

**Charakterisierung des Rezeptors, des Aufnahmeweges und der
Neutralisation humanpathogener Papillomviren**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Tzenan Giroglou
geboren in Xanthi

Mainz, 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2001

I. EINLEITUNG	1
1. Papillomviren	1
1.1 Die genomische Organisation	1
1.2 Die viralen Proteine und ihre Funktion im Replikationszyklus	2
1.3 Pathogenese	5
1.3.1 Infektionszyklus	5
1.3.2 Humanpathogene Papillomviren	7
1.3.3 Strategien zur Vakzinentwicklung	9
2. Problemstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
II. MATERIAL UND METHODEN	14
1. Material	14
1.1 Geräte und Labormaterialien	14
1.2 Enzyme und Puffer	15
1.3 Chemikalien für Inhibitionsstudien	16
1.4 Bakterien-, Virusstämme und Zelllinien	16
1.5 Antikörper	16
1.6 Vektoren und Oligonukleotide	17
2. Methoden	18
2.1 Expression von Proteinen im Baculovirus-Expressionssystem	18
2.1.1 Kultivierung von Insektenzellen (Sf9)	18
2.1.2 Kapsidproteinexpression im Baculovirus-Expressionssystem (Kapsidpräparation)	18
2.2 Expression von Proteinen im Vacciniavirus-Expressionssystem	19
2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen	19
2.2.2 Amplifikation von Vacciniaviren	19
2.2.3 Präparation von Vacciniavirus-DNA	19
2.2.4 Vacciniavirus Rekombination	20
2.2.5 Plaquereinigung rekombinanter Vacciniaviren	21
2.2.6 Transiente Expression im Vaccinia-T7-Expressionssystem	21
2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	22
2.4 Reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion (RT-PCR)	22
2.5 Herstellung einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde	23
2.6 Southern Blot	24
2.7 Herstellung vom Pseudovirionen	25
2.7.1 Transfektion von COS7-Zellen durch Elektroporation	25
2.7.2 Präparation von Pseudovirionen	25
2.8 Reinigung von Pseudovirionen durch Gradientenzentrifugation	26

2.8.1	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	26
2.8.2	Saccharose-Sedimentationszentrifugation	26
2.9	Infektionstest	26
2.9.1	Heparinase I-Behandlung von COS7-Zellen	27
2.9.2	Kultivierung von COS7-Zellen in natriumchlorathaltigem Medium	27
2.10	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Pseudovirionen	27
2.11	Immunologische Techniken	28
2.11.1	Gewinnung polyklonaler Antisera	28
2.11.2	Analytische Durchflußzytometrie (FACS)	28
2.11.3	ELISA	28
2.11.4	Heparin-BSA-ELISA	29
III. ERGEBNISSE		30
1.	Herstellung und Charakterisierung von HPV33-Pseudovirionen mit pEGFP_{GFP}-NLS als Markerplasmid	31
2.	Kreuzneutralisation von HPV-Pseudovirionen durch Antisera gegen klinisch relevante HPV-Typen	34
2.1	Konstruktion und Charakterisierung HPV16-rekombinanter Vacciniaviren	34
2.2	Charakterisierung HPV-typspezifischer Kaninchenantisera	36
2.3	Kreuzneutralisation von Pseudovirionen	38
3.	Molekulare Analyse der Papillomvirus-Wirtszellinteraktion	40
3.1	Die Rolle von α_6 -Integrin in der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	41
3.1.1	Einfluß des α_6 -integrinspezifischen Antikörpers GoH3 auf die Infektion	41
3.1.2	Infektion α_6 -integrinnegativer DG75-Zellen	42
3.1.3	Analyse der PCR-Produkte im Southernblot	44
3.1.3	Einfluß verschiedener VLPs auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	45
3.2	Die Rolle von Heparansulfatproteoglykanen bei der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	46
3.2.1	Bindung von HPV-VLPs an Heparin-BSA	46
3.2.2	Einfluß von Glykosaminoglykanen auf die Interaktion zwischen HPV33-VLPs und Heparin	48
3.2.3	Einfluß von Glykosaminoglykanen auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	49
3.2.4	Einfluß von Heparin auf die Infektion bei einer Applikation vor, während und nach der Pseudovirionenbindung	50
3.2.5	Einfluß von Heparinase I auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	51
3.2.6	Einfluß von NaClO ₃ auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen	53
3.2.7	Die Funktion des C-Terminus von HPV33-L1 bei der Interaktion mit HSPG	54
3.2.8	Die antikörpervermittelte Inhibition der HSPG-Interaktion als möglicher Mechanismus der Virusneutralisation	58
3.2.9	Kinetik der Pseudovirioneninfektion	61
4.	Der infektiöse Aufnahmeweg von Pseudovirionen in COS7-Zellen	63
IV. DISKUSSION		68
1.	Pseudovirionen: Virenanaloge Partikel mit <i>gfp</i> als Reportergen	68

