefe (Yeager et al., 2000) hergestellt wurden, wurde DNA mit dem β -Gal-Reportergen chemisch gekoppelt. Bei einem Reporterplasmid von knapp 9 kb lag die Infektion bei weniger als einem Prozent (Müller et al., 1995). Wurde jedoch ein lineares DNA-Stück von 1,8 kb, das den CVM Promotor, das Reportergen und ein Polyadenylierungssignal umfaßte, an die Partikel gebunden, wurden 15-40 % der Zellen infiziert. Vermutlich verhindert ein komplettes Plasmid aufgrund seiner Größe die Aufnahme der VLPs in Zellen (Yeager et al., 2000). Die Aussagen über die Notwendigkeit von L2 bei der Infektion sind auch hier unterschiedlich.

A.8.3 Kopplung von DNA an ein HPV 16 L2-Peptid

Bei Infektionsversuchen mit HPV 6 und -16 Pseudovirionen fanden Kawana et al. 1999 heraus, daß monoklonale Antikörper gegen ein synthetisches Peptid der HPV 16 L2-Sequenz, das die Aminosäuren 108 bis 120 umfaßt, die Pseudoinfektion blockieren. Da die Antikörper an intakte HPV16 L1/L2 VLPs binden, wird davon ausgegangen, daß sich diese L2-Region an der Oberfläche der Virionen befindet. Auch ist die Aminosäuresequenz verschiedener HPV-Typen in diesem Bereich stark konserviert, so daß es sich eventuell um ein kreuzneutralisierendes Epitop von genitalen HPV-Typen handelt. In einem Kompetitionsassay mit dem L2₁₈₀₋₁₂₆-Peptid von HPV 16 konnte die Infektion von COS-1-Zellen mit HPV 16 Pseudovirionen behindert werden (Kawana et al., 2001). Mit einem Fusionsprotein aus diesem L2-Peptid und GFP konnte gezeigt werden, daß das Peptid die Bindung und den Eintritt in Zellen vermittelt. Wurden die ersten vier Aminosäuren des Peptids, die bei verschiedenen HPV-Typen stark konserviert sind, ausgetauscht, so konnte keine Bindung des Fusionsproteins mehr beobachtet werden. In Pseudovirionen mit der selben Mutation sank die Infektiosität, was nahe legt, daß L2 in einen frühen Schritt bei der Infektion verwickelt ist.

A.8.4. Spezifische Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei verschiedene Vehikelpräparationen im Vergleich zu nackter DNA getestet werden: (i) Pseudovirionen, bei denen das Zielplasmid in HPV 16-VLPs verpackt ist, (ii) VLPs, an die das Reportergen von außen gebunden ist und (iii) ein Peptid von HPV 16 L2, an das das Reportergen gebunden vorliegt. Als Reportergen wurde Ovalbumin ausgewählt.

Dabei waren folgende experimentelle Schritte vorgesehen:

- Klonierung der zu verpackenden / koppelnden DNA-Konstrukte und Test auf Expression des Reportergens Ovalbumin
- Herstellung von Pseudovirionen im Hefesystem und durch Dis- und Reassembly, Kopplung des Reporters an HPV 16 VLPs und L2₁₀₈₋₁₂₆ und Überprüfung der verschiedenen Vehikel auf den korrekten Zusammenbau
- Immunisierung von Versuchstieren und Analyse der Immunantwort

B Material

B.1 Chemikalien

Chemikalien und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

B.2 Radiochemikalien

$[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP (25 $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$)	Amersham Biosciences, Braunschweig
$[\alpha^{32}\text{P}]$ -dGTP (100 $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$)	
$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (gesamt 5 mCi)	Perkin Elmer, Weiterstadt

B.3 Kits

PCR Kits	<i>Taq</i> DNA Polymerase Herkulase™ Hotstart DNA Polymerase	Promega, Mannheim Stratagene, Heidelberg
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit QIAEX II Gel Extraction Kit Effectene™ Transfection Reagent		Qiagen, Düsseldorf
Cytofix / Cytoperm™ Kit		BD PharMingen San Diego, CA, USA

B.4 Enzyme (DNA-Modifikation)

Alle Restriktionsenzyme und andere DNA-modifizierenden Enzyme mit dazugehörigen Puffern wurden von NEBiolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

B.5 Größen- und Konzentrationsstandards

SmartLadder Größen-/Konzentrationsstandard für DNA Protein-Größenstandard BSA-Proteinkonzentrationsstandard		Eurogentech, Darmstadt Biorad, München Sigma, Deisenhofen
---	--	---

B.6 Antikörper

B.6.1 Primärantikörper

Bezeichnung, Spezifität	Typ	Anwendung	Bezugsquelle
α -OVA; 8,1 mg/ml	Maus monoklonal Klon: OVA-14	Western Blot 1:10.000	Sigma, Deisenhofen
α -HPV16 L1; 0,5 mg/ml	Maus monoklonal	Western Blot	BD Pharmingen, San

4543 α -HPV16 L1	Klon: CAMVIR-1 Kaninchen polyklonal	1:2000 Western Blot	Diego, CA, USA Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg
25/C α -HPV16 L1	Maus monoklonal	ELISA 1:5000	Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg
#65-Kanda α HPV16 L2	Kaninchen polyklonal	Western Blot 1:50	Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg
α -Maus CD4; 0,2 mg/ml	Ratte monoklonal Cy-chrom konjugiert Klon: H129.19	FACS 1:100	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
α -Maus CD8a; 0,2 mg/ml	Ratte monoklonal PE konjugiert Klon: 53-6.7	FACS 1:100	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
α -Maus IFN γ ; 0,1 mg/ml	Ratte monoklonal FITC konjugiert Klon: XMG1.2	FACS 1:50	Caltag, Burlingame, CA, USA
α -Maus IFN γ ; 0,5 mg/ml	Ratte monoklonal Biotin konjugiert Klon: XMG1.2	ELISPOT 1:500	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
α -Maus IFN γ ; 1 mg/ml	Ratte monoklonal Klon: R4-6A2	ELISPOT 1:500	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

B.6.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Anwendung	Bezugsquelle
Ziege- α -Maus IgG / IgM, HRP konjugiert	Western, ELISA 1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege- α -Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Western, ELISA 1:7500	Dianova, Hamburg

B.7 DNA und Peptide

B.7.1 Plasmide

pAc-Neo-OVA	12 kb, enthält komplette OVA cDNA unter Kontrolle des humanen β -Actin Promotors; Moore et al, 1988, Cell 54:777-785; von H.G. Rammensee, Tübingen, erhalten; verwendet, um OVA über PCR zu amplifizieren und zu subklonieren;
pcDNA3.1+	5428 bp, MCS zwischen pCMV-Promotor und BGH Polyadenylierungssequenz, Ampicillin-Resistenzgen; Insertion cDNA OVA über BamHI und EcoRI Invitrogen
pYes2*-VP22-E7(1-60)	7906 bp nach Entfernung der bakteriellen Sequenzen, 2 μ ori, HPV 16 E2 und URR, VP22-E7(1-60) unter Kontrolle des pCMV-Promotors, URA3 Marker; Austausch VP22-E7 gegen OVA über BamHI und AflII Targetplasmid für Pseudovirionen; von T. ElHindi DKFZ Heidelberg erhalten
pD125	15 kb, HPV 16 L1 und L2 unter Kontrolle den Gal1/10 Promotors, 2 μ ori, LEU2-d Marker; Hofmann et al., 1995; Verpackungsplasmid; von Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg erhalten

B.7.2 Oligonukleotidprimer

für Klonierung von OVA in pcDNA3.1 mit Restriktionsstellen

sense	OVA 5' BamHI	5' AGCAGTGGATCCATGGGCTCCATCGGCAGCA 3'
antisense	OVA 3' EcoRI	5' AGCAGTGAATTCCTTAAGGGGAAACACAATCTGCC 3'

für den Austausch von VP22-E7(1-60) gegen OVA in pYES2*-VP22-E7(1-60) mit Restriktionsstellen

sense	OVA 5' BamHI	siehe oben
antisense	OVA 3' AflII	5' AGCAGTCTTAAGTTAAGGGGAAACACAATCTGCC 3'

für PCR^{B/N} mit und ohne Modifikation

sense	pCMV 5' (Biotin)	5' GTTGACATTGATTATTGACTA 3'
antisense	BGHpA 3' (NH ₂)	5' CCATAGAGCCCACCGCATCCC 3'

für OVA-Nachweis

sense	yes I	5' TCAACCAAATCACCAAACCAAATGA 3'
antisense	yes II	5' TGCTTGTGTGTCTTCATCCTTAAAT 3'

B.7.3 Peptide

Folgende Peptide wurden in der Peptidsyntheseinheit des DKFZ hergestellt und mittels HPLC gereinigt:

Ovalbumin ₂₅₈₋₂₆₅	SIINFEKL	H2-K ^b restringiertes CTL Epitop (Turner et al., 1997), zur Beladung von Zielzellen im intrazellulären IFN γ -Assay und ELISPOT verwendet
HPV 16 L2 ₁₀₈₋₁₂₆	LVEETSFDAGAPTSVPSI	zur Herstellung eines Antiserums und als Carrierpeptid zum Zelleintritt für DNA verwendet (Kawana et al., 2001)
HPV 16 L1 ₁₆₅₋₁₇₃	AGVDENRECI	H2-D ^b restringiertes CTL Epitop (Öhlschläger et al., 2003), zur Beladung von Zielzellen im Zytotoxizitätstest und ELISPOT verwendet

B.8 Biologische Materialien

B.8.1 Bakterienstämme

E. coli SURE

Präparation von Plasmid DNA

e14^(McrA)D (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC* ::TN 5 (Kan^r) *uvrC* [F⁺ *proAB lacI^f ZAM15Tn 10* (Tet^r)]^c

B.8.2 Hefestämme

saccharomyces cerevisiae 1699/pD125	Herstellung eines DNA-verpackenden Stammes; enthält das Strukturplasmid pD125 MAT α <i>leu2-04 ade1 ura3 pep4::ura3 cir</i> ⁰
-------------------------------------	--

B.8.3 Eukaryontische Zelllinien

B.8.3.1 Insektenzellen

SF9	Ovarialgewebe der Larve der <i>Spodoptera frugiperda</i> ; Replikation rekombinanter Bakulovirus Expressionsvektoren
TN high five	Ovarialgewebe der Larve der <i>Trichoplusia ni</i> ; Expression von VLPs

B.8.3.2 Säugerzellen

EL4	T-Lymphom Linie, Stimulator-Zellen; in C57BL/6 Maus durch 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracen induziert; Shevach et al., 1972
EG7	T-Lymphom Linie, Stimulator-Zellen; mit pAc-neo-OVA transfizierte EL4 Zellen; Moore et al., 1988
RMA-S	TAP-defiziente Lymphomzellen aus einer C57BL/6 Maus, Stimulator-Zellen; Powis et al., 1991
293T	humane Nierenepithelzellen, sehr gut transfizierbarer Abkömmling der Linie 293, in die das Gen für das SV40 T-Antigen inseriert wurde

B.8.4 Mauslinien

C57BL/6	Charles River WIGA, Sulzfeld im Zentralen Tierlabor des DKFZ unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten
---------	--

B.8.5 Bakulovirusstocks

A 245	Expression von HPV 16 L1ΔC, erhalten von Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg
A 194	Expression von HPV 16 L1ΔC E7 ₁₋₅₅ , erhalten von Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg

B.9 Medien

B.9.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefe Extrakt 5 g NaCl	ad 1 l H ₂ O bidest
LB Agar	15 g Bacto-Agar 1 l LB-Medium	

B.9.2 Medien für die Hefekultur

20 % Glucose (sterilfiltrieren)

20 % Galactose (sterilfiltrieren)

YPD-Medium 20 g Difco Pepton

	10 g Hefe Extrakt ad 1 l H ₂ O, auf pH 5,8 einstellen, autoklavieren 2 % Glucose zugeben
URA ⁻ /LEU ⁻ Medium	6,7 g Stickstoffbasis ohne Aminosäuren 20 g Dextrose 182 g Sorbitol 0,02 g L-Arginin 0,01 g L-Histidin 0,06 g L-Isoleucin 0,04 g L-Methionin 0,06 g L-Phenylalanin 0,06 g L-Threonin 0,04 g L-Tryptophan 0,05 g L-Tyrosin ad 1 l H ₂ O, autoklavieren
Agarplatten	98 % Medium 2 % Bacto-Agar, autoklavieren
100 x LEU	10 g L-Leucin ad 1 l H ₂ O, sterilfiltrieren
100 x URA	0,2 g L-Uracil ad 1 l H ₂ O, sterilfiltrieren

B.9.3 Medien für die Zellkultur

TNM-FH und Trypanblau von Sigma (Deisenhofen), alle anderen Medien und Zusätze von GibcoBRL (Eggenstein) bezogen.

Medium	Zusatz von
Dublecco's MEM / 2 mM L-Glutamin	10 % FCS 1 % Penicillin / Streptomycin
RPMI 1640 / 2 mM L-Glutamin	10 % FCS 1 % Penicillin / Streptomycin
Minimum Essential Medium Eagle α -Modification (Restimulierung: „komplett“)	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 % Penicillin / Streptomycin 0,01 mM 2-Mercaptoethanol 25 mM Methyl- α -Mannopyranosid 3,3 % ConA-induzierter Überstand einer Rattenmilzzellkultur als IL2 Quelle)
TMN-FH	10 % FCS 1 % Antibiotikum / Antimykotikum Mix
Excell-8	10 % FCS

	2 mM L-Glutamin 1 % Antibiotikum / Antimykotikum Mix
Fötale Kälberserum (FCS)	vor Gebrauch 30 min bei 56 °C inaktivieren
Penicillin (10000 U / ml) / Streptomycin (10000 µg / ml) Antibiotikum / Antimykotikum-Mix L-Glutamin (200 mM) Geneticin (G418) Trypsin / EDTA 0,4 % Trypanblau	

B.10 Puffer und Lösungen

1 x PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Phenol /CIA	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohl 25:24:1 (Roth)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8 0,1 mM EDTA

C Methoden

C.1 Mikrobiologische Methoden

C.1.1 Aufbewahrung und Kultur von Bakterien

Bakterien können in einer Flüssigkultur bei 4 °C etwa drei Wochen aufbewahrt werden, auf LB-Agarplatten (B.9.1) 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.

C.1.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation durch Elektroporation wurden 500 ml LB-Medium (B.9.1) mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm geschüttelt, bis die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht hatten. Die Bakterien wurden 20 min auf Eis gekühlt und dann bei 4 °C mit 4000 rpm 5 min zentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pond, Bad Nauheim, Rotor SLA-3000). 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 (Sorvall RC-5B)), 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 (Sorvall RC-5B)), in 2 ml kaltem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50-µl-Aliquots bei –70 °C eingefroren.

C.1.3 Elektrotransformation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 1–2 μ l DNA-Lösung vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen, Groningen, Niederlande) überführt. Die Transformation erfolgte in der Elektroporationskammer (Gene Pulser®, Biorad, München) bei 2,1 kV, 25 μ FD und 200 Ω . Sofort danach wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium / 20 mM Glukose aufgenommen und 30–120 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

C.2 Arbeiten mit DNA

C.2.1 Fällen von DNA

Puffer und Lösungen:

3 M NaOAc pH 5,0

Um DNA in wäßrigen Lösungen zu fällen, wurde die Lösung mit $1/10$ Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,0 und 2 Volumen 100%igem (v/v) Ethanol versetzt und 10 min bei –20 °C inkubiert. Dann wurde die DNA bei 4 °C und 15000 rpm für 15 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, 5417R) und das Pellet mit kaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in einem adäquaten Volumen eines geeigneten Puffers gelöst, um eine Konzentration von 0,1 bis 2 μ g zu erreichen, und bis zur Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

C.2.2 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Puffer und Lösungen:

Lösung I 50 mM Glucose / 25 mM Tris-HCl pH 8,0 / 10 mM EDTA

Lösung II 0,2 N NaOH / 1 % (w/v) SDS

Lösung III 49,1 g Kaliumacetat / 20 ml Eisessig / ad 100 ml H₂O

Phenol / CIA

Mit einer einzelnen Bakterienkolonie wurden 3 ml LB-Medium / Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge, 5417R) pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer I resuspendiert, vorsichtig mit 200 µl Puffer II gemischt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl Puffer III wurde vorsichtig gevortext (Reax Top, Heidolph, Kelkheim) und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, 5417R), und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/CIA versetzt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge, 5417R), um die DNA zu extrahieren. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA wie beschrieben gefällt (C.2.1) Nach dem Trocknen wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer (B.10) gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

C.2.3 Großpräparation von Plasmid-DNA

Puffer und Lösungen:

QIAGEN Plasmid Maxi Kit

P1	50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 10 mM EDTA / 100 µg/ml RNase A
P2	200 mM NaOH / 10 % (w/v) SDS
P3	3 M Kaliumacetat pH 5,5
QBT	750 mM NaCl / 50 mM MOPS pH 7 / 15 % (v/v) Ethanol / 0,15 % (v/v) Triton X-100
QC	1 M NaCl / 50 mM MOPS pH 7 / 15 % (v/v) Ethanol
QF	1,25 M NaCl / 50 mM Tris-HCl pH 8,5 / 15 % (v/v) Ethanol

Bakterien einer 200-ml-Übernachtskultur wurden durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 5500 rpm pelletiert (Sorvall RC-5B, Rotor SLA-3000). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml kaltem Puffer P3 wurde vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Entfernung von Zelltrümmern, Proteinen und chromosomaler DNA von der Plasmid-DNA erfolgte durch Zentrifugation (30 min / 15000 rpm / 4 °C (Sorvall RC-5B, Rotor F-28/50)). Der Überstand wurde durch einen Filter auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Nach dem Durchlauf wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und schließlich die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat

wurde zur Fällung der DNA mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert (45 min / 4300 rpm / 4 °C (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R)). Das Sediment wurde mit 5 ml kaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 300 µl eines geeigneten Puffers aufgenommen.

C.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Photometer U-1100, Hitachi, Tokyo, Japan). Für die Messung wurden die Lösungen 1:100 verdünnt.

- für einzelsträngige DNA und RNA: $OD_{260, 1\text{ cm}} = 1\text{ c} \sim 40\ \mu\text{g} / \mu\text{l}$
- für doppelsträngige DNA: $OD_{260, 1\text{ cm}} = 1\text{ c} \sim 50\ \mu\text{g} / \mu\text{l}$

C.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme werden in 50%igem (v/v) Glycerin aufbewahrt, haben aber eine optimale Aktivität bei Glycerinkonzentrationen unter 10 %. Aufgrund dessen ist das Endvolumen des Restriktionsansatzes abhängig von der eingesetzten Enzymmenge.

Analytische Spaltung 10-µl-Ansatz	Präparative Spaltung 100-µl-Ansatz
1 µg Plasmid-DNA 5 U Restriktionsenzym 1 µl 10 x Reaktionspuffer ad 10 µl TE-Puffer	10–20 µg Plasmid-DNA 50–10 U Restriktionsenzym 10 µl 10 x Reaktionspuffer ad 100 µl TE-Puffer

Die Reaktionsansätze wurden für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Fällung, Phenolextraktion oder Zugabe von 6 x Agarosegel-Beladungspuffer gestoppt.

C.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die Entfernung der 5`-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren wird von der „calf intestinal phosphatase“ (CIP) katalysiert. Da die T4-DNA-Ligase 5`phosphorylierte DNA-Enden für die Ligation benötigt, wird auf diese Weise eine Ligation des Vektors mit sich selber verhindert und die Einführung des Inserts erleichtert.

Dazu wurde die DNA in 1 x CIP-Puffer aufgenommen (0,5 µg/10 µl) und nach Zugabe von 0,1 U CIP/pmol DNA für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde dann durch Phenol/CIA-Behandlung extrahiert (C.2.2) und nach Ethanolfällung und Trocknen in TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

C.2.7 Ligation von DNA

Die zu klonierende DNA und der mit entsprechenden Enzymen behandelte Vektor wurden im absoluten Mengenverhältnis 1:1 bis 10:1 eingesetzt, wobei die Menge an Vektor 0,1–0,5 µg betrug.

Ligationsansatz:

- 1 µl Vektor-DNA
- x µl Insert-DNA
- 1 µl 10 x Ligationspuffer
- 0,5–1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)
- 1 µl 5 mM ATP
- ad 10 µl H₂O

Der Ligationsansatz wurde für 4–16 h bei 16 °C inkubiert.

C 2.8 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen

Puffer und Lösungen:

6 x Agarosegel-Beladungspuffer	40 % (w/v) Saccharose / 0,125 % (w/v) Bromphenolblau / 0,1 % (v/v) SDS
50 x Agarosegel-Elektrophoresepuffer	2 mM Tris-HCl pH 7,5 / 250 mM Natriumacetat / 50 mM EDTA pH 8,0, auf pH 7,8 einstellen
1 % (w/v) Ethidiumbromid	

Die Agarosegelelektrophorese wurde durchgeführt, um die Vollständigkeit von Restriktionsspaltungen zu überprüfen, Restriktionsfragmente präparativ zu isolieren und DNA-Konzentrationen im Vergleich zu Standards abzuschätzen.

Die Agarosekonzentration der Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA Fragmente und reichte von 0,7 % (Fragmente von 0,8–12 kb) bis 2 % (Fragmente von 0,05–2 kb).

Die Agarose wurde entsprechend der Gelgröße und -konzentration abgewogen (Satorius, Göttingen), mit dem adäquaten Volumen 1 x Agarosegel-Elektrophoresepuffer gemischt und in der Mikrowelle gekocht, bis die Lösung schlierenfrei war. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg / ml) versetzt und in die Gelapparatur (Renner, Heidelberg) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Agarosegel-Beladungspuffer gemischt (Endkonzentration 1 x) und auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in 1 x Agarosegel-Elektrophoresepuffer bei 80–130 Volt (Spannungsgerät Powersupply EPS 3500, Pharmacia Biotech, Freiburg).

Anschließend konnten die DNA-Banden durch das interkalierte Ethidiumbromid im UV-Licht (UV- Leuchttisch 254nm, K.Benda, Wiesloch) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

C.2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

QIAEX II Gel Extraktion Kit

Puffer QX1, Puffer PE

die Zusammensetzung der Puffer ist nicht bekannt

QIAEX II

Silicagel-Partikel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, und das Gelstück wurde gewogen. Je nach Größe des DNA-Fragments wurde eine dem Gewicht des Gelstücks entsprechende Menge an Puffer QX1 zugegeben. So wurden zum Beispiel bei einer Fragmentgröße von 0,1–4 kb 300 µl Puffer QX1 je 100 mg Gel verwendet.

Fragmentgröße [kb]	Volumen Puffer QX1/ 100 mg Gel [µl]
< 0,1	600
0,1–4	300
>4	300 + 200 H ₂ O

Je nach der Menge der zu eluierenden DNA wurde ein bestimmtes Volumen an QIAEX-II-Silicagel-Partikeln zugegeben.

DNA-Menge [μg]	Volumen QIAEX II [μl]
≤ 2	10
2–10	30
je zusätzliche 10	je 30

Das Gemisch wurde für 10 min bei 50 °C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) und alle 2 min gevortext, (Vortex „Reax Top“, Heidolph, Kelheim) um QIAEX II in Lösung zu halten. Dann wurde zentrifugiert (13000 rpm / 30 sec, (Eppendorf Centrifuge, 5417R)), und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 μl Puffer QX1 und zweimal mit 500 μl Puffer PE gewaschen (13000 rpm / 30 sec), um alle Verunreinigungen wie Agarose, Proteine, Salz und Ethidiumbromid zu entfernen, und anschließend an der Luft getrocknet. Für die Elution der DNA wurden 20 μl H₂O oder 10 mM Tris-HCl pH 8,5 zugegeben und gevortext. Dabei richtete sich die Inkubationszeit und -temperatur nach der Größe der DNA-Fragmente.

Fragmentgröße [kb]	Zeit [min]	Temperatur [°C]
≤ 4	5	Raumtemperatur
4–10	5	50
> 10	10	50

Danach wurde zentrifugiert (13000 rpm / 30 sec), und der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration des Eluats wurde in einem Agarosegel durch Vergleich mit einem Standard (Größenmarker) (B.10) abgeschätzt. Die so gereinigte DNA war für Restriktionsspaltungen (C.2.5), Ligationen (C.2.7), PCR (C.2.10) und Sequenzierungen verwendbar.

C.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Kits von Promega (*Taq*-Polymerase) und Stratagene (Herkulase) (B3)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vermehrung ausgewählter Stücke von DNA. Diese erfolgt mit Hilfe hitzestabiler DNA-Polymerasen.

Zur Anreicherung wurden 20 ng der zu amplifizierenden DNA mit

1 x PCR-Puffer
 2,5 mM MgCl₂
 je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 2,5 U Polymerase
 150 ng Sense-Primer
 150 ng Antisense-Primer
 H₂O ad 50 µl

gemischt und mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA. Die Ansätze wurden im Thermocycler (Landgraf, Langenhagen) folgendermaßen inkubiert:

Herkulase:

1 Zyklus	120 sec 94 °C
10 Zyklen	30 sec 94 °C
	60 sec 50 °C
	180 sec 72 °C
20 Zyklen	30 sec 94 °C
	60 sec 60 °C
	180 sec 72 °C
1 Zyklus	420 sec 72 °C
danach	∞ 4 °C

Taq-Polamerase:

1 Zyklus	180 sec 94 °C
30 Zyklen	30 sec 94 °C
	30 sec 53 °C
	30 sec 72 °C
1 Zyklus	420 sec 72 °C
danach	∞ 4 °C

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (C.2.8).

C.2.11 3'-Endmarkierung von DNA

Puffer und Lösungen:

3 M NaOAc pH 5

Radioaktive Markierung ist bei der Visualisierung kleiner DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese sehr nützlich. Im Gegensatz zum Anfärben mit Ethidiumbromid, wo die

Bandenintensität proportional zur Fragmentlänge ist, besitzen alle endmarkierten Fragmente die gleiche Intensität. DNA mit 5'-Überhängen kann mit Hilfe des Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I an den 3'-Enden radioaktiv markiert werden. Man benötigt dazu die [α - ^{32}P]Desoxynucleosidtriphosphate, die zur jeweils ersten Base der 5'-Einzelstrangenden komplementär sind.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 pmol DNA, 4 μl 10 x Klenow-Puffer, 2 μl [α - ^{32}P]dNTP, 1 μl (2 U) Klenow-Fragment ad 40 μl H₂O zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde für 45 min bei 25 °C inkubiert und anschließend gefällt (C.2.1). Das Sediment wurde getrocknet und in einem für die weitere Verwendung geeigneten Puffer aufgenommen.

C.2.12 Herstellung einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde

Puffer und Lösungen:

Oligo-labelling-buffer (OLB)	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
2 x TNE-Puffer	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
2 % (w/v) BSA	
TE / 0,1 % (w/v) SDS	

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 (= 16 U) und 2,5 μl ^{32}P -dCTP (= 25 μCi) zugefügt. Nach 4 h 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 DNA abgetrennt. Dazu wurde eine Pasteurpipette mit in TE gequollenem Sephadex G-50 befüllt, wobei eine kleine Glaskugel das Auslaufen verhinderte, und 4 x mit 1 ml TE / 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Der Markierungsansatz wurde aufpipettiert, die Strahlung mit einem Zählrohr (LB1200, Berthold, Wildbad) detektiert und die markierte DNA so separat aufgefangen. Die Radioaktivität der markierten DNA wurde in einem β -Counter (Tricarb Liquid Scintillation Analyzer, Packard) vermessen.

C.2.13 DNA-DNA-Hybridisierung

Puffer und Lösungen:

20 x SSC	3 M NaCl / 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
5 % Denhardt	25 g BSA / 25 g Ficoll 400 / 25 g Polyvinylpyrrolidon 25 ad 500 ml H ₂ O
NaPP (Natriumphosphatpuffer)	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
Vorhybridisierungslösung	50 % (v/v) Formamid und 0,1 mg/ml tRNA zusammen 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 42 °C in Vorhybridisierungslösung (0,1 ml/cm² Blotmembran) in einem Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Die Sonde wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 3 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 3 x 10⁶ 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 der Membran exponiert.