2.	Untersuchungen zur Kreuzneutralisation zwischen den HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45	69
3.	Untersuchungen zum Infektionszyklus von Papillomviren	73
3.1	Die Rolle von α_6 -Integrin	74
3.2	Die Rolle von Heparansulfatproteoglykanen	75
3.2	Untersuchung zur Aufnahmekinetik	79
3.3	Die infektiöse Aufnahme von Pseudovirionen	82
	V. ZUSAMMENFASSUNG	89
	VI. LITERATUR	91
	VII. ABKÜRZUNGEN	104

I. Einleitung

1. Papillomviren

Papillomviren (PV) gehören zusammen mit den Polyomviren zur Familie der Papovaviren. Die etwa 55 nm großen, hüllenlosen Viren besitzen ein Kapsid mit icosaedriger Symmetrie, das aus 72 Kapsomeren besteht und das doppelsträngige, zirkuläre DNA-Genom umschließt. Die virale DNA ist mit Histonen zu einem chromatinähnlichen Komplex assoziiert. Neben dem majoren Strukturprotein (L1) ist ein weiteres, minores Kapsidprotein (L2) am Aufbau des Kapsids beteiligt. Dabei ist das molare Verhältnis zwischen L2 und L1 1:30 (Trus *et al.*, 1997).

Papillomviren sind in der Natur weit verbreitet und werden primär bei höheren Vertebraten beobachtet. Sie sind streng speziesspezifisch, sodaß eine Infektion zwischen zwei Spezies sogar unter experimentellen Bedingungen nicht gelingt. Ferner weisen sie einen Tropismus für die Epithelschicht der Haut oder Schleimhaut auf. Eine Infektion führt meist zu gutartigen, lokal begrenzten Epithelwucherungen (cutane Warzen), die zur spontanen Regression neigen. Jedoch sind bestimmte Papillomviren mit der Entstehung maligner, anogenitaler Neoplasien assoziiert (Broker & Botchan, 1986).

1907 konnte erstmals die virale Ätiologie humaner Warzen durch *Ciuffo* im Selbstversuch demonstriert werden. Ihm gelang die Übertragung von Warzen durch die Anwendung von filtrierten, zellfreien Extrakten aus Warzen (Ciuffo, 1907). Dies führte zur These, daß Viren für die Entstehung von Warzen verantwortlich sind. Einige Jahre später konnte *Shope* einen Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem Kaninchenpapillomvirus (cottontail rabbit papillomavirus: CRPV) und der Entstehung von Hauttumoren bei Kaninchen nachweisen (Shope, 1933).

1.1 Die genomische Organisation

Alle Papillomviren haben eine ähnliche Organisation ihres Genoms (Abbildung 1). Das etwa 8000 bp große Genom ist in drei funktionale Regionen unterteilt. Die nichtkodierende Region (NCR) enthält neben dem Replikationsursprung mehrere Promotoren und Transkriptionenhancer. Sie ist wichtig für die Kontrolle der DNA-Replikation und der

Transkription der offenen Leserahmen, die alle auf dem selben DNA-Strang lokalisiert sind. Entsprechend dem Zeitpunkt der Expression im Replikationszyklus werden die kodierenden Sequenzen in eine frühe (early: E) und eine späte (late:L) Region unterteilt. Die frühen Gene kodieren für virale Proteine (E1-E7), die für die Replikation, Transkription und die zelluläre Transformation notwendig sind. Diese Proteine können in den proliferativen Zonen HPV-induzierter Läsionen nachgewiesen werden. Gefolgt wird dieser frühe Abschnitt durch Gene, die für die Kapsidproteine L1 und L2 kodieren. Die Expression dieser Strukturproteine ist auf das differenzierte Epithel beschränkt, wo auch der Zusammenbau der viralen Partikel stattfindet.

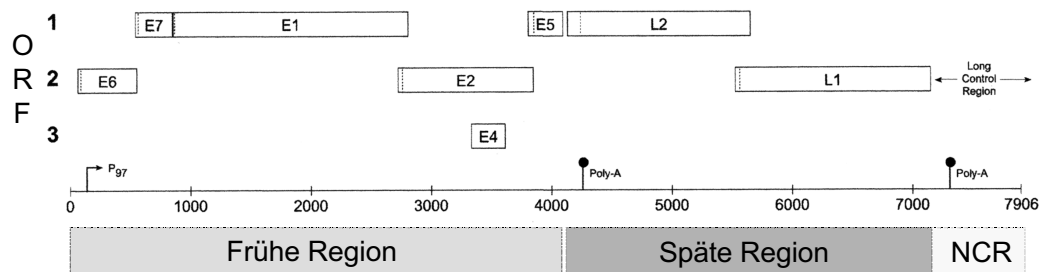


Abbildung 1: Organisation des HPV-Genoms. Exemplarische Darstellung anhand des HPV16-Genoms (nach Shah & Howley, 1996). Offene Rechtecke symbolisieren die Leserahmen der frühen (E1-E7) und der späten Gene (L1-L2). Die nichtkodierende Region (NCR) liegt im zirkulären Genom zwischen dem L1- und dem E6-Gen.

1.2 Die viralen Proteine und ihre Funktion im Replikationszyklus

E1 und E2 sind die ersten viralen Proteine, die nach der Infektion exprimiert werden. Das E1-Protein ist als Initiatorprotein für die Replikation des Virus unentbehrlich (Ustav & Stenlund, 1991). Es kann eigenständig oder im Komplex mit E2 an den A/T-reichen Replikationsursprung in der nichtkodierenden Region des PV-Genoms binden (Ustav *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1991). Ähnlich wie das T-Antigen des simian virus 40 (SV40) weist es sowohl ATPase- als auch Helikaseaktivität (Yang *et al.*, 1993, Seo *et al.*, 1993, Jenkins *et al.*, 1996) auf. Sedman und Stenlund (1998) konnten nachweisen, daß das E1-Protein des BPV-1 in Anwesenheit einzelsträngiger DNA spontan Hexamere bildet. Wie bei dem SV40 T-Antigen scheint auch hier diese Konformation für die Replikationsinitiation wichtig zu sein. Durch die Interaktion mit der zellulären DNA-Polymerase- α -Primase rekrutiert E1 die zelluläre Replikationsmaschinerie an den Initiationskomplex, wodurch die vollständige Replikation erst möglich wird (Park *et al.*, 1994).