C.2.14 Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Puffer und Lösungen:

10 x TBE	108 g Tris / 55 g Borsäure / 5,3 g EDTA ad 1 l H ₂ O
30 % (w/v) Acrylamid	
10 % (w/v) APS	
TEMED	

Polyacrylamid-Gelelektrophorese bietet eine hohe Auflösung von niedermolekularen Nukleinsäuren. Besonders DNA-Fragmente <500 bp werden in normalen Agarosegelen schlecht aufgetrennt. Je nach Porengröße des Gels kann eine Auftrennung von 10 bis 1000 bp erreicht werden.

Acrylamidkonzentrationen für die größtmögliche Auftrennung von DNA-Fragmenten:

Acrylamid (%)	Größe der getrennten Fragmente (bp)	Migration von Bromphenolblau (bp)	Migration von Xylencyanol (bp)
3,5	100 bis 1000	100	460
5,0	100 bis 500	65	260
8,0	60 bis 400	45	160
12,0	50 bis 200	20	70
20,00	5 bis 100	12	45

Daten zusammengestellt aus Maniatis & Ptashne, 1973 a und b; Maniatis et al., 1975

Eine der Glasplatten wurde mit Repelsilan behandelt, um die Trennung der Platte vom Gel nach der Elektrophorese zu erleichtern. Für ein 20 x 20 cm großes Gel mit einer Endkonzentration von 8 % Acrylamid wurden 3 ml 10 x TBE, 8 ml 30 % Acrylamid und 19 ml H₂O gemischt. Dann wurden 17 µl TEMED und 125 µl 10 % (w/v) APS beigegeben, gemischt, zügig zwischen die gut abgeklebten Glasplatten gegossen und der Kamm eingeschoben. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel für mindestens 30 min bei 5 V/cm zum warm werden laufen gelassen (Sequenzgel Elektrophoresekammer ADJ-2, Owl Scientific, Portsmouth, NH, USA). Nach dem Beladen lief das Gel bei 2 bis 10 V/cm, wobei Überhitzung zu vermeiden war, da die Proben in der Mitte des Gels schneller laufen und sogar denaturieren könnten.

C.3 Arbeiten mit Zellkultur

C.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Zellen wurden in beschichteten Zellkulturflaschen aus Kunststoff (Greiner, Frickenhausen) in 10 – 30 ml Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptavidin bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 6 % CO₂ kultiviert (Brutschrank Sterikult 200, Labotect, Göttingen). Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 Medium in einer Dichte von 1 – 10x10⁵ Zellen / ml gehalten. Adhärenz Zellen wuchsen in DMEM bis zur Konfluenz und wurden dann weiter passagiert. Dafür wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 1 – 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch festes Klopfen an die Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden je nach Linie in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20 ausgesät.

C.3.2 T-Zell Kultivierung

Puffer und Lösungen:

ACT-Lysepuffer 17 mM Tris / 160 mM NH₄Cl pH 7,2

Vierzehn Tage nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milzen steril entnommen. Von jeder Milz wurde eine Kultur angelegt, indem durch Passieren der Milzen durch engmaschige Drahtnetze mit einem Spritzenstempel die Zellen vereinzelt wurden. Die Zellen wurden gesammelt (5 min, 1200 rpm (Heraeus Kälzentrifuge Megafuge 1,0 R)), pro Milz in 5 ml ACT-Lysepuffer aufgenommen und 5 min bei 37 °C inkubiert, so daß die Erythrozyten lysiert und aus der Kultur entfernt wurden. Die so behandelten Zellen wurden mit 2×10^6 bestrahlten (200 Gy (Gammacell 1000, Canada Limited)) Stimulator-Zellen (B.8.3.2) in insgesamt 10 ml α MEM (B.9.3) in 25 cm² Zellkulturflaschen stimuliert. Alle sieben Tage erfolgte eine Restimulierung. Dazu wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in jeweils eine Reihe einer 24-well-Zellkulturplatte verteilt und mit 1×10^6 bestrahlten Stimulator-Zellen (200 Gy) und 5×10^6 syngenen Milzzellen, Fütterzellen, (33 Gy) je Vertiefung versorgt. Als Kulturmedium für die Restimulierung wurde α MEM komplett (B.9.3) verwendet.

C.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde durch Färbung mit Trypanblau bestimmt (nur tote Zellen sind durch ihre defekte Plasmamembran anfärbbar). Ein Aliquot einer Zellsuspension wurde 1:10 mit 0,04 % Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Summe aller nicht gefärbten Zellen in den vier großen äußeren Quadranten multipliziert mit $2,5 \times 10^4$ ergab die Zellzahl pro ml.

C.3.4 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Puffer und Lösungen:

Einfriermedium 50 % Kulturmedium / 40 % FCS / 10 % DMSO

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden diese geerntet und sedimentiert (5 min, 1200 rpm (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R)). 5×10^6 – 1×10^7 Zellen wurden in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in einem Kryokonservierungsröhrchen zuerst für mindestens einen Tag bei -70 °C eingefroren und dann zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell bei 37 °C im Wasserbad (Thermomix U, Braun, Melsungen) erwärmt, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R)), um DMSO zu entfernen. Das Zellsediment wurde in 10 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

C.3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen mit DNA

Effectene™ Transfection Reagent, QIAGEN

Die Transfektion eukaryontischer Expressionsvektoren in Zellkultur ermöglicht die Expression der klonierten DNA-Sequenzen. Hierzu wurde der Effectene Transfection Kit (B.3) verwendet, wobei sich die Vorgehensweise an den Empfehlungen des Herstellers orientiert.

Am Tag vor der Transfektion wurden $2 - 8 \times 10^5$ Zellen in 60 mm Ø Kulturschalen (Greiner, Frickenhausen) in 5 ml Medium ausgesät. Für die Transfektion wurden 4 µg DNA mit 150 µl Puffer EC vermischt, 8 µl Enhancer zugegeben und 1 sec gevortext. Nach 2–5 min Inkubation bei RT wurden 25 µl Effectene zugefügt und für 10 sec gevortext und für weitere 5–10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Medium zum Transfektionsmix wurde dieser vorsichtig auf die vorher einmal mit PBS gewaschenen und mit 4 ml Medium versorgten Zellen getropft. Im Anschluß wurden die Zellen für mindestens 24 h kultiviert. Die Genexpression konnte nach Aufschluß der Zellen mittels ECL-Westernblot (C.6.2) überprüft werden.

C.4 Arbeiten mit Hefen

C.4.1 Aufbewahrung und Kultur von Hefen

Die Hefen wurden bei 30 °C in flüssigem YPD-Medium (B.9.2) geschüttelt, bis eine Dichte von 5×10^7 Zellen pro ml erreicht war. Dann wurde 1 ml einer Zellsuspension mit 0,5 ml 86%igem (v/v) Glycerin (sterilfiltriert) vermischt und bei -70 °C eingefroren.

Die Hefen wurden aus der Glycerinkultur auf Platten des passenden Voll- oder Selektionsmediums (B.9.2) ausgestrichen und bei 30 °C für 2 bis 5 Tage kultiviert. Die so gezogenen Kolonien konnten bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden und wurden zum Animpfen von Flüssigmedium verwendet.

C.4.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Puffer und Lösungen:

10 x Lithium-Acetat	1 M LiAc pH 7,5
10 x TE	100 mM Tris-HCl pH 8,0 / 10 mM EDTA pH 8,0

Mehrere Kolonien von 2-3 mm Durchmesser wurden in 1 ml Selektionsmedium inokuliert, gevortext, bis alle Klumpen gelöst waren, in 50 ml Selektionsmedium überführt und bei 30 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. 300 ml YPD-Medium wurden so mit der Übernacht-Kultur angeimpft, daß eine Zelldichte von 5×10^6 / ml entstand und 3-5 h bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt, bis eine Dichte von 1×10^7 Zellen / ml erreicht war. Dann wurden die Zellen geerntet (5 min, 5000 rpm (Sorvall RC-5B, Rotor SLA-3000)) und in 10 ml sterilem H₂O dest. resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml 1x TE / LiAc aufgenommen.

C.4.3 Transformation der Hefezellen

Puffer und Lösungen:

PEG-Lösung	8 vol 50 % (w/v) Polyethylenglycol MW4000 / 1 vol 10 x TE / 1 vol 10 x LiAc
------------	---

Die Lithium-Acetat Methode beruht auf der Tatsache, daß Alkali-Kationen die Hefe für die Aufnahme von DNA kompetent machen. Nachdem die Hefe kurz in gepuffertem Litium-Acetat inkubiert wurde, wird die zu transformierende DNA mittels Träger-DNA eingeführt. Die Zugabe von Polyethylenglycol (PEG) und Hitzeschock lösen die Aufnahme der DNA aus. Für jede Transformation wurden 200 µg Heringsperma-DNA als Träger und 0,1 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Dann wurden 200 µl kompetente Hefezellen und 600 µl PEG-Lösung zugefügt, gut gemischt und 45 min bei 30 °C geschüttelt. Der Hitzeschock wurde für genau 15 min bei 42 °C durchgeführt. Die Hefen wurden sedimentiert (5 sec, 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge, 5417R)) und in 1 ml 1 x TE aufgenommen und je bis zu 200 µl auf Selektionsnährböden ausplattiert.

C.4.4 Nachweis der Proteinexpression in Hefe-Transformanden

Puffer und Lösungen:

Lysepuffer 1 % (w/v) SDS / 0,5 mM EDTA in PBS

Um zu überprüfen, ob Hefeklone, die mit einem induzierbaren Expressionsplamid transfiziert wurden, dieses auch enthalten und das entsprechende Protein produzieren, wurde 1 ml Selektionsmedium in einer 24-well-Platte (Costar, Bodenheim) mit einem Klon angeimpft und für 2 Tage bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert, bis eine Dichte von OD₆₀₀ 1-5 erreicht war. 50 µl dieser Kultur wurden dann in 1 ml YP-Medium mit 2 % Galactose zur Induktion der Proteinexpression überführt und weitere 3 Tage unter Schütteln bei 30 °C wachsen gelassen. Dabei wurde alle 24 h Galactose zugegeben (Endkonzentration 2 %), um anhaltende Induktion zu gewährleisten. Die Hefen wurden sedimentiert (10 min, 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge, 5417R)) und das Pellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Hefen 10 min gekocht und erneut sedimentiert. 100 µl des Überstandes wurde in 1 ml PBS verdünnt und auf eine Protein-Blot-Membran (Protran®, Schleicher & Schuell, Dassel) mittels einer Dot-Blot Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) aufgebracht und ein ECL-Western Blot (C.6.3) durchgeführt.

C.4.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe

Puffer und Lösungen:

Aufbrechpuffer 2 % (v/v) Triton-X-100 / 1 % (v/v) SDS / 100 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA pH 8,0
Phenol / CIA

Die Hefen wurden in 10 ml Selektionsmedium angeimpft und bei 30 °C 24–48 h bis zur stationären Phase auf einem Schüttler wachsen gelassen. Die Kultur wurde 5 min bei 5000 rpm sedimentiert (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Rücklauf resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Aufbrechpuffer, 200 µl Phenol/Chloroform und 0,3 g Glaskügelchen (425-600 µm, Sigma, Deisenhofen) (~200 µl Volumen) aufgefüllt. Dann wurde 5 min gevortext, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit Ethanol gefällt und schließlich in 20-30 µl TE-Puffer mit 0,2 µg RNase aufgenommen.

C.5 Arbeiten mit Proteinen

C.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer und Lösungen:

Trenngel 10-15 % Acrylamid / 125 mM Tris-HCl pH 8,8 / 0,1 % SDS / 0,1 % APS / 0,05 % TEMED
Sammelgel 3 % Acrylamid / 125 mM Tris-HCl pH 6,8 / 0,1 % SDS / 0,1 % APS / 0,05 % TEMED
10 x PAGE-Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1,45 % (w/v) Glycin / 0,1 % (w/v) SDS
2 x Proteingel-Ladepuffer 2 mM EDTA pH 8,0 / 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 / 4 % (w/v) SDS / 20% (v/v) Glycerin / 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol / 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Die SDS-PAGE dient dazu, Proteine ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Das Polyacrylamid hat den Effekt eines Molekülsiebs, SDS denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine einheitliche negative Ladung, so daß sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die Gele sind aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporigen Trenngel zusammengesetzt.

Die Trenngellösung wurde in die Gelapparatur gegossen und bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde abgegossen, die Sammelgellösung eingefüllt und mit eingestecktem Kamm polymerisiert. Die Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit einem Volumen 2 x Proteingelladepuffer versetzt und durch Kochen

denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x PAGE-Puffer bis zum Eintritt ins Trenngel bei 60 V, dann bei 90 V (Elektrophoresekammer vertikal MBT70EL, über Neolab Migge, Heidelberg).

C.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde mittels der Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976). 20 µl einer Proteinlösung wurden mit 200 µl Bradford-Reagenz und 780 µl H₂O vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Als Proteinstandard wurden 5, 10, 15 und 20 µg BSA verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

C.5.3 Herstellung virus-ähnlicher HPV-16-L1 Partikel (VLPs)

Puffer und Lösungen:

Extraktionspuffer 10 mM MgCl₂ / 50 mM CaCl₂ / 150 mM NaCl / 20 mM HEPES pH 7.4 / 1 mM PMSF (/ 0.01 % (v/v) Triton X-100)

100 mM PMSF

40%ige (w/v) Sucroslösung

C.5.3.1 Vermehrung rekombinanter Bakulovirusstocks

Zur Vermehrung rekombinanter Bakulovirusstocks wurden in einer 175 cm²-Zellkulturflasche 4 x 10⁶ Sf9 Zellen in 20 ml TMN-FH-Medium (B.9.3) ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium entfernt, 2 ml des zu amplifizierenden Bakulovirusstocks (B.8.5) mit 10 ml frischem Medium zugegeben und zur Infektion für sechs Tage im 27 °C-Brutschrank inkubiert. Dann wurde der Überstand 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R), um Zellbestandteile zu entfernen und in ein frisches Röhrchen überführt, das bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt wurde.

C.5.3.2 Infektion von TN high five Insektenzellen

Zur Infektion wurden TN high five Zellen in einem 1 l Kolben mit Schikane in 250 ml Ex-cell 450-Medium (B.9.3) bis zu einer Zelldichte von 2×10^6 / ml unter Schütteln bei 27 °C wachsen gelassen. Sie wurden für 30 min bei 1500 rpm sedimentiert (Sorvall RC-5B, Rotor SLA-3000), in 30 ml Ex-cell 450-Medium aufgenommen und zusammen mit 8 ml Virusstock (MOI 2-5) in den Kolben überführt. Nach einer Stunde Schwenken bei RT wurde mit Medium auf 250 ml aufgefüllt und für drei Tage bei 27 °C geschüttelt. Dann wurden die Zellen 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert, (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R) mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

C.5.3.3 Aufschluß der Zellen

Die Zellen wurden aufgetaut, in 9 ml Extraktionspuffer resuspendiert und mit 200 µl PMSF versetzt. Dieser und die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels French Press (Avestin, Ottawa, Kanada). Vor dem Durchlauf der Zellsuspension wurde die Presse mit Ethanol, H₂O und 7 ml Extraktionspuffer gespült, nach dem Zelldurchlauf erneut mit 7 ml Extraktionspuffer. Der Druck während des Aufschlusses sollte 15.000 – 20.000 kPa betragen. Zum Schluß wurde mit Ethanol gespült, das auch im Gerät belassen wurde.

C.5.3.4 Aufreinigung durch Gradientenzentrifugation

Die Insektenzellfragmente wurden durch zweimaliges Zentrifugieren für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C sedimentiert (Sorvall RC-5B, Rotor F-28/50). Der Überstand wurde auf einen Zwei-Phasen-Gradienten aufgetragen. Dazu wurden 4.7 g CsCl in 8 ml Extraktionspuffer ohne Triton gelöst, in ein 25 x 89-mm-Zentrifugenröhrchen (Beckman, München) gefüllt und vorsichtig mit 10 ml einer 40%igen Sucroselösung überschichtet. Der Überstand wurde auf das Sucrosekissen aufgetragen und in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (2 h / 24000 rpm / 10 °C (Beckman XL 70 Ultrazentrifuge, Ausschwingrotor SW 28). Die nun in der Interphase zwischen CsCl und Sucrose befindlichen Partikel wurden zusammen mit der CsCl-Phase abgezogen, mit Extraktionspuffer ohne Triton auf eine Dichte von 1.37 g/ml eingestellt, in ein Quickseal-Zentrifugenröhrchen (13,4 ml, Beckman, München) überführt und auf 13 ml mit Extraktionspuffer ohne Triton aufgefüllt. Die Lösung wurde erneut

zentrifugiert (16 h / 48000 rpm / 20 °C, (Beckman XL 70 Ultrazentrifuge, Festwinkelrotor Ti 70)), und der entstandene Dichtegradient wurde in 1 ml Fraktionen ausgetropft und die Dichte im Refraktometer bestimmt. Die Fraktionen wurden anschließend im ELISA (C.6.4), im ECL-Western-Blot (C.6.3) und auch im Elektronenmikroskop (C.5.4) auf die Gegenwart von VLPs bzw. des rekombinanten Proteins getestet.

C.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Fraktionen, in denen durch ECL-Western-Blot rekombinantes Protein nachgewiesen werden konnte, wurden unter dem Elektronenmikroskop auf Kapside hin untersucht. Dazu wurden 10 µl einer positiven Fraktion auf ein mit Kohle beschichtetes Kupfernetz gegeben. Nach 2 min wurde das Netz abgetupft und für 2 min mit 10 µl 2%igem Uranylacetat als Negativ-Kontrastmittel behandelt. Die so präparierten Proben wurden mit einem Elektronenmikroskop (EM10, Zeiss, Oberkochen) untersucht.

C.5.5 Zerfall und Zusammenlagerung von VLPs (Dis- und Reassembly)

Puffer und Lösungen:

Dialysepuffer PBS / 0,5 M NaCl / 2 mM CaCl₂

Das Dis- und Reassembly diente dazu, *in vitro* Pseudovirionen herzustellen.

Die dazu benötigte Menge an VLPs wurde für 45 min auf einem Nitrocellulosefilter (0,025 µm Typ VS, Millipore, Eschborn) gegen PBS dialysiert und anschließend in 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (2-ME) für 16 h ohne Schütteln bei 4 °C inkubiert, um die Disulfidbrücken zu reduzieren, so daß die Partikel in Kapsomere zerfallen. Nach der Zugabe von Plasmid-DNA in 10-molarem Überschuß folgte Dialyse gegen 4 l Dialysepuffer für 24 h bei 4 °C, wobei sich die Kapsomere wieder zu Partikeln zusammen lagern und das Plasmid inkapsidiert wird. Die entstandenen Pseudovirionen wurden bis zur Verwendung maximal zwei bis drei Tage bei 4 °C aufbewahrt.

C.5.6 Kopplung von DNA an Protein oder Peptid

Puffer und Lösungen:

Aktivierungspuffer	0,1 M MES / 0,5 M NaCl pH 6,0
100 x EDC	0,2 M 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (Pierce)
100 x NHS	0,5 M <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (Pierce)

Mit Hilfe von EDC und NHS kann zwischen einer Carboxylgruppe einerseits und einer Aminogruppe andererseits eine Peptidbindung gebildet werden. Dies gilt sowohl für zwei

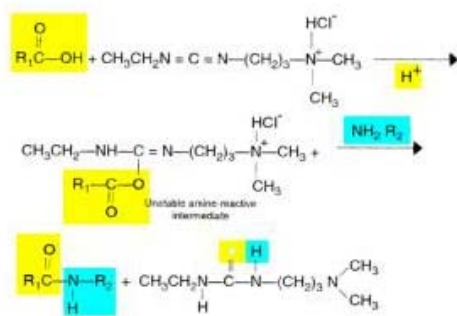


Abbildung C.1: von EDC katalysierte Reaktion
EDC reagiert zuerst mit der Carboxylgruppe des Proteins oder Peptids (gelb) und dann mit der Aminogruppe (blau), die durch den 3'-Primer der DNA-Komponente gestellt wird.

Proteine als auch für ein Protein oder Peptid und DNA, welche über PCR hergestellt und dabei über einen modifizierten Primer mit einer endständigen NH₂-Gruppe versehen wurde. EDC reagiert zuerst mit der Carboxylgruppe unter Ausbildung eines aminreaktiven Zwischenprodukts, *O*-Acylisoharnstoff. Dieses Produkt ist in wässrigen Lösungen instabil und muß deshalb im Konjugationsprozess durch NHS stabilisiert werden.

Um DNA an VLPs oder ein HPV-L2-Peptid zu binden, wurde die Proteinkomponente 45 min gegen Aktivierungspuffer dialysiert. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden dann EDC und NHS zugegeben und mit Aktivierungspuffer aufgefüllt, so daß die Chemikalien in einfacher Endkonzentration in einem insgesamt möglichst kleinen Volumen vorlagen. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion von EDC durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt. Dann wurde eine zum Protein äquimolare Menge an DNA zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Tris/HCl pH 6,8 (Endkonzentration 20-50 mM) abgestoppt.

C.5.7 Isolation von Pseudovirionen aus Hefe

Puffer und Lösungen:

20 mM HEPES pH 7,0

100 mM PMSF

25 ml Selektionsmedium wurden mit 150 μ l Glycerinkultur des Pseudovirionen produzierenden Hefestammes angeimpft und 48 h bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. 20 ml Kultur wurden in 360 ml YP-Medium überführt, mit 20 % Galactose auf eine Endkonzentration von 2 % eingestellt und für 72 h bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. Alle 24 h wurden weitere 40 ml 20 % Galactose zugegeben, um die Proteinexpression aufrecht zu erhalten. Nach den drei Tagen wurden die Hefen zentrifugiert (10 min, 5000 rpm, 4 °C (Sorvall RC-5B, Rotor SLA-3000)) und das Sediment bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Der Aufschluß der Hefen wurde bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurde das Hefesediment in 10 ml HEPES und 250 μ l PMSF resuspendiert und zusammen mit 10 ml Glaskügelchen (425-600 μ m) in den Mixer (Bead-Beater, Hamilton Beach, Washington, NC, USA) gefüllt und wie folgt behandelt:

- 1 min Aufschluß im Mixer
- 2 min Inkubation auf Eis
- 1 min Aufschluß im Mixer
- 2 min Inkubation auf Eis

Der Überstand wurde nach 10 min Zentrifugation (10000 rpm, 4°C (Sorvall RC-5B, Rotor F-28/50)) gesammelt und das Sediment in 10 ml HEPES und 250 μ l PMSF aufgenommen und weiter aufgeschlossen:

- 1,5 min Aufschluß im Mixer
- 2 min Inkubation auf Eis
- 1 min Aufschluß im Mixer
- 2 min Inkubation auf Eis

Nach erneuter Zentrifugation (Sorvall RC-5B, Rotor F-28/50) wurden beide Überstände vereinigt und auf Eis maximal 14 Tage aufbewahrt.

C.6 Immunologische Experimente

C.6.1 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern aus Serum

Puffer und Lösungen:

1 mM HCl

1 M Tris-HCl pH 8,0

Kopplungspuffer 0,2 M NaHCO₃ / 0,5 M NaCl pH 8,3

Blockpuffer 0,5 M Ethanolamin / 0,5 M NaCl pH 8,3

Waschpuffer 0,1 M Na-Azetat / 0,5 M NaCl pH 4,0

Elutionspuffer 0,1 M Glycin / 0,15 M NaCl pH 2,5

Die Aufreinigung spezifischer Antikörper aus Serum erfolgte über eine 1 ml HiTrap NHS-aktivierte Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg), die zur kovalenten Bindung von Liganden mit primären Aminogruppen verwendet wird. Die Gelmatrix besteht aus Agarose. Im ersten Schritt wurde das Peptid (1 mg/ml), gegen welches die zu reinigenden Serumantikörper gerichtet sind, über den N-Terminus an die Säule gebunden. Das Serum wurde mit Hilfe einer Pumpe (Econo Pump, Biorad, München) über die Säule geleitet (0,5 ml / min), so daß spezifische Antikörper an das Peptid binden konnten, die in einem letzten Schritt von der Säule eluiert wurden.

Die Säule wurde mit sechs Säulenvolumina (SV) 1 mM HCl und einer Durchflusgeschwindigkeit von 0,5 ml / min gewaschen und dann das in Kopplungspuffer gelöste Peptid mittels einer Spritze auf die Säule aufgebracht. Zur Bindung des Peptids an die Säule folgte eine Inkubation von 15-30 min bei RT, bzw. 1 h bei 4 °C. Ungebundenes Peptid wurde mit drei SV Kopplungspuffer ausgewaschen (0,5 ml / min). Die Säule wurde mit sechs SV Blockpuffer, sechs SV Waschpuffer und sechs SV Blockpuffer gespült und dann für 30-60 min bei RT inkubiert, um verbleibende reaktive Gruppen zu blocken. Es folgten drei weitere Waschschrte mit jeweils sechs SV Wasch-, Block- und Waschpuffer. Dann wurde die Säule mit fünf SV PBS gespült und das zu reinigende Serum mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,2-1 ml / min aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Vor der Elution wurde die Säule mit 5-10 SV PBS gespült um anschließend die Antikörper mit 1-3 SV Elutionspuffer von der Säule zu lösen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 1 ml, inklusive einer Vorlage von 250 µl Tris/HCl pH 8,0 pro Fraktion zur Neutralisation.

Schließlich wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen mittels Bradford bestimmt (C.5.2).

C.6.2 Immunpräzipitation

Lösungen und Puffer:

Bindungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,0
Aktivierungspuffer	0,1 M MES / 0,5 M NaCl pH 6,0
10 x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,0 / 15 mM MgCl ₂ / 500 mM KCl

Für etwa 1 ml Säulenmaterial wurden 250 mg Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, Freiburg) in PBS gequellt und dreimal mit PBS gewaschen (1500 rpm, 2 min (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R)). Pro Ansatz wurden 100 µl gequellte Protein A Sepharose mit Bindungspuffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit und ohne 10 µl des α-HPV 16 L2-Serums (B.6.1) inkubiert. Die Ansätze wurden dreimal mit je 800 µl Aktivierungspuffer gewaschen (2000 rpm, 2 min (Eppendorf Centrifuge, 5417R)) und dann zusammen mit dem zu testenden Antigen bei 4 °C über Nacht geschüttelt. Es folgten fünf Waschschriffe mit je 1 ml Aktivierungspuffer / 1 % Triton-X-100 und zwei Waschschriffe mit je 500 µl 1 x PCR-Puffer. Dann wurden die Proben in einer PCR auf Kopräzipitation der an das Antigen gebundenen DNA getestet.

C.6.3 Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blot

Lösungen und Puffer:

Western Blot Puffer I	0,3 M Tris-HCl pH 8,0 / 20 % (v/v) Methanol
Western Blot Puffer II	0,025 M Tris-HCl pH 8,0 / 20 % (v/v) Methanol
Western Blot Puffer III	0,025 M Tris-HCl pH 8,0 / 20 % (v/v) Methanol / 0,04 M DL-Norleucin
Blockierlösung	PBS / 5 % (w/v) Magermilchpulver / 0,1 % (v/v) Tween 20
ECL-Lösung	200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6 / 1,25 mM Natrium-Luminol / 2,7 mM H ₂ O ₂
Enhancer	11 mg p-Hydroxy-Cumarinsäure in 10 ml DMSO

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel für 5 min in Western-Blot-Puffer (WBP) III äquilibriert. Die Western-Blot-Membran (Immobilon® P, Millipore, Bedford, MA, USA) wurde für 2 min in Methanol gelegt, mit H₂O gewaschen und für 5 min in WBP II inkubiert. In der Blotkammer (Semidry-Transfer Cell, Biorad, München) wurden 2 Lagen 3MM-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), getränkt in WBP I, 3 Lagen 3MM-Papier, getränkt in WBP II, die Blot-Membran, das Gel und 4 Lagen 3MM-Papier, getränkt in WBP III, übereinander geschichtet. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 175 mA für 45 min. Die Membran wurde anschließend 30 min in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der Erstantikörper, entsprechend (B.6.1) in Blockierlösung verdünnt, wurde mit der Membran 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Membran viermal 5 min mit Blockierlösung gewaschen, mit dem Zweitantikörper, ebenfalls in Blockierlösung verdünnt, (B.6.2) 45 min bei RT inkubiert und noch viermal 5 min mit Blockierlösung gewaschen. Die Membran wurde 1 min in 8 ml ECL-Lösung / 2 ml H₂O / 20 µl Enhancer geschwenkt, nachdem die Reste der Blockierlösung durch Spülen in PBS entfernt worden waren. Danach wurde die Membran mit einer Folie umwickelt, und für die Dauer von 10 sec bis 10 min wurde ein Röntgenfilm (Kodak/NEN Life Science Prod., Köln) der Membran exponiert.