E2 begünstigt durch die Bindung an E1 die Ausbildung multimerer Komplexe, die eine stabile Interaktion mit dem Replikationsursprung eingehen (Yang *et al.*, 1991; Lusky *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu E1 wird E2 für die Elongation der Replikation nicht benötigt. Weiterhin wirkt es für die Replikation stimulierend, indem es die nukleosomenbedingte Repression der viralen DNA-Replikation aufhebt und mit dem zellulären Einzelstrang-DNA-Bindeprotein A (RPA) interagiert (Li & Botchan, 1994). E2 ist neben seiner Funktion in der Replikation ein wichtiger Modulator der viralen Transkription. Mehrere Studien haben gezeigt, daß die Expression aller frühen Gene durch E2 reguliert wird (Androphy *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1991; Spalholz *et al.*, 1985). E2 bindet dabei als Dimer mit hoher Affinität an die palindromische Erkennungssequenz ACC(N)₆GGT, die viermal in der NCR von HPV-Genomen vorkommt. Die sequenzspezifische DNA-Bindung und die Dimerisierung wird über den C-Terminus des E2-Proteins vermittelt, während die aminoterminalen Domäne transaktivierende Eigenschaften besitzt (Giri & Yaniv, 1988). Beide Domänen werden durch eine interne „Scharnier“-Region getrennt, die weder in ihrer Länge noch in der Aminosäureabfolge konserviert ist. Aufgrund der teilweisen Überlappung der E2-Bindungsstellen mit Erkennungssequenzen zellulärer Transkriptionsfaktoren kann je nach Position der E2-Bindungsstelle und abhängig von der E2-Konzentration die Transkription stimuliert oder reprimiert werden (Stenlund & Botchan, 1990).

Die genaue Funktion des E4-Protein im viralen Lebenszyklus ist noch ungeklärt. Obwohl das E4-Gen in der frühen Region des Genoms lokalisiert ist, wird es zusammen mit dem L1- und dem L2-Gen erst in der vegetativen Phase der Infektion exprimiert. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß die zelluläre Verteilung des E4 mit Cytokeratin koinzidiert. Man nimmt an, daß es sich an das Keratingerüst der Zelle anlagert und dessen Stabilität reduziert (Doorbar *et al.*, 1991), wodurch möglicherweise die Freisetzung der Virionen in der oberen Hautschicht erleichtert wird.

Da Papillomviren die zelluläre Replikationsmaschinerie für die virale Replikation benutzen, ist die Ausschaltung der Zellzykluskontrolle eine primäre Aufgabe bei einer Infektion. Dies wird in erster Linie durch die Aktivitäten der Onkogene E5, E6 und E7 erreicht, die für die Aufrechterhaltung der S-Phase sorgen.

Die transformierenden Eigenschaften des E5-Proteins sind je nach Papillomvirus unterschiedlich ausgeprägt. Eine onkogene Aktivität konnte bei HPV nicht eindeutig

nachgewiesen werden, während bei BPV-1 E5 neben E6 für die Transformation der infizierten Zelle essentiell ist (Campo, 1995; DiMaio *et al.*, 1986). Das E5-Protein kann die Zellproliferation stimulieren, indem es durch die Inhibition der endosomalen Ansäuerung den Abbau des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) verhindert (Conrad *et al.*, 1993). Dies erhöht die Halbwertszeit der Rezeptoren, wodurch es zur konstitutiven Aktivierung des EGF-Rezeptors kommt. Desweiteren kann das BPV1-E5 mit dem platelet-derived growth factor (PDGF) assoziieren und so seine transformierende Aktivität ausüben. Ein weiterer Mechanismus ist die Unterdrückung der p21 Genexpression, wodurch ebenfalls eine Proliferation der Zellen induziert wird (Bonnez & Reichman, 2000).

Das E6-Protein übt seine transformierende Wirkung über die Inaktivierung von p53 aus, einem Tumorsuppressorprotein, das normalerweise des Teilungsverhalten der Zelle reguliert. Insbesondere verhindert es die Zellteilung beim Auftreten von DNA-Schäden. Durch die E6-vermittelte Rekrutierung von E6AP wird p53 ubiquitiniert und proteolytisch degradiert. Durch den Ausfall des Tumorsuppressors unterbleibt die Aktivierung des CDK-Inhibitors p21, wodurch der Zellzyklus nicht in der G1-Phase arretiert wird. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Anhäufung von Mutationen und damit zur vermehrten Genominstabilität (Scheffner *et al.*, 1990). Diese Ereignisse führen schließlich zur Transformation der Zelle. Die Affinität des E6-Proteins für p53 variiert unter den verschiedenen HPV-Typen. Sie ist in HPV-Typen der Hochrisikogruppe wesentlich höher als in denen, die mit einem geringen Risiko einer malignen Entartung verknüpft sind (Lechner & Laimins, 1994; Werness *et al.*, 1990).

Das E7 Protein hingegen bindet an den Tumorsuppressor pRb (Retinoblastomprotein), wodurch dessen Interaktion mit dem natürlichen Bindungspartner, dem Transkriptionsfaktor E2F, verhindert wird. Dies hat zur Folge, daß E2F-abhängige Gene, u.a. diejenigen, die für die Zellteilung und DNA-Synthese notwendig sind, konstitutiv aktiviert werden. Das bewirkt einen Eintritt in die S-Phase und begünstigt somit eine unkontrollierte Zellvermehrung. Die Induktion der Cyclin A- und Cyclin E-Expression durch HPV16-E7 stellt einen weiteren Mechanismus dar, der zur Stimulation des Zellwachstums führt (Zerfass *et al.*, 1995). Cycline werden in der Regel erst auf ein proliferatives Signal hin vermehrt synthetisiert und führen über die Aktivierung verschiedener Zellzyklusinasen zur Einleitung der S-Phase.

Die Kapsidproteine L1 und L2 werden erst in der vegetativen Phase der Infektion in den oberen Schichten des Epithels synthetisiert. Der Kapsidzusammenbau findet in den Kernen der infizierten Zellen statt. Das unter Papillomviren hochkonservierte L1-Protein besitzt im C-Terminus eine Kernlokalisationssequenz. Darüber hinaus konnte durch Deletionsanalysen gezeigt werden, daß der C-Terminus für die DNA-Bindung und Verpackung essentiell ist (Touze *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997). Für die Verpackung von DNA ist das L1-Protein alleine ausreichend (Kawana *et al.*, 1998; Touze & Coursaget, 1998; Unckell *et al.*, 1997).

Die genaue Funktion des minoren Kapsidproteins wird noch nicht völlig verstanden. Für die Bindung an Zellen wird L2 nicht benötigt. Jedoch scheint es einen wichtigen Faktor für die Infektiosität der Viren darzustellen (Roden *et al.*, 1996b; Unckell *et al.*, 1997). Auch für L2 konnte eine Bindung an DNA gezeigt werden (Stauffer *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1994). Weiterhin wird eine Rolle des L2-Proteins bei der spezifischen Verpackung diskutiert. Möglicherweise trägt es auf eine indirekte Art und Weise zur viralen DNA-Verpackung bei. In einem Modell nach Day und Mitarbeitern (1998) interagiert L2 mit dem DNA-beladenen E2-Protein und ermöglicht so die Verpackung von viraler DNA in die Kapside.

1.3 Pathogenese

1.3.1 Infektionszyklus

Der produktive Lebenszyklus von PV ist eng an die Differenzierungsstadien des Epithels von Haut und Schleimhaut gekoppelt. Das Epithel ist in mehrere Zellschichten unterteilt (Abbildung 2). Die mitotische Aktivität bleibt auf das *Stratum germinativum* beschränkt. Durch differenzielle Teilung entstandene Zellen gehen fortlaufend in die darüber gelegenen Schichten (*S. spinosum*, *S. granulosum* und *S. corneum*) über. Im Zuge dieses Prozesses differenzieren sich die Zellen zu Keratinozyten, die regelmäßig als Hautschüppchen abgestoßen werden.