C.6.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Puffer und Lösungen:

Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver / 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Substratlösung	100 mM Na-Acetat pH 6 / 1 mM Zitronensäure / 2 % (v/v) Tetramethylbenzidin (TMB, 10 mg/ml DMSO) / 0,03 % H ₂ O ₂
Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄

Eine 96-Loch Platte (Falcon, über Becton Dickinson, Heidelberg) wurde mit 50 µl / well einer 1:300 Verdünnung eines HPV-16 L1 – spezifischen monoklonalen Antikörpers (25/C) (B.6.1) beladen und für 1 h bei 37 °C oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 200 µl Blockpuffer pro well für 1 h bei 37 °C abgesättigt. Die Platte wurde dreimal gewaschen und mit 50 µl (entweder in konzentrierter Form oder in einer Verdünnung von bis zu 1:25 in Blockpuffer) der einzelnen vom

Gradienten getropften Fraktion (C.5.3.4) beladen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde erneut dreimal gewaschen und gebundene Partikel durch ein HPV-16 L1 – spezifisches Kaninchenserum (B.6.1) (4543), 50 µl/well, 1:5000 in Blockpuffer verdünnt, detektiert (1h, 37 °C). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Bindung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (B.6.2), 50 µl/well, 1:7500 in Blockpuffer verdünnt, für 1 h bei 37 °C. Nach drei weiteren Waschschrritten durch Zugabe von 50 µl Substratpuffer pro well erfolgte der Nachweis der gebundenen Partikel. Dazu wurde nach 1-5 min die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Loch beendet und die Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Lesegerät (Titertek Multiskan MKII, Labsystems, Turku, Finnland) gemessen.

C.6.5 ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay)

Puffer und Lösungen:

PBS / 0,5 % Tween 20

Pokeweed Mitogen (Sigma)

Streptavidin Alkaline Phosphatase (Pharmingen)

BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indyl Phosphat / Nitro blue; Sigma)

Dieser Filter-Immuno-Plaque-Assay dient dazu, die Cytokin-Sekretion von Zellen zu messen. Er nutzt den Vorteil einer relativ hohen Konzentration eines Proteins in der unmittelbaren Umgebung einer dieses Protein sezernierenden Zelle. Diese Zellprodukte werden von hochaffinen Antikörpern abgefangen und detektiert, die gegen verschiedene Epitope des selben Zytokins gerichtet sind. Die im ELISPOT durch eine Farbreaktion erzeugten Tupfen (spots) repräsentieren den „Fußabdruck“ einer einzelnen Zytokin-produzierenden Zelle.

Tag 1: 96-Loch Nitrocellulose Microtiterplatten (MultiScreen-HA, Millipore, Eschborn) wurden mit 200 µl PBS pro Loch äquilibriert, dann mit einem Ratte-anti-Maus-IFN γ -Antikörper (B.6.1) in einer 1:500 Verdünnung in PBS beladen (100 µl pro well) und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tag 2: Die Platte wurde einmal mit 200 µl PBS pro well gewaschen und dann mit 200 µl RPMI-Medium pro well für 1-2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator geblockt, um verbleibende Bindestellen abzusättigen. Von jeder Zelllinie wurden Triplikate serieller 1:2-Verdünnungen angelegt, so daß insgesamt vier verschiedene Konzentrationen der

Milzellsuspension (100 μl / well) vorlagen. Als Positivkontrolle wurde Pokeweed Mitogen in einer Konzentration von 200 ng / well zugegeben. Um die spezifischen zytotoxischen T-Zellen zu aktivieren wurden 0,2 μmol Peptidlösung (B.7.3) pro Vertiefung zugegeben. Als Negativkontrolle, um die Hintergrundproduktion von Zytokin zu messen, wurden Zellen ohne zusätzliche Stimuli in Medium belassen. Die Zellen wurden 16 bis 20 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator gehalten.

Tag 3: Die Platte wurde fünfmal mit 200 μl PBS / 0,5 % Tween 20 pro Vertiefung gewaschen und anschließend mit 200 μl PBS. Ein zweiter, Biotin markierter Ratte-anti-Maus- $\text{IFN}\gamma$ Antikörper (B.6.1) wurde in einer 1:500-Verdünnung in PBS dazu pipettiert (100 μl / well) und die Platte bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tag 4: Die Platte wurde vier Mal mit 200 μl PBS / Vertiefung gewaschen, bevor je 100 μl Streptavidin-Alkaline Phosphatase in einer Verdünnung von 1:500 in PBS in die wells gegeben wurden. Die Platte wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Vor der Substratzugabe (50 μl / well) wurde die Platte erneut viermal mit 200 μl PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach der Entwicklung blauer Tupfen (5–30 min bei Raumtemperatur) wurde die Platte unter fließendem VE-Wasser gründlich gespült, getrocknet und mit einem ELISPOT-Lesegerät (AID, Autoimmundiagnostika, Strassberg) ausgezählt.

C.6.6 Intrazelluläre $\text{IFN}\gamma$ -Färbung

Puffer und Lösungen:

Monensinlösung 3 mM Monensin in 100 % Ethanol (Sigma)

PBS / 0,5 % (w/v) BSA

Cytofix/Cytoperm™ Kit (PharMingen)

Die Messung der Zytokin-produzierenden Zellen dient dazu, die Spezifität zytotoxischer T-Zellen zu messen. Das intrazelluläre Zytokin und die Korezeptoren CD4 und CD8 werden hier durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (B.6.1) nachgewiesen.

In einer 96-Loch Rundboden-Platte (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden jeweils 50 μl der Zielzellen (5×10^5 / ml) in Duplikaten ausgesät: Als Negativkontrolle die Parentalzellen EL4, als Zielzellen mit Peptid (10 μM / well) beladene EL4 Zellen und EG.7 Zellen. Sie wurden über Nacht bei 37 °C und 6 % CO_2 belassen. Am nächsten Tag wurden die auf ihre Aktivierung zu untersuchenden T-Zellen geerntet ($\sim 1 \times 10^5$ / ml), in 50 μl Medium pro well

aufgenommen und zu den Zielzellen gegeben. Die Platte wurde kurz zentrifugiert (1 min, 1200 rpm (Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R)), um die Zellen am Boden zu sammeln und dann für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Zur Inhibition der Zytokinsekretion wurde pro well 3 µM Monensinlösung zupipettiert und die Zellen für 5 h bei 37 °C und 6 % CO₂ belassen. Die Platte wurde zentrifugiert (2 min, 1200 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen durch kurzes Vortexen resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Cytofix/Cytoperm™ pro well für 20 min bei 4 °C. Vor dem Färben wurden die Zellen zweimal mit 1 x Perm/Wash™-Lösung gewaschen. Die Antikörper gegen CD4 (Cy-chrom-markiert) und CD8 (PE-markiert) wurden 1:100, der anti-IFN γ -Antikörper (FITC-markiert) 1:50 in 1 x Perm/Wash™-Lösung verdünnt und jeweils insgesamt 20 µl pro well eingesetzt. Die Bindung erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit 1 x Perm/Wash™-Lösung gewaschen und dann in 130 µl BSA-Lösung aufgenommen, so daß sie im Durchflußzytometer (FACSSort™, Becton Dickinson, Heidelberg) vermessen werden konnten (C.6.7).

C.6.7 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) erlaubt die Analyse einzelner Zellen nach Größe und Granularität. Des weiteren können Zellen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt wurden, voneinander unterschieden werden.

Bei der Messung werden die Zellen in einer konischen Kanüle eingesaugt, deren Enddurchmesser 20–40 µm beträgt, so daß die Zellen einzeln ein Argon-Laserstrahl (488 nm) passieren. Durch die Lichtbeugung und -streuung können Aussagen über die Größe (forwardscatter, FSC) und Granularität (sidescatter, SSC) getroffen werden, und die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt. Sie emittieren ihrerseits Licht, welches von Fotodioden erfaßt und amplifiziert wird. Die Überlappung der Emissionsspektren verschiedener Farbstoffe (FITC: λ_{\max} = 525 nm; PE: λ_{\max} = 575 nm; Cy-5: λ_{\max} = 670 nm) muß bei einer Mehrfarbenmessung durch Kompensation der verschiedenen Kanäle korrigiert werden. Mit dem Softwareprogramm *Cellquest*™ werden dies Vorgänge grafisch dargestellt, so daß Zellpopulationen und auch einzelne Zellen sichtbar werden.

C.6.8 Zytotoxizitätstest

Die Effektorzellen der Milzzellkultur wurden ausgezählt, wobei nur solche Zellen gerechnet wurden, die Blastenmorphologie aufwiesen (Vergrößerung gegenüber primären Milzzellen oder T-förmige Gestalt, Abb. C.2), und in 96-Loch Rundbodenplatten in 1:2 Verdünnungen ausgesät. Für jede Zelllinie wurden Kontrollen für die Spontanlyse (nur Medium) und die Totallyse (5 % Triton X-100) pipettiert. Die Zielzellen (1×10^6 / Platte) wurden mit $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für eine Stunde bei 37°C markiert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen (1200 rpm, 5 min), in 10 ml RPMI Medium aufgenommen und zu den Effektorzellen und Kontrollen gegeben (5×10^3 /Vertiefung). Nach vierständiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde aus jeder Vertiefung $50 \mu\text{l}$ zellfreier Überstand auf LumaPlates-96 (Packard Bioscience, Meriden, USA) überführt. Nach dem Trocknen wurden die Platten in einem Mikroplatten Scintilationszähler (Microbeta Trilux 1450, Wallac, Turku, Finnland) vermessen. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontanlyse}) / (\text{Totallyse} - \text{Spontanlyse}) \times 100 \%$$

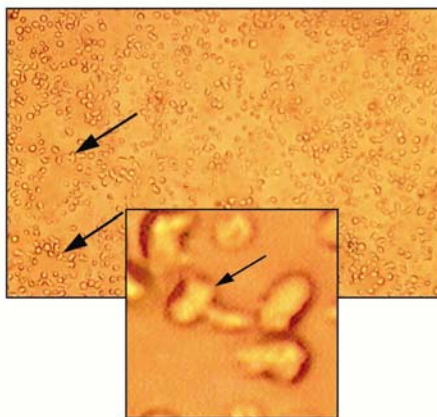


Abbildung C.2: T-Zelle in einer Milzzellkultur von C57BL/6 Mäusen in 40x Vergrößerung
von P. Öhlschläger

C.7 Tierexperimentelle Methoden

C.7.1 Anästhesie der Versuchstiere

Zur intramuskulären (i.m.) Immunisierung wurden die Mäuse mit Methoxyfluran (Metofane®, Janssen, Neuss) ruhiggestellt.

C.7.2 Immunisierung

Für die i.m. DNA-Immunisierung wurde den Tieren 5 Tage vor der DNA-Injektion je 50 μ l 10 μ M Cardiotoxin in den Musculus Tibialis Anterior gespritzt. Für die Vakzinierung wurde den Mäusen die gewünschte DNA-Menge in je 50 μ l PBS in die vorbehandelten Muskeln injiziert.

Bei der subkutanen (s.c.) Immunisierung wurde die Vakzine in Volumina zwischen 100 und 300 μ l unter die Nackenhaut appliziert.

Nach 14 Tagen wurden die Mäuse getötet, um aus den entnommenen Milzen Zellkulturen anzulegen.

D Ergebnisse

Es sollte untersucht werden, ob sich die Strukturproteine L1 und L2 des humanpathogenen Papillomvirus Typ 16 als Vehikel zur Immunisierung eignen. HPV-Partikel und auch virus-like particles (VLPs) werden von Zellen verschiedener Spezies und Gewebe sehr gut aufgenommen (Müller et al., 1995). Diese Eigenschaft sollte genutzt werden, um DNA in Zellen einzuschleusen, die eine Immunantwort auf das codierte Antigen hervorrufen soll.

Es sollten drei verschiedene Vehikelpräparationen im Vergleich zu nackter DNA getestet werden: (i) Pseudovirionen, bei denen das Reportergen in HPV 16-VLPs verpackt ist, (ii) VLPs, an die das Reporter(anti)gen von außen gebunden ist und (iii) ein Peptid von HPV 16 L2, an das das Reportergen gebunden vorliegt. Als Reportergen wurde Ovalbumin ausgewählt, da die Immunogenität des Proteins gut definiert ist, und verschiedene Methoden zur Messung der Immunantwort zur Verfügung stehen.

D.1 Klonierungen der für die Vehikelpräparationen notwendigen Plasmide

D.1.1 Klonierung des Ovalbumingens (OVA) in pcDNA3.1+

Der Vektor pcDNA3.1/OVA sollte im Dis- und Reassembly (C.5.5, D.3.1.2) in HPV 16 VLPs verpackt werden, um so *in vitro* Pseudovirionen herzustellen. Des weiteren diente er als Matrize, um ein exprimierbares DNA-Fragment über PCR zu amplifizieren (D.1.3). Ovalbumin wurde mittels PCR aus dem Vektor pAc-Neo-OVA mit den Primern OVA 5' BamHI und OVA 3' EcoRI amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pcDNA3.1+ wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI gespalten und miteinander ligiert. Anschließend wurde das Plasmid pcDNA3.1/OVA sequenziert, um die PCR zu überprüfen.

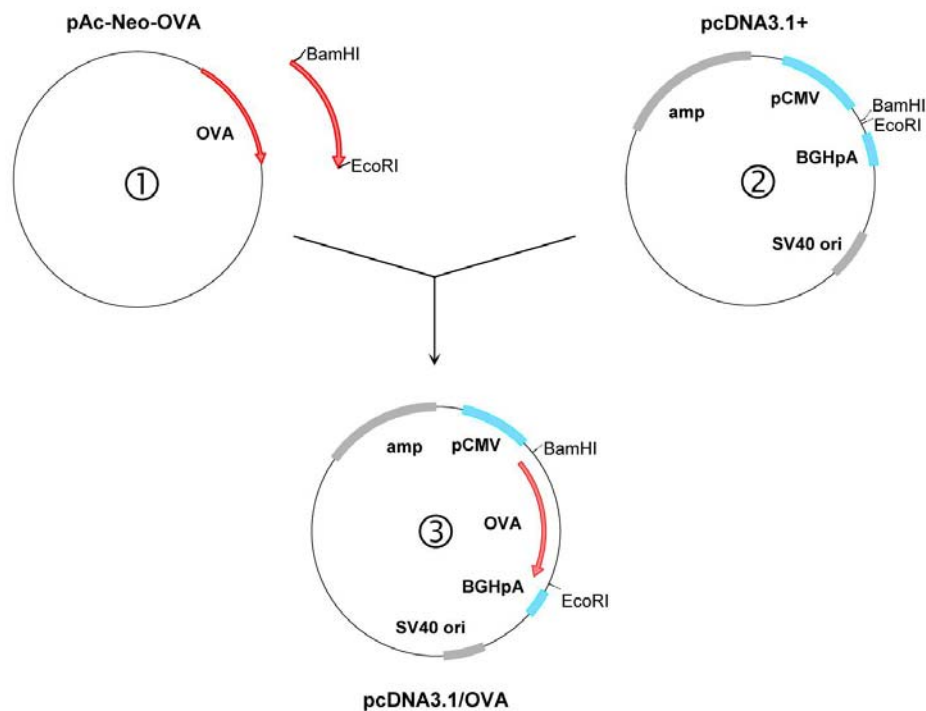


Abbildung D.1: Klonierungsschema für pcDNA3.1 /OVA

① Aus dem Vektor pAc-Neo-OVA wurde die Ovalbumin-cDNA durch PCR amplifiziert und im gleichen Schritt mit den Schnittstellen BamHI und EcoRI versehen. ② Der Zielvektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geöffnet (BamHI, EcoRI), so daß Ovalbumin einligiert werden konnte (③).

D.1.2 Klonierung des Ovalbumingens (OVA) in pYes2*-VP22-E7(1-66)

Dieser Vektor sollte bei der Herstellung von Pseudovirionen im Hefesystem Verwendung finden. Auf ihm sind Elemente zur Verpackung und Replikation in Hefe vorhanden: die HPV 16 URR als mögliches cis-Element für die Verpackung, das offene Leseraster für HPV 16 E2 unter der Kontrolle des induzierbaren Hefepromotors Gal 10 als mögliches trans-Element und das Ovalbumingen unter Kontrolle des CMV-Promotors als Reportergen. Vor der Transformation in Hefe mußte noch ein 1875 bp großes Fragment entfernt werden, das Sequenzen zur Amplifikation in Bakterien enthielt, so daß der Vektor anschließend fast die Größe des HPV-Genoms aufwies (7968 bp). Zusätzlich enthielt das Plasmid den 2 µ Hefereplikationsursprung und den auxotrophen Marker URA3, der Wachstum in Medium ohne Uracil ermöglicht.

Der VP22-E7(1-66)-Teil wurde durch Spaltung des Vektors mit den Enzymen BamHI und AflIII aus dem Plasmid pYes2*-VP22-E7(1-66) entfernt, so daß das mit den Primern OVA 5' BamHI und OVA 3' AflIII aus pAc-Neo-OVA amplifizierte Ovalbumingen eingesetzt werden konnte.

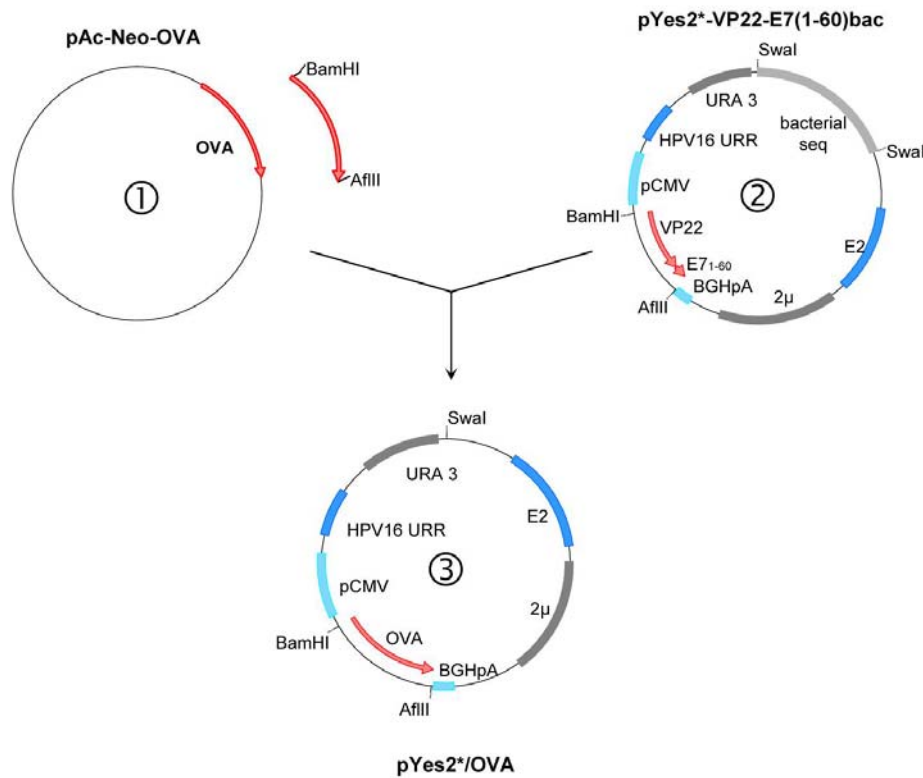


Abbildung D.2: Klonierungsschema des Targetplasmids

① Aus dem Vektor pAc-Neo-OVA wurde die Ovalbumin-cDNA durch PCR amplifiziert und im gleichen Schritt mit den Schnittstellen BamHI und AflIII versehen. ② Aus dem Vektor pYes2*-VP22-E7(1-66) wurde der VP22-E7-Teil über die Schnittstellen BamHI und AflIII entfernt, so daß Ovalbumin eingesetzt werden konnte (③).

D.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Herstellung eines exprimierbaren DNA-Fragments (PCR^{B/N})

Es sollte ein exprimierbarer, jedoch gleichzeitig möglichst kleiner Reporter hergestellt werden, der in den Kopplungen an HPV 16 Strukturproteine eingesetzt werden sollte (D.3.2). Er beschränkte sich deshalb auf drei notwendige Elemente: einen Promotor, das Reportergen und eine Polyadenylierungsstelle.

Die PCR wurde mit modifizierten Primern durchgeführt: Der 5'-Primer war biotinyliert, um einerseits das später freie Ende der DNA zu schützen und um andererseits eine Möglichkeit zur Detektion zu bieten. Das 3'-Ende trug einen Aminolink, um darüber eine Bindung an Protein oder Peptid zu ermöglichen (C.5.6, Abb. C.1). Die Amplifikation erfolgte aus dem Plasmid pcDNA3.1/OVA und umfaßte den pCMV-Promotor, das Ovalbumin und die Polyadenylierungsstelle des Bovinen Wachstumshormons (bovine growth hormone, BGHpA), was einer Gesamtlänge von 2165 bp entspricht.

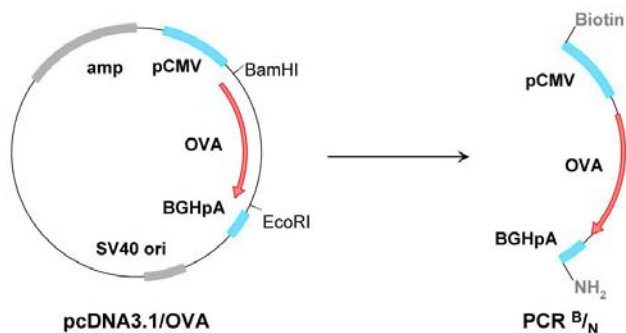


Abbildung D. 3: Herstellung PCR^B/_N

Das lineare DNA Fragment setzt sich aus dem pCMV-Promotor, Ovalbumin und der BGH-Polyadenylierungsstelle zusammen. Beide Primer tragen Modifikationen: 5' eine Biotinylierung, 3' eine Aminogruppe.

D.2 Expressionskontrolle der verschiedenen DNA-Konstrukte

Um die verschiedenen in D.1 beschriebenen Konstrukte auf die Produktion des gewünschten Proteins, Ovalbumin, zu testen, wurden 293T-Zellen mit pcDNA3.1/OVA, pYes2*/OVA und PCR^B/_N transfiziert. Als Negativkontrollen dienten die mit Leervektor pcDNA3.1 und nicht-transfizierte Zellen. Die nach 48 h gewonnenen Zellextrakte wurden im Westernblot auf die Expression von Ovalbumin hin untersucht. Als Positivkontrolle für das Laufverhalten in der SDS-PAGE und die Antikörperdetektion wurde gereinigtes Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt.

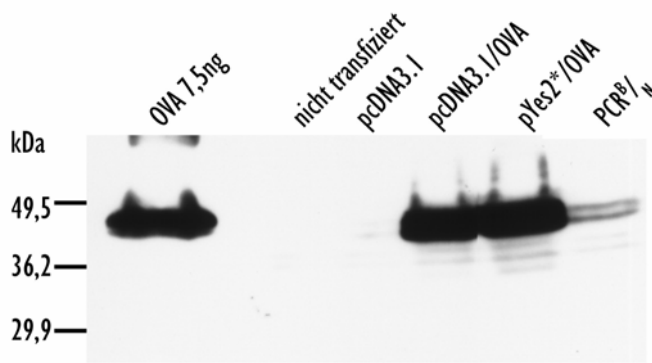


Abbildung D.4: Überprüfung der Expression von Ovalbumin durch die verschiedenen DNA-Konstrukte

Im Western Blot wurden Zellextrakte von transfizierten 293T-Zellen auf Ovalbumin getestet. Die Plasmide pcDNA3.1/OVA und pYes2*/OVA zeigten eine hohe Expressionsrate, PCR^B/_N eine eher niedrige. Als Positivkontrolle dienten 7,5 ng Ovalbumin, als Negativkontrolle nicht transfizierte, bzw. mit Leervektor pcDNA3.1 transfizierte Zellen.

Durch alle drei Konstrukte konnte Ovalbumin exprimiert werden, wobei das lineare PCR-Produkt die geringste Expression zeigte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß in dieser DNA kein weiterer Replikationsursprung enthalten ist. Plasmide wie pcDNA3.1, die außerdem noch einen SV40 Ori enthalten, haben dem gegenüber einen Vorteil, da in 293T-Zellen das SV40 large T-Antigen konstitutiv exprimiert wird, was zur ori-abhängigen Replikation des Plasmids führt (Wobbe et al., 1986; Tsurimoto et al., 1989; Castellino et al., 1997). Die auf diese Art erhöhte Plasmidzahl trägt so zu einer höheren Proteinausbeute bei gleicher Ausgangsmenge an DNA für die Transfektion bei. Auch ist die bei PCR^B/_N auftretende Doppelbande ungewöhnlich, da Ovalbumin unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE nur eine sichtbare Bande von 45 kDa hat (Kahlert et al., 1992; siehe Diskussion E.1).

Aufgrund der positiven Transfektionsergebnisse konnten alle DNAs für die weitere Herstellung von Vehikeln eingesetzt werden.

D.3 Herstellung der Vehikel zur Immunisierung

D.3.1 Pseudovirionen (ψ VLPs)

D.3.1.1 Pseudovirionen im Hefesystem

Zur Herstellung von Pseudovirionen in Hefe wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm #1699 mit einem Plasmid transformiert, das die Produktion von HPV 16 VLPs ermöglicht (Abb. D.5). Durch eine zweite Transformation wurde das Targetplasmid (D.1.2), das etwa die

Größe des HPV-Genoms hat (7965 bp), ebenfalls in den Hefestamm eingeführt und dort in die HPV-Kapside verpackt.

D.3.1.1.1 Transformation des Hefestammes #1699 mit dem Targetplasmid

Der Hefestamm #1699, der schon das sogenannte Strukturplasmid pD125 mit den Genen für HPV16 L1 und L2 enthielt (Abb. D.5), wurde mit dem Targetplasmid pYes2*/OVA

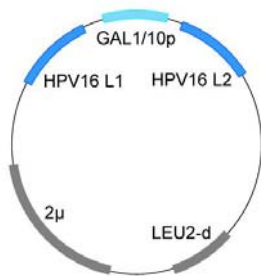


Abbildung D.5:
Expressionsplasmid **pD125**
für die Strukturproteine **L1**
und **L2** von **HPV 16** in Hefe

transfiziert, um infektiöse Pseudovirionen herzustellen. Zu diesem Zweck wurde aus dem Plasmid pYes2*/OVA über einen Verdau mit SmaI ein 1875 bp großes Stück entfernt, das die für die Vermehrung in Bakterien notwendigen Sequenzen umfaßt. Vor der Transformation in den das Strukturplasmid enthaltenden Hefestamm wurde pYes2*/OVA religiert, so daß es etwa die Größe des HPV 16 Genoms vorwies (7965 bp, Abb. D.2). Das Strukturplasmid pD125 trägt den auxotrophen Marker Leucin (LEU2) und das Targetplasmid pYes2*/OVA den Marker Uracil (URA3), so daß eine Doppelselektion auf Struktur- und

Targetplasmid-positive Klone auf Minimalmediumplatten ohne Leucin und Uracil stattfinden konnte. Nach viertägigem Wachstum bei 30 °C konnten elf Klone zur weiteren Untersuchung isoliert werden. Um Revertanten, das heißt Klone, die durch Rekombination mit den transfizierten Plasmiden die zur Selektion benötigten Aminosäuren wieder selbst synthetisieren können, auszuschließen, wurden diese Klone noch auf die Expression der Strukturproteine und das Vorhandensein des Targetplasids hin getestet.

D.3.1.1.2 Überprüfung der Expression der Strukturproteine in den Hefezellen

Die Expression des HPV 16 L1 Proteins wurde im Dotblot (C.4.4) getestet. Als Positivkontrolle für die L1-Expression diente der Extrakt aus einem GFP-Pseudovirionen produzierenden Hefeklon (erhalten von Dr. M. Müller, DKFZ, Heidelberg), als Negativkontrolle der Ausgangshefestamm #1699. Im Dotblot wurden zusätzlich als Positivkontrolle

im Bakulovirussystem produzierte HPV16 L1/L2 VLPs verwendet (Abb. D.6). Mit dem Antikörper α -HPV16 L1 konnte die Expression der Strukturproteine in 10 von 11 Klonen - Klon # 8 war negativ - nachgewiesen werden.

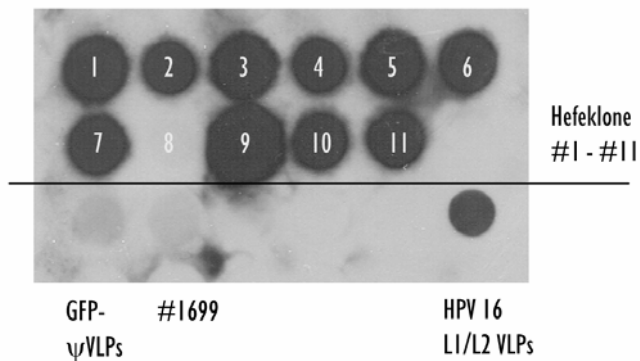


Abbildung D.6: Nachweis der Expression von HPV 16 L1

Pro Klon wurden 200 μ l Hefeextrakt auf die Membran aufgebracht und mit dem monoklonalen α -HPV 16 L1-Antikörper CAMVIR-1 auf Expression des L1-Proteins getestet. Als Positivkontrollen dienten im Bakulovirussystem hergestellte HPV 16 L1/L2 VLPs und ein GFP- ψ VLPs produzierender Hefestamm, als Negativkontrolle der Ausgangshefestamm #1699.

D.3.1.1.3 Überprüfung des Vorhandenseins des Targetplasmids in den Hefezellen

Die Gegenwart des Targetplasmids wurde über PCR mit für Ovalbumin spezifischen Primern getestet. Dazu wurden Plasmidpräparationen aller elf Hefeklone durchgeführt (Abb. D.7, Spuren 1-11) und zusätzlich noch als Negativkontrollen GFP-Pseudovirionen, der Ausgangshefestamm #1699 und der nur das Strukturplasmid pD125 (D.3.1.1.1, Abb. D.5) enthaltende Stamm #1699 benutzt. Als Positivkontrolle in der PCR diente der Vektor pYes2*/OVA (Abb. D.7). Auf diese Weise konnten zwei Hefeklone, #2 und #9, identifiziert werden, in denen das Targetplasmid enthalten war.

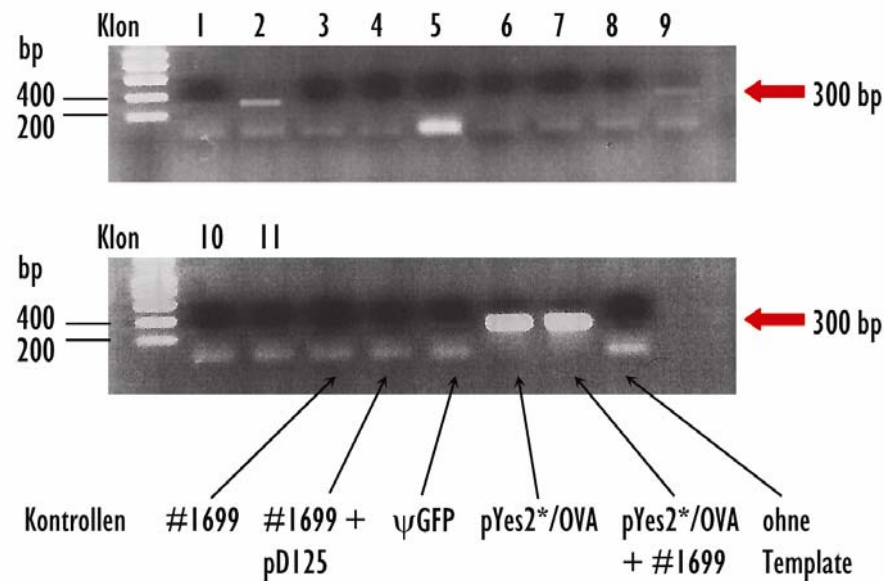


Abbildung D.7: PCR zum Nachweis des Targetplasmids

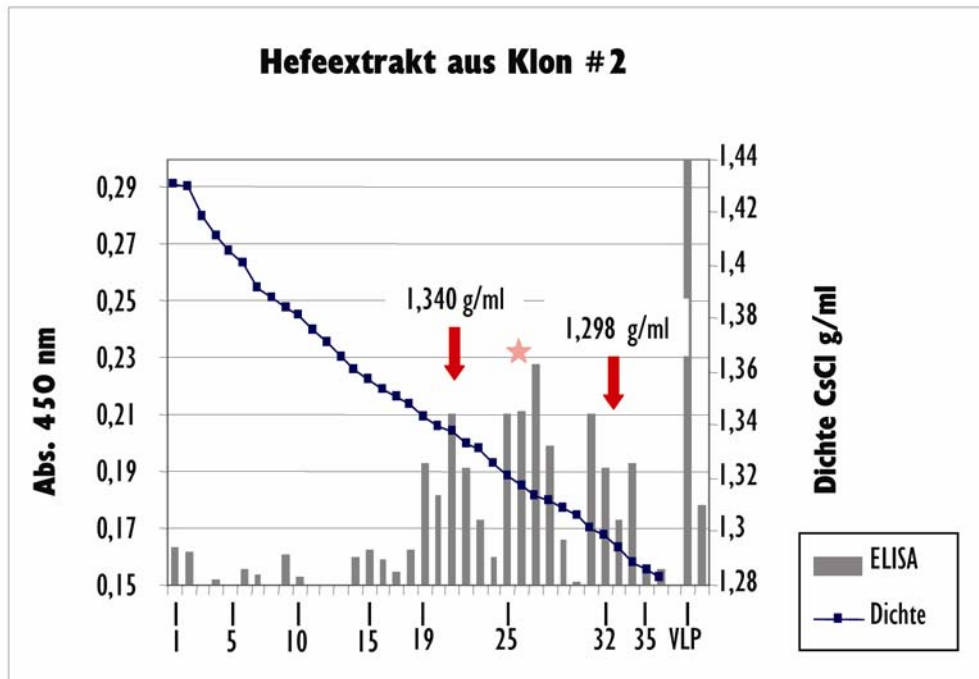
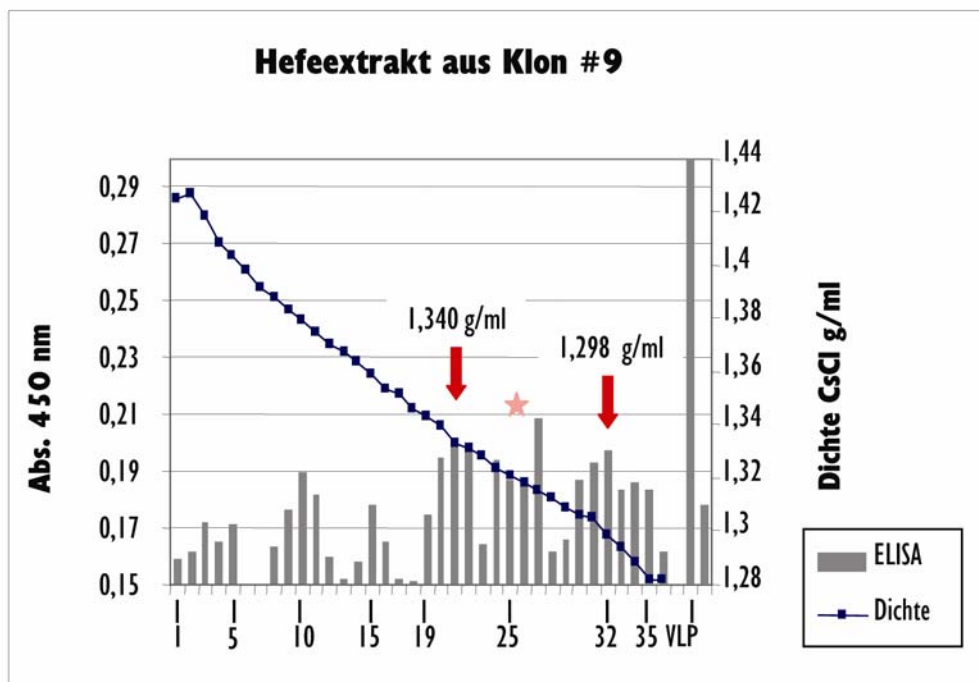
Die Detektion des Targetplasmids wurde mit OVA-spezifischen Primern durchgeführt. Ein 300 bp großes Fragment wurde amplifiziert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Als Negativkontrollen dienten der Ausgangshefestamm #1699, #1699 mit Strukturplasmid pD125, GFP- ψ VLP und ein Ansatz ohne DNA („ohne Template“), als Positivkontrollen das Targetplasmid pYes2*/OVA und pYes2*/OVA gemischt mit #1699.

Die weiteren Versuche zur Produktion von Pseudovirionen wurden mit den für Struktur- und Targetplasmid positiven Hefeklonen #2 und #9 durchgeführt.

D.3.1.1.4 Aufreinigung von ψ VLPs im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten

Die Auftrennung im CsCl-Gradienten ermöglicht die Aufreinigung von vollen, d.h. DNA-enthaltenden, und leeren Partikeln aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Volle Partikel sind bei ca. 1,34 g / ml CsCl zu finden, leere bei etwa 1,29 g / ml (Crawford & Crawford, 1963).

Die Extrakte der Hefeklone #2 und #9 wurden einer Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten unterzogen (C.5.3.4). Nach der Zentrifugation wurden Fraktionen von 100 - 200 μ l abgetropft und in einem Capture-ELISA auf VLPs getestet. Da ein monoklonaler Antikörper, der ein Konformationsepitop erkennt (25/C, B.6.1), zum Abfangen der HPV 16-Partikel benutzt wurde, konnte auch sicher gestellt werden, daß komplette VLPs erkannt wurden, nicht nur das Vorhandensein von L1-Protein (Christensen et al., 1996).

A**B****Abbildung D.8: Korrelation von Dichte und ELISA der Hefeextrakte**

Verteilung von HPV 16 VLPs aus Hefeextrakt #2 (A) und #9 (B) im CsCl-Dichtegradienten bestimmt durch ELISA. Die Korrelation von Dichte (g/ml) und ELISA-Titer (Abs. 450 nm) für jede der gezapften Fraktionen ist dargestellt.

Der mittlere in ELISA-Profil auftretenden Peak (Stern) war wiederholt zu beobachten, der Grund hierfür ist nicht klar (siehe Diskussion E.2). In den Dichtebereichen um 1,34 und 1,29 g/ml CsCl traten jedoch Peaks im ELISA auf (Pfeile), die die Gegenwart von vollen bzw. leeren VLPs indizieren. Diese sollten auf verpacktes Targetplasmid getestet werden. Um sicher zu gehen, daß das Targetplasmid in den VLPs enthalten war und nicht nur außen an den Partikeln haftet, wurden die einzelnen Fraktionen vor und nach DNaseI-Verdau mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids hin überprüft. Im Anschluß wurden die Fraktionen nach einem Proteinase K-Verdau auf verpackte DNA untersucht, die vor dem vorangegangenen DNaseI-Verdau durch das Kapsid geschützt war. Als Kontrollen wurde das Targetplasmid vor und nach DNaseI-Verdau ebenfalls in der PCR getestet.

Leider war es nicht möglich, in auch nur einer Fraktion DNA nach zu weisen, was nicht am Versuchsaufbau lag, wie durch die mitlaufenden Kontrollen bestätigt wurde: so konnte von der Kontroll-DNA pcDNA3.1/OVA vor dem DNaseI-Verdau mittels PCR ein 300 bp-Fragment amplifiziert werden, nach dem DNaseI- und Proteinase K-Verdau jedoch nicht mehr (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis gilt für beide Hefeklone, #2 und #9.

Aufgrund dieser Tatsache wurde eine weitere Methode zur Herstellung von Pseudovirionen herangezogen, das sogenannte *in vitro* Dis- und Reassembly.

D.3.1.2 Herstellung von Pseudovirionen durch *in vitro* Dis- und Reassembly

Hierbei werden im Bakulovirussystem hergestellte VLPs durch Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen im C-terminalen Bereich von L1 in Kapsomere zerlegt. Bei SV40 bilden sich interpentamere Disulfidbrücken aus (Stehle et al., 1996), was durch eine Röntgenstrukturanalyse durch Chen et al. auch für HPV 16 L1 VLPs nahe gelegt wurde. Der Verbindungsarm, der von einer aus den Aminosäuren TLEDTYRFVTSQAIACQ bestehenden Helix (Helix 4) gebildet wird, und an Position 428 ein Cystein enthält, dient durch interpentamere Bindungen zwischen den Kapsomeren der Ausbildung von Kapsiden (Li et al., 1998; McCarthy et al, 1998, Chen et al., 2000). In Gegenwart des Targetplasmids lagern sich die Kapside durch Dialyse in calciumhaltigem Puffer mit erhöhter NaCl-Konzentration (0,5 M) zur Stabilisierung (McCarthy et al., 1998) wieder zu VLPs zusammen und verpacken dabei das Plasmid (Kawana et al., 1998).

D.3.1.2.1 Verifikation des Dis- und Reassembly

Der erfolgreiche Zerfall und Neuzusammenschluß der VLPs wurde elektronenmikroskopisch bestätigt. Aus TN high five Zellen aufgereinigte Partikel (Abb. D.9 A) wurden durch Reduktion der Disulfidbrücken in Kapsomere zerlegt (Abb. D.9 B) aus denen sich durch Dialyse wieder Partikel zusammen lagerten (Abb. D.9 C). Diese glichen morphologisch den in TN high five Zellen produzierten VLPs in Abb. D.9 A.

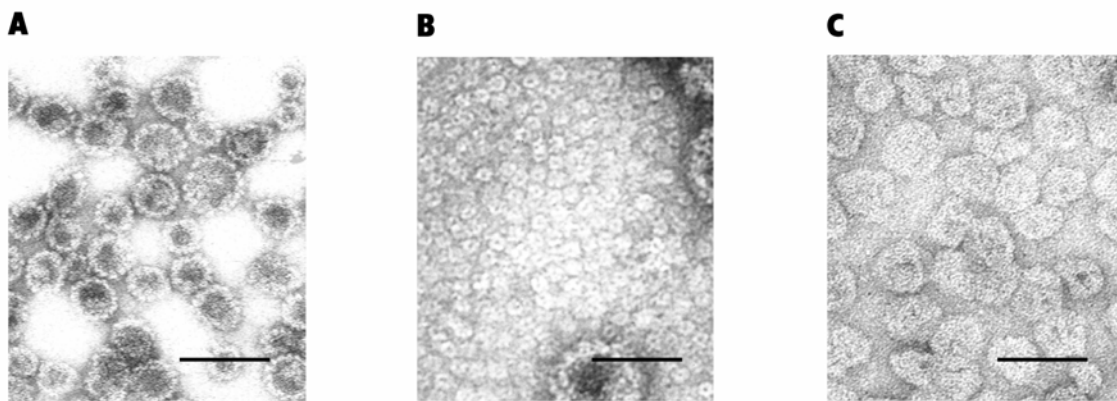


Abbildung D.9: Elektronenmikroskopische Bestätigung des Dis- und Reassembly
 (A) gereinigte HPV16 VLPs, (B) in Kapsomere zerfallene Partikel, (C) neu zusammengelagerte Kapside
 Balken 100 nm (A, C), 50 nm (B)

D.3.1.2.2 Analyse der ψ VLPs im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten

Um die Verpackung von DNA zu bestätigen wurde wie bei den Hefe- ψ VLPs eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. So konnte festgestellt werden, ob volle und leere Partikel in der Präparation vorhanden waren. Auch hier wurden Fraktionen von etwa 150 μ l abgetropft und im ELISA auf das Vorhandensein von VLPs untersucht. Zur Kontrolle wurden und behandelte VLPs aus dem Bakulovirussystem ebenfalls in einer Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und auf den VLP-Gehalt in den im Anschluß ausgetropften Fraktionen untersucht (Abb. D.10).

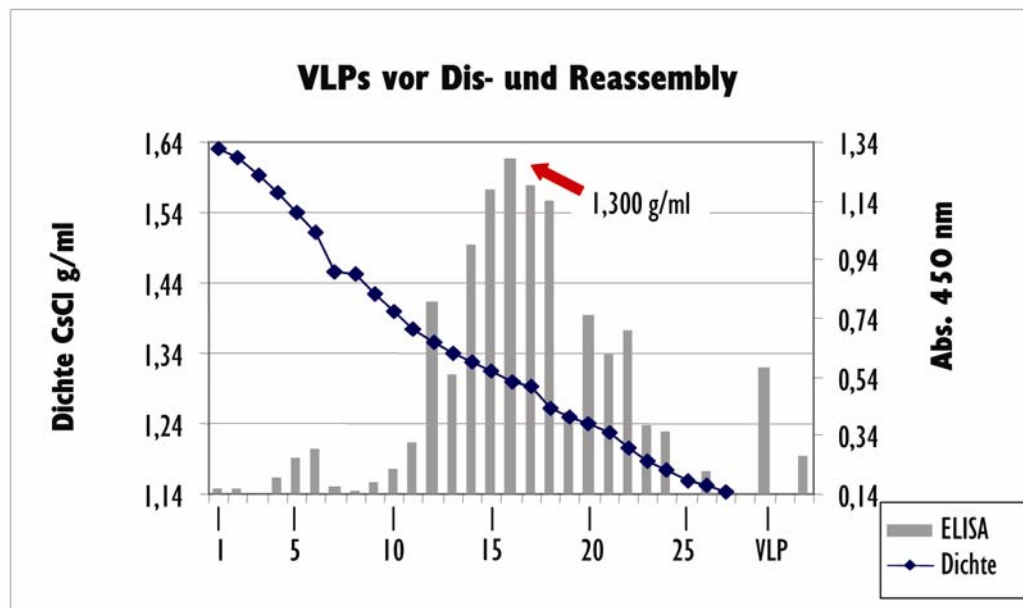


Abbildung D.10: Korrelation von ELISA und Dichte bei unbehandelten VLPs und nach dem Dis- und Reassembly
Verteilung von HPV 16 VLPs im CsCl-Dichtegradienten von unbehandelten VLPs (A) und nach Reassembly (B) bestimmt durch ELISA. Die Korrelation von Dichte (g/ml) und ELISA Titer (Abs. 450 nm) für jede der getropften Fraktionen ist dargestellt.

Ein Vergleich der ELISA-Profile zeigte, daß die Verteilung von unbehandelten Partikeln aus dem Bakulovirussystem (Abb. D.9 A) im Vergleich zu Partikeln, wie sie nach Dis- und Reassembly entstanden sind (Abb. D.9 C) homogener war. Die Analyse der getropften Fraktionen zeigte, daß der Peak der unbehandelten VLPs bei 1,300 g/ml CsCl lag, also etwas über dem von Crawford und Crawford bestimmten Wert von 1,29 (Abb. D.10 A). Der erste

Peak im VLP-ELISA der Pseudovirionen in den Fraktionen 19 - 21 entspricht einer Dichte von 1,329 bis 1,327 g/ml im Gradienten, was das Vorhandensein voller Partikel demonstriert (Abb. D.10 B). Diese bandieren laut Crawford und Crawford zwar bei 1,34 g/ml CsCl, aber auch bei Kawana et al. fanden sich die DNA-enthaltenden Partikel bei einer niedrigeren Dichte, nämlich 1,31 g/ml CsCl. Die anderen Peaks könnten durch Reassembly entstandene VLPs sein, die keine DNA enthalten (siehe Diskussion E.3).

Die Verpackung von DNA bzw. das Vorhandensein freier DNA wurde wieder über DNaseI- und Proteinase K-Verdau und PCR mit für Ovalbumin spezifischen Primern nachgewiesen. Die möglicherweise in den Fraktionen 19-35 (Abb. D.10 B), die ein hohes Signal im L1-ELISA aufwiesen, enthaltene DNA wurde als Matrize verwendet.

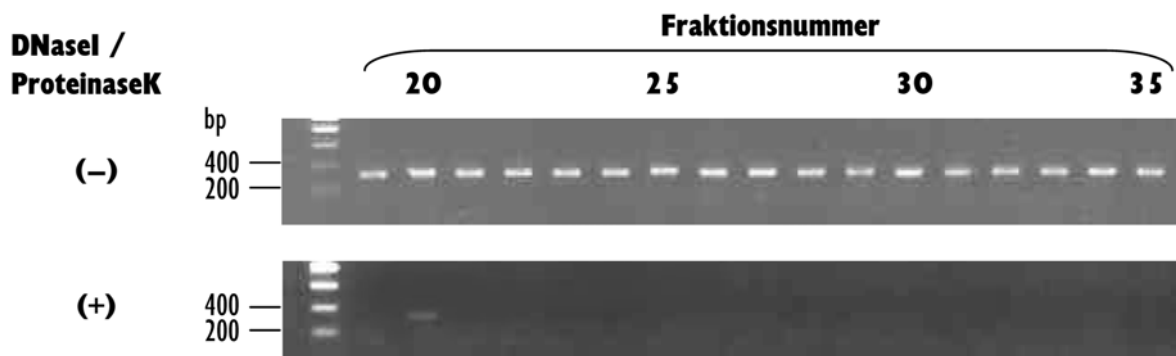


Abbildung D.11: Verteilung der DNA in den vom CsCl-Gradienten nach Dis- und Reassembly gezapften Fraktionen
 Von den Fraktionen 19-35 (Dichte 1,33-1,30g/ml, siehe Abb. D.10 B) wurde eine PCR mit OVA-spezifischen Primern vor DNaseI-Verdau und nach DNaseI- und Proteinase K-Verdau durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente (300 bp) wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

In den mit DNaseI und Proteinase K behandelten Fraktionen konnte ein DNA-Fragment von 300 bp nur in Fraktion 20 amplifiziert werden, wohingegen aus allen unverdauten Fraktionen ein DNA-Fragment vermehrt werden konnte. Die DNA-Daten (Abb. D.11) und die Proteindaten (Abb. D.10 B) legen nahe, daß Fraktion 20 (und möglicherweise noch umliegende Fraktionen) zusammengelagerte HPV 16 Pseudovirionen enthalten, die in einer Immunisierung als Shuttle eingesetzt werden können.

D.3.2 Kopplung von DNA

Ein weiterer Ansatz war, DNA chemisch an die HPV 16 Strukturproteine (L1-VLPs bzw. L2) zu binden. Die DNA (=PCR^{B/N}, siehe D.1.3) bestand aus einem 2,165 kbp großen Stück, das den pCMV-Promotor, das Ovalbumingen und die Polyadenylierungsstelle des bovinen Wachstumshormons umfaßte. Die Herstellung erfolgte über PCR mit modifizierten Primern, die zum einen für die Bindung an die VLPs (3' -NH₂) und zum anderen zur Detektion und zum Schutz des nach der Kopplung freien Endes der DNA benötigt wurden (5' -Biotin). Die Kopplung wurde mit Hilfe von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) durchgeführt, welches für die Ausbildung von Peptidbindungen zwischen den Bindungspartnern sorgt. In einem ersten Schritt reagiert EDC mit einer Carboxylgruppe des Proteins unter Ausbildung von *O*-Acylisoharnstoff, einem aminreaktiven Zwischenprodukt. Nach Zugabe der DNA, die durch den 3'-Primer mit einer terminalen NH₂-Gruppe ausgestattet ist, findet die Bildung der Peptidbindung statt (Abbildung siehe C.5.6).

D.3.2.1 Kopplung von DNA an VLPs

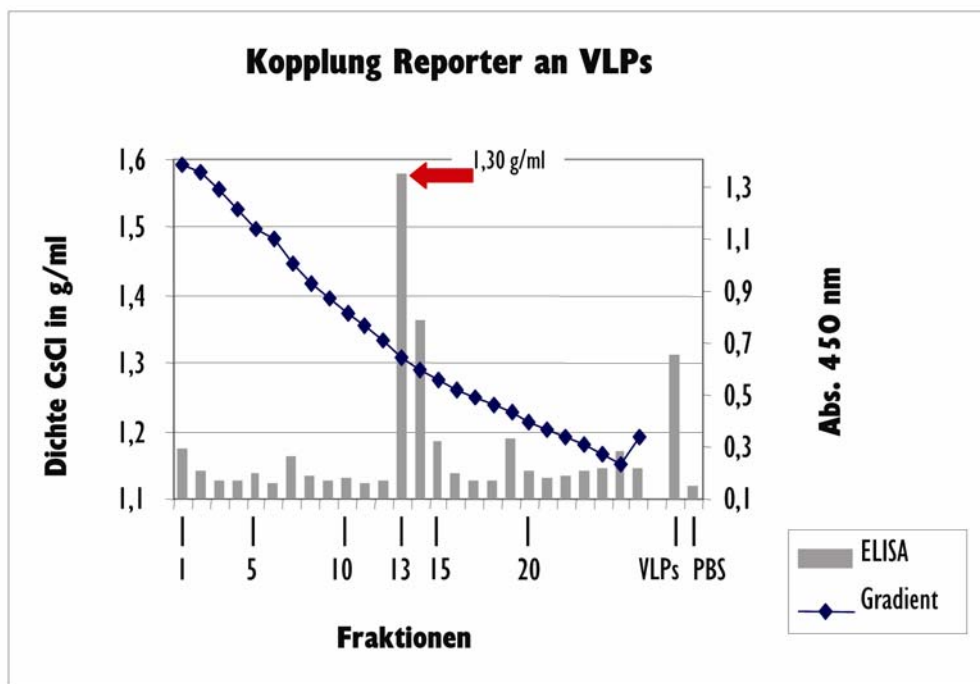
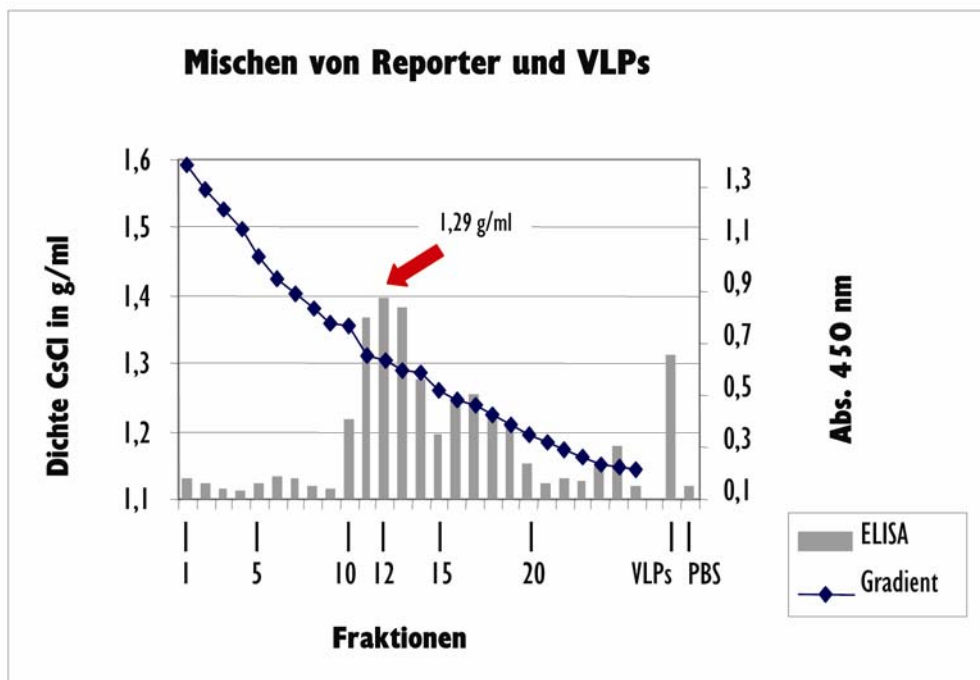
Für die Bindung von Reporter-DNA, PCR^{B/N}, an die Kapsid-Oberfläche konnten wie beim Dis- und Reassembly (D.3.1.2) im Bakulovirussystem hergestellte VLPs verwendet werden.

D.3.2.1.1 Überprüfung der Kopplung

Um die Kopplung der DNA an die Partikel zu verifizieren, wurden zwei Präparationen von HPV 16 VLPs plus PCR^{B/N} im CsCl-Dichtegradienten aufgetrennt und anschließend die einzelnen getropften Fraktionen mittels ELISA auf VLPs und mittels PCR auf DNA getestet. Der einzige Unterschied zwischen den Ansätzen bestand darin, daß in einem das Kopplungsagens EDC fehlte, um sicher zu stellen, daß die Reporter-DNA PCR^{B/N} nicht von sich aus mit VLPs assoziiert.

Freie DNA ist in einem CsCl-Gradienten bei einer Dichte von etwa 1,6 g / ml zu finden, VLPs bei ca. 1,29 g / ml. Dies erlaubt eine Unterscheidung zwischen frei vorliegender und an Partikel gebundener DNA. In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß PCR^{B/N} auch nach der Kopplung nicht komplett an VLPs gebunden vorliegt (sieh Signal in Fraktion 1-3, Abb. D.12 C). Die anderen nach PCR auftretenden Banden sind jedoch in den Fraktionen zu finden,

in denen VLPs im ELISA detektiert wurden (Fraktionen 10-17, Abb. D.12 A und C). Im Gegensatz dazu sind im Ansatz ohne Kopplungsagenz nach der PCR nur Signale bei hoher Dichte zu finden, bei der die freie DNA vorliegt. Es gibt keine Fraktionen, in denen sowohl DNA als auch Partikel zu finden sind (Abb. D.12 B, D). Aus diesen Daten folgt, daß durch den Kopplungsprozeß DNA an Partikel gebunden werden kann und dieser Vorgang notwendig ist, um ein zusammenhängendes Vehikel zu erhalten.

A**B**

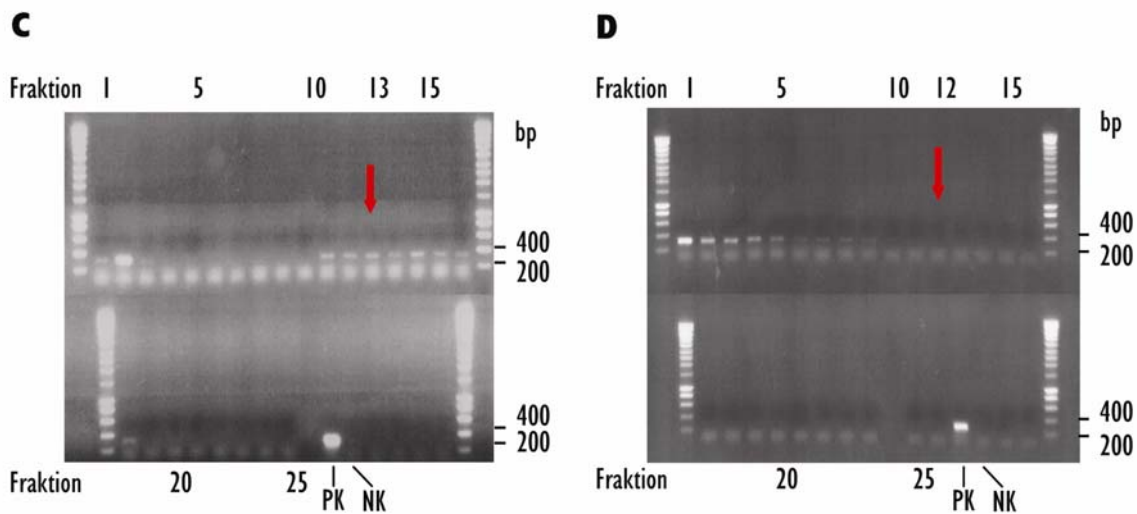


Abbildung D.1 2: Kopplung von DNA an VLPs

Verteilung von HPV16 L1 nach der Kopplung (A) und im Ansatz ohne Kopplungsagenz (B) im CsCl-Dichtegradienten bestimmt durch ELISA. Die Korrelation von Dichte (g/ml) und ELISA Titer (Abs. 450 nm) für jede der Fraktionen ist dargestellt. Verteilung der DNA im Gradienten nach der Kopplung (C) und im Ansatz ohne Kopplungsagenz (D). Die PCR zur Detektion wurde mit OVA-spezifischen Primern durchgeführt. Ein 300 bp großes DNA-Fragment wurde amplifiziert, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Positivkontrolle in der PCR wurde pcDNA3.1/OVA verwendet, als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA.

D.3.2.2 Kopplung von DNA an HPV16 L2₁₀₈₋₁₂₆

In einem weiteren Kopplungsansatz sollte versucht werden, PCR^{B/N} an ein HPV16 L2-spezifisches Peptid (LVEETSFIDAGAPTSVPSI) zu binden. Dieses die Aminosäuren 108 bis 126 von HPV 16 L2 umfassende Peptid stellt ein kreuzneutralisierendes Epitop bei genitalen HPV-Typen dar (Kawana K et al., 1999). Die Autoren folgerten, daß es sich an der Oberfläche von Virionen befindet. Diese Annahme wurde durch Beobachtungen unterstützt, daß das Peptid L2₁₀₈₋₁₂₆ die Infektion mit HPV16-Pseudovirionen inhibiert und daß ein HPV16 L2₁₀₈₋₁₂₆ GFP Fusionsprotein nach spezifischer Bindung in Zellen eintritt (Kawana Y et al., 2001). Diese Eigenschaften sollten dazu benutzt werden, an das Peptid gebundene DNA in Zellen einzuschleusen.

D.3.2.2.1 Überprüfung der Kopplung

In einem ersten Ansatz wurde versucht, die Bindung zwischen PCR^{B/N} und L2₁₀₈₋₁₂₆ durch Immunpräzipitation des L2-Teils und anschließende Ovalbumin-spezifische PCR

nachzuweisen (Abb. D.13, Ansatz A). Die durchgeführten Kontrollen zeigten jedoch, daß auch ein Signal in der PCR detektierbar war, wenn kein Antikörper zum Abfangen des Komplexes (Ansatz B) oder kein Peptid, über das die Bindung an die Antikörper stattfinden sollte, verwendet wurde (Ansatz C). Eine weitere Kontrolle zeigte schließlich, daß die DNA auch ohne Antikörper und gekoppeltem Peptid an der Protein-A-Sepharose haftet (Ansatz D), was an der Größe von PCR^B/_N liegen kann (persönliche Mitteilung Dr. Herbert Tschochner, BZH Heidelberg).

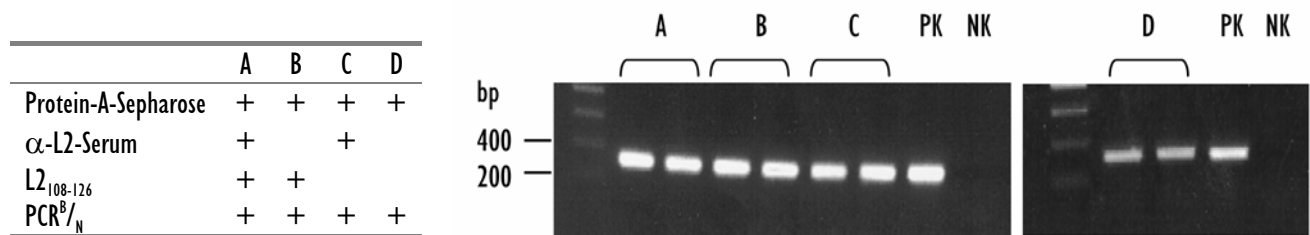


Abbildung D.13: PCR zur Detektion des Komplexes aus PCR^B/_N und L2₁₀₈₋₁₂₆ nach Immunpräzipitation des Kopplungsansatzes

Die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze ist in der Tabelle zusammengestellt. Als Positivkontrolle in der PCR diente pcDNA3.1/OVA mit unbehandelter Sepharose, als Negativkontrolle ein Ansatz nur mit unbehandelter Sepharose.

Ein weiterer Ansatz bestand darin, in einem Band-Shift-Assay unterschiedliches Laufverhalten der gekoppelten, bzw. ungekoppelten Reporter DNA im Polyacrylamidgel nachzuweisen. Hierzu wurde die DNA mit und ohne L2₁₀₈₋₁₂₆-Peptid inkubiert und mit BanI geschnitten. Im Fall einer erfolgreichen Kopplung sollte am kleinsten resultierenden DNA-Fragment von 159 bp (Abb. D.14) das Peptid über den modifizierten Primer gebunden sein, so daß sich eine Verschiebung der Bande um eine etwa 3,2 bp entsprechende Strecke einstellen sollte, wenn man davon ausgeht, daß eine Aminosäure ein durchschnittliches Gewicht von 110 Da hat und ein Basenpaar von 660 Da (Abb. D.14 A). Um diese sehr kleine Verschiebung einer unter Umständen auch sehr geringen Menge an DNA sichtbar zu machen, wurden die Fragmente 3' mit [α^{32} P]-dGTP endmarkiert und in einem 12 %igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. D.14 B). Die Tatsache, daß die jeweils größte und kleinste Bande das stärkste Signal zeigten, war wiederholt zu beobachten, konnte jedoch nicht erklärt werden (siehe Diskussion E.4). Bei einer radioaktiven Markierung sollten alle Banden die gleiche Intensität aufweisen, da das Signal nicht wie bei einer Färbung mit Ethidiumbromid größenabhängig ist.

Trotz der hohen Sensitivität ist es wiederholt mißlungen, den vorhergesagten Effekt sichtbar zu machen, da die Auftrennung auch bei einer Gellänge von 35 cm möglicherweise nicht

ausreichend war, obwohl ein Gel mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % die maximal Auflösung von Fragmenten mit einer Länge zwischen 50 und 200 bp ermöglicht (C.2.14). Auch diese Methode konnte nicht zur Bestätigung der Kopplung von PCR^{B/N} und L2₁₀₈₋₁₂₆ nicht herangezogen werden.

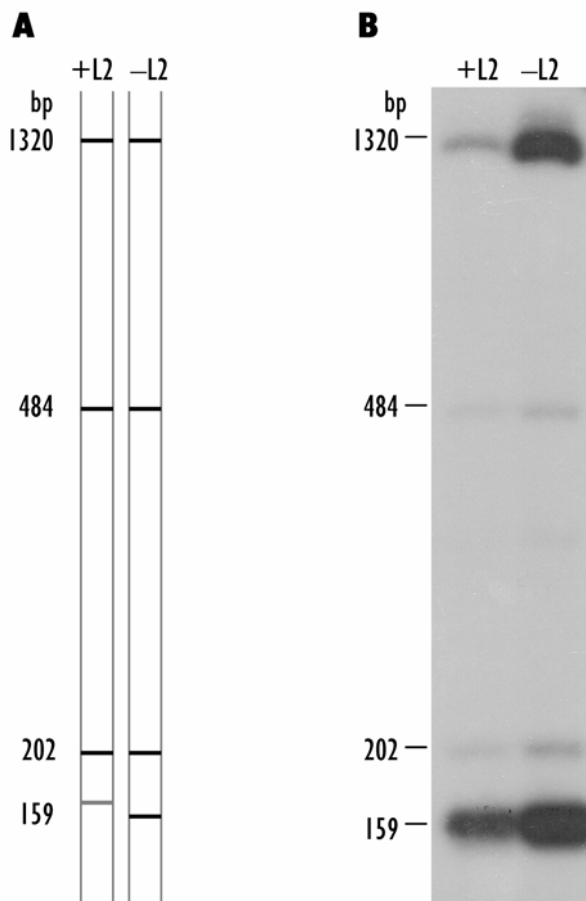


Abbildung D.14: Detektion der Kopplung via Band-shift-Assay

(A) Vorhersage des Bandenmusters durch Clone-Manager bei erfolgreicher Kopplung von L2₁₀₈₋₁₂₆ an den Reporter PCR^{B/N} und anschließendem Verdau mit BanI. (B) Auftrennung des Reporters in einem 12%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel nach Kopplung an L2₁₀₈₋₁₂₆, Verdau mit BanI und Markierung mit ³²P-dGTP.

Eine dritte Möglichkeit war, die Reporter DNA über den biotinylierten Primer mit Hilfe von magnetischen Streptavidin-Dynabeads zu immobilisieren, dann auf eine Membran aufzubringen und mit einem L2-spezifischen Serum den Peptidanteil zu detektieren. Zuerst mußte gezeigt werden, daß Biotin notwendig ist, um die Bindung an die Kügelchen zu vollziehen (Abb. D.15). Dazu wurde Reporter-DNA ohne (PCR^{-/N}) und mit (PCR^{B/N}) biotinyliertem Primer hergestellt und in getrennten Ansätzen mit den magnetischen Streptavidin-Dynabeads inkubiert. Ungebundene und an die Kügelchen gebundene DNA wurden mit Hilfe eines Magneten voneinander getrennt und auf eine Membran gedotet (Abb. D.15). Der Nachweis erfolgte nach DNA-DNA-Hybridisierung mit einer ³²P-dCTP-markierten Sonde durch Autoradiographie und zusätzlicher Messung der Membran im Scintillationszähler. Wie in Abbildung D.15 gezeigt, ist im Überstand des biotinylierten PCR-

Produkts (B) etwa 7mal weniger Radioaktivität nachweisbar, als bei der unbiotinylierten DNA (A). Bei der an die Kügelchen gebundenen Radioaktivität wäre ein umgekehrtes Verhältnis zu erwarten gewesen. Das schwache Signal, bzw. die geringe gezählte Radioaktivitätsmenge in Abbildung D.15 D erklärt sich wahrscheinlich dadurch, daß die Kügelchen beim Waschen teilweise von der Membran abgespült wurden.

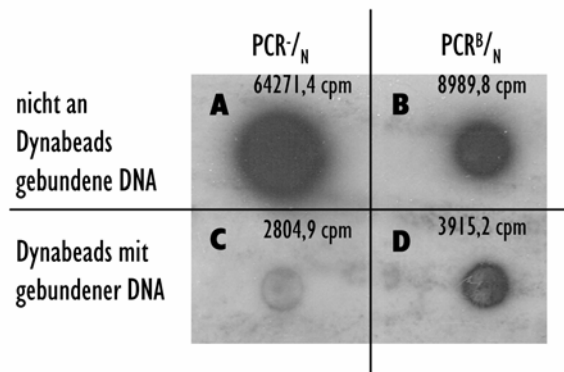


Abbildung D.15: Bindung Biotin-Primer an Streptavidin-Dynabeads

Reporter DNA ohne (links, A, C) und mit (rechts B, D) biotinyliertem Primer wurde an Streptavidin-Dynabeads gebunden, ungebundene DNA gewaschen und alle Ansätze wurden auf eine Membran gedotet. Der Nachweis erfolgte nach DNA-DNA-Hybridisierung mit einer ³²P-dCTP-markierten Sonde durch Autoradiographie und zusätzlicher Messung im Scintillationszähler (Werte neben den Spots angegeben). A ungebundene DNA ohne Biotin-Primer, B ungebundene DNA mit Biotin-Primer, C gebundene DNA ohne Biotin-Primer, D gebundene DNA mit Biotin-Primer.

Nachdem gezeigt wurde, daß Biotin für die Bindung an die Kügelchen notwendig ist (Abb. D.15), wurden für den eigentlichen Nachweis der Kopplung von L2₁₀₈₋₁₂₆ und PCR^B/_N (Abb. D.16) folgende Kontrollen durchgeführt: Inkubation der DNA und des Peptids ohne Verwendung von EDC (Ansatz B), Weglassen des Peptids in der Reaktion (Ansatz C) und das Fehlen der Beads (Ansatz D) bei der magnetischen Abtrennung von an die Kügelchen gebundenem und freiem L2₁₀₈₋₁₂₆-PCR^B/_N-Komplex.

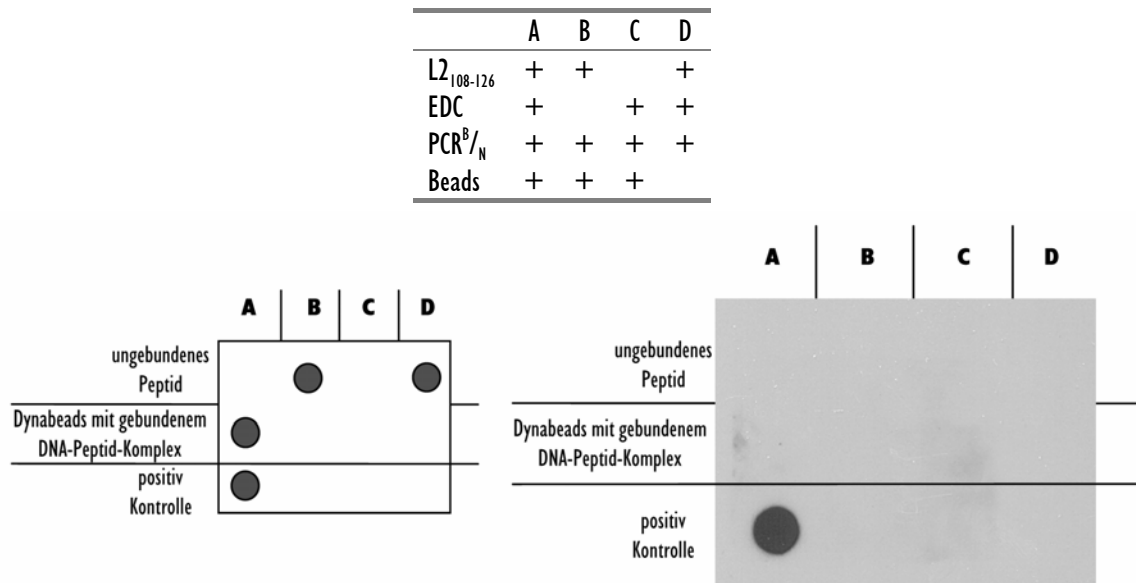


Abbildung D.16: Detektion der Kopplung über den Peptid-Anteil

Die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze ist in der Tabelle zusammengefaßt. Präparationen mit und ohne EDC und mit und ohne L2 wurden an Streptavidin-Dynabeads gebunden, gewaschen und alle Ansätze aufgedotet. HPV 16 L1/L2 VLPs dienten als Positivkontrolle. Der L2-Anteil wurde mit dem affinitätsgereinigten α -HPV 16 L2₁₀₈₋₁₂₆-Serum (C.6.1) detektiert. Links ist das erwartete Dot-Muster gezeigt, rechts der dazugehörige Blot.

Erwartet wurde, daß in allen Ansätzen außer (D), in dem keine Dynabeads enthalten waren, die DNA über den biotinylierten Primer an die Kügelchen binden sollte. Nach dem Nachweis des L2-Anteils mit dem affinitätsgereinigten α -HPV 16 L2₁₀₈₋₁₂₆-Serum sollte das Peptid nur im kompletten Ansatz (A) an die Beads gebunden vorliegen, bei Weglassen des Kopplungsreagenz EDC (B) bzw. der Beads (D) sollte das Peptid ungebunden sein. Ansatz C, der kein Peptid enthält, diente als Negativkontrolle, HPV 16 L1/L2 VLPs als Positivkontrolle. Diese Methode brachte ebenfalls kein Ergebnis bezüglich der Kopplung von PCR^B/_N und L2₁₀₈₋₁₂₆, da in keinem der Ansätze ein Signal detektiert werden konnte, so daß keine Rückschlüsse über die Zusammensetzung dieses Vehikels gemacht werden konnten (siehe Diskussion). Trotzdem sollte auch dieser Ansatz in den Immunisierungsexperimenten getestet werden, da möglicherweise trotz der Schwierigkeiten im Nachweis das Vehikel in der korrekten Zusammensetzung vorlag und eine gegenüber nackter DNA verbesserte Immunantwort hervorzurufen vermag.

D.4 Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden

D.4.1 DNA-Immunisierung

Um die Effizienz der verschiedenen Vehikelpräparationen im Vergleich mit nackter DNA im Auslösen einer Immunantwort vergleichen zu können, wurde die pro Maus eingesetzte DNA-Menge als Standard gesetzt.

Um heraus zu finden, welches die minimale Menge an DNA ist, die noch eine Immunantwort hervorruft, wurde eine DNA-Titration durchgeführt. Da DNA-Immunisierungen üblicherweise intramuskulär vorgenommen werden und diese Art der Vakzinierung als Ausgangspunkt für den Vergleich galt, wurden Mengen von 100 µg bis 3 µg DNA i.m. appliziert (Abb. D.17). So konnte mit Hilfe der intrazellulären IFN γ -Analyse festgestellt werden, daß bei C57BL/6 Mäusen eine Menge von mindestens 10 µg pcDNA3.1/OVA benötigt wurde, um eine meßbare Antwort zu erhalten.

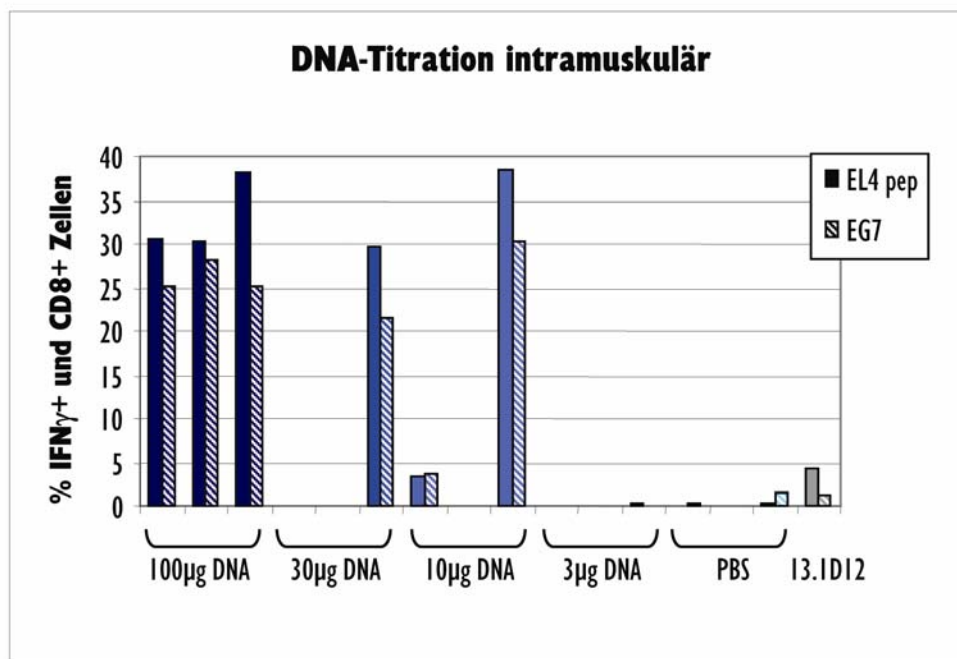


Abbildung D.17: Immunogenität verschiedener Mengen des Expressionsplasmids pcDNA3.1/OVA nach intramuskulärer Applikation

Intrazelluläre IFN γ -Färbung ovalbuminspezifischer zytotoxischer T-Zellen.

Je drei C57BL/6 Mäuse wurden mit 100 µg, 30 µg, 10 µg oder 3 µg pcDNA3.1/OVA i.m. injiziert. Als Negativkontrolle erhielten drei Tiere PBS. Nach 14 Tagen wurden die OVA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen durch intrazelluläre IFN γ -Färbung quantifiziert, wobei die Aktivierung der Milzzellen durch EL4-Zellen, mit OVA₂₅₈₋₂₆₅ beladenen EL4-Zellen und EG7-Zellen (B.8.3.2) getestet wurde. Doppelt positive T-Zellen (CD8+ und IFN γ +) sind als Prozent aller CD8-positiven Zellen dargestellt. Der mit EL4-Zellen erhaltene Hintergrundwert wurde von den EL4-OVA und EG7-Daten abgezogen.

Da sich gezeigt hatte, daß die Volumina der verschiedenen Vehikelpräparationen (D.3.1.2, D.3.2.1, D.3.2.2) selten geringer waren als 150 µl, wurde auch eine subkutane Titration durchgeführt. Das maximale Volumen, das für eine i.m. Injektion bei einer Maus eingesetzt werden sollte, beträgt 50 µl pro Muskel, so daß eine andere Applikationsart für die Vehikel gewählt und getestet werden mußte. Bei der subkutanen Immunisierung können Volumina bis zu 3 ml pro Maus (Tuffery, 1987) verabreicht werden, so daß diese Applikationsroute geeigneter erschien.

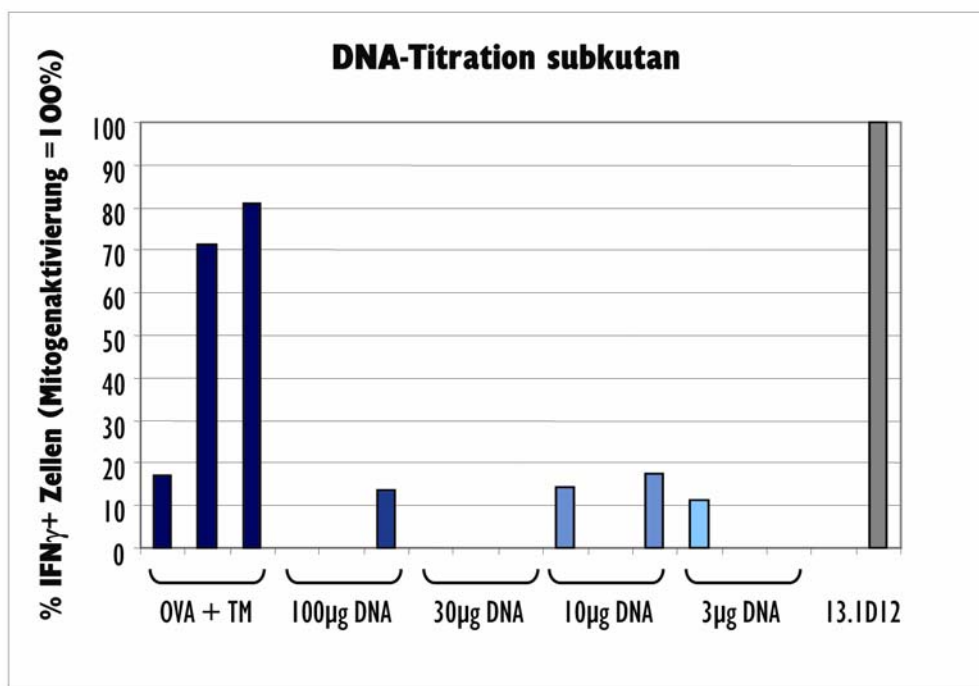


Abbildung D.18: Immunogenität verschiedener Mengen des Expressionsplasmids pcDNA3.1/OVA nach sukutaner Applikation

IFN γ -ELISPOT (C.6.5) zum Nachweis von ovalbuminspezifischen T-Zellen. Je drei C57BL/6 Mäuse wurden mit 100, 30, 10 oder 3 µg pcDNA3.1/OVA s.c. injiziert. Als Positivkontrolle wurden drei Tiere mit 100 µg Ovalbumin (Protein) plus Titermax behandelt. Nach 14 Tagen wurden die Milzen in Kultur genommen, einmal mit EG7 Zellen stimuliert und dann im IFN γ -ELISPOT quantifiziert. Als Positivkontrolle für den Assay diente die Ova-spezifische ZTL-Linie 13.ID12. Alle Singale einer seriellen Verdünnung wurden addiert und die Tupfen der OVA-spezifischen T-Zellen (durch OVA₂₅₈₋₂₆₅-Peptid aktiviert) wurden als Prozent der unspezifisch IFN γ -produzierenden Zellen (aktiviert durch Pokeweed Mitogen) dargestellt. Der Hintergrundwert der Mediumkontrolle wurde von beiden Werten subtrahiert.

Die s.c. Titration ergab, daß die Immunantwort in allen mit DNA behandelten Gruppen nur bei einem Teil der Mäuse meßbar war. Nur in der Positivkontrolle mit Protein und Adjuvans konnte eine starke Reaktion bei allen Tieren beobachtet werden. Möglicherweise werden DNA-Mengen von mehr als 100 µg benötigt, um eine homogene Immunantwort auf nackte DNA bei der subkutanen Applikation auszulösen. Wenn die Hypothese sich jedoch als richtig

erweisen sollte, daß über ein Vehikel eingeschleuste DNA immunogener ist als nackte DNA, so ließe sich auch mit einer geringeren Menge eine Immunantwort auslösen. Um dies zu testen, wurde die in der i.m.-Titration als gerade nicht mehr immunogen getestete Menge von 3 µg DNA als die pro Maus für die Vehikelpräparation einzusetzende Menge festgelegt.

D.4.2 Adjuvante Wirkung von VLPs

Da die verschiedenen Vehikelpräparationen unterschiedliche Mengen an VLPs enthielten, mußte ausgeschlossen werden können, daß diese eine adjuvante Wirkung bei der Immunisierung haben könnten. Bei Immunisierungen mit chimären VLPs (CVLPs) bestehend aus entweder bovinen L1-VLPs (Liu et al., 1998) oder HPV 16 L1-VLPs (Schäfer et al, 1999) und einem T-Zellepitop des E7 Proteins von HPV 16 konnte gezeigt werden, daß sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort ausgelöst wurde, was zeigt, daß VLPs *in cis* eine Rolle als Adjuvans spielen. Protein alleine ohne Adjuvans kann allenfalls eine schlechte ZTL-Antwort auslösen. Ob die adjuvante Wirkung von VLPs auch *in trans* vorhanden ist, wurde am Beispiel von Ovalbumin (Protein) untersucht.

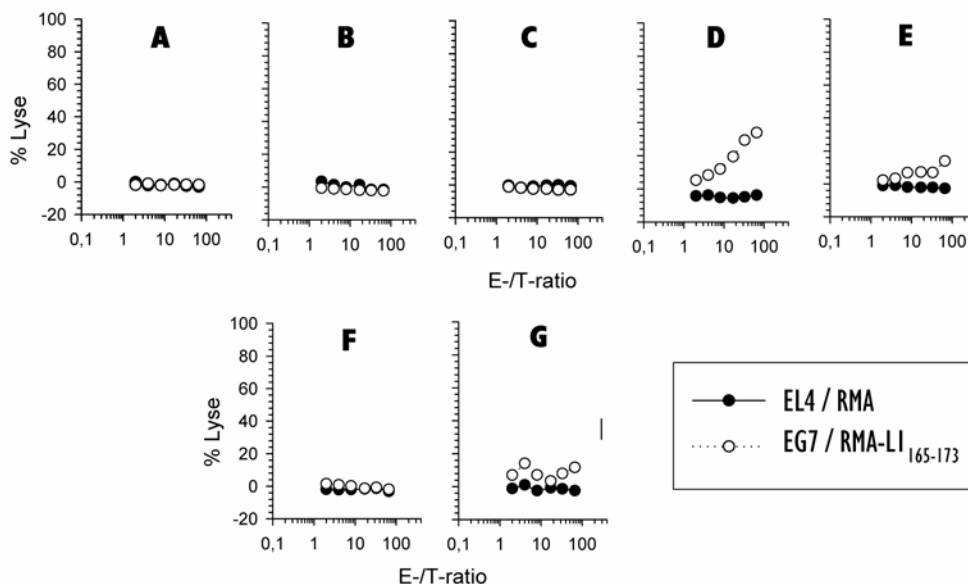


Abbildung D.19: VLPs als Adjuvans

Zytotoxizitätstest von je einer Maus, die mit PBS (A), 30 µg OVA (B, F), 30 µg OVA und 10 µg VLPs (C, G), 30 µg (D) bzw. 100 µg (E) OVA und Titermax geimpft wurde. Nach 14 Tagen wurden die Milzen in Kultur genommen und mit EG7 Zellen (A-E) oder mit LI₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladenen RMA-Zellen (RMA-LI) (F, G) 19 Tage stimuliert. Dann wurden die Zellen im Zytotoxizitätstest gegen EG7 Zellen (A-E) oder RMA-LI Zellen (F, G) als Zielzellen getestet.

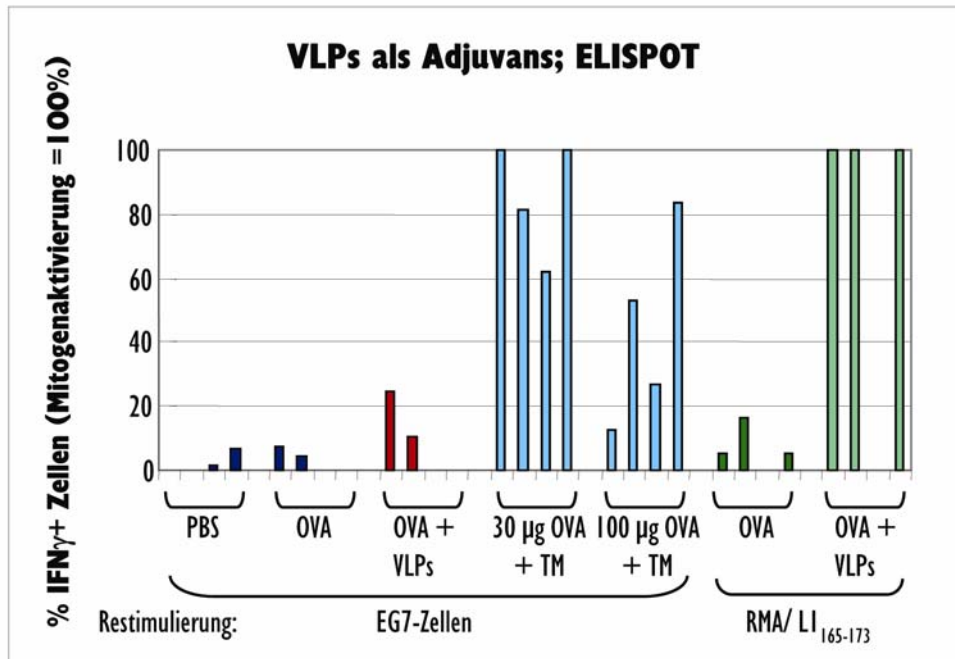


Abbildung D.20: VLPs als Adjuvans

IFN γ -ELISPOT (C.6.5) zum Nachweis von ovalbuminspezifischen T-Zellen.

Vier C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 µg Ovalbumin zusammen mit 10 µg VLPs injiziert. Je vier Tiere erhielten als Negativkontrollen entweder PBS oder 30 µg unbehandeltes Ovalbumin (3 mg / ml, Speidel et al., 1997) und als Positivkontrollen 30 bzw. 100 µg Ovalbumin mit Titermax als Adjuvans. Nach 14 Tagen wurden die Milzen in Kultur genommen, einmal mit EG7 Zellen stimuliert und dann im IFN γ -ELISPOT quantifiziert. Die Milzzellen der mit 30 µg OVA und mit OVA und VLPs behandelten Tiere wurden zur Kontrolle in zwei Kulturen geteilt: Die eine Hälfte wurde mit EG7-Zellen, die andere mit LI₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladenen RMA-Zellen stimuliert. Alle Signale einer seriellen Verdünnung wurden addiert und die Tupfen der OVA- /LI-spezifischen T-Zellen (durch OVA₂₅₈₋₂₆₅-Peptid / LI₁₆₅₋₁₇₃-Peptid aktiviert) wurden als Prozent der unspezifisch IFN γ -produzierenden Zellen (aktiviert durch Pokeweed Mitogen) angegeben. Der Hintergrundwert der Mediumkontrolle wurde von beiden Werten abgezogen.

C57BL/6 Mäusen wurde 30 µg Ovalbumin alleine oder zusammen mit 10 µg VLPs und 30 und 100 µg OVA mit dem Adjuvans TiterMax GoldTM verabreicht und die ZTL-Antwort anschließend im ELISPOT (Abb. E.20) und im Zytotoxizitätstest (Abb. E.19) analysiert. Bei den auf Ovalbumin getesteten spezifischen T-Zellen konnte eine Aktivierung nur bei den mit Titermax behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. E.19 D + E, E.20). Um ausschließen zu können, daß ein Fehlen der adjuvanten Wirkung in Zusammenhang mit den VLPs steht, wurden die Zellen der mit Ovalbumin und mit Ovalbumin und VLPs behandelten Mäuse aufgeteilt und auch auf LI-spezifische T-Zellen getestet. Die Zellen der nur mit OVA behandelten Tiere zeigten keine Aktivierung, die der mit OVA und VLPs behandelten jedoch eine hohe IFN γ -Sekretion (Abb. E.20) und eine moderate Lyse der Zielzellen (Abb. E.19 G).

Offensichtlich besitzen VLPs *in trans* bei einer Vakzinierung mit Ovalbumin keine adjuvante Wirkung. Man sollte also davon ausgehen können, daß eine Immunantwort allein durch DNA ohne verstärkende Wirkung des Vehikels hervorgerufen wurde.

D.5 Immunisierung mit Vehikelpräparationen

Auf der Basis der hier definierten Parameter wurden C57BL/6 Mäuse s.c. mit den verschiedenen Präparationen - ψ VLPs erhalten durch Dis- und Reassembly und Kopplung des Reporters an VLPs bzw. L2₁₀₈₋₁₂₆ - immunisiert und die zelluläre Immunantwort anschließend im ELISPOT überprüft (Abb. E.21). Jeder Maus wurde dabei über das Vehikel eine DNA-Menge von 3 μ g zugeführt.

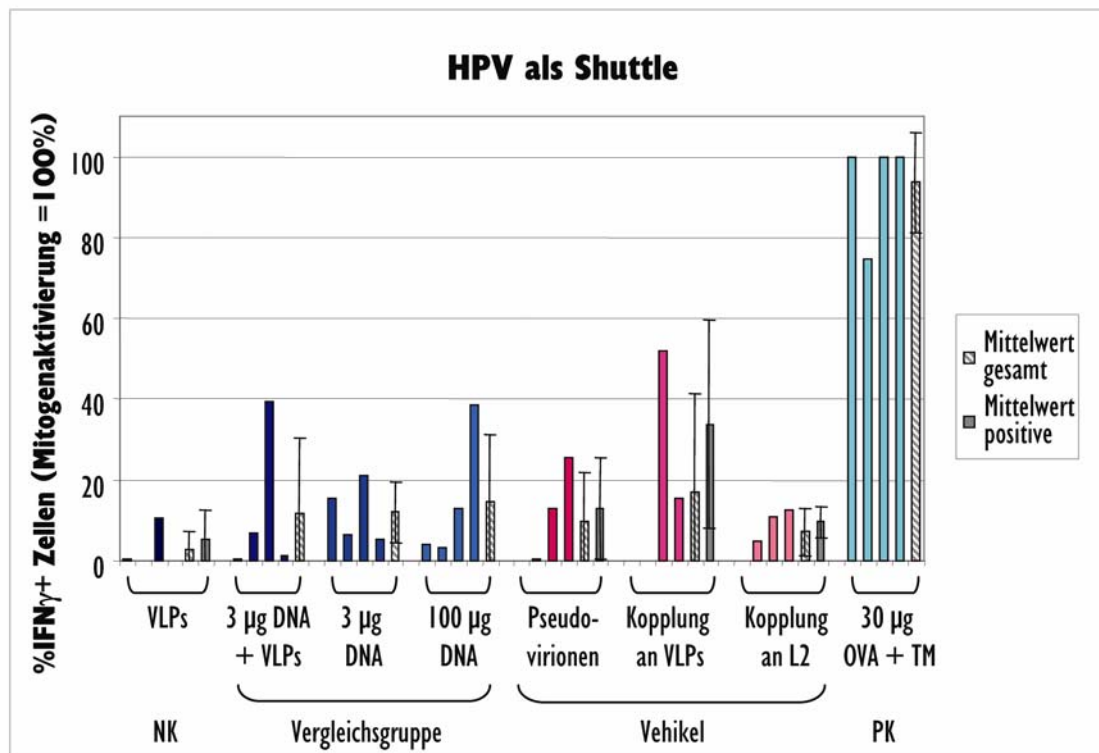


Abbildung D.21: HPV als Shuttle

IFN γ -ELISPOT (C.6.5) zum Nachweis von ovalbuminspezifischen T-Zellen. Je vier C57BL/6 Mäuse wurden mit ψ VLPs, DNA an VLPs und an L2₁₀₈₋₁₂₆ gekoppelt s.c. injiziert. Als Kontrollen wurden je vier Tiere mit 10 μ g VLPs, 3 μ g DNA mit bzw. ohne 10 μ g VLPs, 100 μ g DNA und 30 μ g OVA plus Titermax behandelt. Nach 14 Tagen wurden die Milzen entnommen und im IFN γ -ELISPOT quantifiziert. Alle Singale einer seriellen Verdünnung wurden addiert und die Anzahl der OVA-spezifischen T-Zellen (durch OVA₂₅₈₋₂₆₅-Peptid aktiviert) wurden als Prozent der unspezifisch IFN γ -produzierenden Zellen (aktiviert durch Pokeweed Mitogen) dargestellt. Der Hintergrundwert der Mediumkontrolle wurde von beiden Werten abgezogen. Der Mittelwert der Positiven ist nur angegeben, wenn nicht bei allen Mäusen eine Immunantwort meßbar war.

In keiner der fraglichen Gruppen konnte eine Zunahme der Immunantwort im Vergleich zur nackten DNA festgestellt werden. Eindeutig positiv war nur die Kontrolle mit Ovalbumin und TiterMax.

Die Hypothese, daß Vehikelpräparationen bestehend aus HPV 16 Strukturproteinen und für Ovalbumin kodierender DNA immunogener sind als nackte DNA, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen.

E Diskussion

Papillomviren sind zwar streng spezies- und gewebespezifisch, jedoch ist bekannt, daß virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs) aus L1 allein oder aus L1 und L2 bestehend von einer großen Zahl unterschiedlicher Zellen aufgenommen werden (Roden et al., 1994; Müller et al., 1995, Volpers et al., 1995). Diese Eigenschaft sollte für eine DNA-Immunisierung genutzt werden, in der Annahme daß eine Induktion der Immunantwort effizienter sei, wenn ein Shuttle zum Eintritt der Nukleinsäure in Zellen eingesetzt wird. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Strukturproteine L1 und L2 des humanpathogenen Papillomvirus (HPV) Typ 16 diese Aufgabe erfüllen können.

Dazu sollten drei verschiedene Vehikelpräparationen hergestellt und getestet werden: (i) Pseudovirionen, bei denen das Reporter(anti)gen in HPV 16-VLPs verpackt ist, (ii) VLPs, an die das Reporter(anti)gen von außen gebunden ist und (iii) ein Peptid von HPV 16 L2, an das das Reporter(anti)gen gebunden vorliegt. Als Reporter(anti)gen wurde Ovalbumin ausgewählt, da die Immunogenität des Proteins gut definiert ist, und verschiedene Methoden zur Messung der Immunantwort zur Verfügung stehen.

E.1 Klonierung und Expression des Reporter(anti)gens

Zunächst wurden die benötigten Vektoren kloniert (D.1) und auf die Expression von Ovalbumin getestet (D.2). Die unterschiedlichen Ansätze benötigten verschiedene DNAs: Für die Produktion von Pseudovirionen in Hefe wurde ein Plasmid verwendet (pYes2*/OVA, D.1.2), das Elemente für die Replikation und Selektion in Hefe, sowie zur Verpackung des Plasmids in VLPs enthielt. Das andere Plasmid (pcDNA3.1/OVA, D.1.1) sollte im Dis- und Reassembly in HPV 16 VLPs verpackt werden, diente als Matrize für die Herstellung des linearen Reporters PCR^{B/N} (D.1.3) für die Kopplung an L1 VLPs und ein die Aminosäuren 108 - 126 umfassendes L2 Peptid und wurde für Immunisierungen mit nackter DNA verwendet.

Die Expressionskontrolle der drei Konstrukte wurde durchgeführt, um zu testen, ob überhaupt Antigen produziert wird, so daß eine Antwort nach einer Immunisierung mit diesen Reportern hervorgerufen werden kann. Nach Transfektion in 293T-Zellen wurde von allen DNAs Ovalbumin exprimiert, wobei bei der gleichen Menge an eingesetzter DNA die Expression

vom linearen Reporter PCR^{B/N} am geringsten ausfiel (Abb. D.4). Ein Grund dafür könnte sein, daß in diesem Stück kein Replikationsursprung enthalten ist, der die Kopienzahl nach der Transfektion erhöht. So erfolgt z.B. über den in pcDNA3.1/OVA enthaltenen SV40-ori die Replikation des Plasmids durch das konstitutiv in 293T-Zellen exprimierte SV40 large T-Antigen (Wobbe et al., 1986; Tsurimoto et al., 1989; Castellino et al., 1997). Die bei PCR^{B/N} auftretende Doppelbande ließe sich eventuell durch Degradation des Proteins erklären. Möglicherweise ist aber die Reduktion von Ovalbumin durch die Vorbehandlung mit Proteingel-Ladepuffer, der 5 % 2-Mercaptoethanol enthält, nicht vollständig, so daß es in der SDS-PAGE ein scheinbares Molekulargewicht von 40, 45, 63 und 72 kD hat (Kahlert et al., 1992) und die prominenten Banden die von 40 und 45 kD sind. Unter reduzierten Bedingungen wäre nur eine Bande von 45 kD zu beobachten.

Da durch jedes der drei Konstrukte Ovalbumin exprimiert wurde, konnten die DNAs zur Herstellung von Vehikeln zum Zweck der Immunisierung verwendet werden.

E.2 Pseudovirionen in Hefe

Rossi et al. zeigten 2000, daß sich HPV 16 Pseudovirionen in *Saccharomyces cerevisiae* herstellen lassen. Ein Targetplasmid ließ sich erfolgreich in VLPs verpacken, die in Hefe exprimiert wurden, und dann in verschiedene Primärzellen und etablierte Zelllinien transduzieren.

Der Hefestamm, der das Plasmid pD125 enthielt, das für die Expression der Strukturproteine L1 und L2 von HPV 16 zuständig ist, wurde mit einem für Ovalbumin kodierenden Targetplasmid transfiziert. Alle erhaltenen Klone wurden sodann untersucht, ob sowohl Struktur, als auch Targetplasmid in ihnen enthalten waren. Zwei doppelt positive Klone konnten gefunden werden, die zur Herstellung von Pseudovirionen verwendet werden sollten (D.3.1.1.2 und D.3.1.1.3). Die Analyse der über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigten Hefeextrakte zeigte, daß zwar VLPs produziert wurden, diese aber kein Targetplasmid enthielten (D.3.1.1.4). Vor der Transfektion des Targetplasmids pYes2*/OVA in Hefezellen mußten Sequenzen zur Vermehrung der DNA in Bakterien entfernt werden, damit es in etwa die Größe des HPV 16-Genoms hat. Anschließend wurde das Plasmid religiert und durch Hitzeschock in die Hefezellen eingebracht. Durch die Selbstligation nach Entfernen dieser Sequenzen könnten sich Konkatemere bilden, die zwar in einer Plasmidpräparation nachweisbar wären, aber zu groß sind, um in VLPs verpackt zu werden. Zhao et al. zeigten

1998, daß die absolute Obergrenze für zu verpackende DNA bei 10,2 kb liegt, die schon durch Zusammenschluß von nur zwei Targetplasmiden mit knapp 16 kb überschritten wäre. Außerdem beobachteten sie, daß die Unterschiede in der Dichte schwerer und leichter VLPs möglicherweise die Größe der verpackten DNA widerspiegeln. Die aus den leichten VLPs gewonnene DNA war heterogen in der Größe, aber die meisten Plasmide waren verstümmelt und hatte eine Länge von etwa 3,5 kb. Weiterhin wollten die Autoren nicht ausschließen, daß diese leichten Partikel unsachgemäß geformte Partikel sind, die DNA eingeschlossen haben. Eventuell läßt sich darüber das Profil des CsCl-Dichtegradienten der in Hefe gewonnenen Pseudovirionen erklären (Abb. D.8). So könnte der mittlere Peak (Stern in Abb. D.8) bei 1,31 g/ml CsCl Partikel widerspiegeln, die gestutzte DNA enthalten, der bei 1,34 g/ml CsCl auftretende Peak VLPs mit dem Volllänge-Plasmid und der Peak bei 1,29 g/ml CsCl Partikel ohne DNA.

Eine andere Möglichkeit weshalb keine Pseudovirionen produziert wurden, besteht darin, daß der verwendete Hefestamm zum Wildtyp (wt) revertiert und die für das Wachstum in Selektionsmedium benötigten Plasmide nicht mehr gebraucht werden. Die genomischen Allele vieler häufig verwendeter auxotropher Marker enthalten Punktmutationen, kleine Deletionen oder Ty1-Insertionen und können deshalb noch große homologe Regionen zu dem entsprechenden wt-Gen auf einem eingeführten Plasmid beherbergen, was zu unerwünschten Rekombinationen führen kann (Brachmann et al., 1998). Der Genotyp des verwendeten Hefestammes #1699 ist nur ungenügend definiert, so daß sich z.B. keine genaue Aussage über das *ura3*-Allel machen läßt. Eine Unterscheidung zwischen *ura3-52* und *ura3-1* wäre aber sinnvoll, denn das *ura3-1*-Allel kann revertieren (Brachmann et al., 1998). In diesem Fall würde das Targetplasmid, welches diesen Marker beinhaltet, nicht mehr fürs das Wachstum auf Selektionsmedium benötigt und deshalb der Bestand nicht mehr aufrecht erhalten.

Beide für die Produktion von Pseudovirionen benötigten Plasmide besitzen 2 μ -Replikationsursprünge, wodurch für hohe Kopienzahlen in einer Hefezelle gesorgt wird. Jedoch übersteigt die Kopienzahl aller in einer Zelle befindlichen Plasmide, die einen 2 μ -ori besitzen, nicht 60 bis 100 (Rose & Broach, 1990). Dies kann sich ungünstig auf den Anteil des Targetplasmids auswirken, da sich das Gleichgewicht zwischen den Plasmiden aufgrund der verwendeten Selektionsmarker zugunsten des Strukturplasmids verschieben kann. Die eingesetzten Marker sind *URA3* auf dem Targetplasmid und *LEU2* auf dem Strukturplasmid. Plasmide, die *leu2-d* enthalten, fallen durch eine hohe Kopienzahl auf. Die Expression des *LEU2*-Gens ist sehr niedrig, weshalb eine hohe Anzahl an Kopien benötigt wird, damit ein Hefestamm unter Selektion auf Leucin wachsen kann (Erhart & Hollenberg, 1983). Es könnte

sich demnach als günstig erweisen, diesen starken Selektionsmarker im Target- statt im Strukturplasmid einzusetzen, um dessen Kopienzahl und damit die Chance auf Verpackung zu erhöhen.

Wollte man das Hefesystem für die Produktion von Pseudovirionen beibehalten, da es prinzipiell auch für die Herstellung größerer Mengen geeignet ist, so müßte zuerst ein Hefestamm mit genau definiertem Genotyp ausgewählt werden, um alle Möglichkeiten für eine Reversion ausschließen zu können. Außerdem wäre es von Vorteil, wenn das Target- statt das Strukturplasmid den stärkeren Selektionsmarker besäße (siehe oben), um dessen Kopienzahl zu erhöhen.

Statt diese Modifikationen vorzunehmen wurde hier eine weitere Methode zur Produktion von Pseudovirionen herangezogen, das sogenannte *in vitro* Dis- und Reassembly.

E.3 Dis- und Reassembly von HPV 16 VLPs zur Herstellung von Pseudovirionen

Kawana et al. und Touze & Coursaget konnten zeigen, daß *in vitro* hergestellte Pseudovirionen in der Lage waren, Zellen unterschiedlicher Gewebe und Spezies zu infizieren und sich somit zur Verwendung als Shuttle-Vektor für beliebige Plasmide eignen. Diese Fähigkeit zum Gentransfer sollte genutzt werden, um *in vivo* eine Immunantwort auf ein auf der verpackten DNA kodiertes Antigen zu induzieren.

Durch Verwendung eines reduzierenden Agens, 2-Mercaptoethanol, konnten im Bakulovirussystem produzierte HPV 16 VLPs in Kapsomere zerlegt werden und sich in Gegenwart von pcDNA3.1/OVA durch Dialyse wieder zu Partikeln zusammen lagern und das Plasmid einschließen (D.3.1.2.1). Die Analyse der getropften Fraktionen des anschließend durchgeführten CsCl-Dichtegradienten im ELISA zeigte, daß in den Fraktionen 19 bis 35 VLPs vorhanden waren. Der erste Peak in Fraktion 20 entspricht einer Dichte von 1,327 g/ml CsCl im Gradienten, was das Vorhandensein voller Partikel nahe legt, da diese Dichte fast der von DNA-enthaltenden Partikeln entspricht (Abb. D.10). Diese bandieren laut Crawford und Crawford zwar bei 1,34 g/ml CsCl, aber auch bei Kawana et al. fanden sich die DNA-enthaltenden Partikel bei einer niedrigeren Dichte, nämlich 1,31 g/ml CsCl. Ein Grund für diesen Unterschied könnte sein, daß Crawford und Crawford native Partikel aus Warzen untersuchten, die sich in der Verpackung der DNA und im Aufbau von den *in vitro* generierten Pseudovirionen unterscheiden. Die von Zhao et al., 1998 *in vivo* in Cos-1-Zellen

oder auch von Unckell et al. 1997 in Cos-7-Zellen hergestellten Pseudovirionen weisen sicher eine größere Homologie zu nativen Partikeln auf, jedoch ist auch hier keine volle Übereinstimmung in der Dichte zu finden, bei denen volle und leere Partikel im CsCl-Gradienten laut Crawford und Crawford zu finden sind: 1,34 g/ml und 1,30 g/ml CsCl bei Zhao et al. bzw. 1,31 g/ml und 1,29 g/ml CsCl bei Unckell et al..

Die in diesem ELISA (Abb. D.10 B) auftretenden weiteren Peaks bei einer Dichte von 1,31 und 1,32 g/ml CsCl könnten möglicherweise, wie schon bei den in Hefen produzierten Pseudovirionen angenommen, VLPs darstellen, die trunkierte Plasmid-DNA enthalten oder aber auch falsch geformte, DNA enthaltende Partikel darstellen (Zhao et al., 1998).

Die Verpackung von DNA in VLPs (52-55 nm Durchmesser) im *in vitro*-System könnte problematisch sein, da sich die DNA durch ihre eigene Ladung abstößt und hier keine Faktoren zur Kondensation der DNA verwendet werden. Möglicherweise ließe sich durch Verwendung von Zellkernextrakt beim Dis- und Reassembly die Ausdehnung des Plasmids für die Verpackung reduzieren, da Kernextrakte aus *Xenopus* Oozyten oder auch ein sogenannter Kondensin-Komplex aus einem solchen Oozyten-Extrakt die Kondensation von Chromatin bewirken (Ohsumi et al, 1998; Kimura et al., 2001).

Über DNaseI- und Proteinase K-Verdau konnte gezeigt werden, daß in den in Fraktion 20 vorhandenen VLPs, die bei einer Dichte 1,327 g/ml CsCl auftraten, bei der sich volle Partikel erwarten lassen, geschützte DNA enthalten war (Abb. D.11). Hier handelte es sich um Pseudovirionen, die, wie in der Literatur beschrieben, während des Reassemblys das Targetplasmid verpacken, welches dann vor DNase-Verdau geschützt ist. Die so generierten Pseudovirionen konnten dazu verwendet werden, pcDNA3.1/OVA als DNA-Vakzine in Zellen einzuschleusen.

E.4 Kopplung von DNA an HPV 16 VLPs

Die durch Kopplung hergestellten Pseudovirionen wurden für unterschiedliche Zwecke entwickelt: Müller et al. (1995) wollten damit die Interaktionen von Papillomvirus Kapsiden mit der Zelle untersuchen, Yeager et al. (2000) testeten Patientenseren auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper. Möglicherweise lassen sich diese Pseudovirionen aber auch für eine *in vivo*-Infektion von Zellen und somit zur Induktion einer Immunantwort einsetzen.

Offensichtlich scheint die Länge der an die Partikeloberfläche gekoppelten DNA für die Interaktion mit der Zelle kritisch zu sein: Müller et al. verwendeten ein 8,9 kb großes Plasmid,

wodurch weniger als 1 % der Zellen infiziert wurden. Erst nach Koinfektion mit einem replikationsdefizienten Adenovirus, gelang es, eine Infektion von 10 – 20 % zu erreichen. Adenoviren vereinfachen die Lyse der Lysosomenmembran, wodurch der Komplex ins Zytoplasma gelangen und exprimiert werden kann. Im Gegensatz dazu wurden in der Untersuchung von Yeager et al., die ein lineares Reporterkonstrukt von 1,8 kb einsetzten, bis zu 40 % der Zielzellen infiziert, ohne daß eine Koinfektion vonnöten gewesen wäre. Möglicherweise wirkt die Größe des von Müller et al. verwendeten Plasmids inhibierend auf die Aufnahme in Zellen. Aus diesem Grund wurde eine etwa 2,1 kb großer Reporter-Gen-DNA (PCR^{B/N}) für die Kopplung über PCR hergestellt, die den pCMV-Promotor, das Gen für Ovalbumin und die BGH-Polyadenylierungsstelle umfaßte (D.1.3). Die dafür verwendeten Primer trugen 5' eine Biotinylierung mit Detektions- und Schutzfunktion und 3' einen Aminolink, über den die Bindung an die Partikel stattfand. Durch Protein- und DNA-Analysen (ELISA und PCR) konnte festgestellt werden, daß der Reporter nach der chemischen Kopplung mittels 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid (EDC) an die Partikel gebunden vorlag (D.3.2.1.1). Jedoch ist nicht die gesamte eingesetzte DNA an die Partikel gebunden, sondern ein Teil, etwas 30 %, lag frei vor (Abb. D.12 C). Für eine Immunisierung dürfte das aber nicht hinderlich sein, da die Gesamtmenge an DNA (als DNA-VLP-Komplex und freie DNA zusammen genommen) geringer ist, als die minimale Menge nackter DNA, die zur Induktion einer Immunantwort benötigt wird (< 10 µg, D.4.1). Falls durch das gekoppelte Shuttle eine Immunantwort hervorgerufen wird, so ist dies der Assoziation von DNA und VLPs zuzuschreiben, nicht dem Anteil nackt vorliegender DNA, da auch VLPs in trans keinen adjuvanten Effekt haben (D.4.2).

E.5 HPV 16 L2 als Shuttlevektor

In einer Studie von Kawana et al. zur Lokalisation der Epitope monoklonaler Mausantikörper gegen HPV 16 L2 konnten zwei Antikörper gefunden werden, die das die Aminosäuren (AS) 108-126 umfassende L2-Peptid (LVEETSFIDAGAPTSVPSI) binden. In einem Sequenzvergleich wurde festgestellt, daß dies eine konservierte Sequenz innerhalb der genitalen HPV-Typen darstellt. Durch die Antikörper gegen dieses Peptid konnte eine Pseudoinfektion mit HPV 16 und 6 blockiert werden, was nahe legt, daß diese beiden Typen ein gemeinsames L2-Neutralisationsepitop besitzen, das an der Virusoberfläche lokalisiert ist.

Es erscheint als wahrscheinlich, daß die Aminosäuren 108-126 innerhalb des L2-Proteins eine wichtige Funktion bei der Infektion mit HPV spielen (Kawana et al., 1999).

In einem Kompetitionsassay interferierte HPV 16 L2₁₀₈₋₁₂₆ mit der Infektiosität von HPV16 Pseudovirionen in COS-Zellen und das L2₁₀₈₋₁₂₆-Peptid fusioniert an GFP vermittelte dessen Bindung an und Eintritt in Zellen verschiedener Herkunft. Wurden Pseudovirionen mit Mutationen in den AS 108-111 von L2 verwendet, so resultierte daraus eine geringere Infektiosität. Auch diese Daten weisen auf eine Rolle von L2 bei der Infektion mit HPV durch Interaktion der N-terminalen Region mit einem zellulären Oberflächenprotein hin (Kawana et al., 2001).

Die Experimente mit der Fusion aus L2₁₀₈₋₁₂₆ und GFP regten an, daß dieses Peptid eine Funktion als Shuttle nicht nur für Protein, sondern möglicherweise auch für DNA haben könnte. Deshalb wurde versucht, L2₁₀₈₋₁₂₆ und PCR^{B/N} chemisch mittels eines Katalysators (EDC) über eine Peptidbindung zu koppeln, um so dem DNA-Teil zum Eintritt in Zellen zu verhelfen, wo schließlich Expression und Prozessierung des Antigens, Ovalbumin, stattfinden sollten.

Um die Bindung von Peptid an PCR^{B/N} nachzuweisen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt (D.3.2.2.1). In einer Immunpräzipitation des L2-Teils und anschließender Ovalbumin-spezifischer PCR sollte die Kopplung überprüft werden. In den Kontrollen zeigte sich, daß die DNA auch in Abwesenheit des Peptids an der Protein-A-Sepharose haftet (Abb. D.13, Ansatz D), was an der Größe der Reporter-DNA (2165 bp) liegen kann (persönliche Mitteilung Dr. Herbert Tschochner, BZH Heidelberg). Immunpräzipitationen werden zwar auch durchgeführt, um DNA-bindende Protein zu analysieren, jedoch liegt die optimale Länge der verwendete DNA zwischen 80 und 600 bp (Pollock & Treisman, 1990; Orlando et al., 1997). Somit konnte diese Methode nicht zur Verifikation der Kopplung zwischen PCR^{B/N} und L2₁₀₈₋₁₂₆ herangezogen werden.

In einem anderen Ansatz sollte untersucht werden, ob die Bindung von L2₁₀₈₋₁₂₆ an PCR^{B/N} eine Verschiebung im Laufverhalten in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel, das der Auftrennung doppelsträngiger DNA dient, verursachen kann. Wenn man davon ausgeht, daß eine Aminosäure ein durchschnittliches Gewicht von 110 Da hat und ein Basenpaar von 660 Da, würde L2₁₀₈₋₁₂₆ eine Verschiebung von etwa 3,2 bp bewirken. Um eine Veränderung dieser Größenordnung sichtbar zu machen, wurde die Reporter DNA nach der chemischen Kopplung mit einem Restriktionsenzym (BamI) verdaut, so daß das L2-Peptid am kleinsten resultierenden Fragment gebunden sein sollte. Zum besseren Nachweis wurden die Fragmente am 3'-Ende radioaktiv markiert, was für eine gleichmäßige, größenunabhängige Signalstärke

wichtig ist, und die Polyacrylamidkonzentration so gewählt, daß DNA-Fragmente mit einer Größe von 50 bis 200 bp gut aufgetrennt werden können. Trotzdem konnte keine Verschiebung des Bandenmusters beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, daß die Gellänge für eine Trennung nicht ausreichend war und der Anteil ungekoppelter DNA ein Signal zeigte, das das der verschobenen DNA überlagerte. Eine Möglichkeit, um eine Verschiebung sichtbar zu machen, könnte ein sogenannter Antibody-Supershift-Assay sein (Kristie & Roizman, 1986). Die Bindung von Antikörper und Protein, oder in diesem Fall Peptid, kann zu einer weiteren Reduktion der Mobilität des DNA-Peptid-Komplexes im Gel führen, so daß die Verschiebung deutlicher wird.

Auch zeigten die größte und kleinste Bande (1320 bzw. 159 bp) das stärkste Signal, obwohl bei einer radioaktiven Markierung alle Banden die gleiche Intensität aufweisen sollten, nicht wie bei einer Färbung mit Ethidiumbromid, wo das Signal von der Fragmentgröße abhängig ist. Für dieses Phänomen konnte auch in der Literatur kein Hinweis auf eine Erklärung gefunden werden. Wenn man versuchen wollte, als Erklärung einen nur partiellen Verdau mit BanI anzuführen, müßten die Banden mittlerer Länge von 202 und 484 bp intensiver sein und noch zusätzliche Banden sichtbar werden. Auch eine mögliche Bevorzugung der terminalen DNA-Fragmente durch das Klenow-Fragment kann man ausschließen, denn das größte Fragment von 1320 bp befindet sich wie das 202 bp große Stück zentral in PCR^{B/N}. Auch die Termini zeigen eine unterschiedliche Signalintensität in der Radiographie: Das biotinylierte 5'-Ende von 484 bp zeigt ein schwaches Signal, das mit dem Aminolink versehene 3'-Ende von 159 bp hingegen ein starkes, unabhängig davon, ob L2₁₀₈₋₁₂₆ daran gebunden vorliegt oder nicht. Eventuell wurde das Peptid auch während des Versuchs degradiert. Peptide sind zwar bei Raumtemperatur für einige Stunden stabil, aber möglicherweise führten die einzelnen Schritte des Versuchs wie Kopplung, Verdau und radioaktive Markierung der DNA mit jeweils anschließender Fällung der DNA zur Degradation des Peptids.

Eine dritte Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von Peptid an PCR^{B/N} bestand darin, die Reporter-DNA über den biotinylierten Primer an Streptavidin-Dynabeads zu binden und so von nicht-gebundener DNA abzutrennen, dann auf eine Membran aufzubringen und mit einem L2-spezifischen Serum zu detektieren (D.3.2.2.1). Nur die Positivkontrolle aus HPV 16 L1/L2 VLPs rief ein Signal hervor, jedoch keiner der Kopplungsansätze. Je Kopplungsansatz wurden 40 ng Peptid eingesetzt, in der Positivkontrolle 400 ng L1/L2 VLPs, was bei einem Verhältnis von 30:1 zwischen L1 und L2 etwa 13 ng L2-Protein entspricht, also ca. einem Drittel der eingesetzten Peptidmenge. Das entspricht in etwa einem molaren Verhältnis von L2₁₀₈₋₁₂₆-Peptid zu L2-Protein von 88:1. Da das Antiserum gegen das synthetisch hergestellte

L2-Peptid gerichtet ist, nicht gegen das komplette Protein oder L1/L2 VLPs, läßt sich das fehlende Signal im Dotblot nicht durch unkompatible Epitope (synthetisches Peptid bzw. natives Protein) erklären. Möglicherweise wurde auch hier der Peptidanteil während des Versuchsverlaufs degradiert, so daß keine Detektion erfolgen konnte. Die Immunisierung sollte von diesem Problem nicht betroffen sein, da die Kopplungsprozedur in zwei Stunden abgeschlossen ist und das Vehikel direkt im Anschluß den Mäusen injiziert wurde.

Da es in dieser Arbeit nicht gelang, eine Bindung von Peptid an PCR^{B/N} nachzuweisen, kann auch nicht klar gesagt werden, ob die fehlende Immunantwort nach Applikation an Mäusen auf möglicherweise nicht zusammengebaute Komponenten zurückzuführen ist, oder ob auch ein korrekt zusammengesetztes Shuttle keine Resultate in einer Immunisierung gezeigt hätte (D.5, Abb. D.21).

Ein Grund für einen Fehlschlag der Verbesserung einer Immunantwort könnte eventuell in der Wahl des Peptids liegen, da eine andere Studie (Yang et al., 2003) besagt, daß die AS 91-129 von L2 zwar für die Infektion, nicht aber für die Bindung des Partikels an die Zelloberfläche benötigt werden. Statt dessen sind die Aminosäuren 13-31 für die Kompetition zur Bindung an Zellen vonnöten und auch nur ein Fusionsprotein aus AS 13-31 und GFP, nicht aber AS 25-45 oder 299-333, zeigt Bindung an und sogar Aufnahme in Zellen. Mutationen in den Positionen 18 und 19 oder 21 und 22 von L2 reduzierten die Bindung des Fusionspeptids an Zellen und die Infektiosität von HPV 16 Pseudovirionen. Auch wurde für BPV 1 gezeigt, daß das Fehlen der AS 91-129 von L2 zwar eine Infektion verhindert, nicht aber das Assembly, die Struktur oder die Bindung der Virionen an die Zelloberfläche stört (Yang et al., 2003). Diese gegenteiligen Aussagen bezüglich der Fähigkeit zur Bindung der verschiedenen HPV 16 L2-Peptide (Kawana: AS 108-126 bzw. Yang: AS 13-31) an Zellen könnten bedeuten, daß HPV 16 L2₁₃₋₃₁ statt L2₁₀₈₋₁₂₆ als der geeignetere Kandidat für ein Shuttle angesehen werden kann.

Eine andere Möglichkeit zur Komplexierung eines L2-Peptids und DNA durch direkte Interaktion wie von Bousarghin et al. 2003 beschrieben, ist für das L2₁₀₈₋₁₂₆ Peptid jedoch nicht geeignet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß positiv geladene Sequenzen (AS 1-13 und AS 454-462) am N- und C-Terminus von HPV 16 L2 an DNA und Heparansulfat binden können und Gentransfer in Cos-7 Zellen vermitteln. Die DNA war durch Komplexierung mit diesen Peptiden vor Benzonaseverdau geschützt. Allerdings sind diese Sequenzen reich an Arginin und Lysin, wohingegen L2₁₀₈₋₁₂₆ nur ein N-terminales Lysin vorweisen kann (LVEETSFIDAGAPTSVPSI), was es für die auf den Ladungsverhältnissen der

Bindungspartner beruhende Methode zur Komplexbildung wahrscheinlich unbrauchbar macht.

Auch besitzt L₂₁₀₈₋₁₂₆ keine Zugehörigkeit zur Gruppe der sogenannten Penetratine, die translozierende Eigenschaften besitzen, da auch diese Peptide viele basische und apolare Aminosäuren beinhalten. Aber auch dann wäre das Einschleusen von PCR^{B/N} problematisch, da durch die Bindung doppelsträngiger DNA die Penetratin-vermittelte Translokation aufgehoben wird (Prochiantz, 1996; Derossi et al., 1998; Schwarze et al., 2000).

Es läßt sich also aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse keine Aussage bezüglich des Status der Kopplung treffen, und auch die Wahl des Peptids in Hinsicht auf Zellbindung und –Eintritt war eventuell nicht optimal. Trotzdem wurde der Ansatz in den Immunisierungen verwendet, um feststellen zu können, ob trotz der Schwierigkeiten im Nachweis des Komplexes ein ihm zu zuschreibender Effekt nach der Immunisierung zu beobachten war.

E.6 DNA-Immunisierung

Die ersten humanen Studien zur DNA-Immunisierung wurden 1998 publiziert (Calarota et al., 1998; MacGregor et al., 1998; Ugen et al., 1998; Wang et al., 1998). Inzwischen hat sich herausgestellt, daß die Effizienz von DNA-Vakzinen in Primaten wesentlich geringer zu sein scheint, insbesondere die Induktion der humoralen Immunantwort, als Studien mit Mäusen vermuten ließen (Gregersen, 2001; Johnston et al., 2002). So waren Rhesusaffen, an denen ein SIV-Impfstoff getestet wurde, vor einer Infektion mit dem SI-Virus nur nach viermaliger Injektion von 5 mg DNA geschützt (Couillin et al., 2001). In einer Studie für eine Malaria-Vakzine mußte den Probanden große Mengen an DNA (2,5 mg / Injektion) verabreicht werden, um eine Immunantwort, gemessen durch ⁵¹Cr-Freisetzung im Zytotoxizitätstest, zu erhalten (Wang et al., 1998). In beiden Studien konnten keine Antikörper induziert werden.

Durch Modifikation oder Targeting der DNA-Vakzine ist es möglich, die Immunantwort zu verbessern. So kann z.B. durch Immunisierung mit DNA-Vektoren, die für ein Ubiquitin-Fusionsprotein kodieren, das Antigen innerhalb der Zelle durch Anhängen weiterer Ubiquitinmoleküle zum Proteasom geleitet werden, was die MHC Klasse I-Präsentation verstärkt (Fu et al., 1998). Für extrazelluläres Targeting können Signalpeptide verwendet werden, die der DNA zur Aufnahme in Antigen-präsentierende Zellen (APCs) verhelfen und die Immunantwort verstärken (Barry et al., 1996). Eine weitere Möglicherweise für extrazelluläres Targeting können HPV-Strukturproteine sein, da diese von einer Vielzahl von

Zellen, darunter auch Dendritische Zellen, aufgenommen werden (Roden et al., 1994; Müller et al., 1995, Volpers et al., 1995). Auf diese Weise könnten sie einem DNA-Impfstoff den Eintritt in Zellen erleichtern und so die Wirkung einer DNA-Immunisierung verbessern.

Bei DNA-Immunisierungen im Mausmodell wird am häufigsten die intramuskuläre (i.m.) Applikation gewählt, gefolgt von intradermaler (i.d.) und subkutaner (s.c.) Administration (Gregoriadis et al., 2002). Bei der i.m. Injektion verwenden einige Autoren Cardiotoxin (Davis et al., 1993) oder Bupivacain (Wang et al., 1993) zur Vorbehandlung des Muskels, um durch auf die Schädigung folgende Regeneration die Infiltration von Lymphozyten zu erhöhen oder den Blutfluß zu steigern. Die verwendete DNA-Dosis hängt vom Antigen und vom Modellsystem ab, wobei typischerweise für i.m. und s.c. Immunisierungen Mengen von 10 – 100 µg und bei i.d. Applikation mit einer Gene Gun, die mit DNA beschichtete mikro-Goldpartikel in die Haut schießt, 0,1 – 1 µg eingesetzt werden (Gurunathan et al., 2000; Rodriguez & Whitton, 2000).

Die hier durchgeführte i.m. Immunisierung mit pcDNA3.1/OVA zeigte, daß durch DNA-Mengen von 10 – 100 µg eine zelluläre Immunantwort hervorgerufen wird (D.4.1), wie auch von Gurunathan et al. beschrieben. Aufgrund der großen Volumina der Vehikelpräparationen mußte jedoch eine andere Applikationsroute gewählt werden, da pro Muskel maximal 0,05 ml injiziert werden sollen (Tuffery, 1987). Da subkutan (s.c.) Volumina von bis zu 3 ml pro Maus appliziert werden können (Tuffery, 1987), bot sich diese Immunisierungsrouten an. Die s.c. Injektion kann entweder in den Fußballen, an der Schwanzwurzel oder unter die Haut zwischen den Schulterblättern erfolgen, wobei letztere Möglichkeit am einfachsten durchzuführen ist und auch in einer Untersuchung der DNA-Immunisierung gegen Varicella-Zoster-Virus genauso effektiv war, wie eine i.m. Applikation (Hasan et al., 2000). In einer Studie zum Schutz vor kutaner Leishmaniose (Mendez et al., 2002) war die s.c. Applikation, allerdings in den Fuß, der i.m. Administration sogar überlegen. In dieser Arbeit wurden die Mäuse mit Dosen von 3 – 100 µg pcDNA3.1/OVA zwischen den Schulterblättern vakziniert, wobei in keiner der Gruppen eine Immunantwort detektiert werden konnte (D.4.1). Dies ist möglicherweise auf das Immunisierungsprotokoll zurück zu führen, da die Tiere nur eine Einfachdosis ohne Booster-Injektion erhielten. Bei Hasan et al. (2000) wurden die besten Ergebnisse mit 200 µg DNA, also einer höheren Dosis, und einer Booster-Injektion erhalten, und bei einer Untersuchung der Immunantwort gegen das kleine Hepatitis B Oberflächenantigen (HbsAg) konnten zwar bei Mengen von 10 und 100 µg DNA zytotoxische T-Zellen induziert werden, aber die Administration wurde an der Schwanzwurzel durchgeführt (Böhm et al., 1998). Eventuell ist auch die s.c. Immunisierung

für Ovalbumin kodierende DNA ungeeignet, da nicht jede Applikationsroute für verschiedene Antigene gleichermaßen geeignet ist (Böhm et al., 1998; McCluskie et al., 1999; Hasan et al., 2000; Mendez et al., 2002).

Auch die negativen Ergebnisse bei der vergleichenden Immunisierung der verschiedenen HPV-Shuttles (D.5) lassen sich möglicherweise mit dem Immunisierungsprotokoll erklären. Da die s.c. Injektion offensichtlich für Ovalbumin-DNA nicht geeignet ist (D.4.1), ist es möglich, daß auch durch die Verwendung eines Vehikels, das per se die Immunantwort verbessern könnte, keine nachweisbare Antwort erzielt wird. Falls es gelänge, die Konzentration der VLP-Präparationen zu erhöhen (auf etwa 1mg/ml), reduzierte sich das Volumen der Vehikelansätze, so daß auf eine i.m. Immunisierung zurück gegriffen werden könnte oder sogar auf intradermale (i.d.) Applikation, die in der Untersuchung von Mendez der Administration in die Fußsohle noch überlegen war. Diese Steigerung ist dadurch zu erklären, daß sich in der Haut spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Langerhanszellen und dermale Dendritische Zellen (Casares et al., 1997) befinden, die bei der Immunisierung direkt getroffen („infiziert“) werden könnten.

Von den verwendeten Vehikeln zur Immunisierung konnte bei zweien der korrekte Zusammenbau gezeigt werden: Im Dis- und Reassembly ließen sich HPV 16 Pseudovirionen herstellen, in die das Reporterplasmid verpackt wurde und auch die Kopplung der linearen Reporter-DNA an HPV 16 VLPs konnte nachgewiesen werden. Der dritte Ansatz jedoch, die Kopplung von Reporter-DNA an ein HPV 16 L2-Peptid, konnte nicht bestätigt werden.

In der vergleichenden Immunisierung der drei Vehikel mit nackter DNA, die subkutan bei C57BL/6Mäusen durchgeführt wurde, konnte keine Verbesserung der Immunogenität der Shuttle gegenüber nackter DNA festgestellt werden.

Die Hypothese, daß HPV-Strukturproteine als Shuttle für DNA die Immunisierung im Vergleich zu nackter DNA verbessern, konnte mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau also nicht bestätigt werden.

F Zusammenfassung

Bestimmte Typen der humanpathogenen Papillomviren (HPV), z.B. HPV 16, sind ursächlich an der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs und seinen Vorläuferläsionen beteiligt. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Infektion mit HPV in undifferenzierten Epithelzellen des Stratum basale. Jedoch können infektiöse Papillomviren und durch Expression des Hauptstrukturproteins L1 hergestellte virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs), aber auch das „minor“ Strukturprotein L2, an eine Vielzahl von Zellen binden und von diesen aufgenommen werden. Diese Eigenschaft sollte für eine DNA-Immunisierung genutzt werden in der Annahme, daß eine Induktion der Immunantwort effizienter sei, wenn ein Shuttle zum Eintritt der Nukleinsäure in Zellen eingesetzt wird. So könnte eine erhöhte Proteinexpression in den getroffenen Zellen stattfinden. Die Freisetzung größerer Antigenmengen aus infizierten Zellen wie Muskel- oder Epithelzellen könnte vermehrt zu „cross-priming“ professioneller Antigen-präsentierender Zellen führen und dadurch oder durch direkte Infektion von Zellen des Immunsystems wie Dendritischen Zellen (DCs) die Präsentation des Antigens erhöhen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Strukturproteine L1 und L2 des HPV Typs 16 diese Aufgabe erfüllen können.

Zu diesem Zweck sollten drei verschiedene Vehikelpräparationen mit Ovalbumin als Reportergen hergestellt und getestet werden: (i) Pseudovirionen, bei denen die für das Antigen kodierende Reporter-DNA in HPV 16-VLPs verpackt ist, (ii) VLPs, an die das Reportergen von außen chemisch gebunden ist und (iii) ein Peptid von HPV 16 L2, an das das Reportergen gebunden vorliegt.

Durch Dis- und Reassembly, bei dem *in vitro* DNA in VLPs verpackt wird, konnten Pseudovirionen hergestellt werden. Auch die Kopplung des Reportergens an VLPs war erfolgreich. Allein die Bindung zwischen dem HPV 16 L2-Peptid und dem Reportergen konnte nicht nachgewiesen werden. Trotzdem wurden alle Präparationen im Mausmodell auf ihre Immunogenität getestet.

Die eingesetzte DNA-Menge pro Maus wurde als Standard gesetzt, um die Effizienz der verschiedenen Vehikelpräparationen vergleichen zu können. In einer intramuskulär (i.m.) durchgeführten DNA-Titration konnte festgestellt werden, daß eine Menge von mindestens 10 µg DNA benötigt wird, um eine meßbare zelluläre Immunantwort zu induzieren. Da die Vehikelpräparationen jedoch das maximale Volumen von 0,05 ml überschritten, das in einer i.m.-Injektion pro Maus eingesetzt werden kann, wurde außerdem die subkutane (s.c.) Route getestet. Bei dieser Applikationsart reichte sogar eine Menge von 100 µg DNA nicht aus, um eine meßbare Immunantwort hervor zu rufen.

In der vergleichenden Immunisierung der Shuttle-Vektoren mit nackter DNA erhielt jede Maus über das Vehikel 3 µg DNA, eine Menge, die sich in der i.m. Titration als gerade nicht mehr immunogen erwies. Ein möglicher adjuvanter Effekt der VLPs bei einer Immunisierung mit Ovalbumin war vorher experimentell ausgeschlossen worden. So sollte getestet werden, ob durch Vehikel eingeschleuste DNA immunogener ist als nackte DNA. Eine Zunahme der Immunantwort im Vergleich zu nackter DNA konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Somit konnte die Hypothese, daß Vehikelpräparationen bestehend aus HPV 16-Strukturproteinen und für Ovalbumin kodierender DNA immunogener sind als nackte DNA, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

G Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaar
BPV	bovines Papillomvirus
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cystein
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	humane Leukozyten Differenzierungsantigenen (<i>cluster of differentiation</i>)
Ci	Curie
CIA	Chloroform / Isoamylalkohol
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
cm	Zentimeter
cpm	radioaktiver Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
CVLPs	chimäre virus-ähnliche Partikel (<i>chimeric virus-like particles</i>)
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E	Effektorzelle im Zytotoxizitätstest
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immunospot</i>
F	Phenylalanin
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinthiocynat

g	Gramm
G	Glycin
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HPV	humanpathogenes Papillomvirus
H ₂ O	bidestilliertes Wasser
I	Isoleucin
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
i.d.	intradermal
i.m.	intramuskulär
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
L	Leucin
LEU	Leucin
M	molar
μ	Mikro
μ FD	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mA	Milliampère
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
n	Nano
N	Asparagin
ng	Nanogramm
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
OVA	Ovalbumin
p	Pico
P	Prolin

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PV	Papillomviren
ψVLPs	Pseudovirionen
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>runs per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAP	Streptavidin-alkaline Phosphatase
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sec	Sekunde
T	Threonin
T	Zielzelle (<i>target cell</i>) im Zytotoxizitätstest
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheiten (<i>units</i>)
ÜN	über Nacht
URA	Uracil
URR	<i>upstream regulatory region</i>
UV	ultraviolett
V	Valin
V	Volt
VLPs	virus-ähnliche Partikel (<i>virus-like particles</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Y	Tyrosin
ZTLs	zytotoxische T-Lymphozyten

H Literatur

- BAKER, C. C., and HOWLEY, P. M. (1987). Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *Embo J* **6**(4), 1027-35.
- BAKER, D., and HANKEY, D. J. (2003). Gene therapy in autoimmune, demyelinating disease of the central nervous system. *Gene Ther* **10**(10), 844-53.
- BAKER, T. S., NEWCOMB, W. W., OLSON, N. H., COWSERT, L. M., OLSON, C., and BROWN, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* **60**(6), 1445-56.
- BARBOSA, M. S., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* **63**(3), 1404-7.
- BARBOSA, M. S., and SCHLEGEL, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene* **4**(12), 1529-32.
- BARRY, M. A., DOWER, W. J., and JOHNSTON, S. A. (1996). Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat Med* **2**(3), 299-305.
- BERRY, J. M., and PALEFSKY, J. M. (2003). A review of human papillomavirus vaccines: from basic science to clinical trials. *Front Biosci* **8**, s333-45.
- BHATTACHARY, R., BUKKAPATNAM, R., PRAWOKO, I., SOTO, J., MORGAN, M., and SALUP, R. R. (2002). Efficacy of vaccination with plasmid DNA encoding for HER2/neu or HER2/neu-eGFP fusion protein against prostate cancer in rats. *Int Immunopharmacol* **2**(6), 783-96.
- BOHM, W., MERTENS, T., SCHIRMBECK, R., and REIMANN, J. (1998). Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **16**(9-10), 949-54.
- BOSCH, F. X., MUNOZ, N., DE SANJOSE, S., NAVARRO, C., MOREO, P., ASCUNCE, N., GONZALEZ, L. C., TAFUR, L., GILI, M., LARRANAGA, I., and ET AL. (1993). Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2**(5), 415-22.
- BOUSARGHIN, L., TOUZE, A., COMBITA-ROJAS, A. L., and COURSAGET, P. (2003). Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J Gen Virol* **84**(Pt 1), 157-64.
- BOYLE, P. (1997). Global burden of cancer. *Lancet* **349**(Suppl 2), SII23-6.
- BRACHMANN, C. B., DAVIES, A., COST, G. J., CAPUTO, E., LI, J., HIETER, P., and BOEKE, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**(2), 115-32.
- BROWN, D. R., BRYAN, J. T., SCHROEDER, J. M., ROBINSON, T. S., FIFE, K. H., WHEELER, C. M., BARR, E., SMITH, P. R., CHIACCHIERINI, L., DiCELLO, A., and JANSEN, K. U. (2001). Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis* **184**(9), 1183-6.
- BURKHARDT, A., DiMAIO, D., and SCHLEGEL, R. (1987). Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *Embo J* **6**(8), 2381-5.
- CALAROTA, S., BRATT, G., NORDLUND, S., HINKULA, J., LEANDERSSON, A. C., SANDSTROM, E., and WAHREN, B. (1998). Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* **351**(9112), 1320-5.
- CARTER, J. J., and GALLOWAY, D. A. (1997). Humoral immune response to human papillomavirus infection. *Clin Dermatol* **15**(2), 249-59.

- CASARES, S., INABA, K., BRUMEANU, T. D., STEINMAN, R. M., and BONA, C. A. (1997). Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* **186**(9), 1481-6.
- CASTELLANOS, M. R., HAYES, R. L., and MAIMAN, M. A. (2001). Synthetic peptides induce a cytotoxic response against human papillomavirus type-18. *Gynecol Oncol* **82**(1), 77-83.
- CASTELLINO, A. M., CANTALUPO, P., MARKS, I. M., VARTIKAR, J. V., PEDEN, K. W., and PIPAS, J. M. (1997). trans-Dominant and non-trans-dominant mutant simian virus 40 large T antigens show distinct responses to ATP. *J Virol* **71**(10), 7549-59.
- CHELLAPPAN, S., KRAUS, V. B., KROGER, B., MUNGER, K., HOWLEY, P. M., PHELPS, W. C., and NEVINS, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10), 4549-53.
- CHEN, X. S., GARCEA, R. L., GOLDBERG, I., CASINI, G., and HARRISON, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**(3), 557-67.
- CHENG, W. F., HUNG, C. F., PAI, S. I., HSU, K. F., HE, L., LING, M., and WU, T. C. (2002). Repeated DNA vaccinations elicited qualitatively different cytotoxic T lymphocytes and improved protective antitumor effects. *J Biomed Sci* **9**(6), 675-87.
- CHIANG, C. M., DONG, G., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1992). Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* **66**(9), 5224-31.
- CHRISTENSEN, N. D., CLADEL, N. M., REED, C. A., BUDGEON, L. R., EMBERS, M. E., SKULSKY, D. M., MCCLEMENTS, W. L., LUDMERER, S. W., and JANSEN, K. U. (2001). Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology* **291**(2), 324-34.
- CHRISTENSEN, N. D., DILLNER, J., EKLUND, C., CARTER, J. J., WIPF, G. C., REED, C. A., CLADEL, N. M., and GALLOWAY, D. A. (1996). Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* **223**(1), 174-84.
- CHRISTENSEN, N. D., HOPFL, R., DIANGELO, S. L., CLADEL, N. M., PATRICK, S. D., WELSH, P. A., BUDGEON, L. R., REED, C. A., and KREIDER, J. W. (1994). Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol* **75**(Pt 9), 2271-6.
- 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.
- COLEMAN, N., BIRLEY, H. D., RENTON, A. M., HANNA, N. F., RYAIT, B. K., BYRNE, M., TAYLOR-ROBINSON, D., and STANLEY, M. A. (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* **102**(6), 768-74.
- CONDON, C., WATKINS, S. C., CELLUZZI, C. M., THOMPSON, K., and FALO, L. D., JR. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* **2**(10), 1122-8.
- CONGER, K. L., LIU, J. S., KUO, S. R., CHOW, L. T., and WANG, T. S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* **274**(5), 2696-705.
- COUILLIN, I., LETOURNEUR, F., LEFEBVRE, P., GUILLET, J. G., and MARTINON, F. (2001). DNA vaccination of macaques with several different Nef sequences induces multispecific T cell responses. *Virology* **279**(1), 136-45.
- CRAWFORD, L. V., and CRAWFORD, E. M. (1963). A comparative study of polyoma and papillomaviruses. *Virology* **217**:285-92

- CROOK, T., WREDE, D., TIDY, J. A., MASON, W. P., EVANS, D. J., and VOUSDEN, K. H. (1992). Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet* **339**(8801), 1070-3.
- CROOK, T., WREDE, D., and VOUSDEN, K. H. (1991). p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* **6**(5), 873-5.
- DAVIS, H. L., WHALEN, R. G., and DEMENEIX, B. A. (1993). Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* **4**(2), 151-9.
- DE GRUIJL, T. D., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M., COURSAGET, P., STUKART, M. J., DUPUY, C., KUETER, E., VERHEIJEN, R. H., HELMERHORST, T. J., DUGGAN-KEEN, M. F., STERN, P. L., MEIJER, C. J., and SCHEPER, R. J. (1999). Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome. *J Gen Virol* **80**(Pt 2), 399-408.
- DE GRUIJL, T. D., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M., STUKART, M. J., DOEKHIE, F. S., REMMINK, A. J., HELMERHORST, T. J., VERHEIJEN, R. H., DUGGAN-KEEN, M. F., STERN, P. L., MEIJER, C. J., and SCHEPER, R. J. (1998). Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res* **58**(8), 1700-6.
- DE MARCO, F., HALLEZ, S., BRULET, J. M., GESCHE, F., MARZANO, P., FLAMINI, S., MARCANTE, M. L., and VENUTI, A. (2003). DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Res* **23**(2B), 1449-54.
- DE VILLIERS, E. M. (1997). Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* **15**(2), 199-206.
- DEROSSI, D., CHASSAING, G., and PROCHIANZ, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **8**(2), 84-7.
- DI LEONARDO, G., TORCHIO, P., PASQUALONI, E., CORRAO, G., and QUAGLINO, D. (1998). Incidence of malignant lymphoproliferative diseases by stage and histological variants in central Italy: a population based study 1982-1994. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2**(2), 65-74.
- DOORBAR, J., ELY, S., STERLING, J., MCLEAN, C., and CRAWFORD, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**(6338), 824-7.
- DYSON, N., HOWLEY, P. M., MUNGER, K., and HARLOW, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893), 934-7.
- EMENY, R. T., WHEELER, C. M., JANSEN, K. U., HUNT, W. C., FU, T. M., SMITH, J. F., MACMULLEN, S., ESSER, M. T., and PALIARD, X. (2002). Priming of human papillomavirus type 11-specific humoral and cellular immune responses in college-aged women with a virus-like particle vaccine. *J Virol* **76**(15), 7832-42.
- EVANS, E. M., MAN, S., EVANS, A. S., and BORYSIEWICZ, L. K. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **57**(14), 2943-50.
- EVANS, T. G., BONNEZ, W., ROSE, R. C., KOENIG, S., DEMETER, L., SUZICH, J. A., O'BRIEN, D., CAMPBELL, M., WHITE, W. I., BALSLEY, J., and REICHMAN, R. C. (2001). A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* **183**(10), 1485-93.
- FU, T. M., GUAN, L., FRIEDMAN, A., ULMER, J. B., LIU, M. A., and DONNELLY, J. J. (1998). Induction of MHC class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. *Vaccine* **16**(18), 1711-7.
- GAGE, J. R., MEYERS, C., and WETTSTEIN, F. O. (1990). The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* **64**(2), 723-30.

- GARZETTI, G. G., CIAVATTINI, A., BUTINI, L., VECCHI, A., and MONTRONI, M. (1995). Cervical dysplasia in HIV-seropositive women: role of human papillomavirus infection and immune status. *Gynecol Obstet Invest* **40**(1), 52-6.
- GERARD, C. M., BAUDSON, N., KRAEMER, K., BRUCK, C., GARCON, N., PATERSON, Y., PAN, Z. K., and PARDOLL, D. (2001). Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumour growth. *Vaccine* **19**(17-19), 2583-9.
- 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.
- GREGORIADIS, G., BACON, A., CAPARROS-WANDERLEY, W., and MCCORMACK, B. (2002). A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* **20**(Suppl 5), B1-9.
- GROSSMAN, S. R., and LAIMINS, L. A. (1989). E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* **4**(9), 1089-93.
- GURUNATHAN, S., KLINMAN, D. M., and SEDER, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-74.
- 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.
- HALBERT, C. L., DEMERS, G. W., and GALLOWAY, D. A. (1992). The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* **66**(4), 2125-34.
- HARIHARAN, K., BRASLAWSKY, G., BARNETT, R. S., BERQUIST, L. G., HUYNH, T., HANNA, N., and BLACK, A. (1998). Tumor regression in mice following vaccination with human papillomavirus E7 recombinant protein in PROVAX. *Int J Oncol* **12**(6), 1229-35.
- HARTL, A., KIESSLICH, J., WEISS, R., BERNHAUPT, A., MOSTBOCK, S., SCHEIBLHOFFER, S., EBNER, C., FERREIRA, F., and THALHAMER, J. (1999). Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol* **103**(1 Pt 1), 107-13.
- HASAN, U. A., HARPER, D. R., ARGENT, S., LAYTON, G., WREN, B. W., and MORROW, W. J. (2000). Immunization with a DNA expression vector encoding the varicella zoster virus glycoprotein E (gE) gene via intramuscular and subcutaneous routes. *Vaccine* **18**(15), 1506-14.
- HOFFMAN, S. L., DOOLAN, D. L., SEDEGAH, M., AGUIAR, J. C., WANG, R., MALIK, A., GRAMZINSKI, R. A., WEISS, W. R., HOBART, P., NORMAN, J. A., MARGALITH, M., and HEDSTROM, R. C. (1997). Strategy for development of a pre-erythrocytic Plasmodium falciparum DNA vaccine for human use. *Vaccine* **15**(8), 842-5.
- HOHN, H., PILCH, H., GUNZEL, S., NEUKIRCH, C., HILMES, C., KAUFMANN, A., SELIGER, B., and MAEURER, M. J. (1999). CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol* **163**(10), 5715-22.
- HSU, C. H., CHUA, K. Y., TAO, M. H., HUANG, S. K., and HSIEH, K. H. (1996a). Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int Immunol* **8**(9), 1405-11.
- HSU, C. H., CHUA, K. Y., TAO, M. H., LAI, Y. L., WU, H. D., HUANG, S. K., and HSIEH, K. H. (1996b). Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med* **2**(5), 540-4.
- HUBBERT, N. L., SEDMAN, S. A., and SCHILLER, J. T. (1992). Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol* **66**(10), 6237-41.

- HUIBREGTSE, J. M., SCHEFFNER, M., and HOWLEY, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* **10**(13), 4129-35.
- HUMMEL, M., LIM, H. B., and LAIMINS, L. A. (1995). Human papillomavirus type 31b late gene expression is regulated through protein kinase C-mediated changes in RNA processing. *J Virol* **69**(6), 3381-8.
- HWANG, E. S., NOTTOLI, T., and DIMAIO, D. (1995). The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* **211**(1), 227-33.
- JACQUET, A., MAGI, M., HAUMONT, M., JURADO, M., GARCIA, L., and BOLLEN, A. (2003). Absence of immunoglobulin E synthesis and airway eosinophilia by vaccination with plasmid DNA encoding ProDer p 1. *Clin Exp Allergy* **33**(2), 218-25.
- KADISH, A. S., HO, G. Y., BURK, R. D., WANG, Y., ROMNEY, S. L., LEDWIDGE, R., and ANGELETTI, R. H. (1997). Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **89**(17), 1285-93.
- KADISH, A. S., TIMMINS, P., WANG, Y., HO, G. Y., BURK, R. D., KETZ, J., HE, W., ROMNEY, S. L., JOHNSON, A., ANGELETTI, R., and ABADI, M. (2002). Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(5), 483-8.
- KAHLERT, H., PETERSEN, A., BECKER, W. M., and SCHLAAK, M. (1992). Epitope analysis of the allergen ovalbumin (Gal d II) with monoclonal antibodies and patients' IgE. *Mol Immunol* **29**(10), 1191-201.
- KAWANA, K., KAWANA, Y., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y., YOSHIKE, K., and KANDA, T. (2001a). Nasal immunization of mice with peptide having a cross-neutralization epitope on minor capsid protein L2 of human papillomavirus type 16 elicit systemic and mucosal antibodies. *Vaccine* **19**(11-12), 1496-502.
- KAWANA, K., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y., YOSHIKE, K., and KANDA, T. (1998). In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol* **72**(12), 10298-300.
- KAWANA, K., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y., YOSHIKE, K., and KANDA, T. (1999). Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol* **73**(7), 6188-90.
- KAWANA, Y., KAWANA, K., YOSHIKAWA, H., TAKETANI, Y., YOSHIKE, K., and KANDA, T. (2001b). 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.
- KIM, T. Y., MYOUNG, H. J., KIM, J. H., MOON, I. S., KIM, T. G., AHN, W. S., and SIN, J. I. (2002). Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. *Cancer Res* **62**(24), 7234-40.
- KIMURA, K., CUVIER, O., and HIRANO, T. (2001). Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* **276**(8), 5417-20.
- KIRNBAUER, R. (1996). Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology* **39**(1-2), 54-61.
- KIRNBAUER, R., BOOY, F., CHENG, N., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24), 12180-4.
- KIRNBAUER, R., 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.
- KNOWLES, G., O'NEIL, B. W., and CAMPO, M. S. (1996). Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* **70**(12), 8451-8.

- KRISTIE, T. M., and ROIZMAN, B. (1986). Alpha 4, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes and of selected other viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10), 3218-22.
- KULSKI, J. K., SADLEIR, J. W., KELSALL, S. R., CICCHINI, M. S., SHELLAM, G., PENG, S. W., QI, Y. M., GALLOWAY, D. A., ZHOU, J., and FRAZER, I. H. (1998). Type specific and genotype cross reactive B epitopes of the L1 protein of HPV16 defined by a panel of monoclonal antibodies. *Virology* **243**(2), 275-82.
- KUO, S. R., LIU, J. S., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem* **269**(39), 24058-65.
- KURATSUKURI, K., SONE, T., WANG, C. Y., NISHISAKA, N., JONES, R. F., and HAAS, G. P. (2002). Inhibition of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-positive tumor growth by vaccination with either full-length or the C-terminal end of PSMA. *Int J Cancer* **102**(3), 244-9.
- LAGA, M., ICENOGLE, J. P., MARSELLA, R., MANOKA, A. T., NZILA, N., RYDER, R. W., VERMUND, S. H., HEYWARD, W. L., NELSON, A., and REEVES, W. C. (1992). Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia--opportunistic complications of HIV infection. *Int J Cancer* **50**(1), 45-8.
- LAIMINS, L. A. (1993). The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis* **2**(2), 74-86.
- LEHTINEN, M., RANTALA, I., TOIVONEN, A., LUOTO, H., AINE, R., LAUSLAHTI, K., YLA-OUTINEN, A., ROMPPANEN, U., and PAAVONEN, J. (1993). Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis* **101**(11), 833-7.
- LI, A. F., and ESCHER, A. (2003). Intradermal or oral delivery of GAD-encoding genetic vaccines suppresses type 1 diabetes. *DNA Cell Biol* **22**(4), 227-32.
- LI, M., BEARD, P., ESTES, P. A., LYON, M. K., and GARCEA, R. L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* **72**(3), 2160-7.
- LIU, J. S., KUO, S. R., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1995). The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* **270**(45), 27283-91.
- LIU, X. S., ABDUL-JABBAR, I., QI, Y. M., FRAZER, I. H., and ZHOU, J. (1998). Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. *Virology* **252**(1), 39-45.
- LUNSFORD, L., MCKEEVER, U., ECKSTEIN, V., and HEDLEY, M. L. (2000). Tissue distribution and persistence in mice of plasmid DNA encapsulated in a PLGA-based microsphere delivery vehicle. *J Drug Target* **8**(1), 39-50.
- LUXTON, J. C., ROSE, R. C., COLETART, T., WILSON, P., and SHEPHERD, P. S. (1997). Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol* **78**(Pt 4), 917-23.
- MACGREGOR, R. R., BOYER, J. D., UGEN, K. E., LACY, K. E., GLUCKMAN, S. J., BAGARAZZI, M. L., CHATTERGOON, M. A., BAINE, Y., HIGGINS, T. J., CICCARELLI, R. B., CONEY, L. R., GINSBERG, R. S., and WEINER, D. B. (1998). First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* **178**(1), 92-100.
- MANIATIS, T., JEFFREY, A., and VAN DESANDE, H. (1975). Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **14**(17), 3787-94.
- MANIATIS, T., and PTASHNE, M. (1973a). Multiple repressor binding at the operators in bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(5), 1531-5.
- MANIATIS, T., and PTASHNE, M. (1973b). Structure of the lambda operators. *Nature* **246**(5429), 133-6.

- MCBRIDE, A. A., ROMANCZUK, H., and HOWLEY, P. M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* **266**(28), 18411-4.
- MCCARTHY, M. P., WHITE, W. I., PALMER-HILL, F., KOENIG, S., and SUZICH, J. A. (1998). Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J Virol* **72**(1), 32-41.
- MCCLUSKIE, M. J., BRAZOLOT MILLAN, C. L., GRAMZINSKI, R. A., ROBINSON, H. L., SANTORO, J. C., FULLER, J. T., WIDERA, G., HAYNES, J. R., PURCELL, R. H., and DAVIS, H. L. (1999). Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med* **5**(5), 287-300.
- MENDEZ, S., BELKAID, Y., SEDER, R. A., and SACKS, D. (2002). Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **20**(31-32), 3702-8.
- MORELLI, A. E., SANANES, C., DI PAOLA, G., PAREDES, A., and FAINBOIM, L. (1993). Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans' cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* **99**(2), 200-6.
- MOROZOV, A., SHIYANOV, P., BARR, E., LEIDEN, J. M., and RAYCHAUDHURI, P. (1997). Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *J Virol* **71**(5), 3451-7.
- MORRISSEY, J. H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* **117**(2), 307-10.
- MULLER, M., GISSMANN, L., CRISTIANO, R. J., SUN, X. Y., FRAZER, I. H., JENSON, A. B., ALONSO, A., ZENTGRAF, H., and ZHOU, J. (1995). Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* **69**(2), 948-54.
- 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.
- NAKAGAWA, M., STITES, D. P., FARHAT, S., JUDD, A., MOSCICKI, A. B., CANCHOLA, A. J., HILTON, J. F., and PALEFSKY, J. M. (1996). T-cell proliferative response to human papillomavirus type 16 peptides: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**(2), 205-10.
- O'BRIEN, P. M., and SAVERIA CAMPO, M. (2002). Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* **88**(1-2), 103-17.
- OHLSCHLAGER, P., OSEN, W., DELL, K., FAATH, S., GARCEA, R. L., JOCHMUS, I., MULLER, M., PAWLITA, M., SCHAFER, 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.
- OHSUMI, K., KATAGIRI, C., and YANAGIMACHI, R. (1988). Human sperm nuclei can transform into condensed chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Gamete Res* **20**(1), 1-9.
- ORLANDO, V., STRUTT, H., and PARO, R. (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**(2), 205-14.
- OSEN, W., PEILER, T., OHLSCHLAGER, P., CALDEIRA, S., FAATH, S., MICHEL, N., MULLER, M., TOMMASINO, M., JOCHMUS, I., and GISSMANN, L. (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* **19**(30), 4276-86.
- OSTOR, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* **12**(2), 186-92.
- PARKER, S. E., BORELLINI, F., WENK, M. L., HOBART, P., HOFFMAN, S. L., HEDSTROM, R., LE, T., and NORMAN, J. A. (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Hum Gene Ther* **10**(5), 741-58.

- PENG, S., FRAZER, I. H., FERNANDO, G. J., and ZHOU, J. (1998). Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virology* **240**(1), 147-57.
- 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.
- PHELPS, W. C., BAGCHI, S., BARNES, J. A., RAYCHAUDHURI, P., KRAUS, V., MUNGER, K., HOWLEY, P. M., and NEVINS, J. R. (1991). Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism. *J Virol* **65**(12), 6922-30.
- 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.
- POLLOCK, R., and TREISMAN, R. (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* **18**(21), 6197-204.
- PROCHIANTZ, A. (1996). Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr Opin Neurobiol* **6**(5), 629-34.
- 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.
- RIETHMULLER, D., SCHAAL, J. P., and MOUGIN, C. (2002). [Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus]. *Gynecol Obstet Fertil* **30**(2), 139-46.
- ROBERTS, S., ASHMOLE, I., JOHNSON, G. D., KREIDER, J. W., and GALLIMORE, P. H. (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**(1), 176-87.
- ROCHA-ZAVALA, L., ALEJANDRE, J. E., and GARCIA-CARRANCA, A. (2002). Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Med Virol* **66**(1), 86-95.
- RODEN, R. B., KIRNBAUER, R., JENSON, A. B., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1994). Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* **68**(11), 7260-6.
- RODRIGUEZ, F., and WHITTON, J. L. (2000). Enhancing DNA immunization. *Virology* **268**(2), 233-8.
- ROSE, A. B., and BROACH, J. R. (1990). Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors. *Methods Enzymol* **185**, 234-79.
- ROSE, R. C., WHITE, W. I., LI, M., SUZICH, J. A., LANE, C., and GARCEA, R. L. (1998). Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol* **72**(7), 6151-4.
- ROSSI, J. L., GISSMANN, L., JANSEN, K., and MULLER, M. (2000). Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Gene Ther* **11**(8), 1165-76.
- RUESCH, M. N., and LAIMINS, L. A. (1997). Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol* **71**(7), 5570-8.
- SCHAFFER, 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.
- SCHWARZE, S. R., HRUSKA, K. A., and DOWDY, S. F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* **10**(7), 290-5.

- SEDMAN, S. A., BARBOSA, M. S., VASS, W. C., HUBBERT, N. L., HAAS, J. A., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**(9), 4860-6.
- SHEETS, E. E., URBAN, R. G., CRUM, C. P., HEDLEY, M. L., POLITCH, J. A., GOLD, M. A., MUDERSPACH, L. I., COLE, G. A., and CROWLEY-NOWICK, P. A. (2003). Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. *Am J Obstet Gynecol* **188**(4), 916-26.
- 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.
- STAUFFER, Y., RAJ, K., MASTERNAK, K., and BEARD, P. (1998). Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* **283**(3), 529-36.
- STEHLE, T., GAMBLIN, S. J., YAN, Y., and HARRISON, S. C. (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* **4**(2), 165-82.
- STEINER, M. S., GINGRICH, J. R., and CHAUHAN, R. D. (2002). Prostate cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* **11**(3), 607-20.
- STERN, P. L., FAULKNER, R., VERANES, E. C., and DAVIDSON, E. J. (2001). The role of human papillomavirus vaccines in cervical neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **15**(5), 783-99.
- STRAIGHT, S. W., HINKLE, P. M., JEWERS, R. J., and MCCANCE, D. J. (1993). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* **67**(8), 4521-32.
- STUBENRAUCH, F., and LAIMINS, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **9**(6), 379-86.
- SWINDLE, C. S., ZOU, N., VAN TINE, B. A., SHAW, G. M., ENGLER, J. A., and CHOW, L. T. (1999). Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* **73**(2), 1001-9.
- TERHUNE, S. S., MILCAREK, C., and LAIMINS, L. A. (1999). Regulation of human papillomavirus type 31 polyadenylation during the differentiation-dependent life cycle. *J Virol* **73**(9), 7185-92.
- TINDLE, R. W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* **8**(5), 643-50.
- TINDLE, R. W., and FRAZER, I. H. (1994). Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**, 217-53.
- TOUZE, A., and COURSAGET, P. (1998). In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* **26**(5), 1317-23.
- TSUKUI, T., HILDESHEIM, A., SCHIFFMAN, M. H., LUCCI, J., 3RD, CONTOIS, D., LAWLER, P., RUSH, B. B., LORINCZ, A. T., CORRIGAN, A., BURK, R. D., QU, W., MARSHALL, M. A., MANN, D., CARRINGTON, M., CLERICI, M., SHEARER, G. M., CARBONE, D. P., SCOTT, D. R., HOUGHTEN, R. A., and BERZOFKY, J. A. (1996). Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* **56**(17), 3967-74.
- TSURIMOTO, T., FAIRMAN, M. P., and STILLMAN, B. (1989). Simian virus 40 DNA replication in vitro: identification of multiple stages of initiation. *Mol Cell Biol* **9**(9), 3839-49.
- TUFFERY A. A. (1987). *Laboratory Animals: An introduction for new experimentators*. pp. 225-6. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- UGEN, K. E., NYLAND, S. B., BOYER, J. D., VIDAL, C., LERA, L., RASHEID, S., CHATTERGOON, M., BAGARAZZI, M. L., CICCARELLI, R., HIGGINS, T., BAINE, Y., GINSBERG, R., MACGREGOR, R. R., and WEINER, D. B.

- (1998). DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* **16**(19), 1818-21.
- UNCKELL, F., STREECK, R. E., and SAPP, M. (1997). Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol* **71**(4), 2934-9.
- VAN DER BURG, S. H., KWAPPENBERG, K. M., O'NEILL, T., BRANDT, R. M., MELIEF, C. J., HICKLING, J. K., and OFFRINGA, R. (2001). Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. *Vaccine* **19**(27), 3652-60.
- VIAC, J., GUERIN-REVERCHON, I., CHARDONNET, Y., and BREMOND, A. (1990). Langerhans cells and epithelial cell modifications in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology* **180**(4-5), 328-38.
- VOLPERS, C., UNCKELL, F., SCHIRMACHER, P., STREECK, R. E., and SAPP, M. (1995). Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol* **69**(6), 3258-64.
- WAKABAYASHI, M. T., DA SILVA, D. M., POTKUL, R. K., and KAST, W. M. (2002). Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric virus-like particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. *Intervirology* **45**(4-6), 300-7.
- 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.
- WANG, B., UGEN, K. E., SRIKANTAN, V., AGADJANYAN, M. G., DANG, K., REFAELI, Y., SATO, A. I., BOYER, J., WILLIAMS, W. V., and WEINER, D. B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9), 4156-60.
- WANG, P., PENG, Z., and WANG, H. (1997). [Relationship between human papillomavirus E7 protein and Rb gene product in fresh tissues of squamous cervical carcinoma]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **32**(12), 722-4.
- WANG, R., DOOLAN, D. L., LE, T. P., HEDSTROM, R. C., COONAN, K. M., CHAROENVIT, Y., JONES, T. R., HOBART, P., MARGALITH, M., NG, J., WEISS, W. R., SEDEGAH, M., DE TAISNE, C., NORMAN, J. A., and HOFFMAN, S. L. (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **282**(5388), 476-80.
- WATT, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**(1370), 831-7.
- WERNES, B. A., LEVINE, A. J., and HOWLEY, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**(4951), 76-9.
- WOBBE, C. R., DEAN, F. B., MURAKAMI, Y., WEISSBACH, L., and HURWITZ, J. (1986). Simian virus 40 DNA replication in vitro: study of events preceding elongation of chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13), 4612-6.
- YANG, R., DAY, P. M., YUTZY, W. H. T., LIN, K. Y., HUNG, C. F., and RODEN, R. B. (2003). Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol* **77**(6), 3531-41.
- YEAGER, M. D., ASTE-AMEZAGA, M., BROWN, D. R., MARTIN, M. M., SHAH, M. J., COOK, J. C., CHRISTENSEN, N. D., ACKERSON, C., LOWE, R. S., SMITH, J. F., KELLER, P., and JANSEN, K. U. (2000). Neutralization of human papillomavirus (HPV) pseudovirions: a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies. *Virology* **278**(2), 570-7.
- 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.
- ZUR HAUSEN, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1288**(2), F55-78.

ZWAVELING, S., FERREIRA MOTA, S. C., NOUTA, J., JOHNSON, M., LIPFORD, G. B., OFFRINGA, R., VAN DER BURG, S. H., and MELIEF, C. J. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* **169**(1), 350-8.