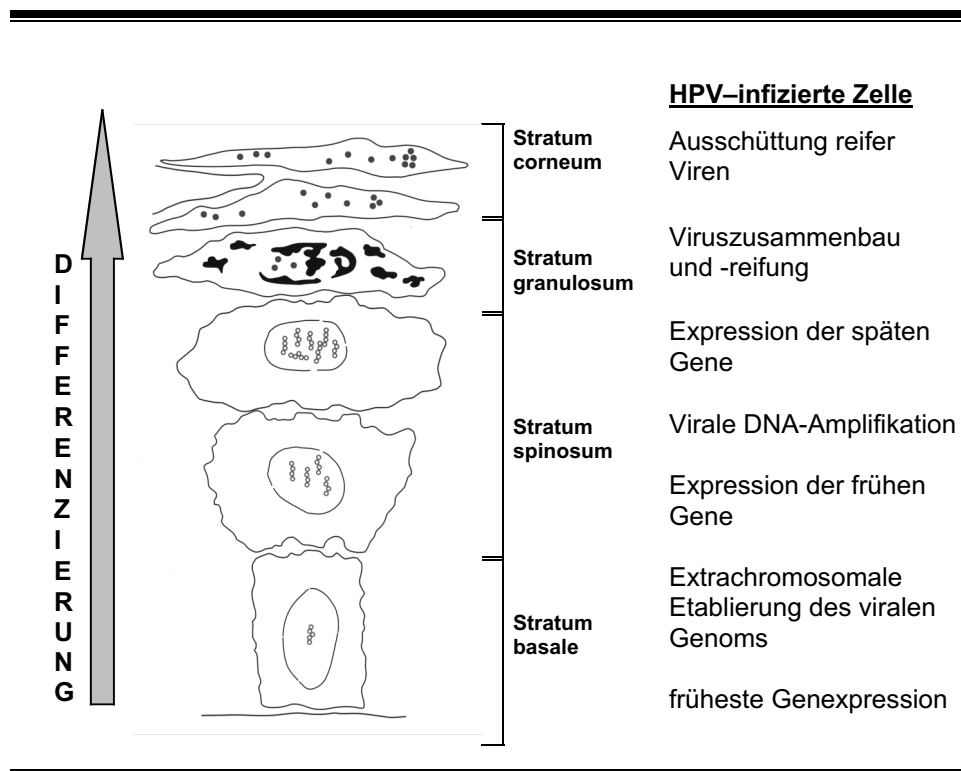


Abbildung 2: Querschnitt durch eine Warze. Dargestellt sind die einzelnen Schichten der Epidermis nach einer Infektion mit Papillomviren und ihre Beziehung zum Replikationszyklus des Virus (Chow & Broker, 1997).

Obwohl die frühen Schritte der Infektion noch ungeklärt sind, nimmt man an, daß die Infektion durch den Eintritt der Viren in die sich teilenden Basalzellen beginnt, da man hier virale DNA nachweisen kann. Kleinste Verletzungen der Haut und Schleimhaut dienen vermutlich als Eintrittspforte für das Virus. Nach erfolgtem Zelleintritt manifestiert sich das virale Genom episomal im Zellkern in einer Kopienzahl von 50-100. Teilt sich die infizierte Zelle, so wird die virale DNA unter den Tochterzellen aufgeteilt. Während die eine in höhere Zellschichten migriert und das Differenzierungsprogramm startet, bleibt die andere Tochterzelle in der Basalschicht, wo sie ein Reservoir an viraler DNA für zukünftige Zellteilungen bildet. Durch die Virusinfektion ist die Differenzierung gegenüber normalen Keratinozyten retardiert, was eine Verdickung der Zellen im *Stratum spinosum* zur Folge hat. Einschlußkörperchen und ein vakuolisierte Kern sind neben der Zellvergrößerung typische Kennzeichen dieser sogenannten Koilozyten. Diese morphologischen Charakteristika werden in der Diagnostik zur Feststellung einer HPV-Infektion genutzt. Mit fortschreitender Differenzierung der Epithelzellen findet in den oberen Schichten der Epidermis die Expression der späten HPV-Gene statt. Durch die Kapsidzusammenlagerung kommt es zur Verpackung des viralen Genoms. In diesem Stadium kann man reife Virionen in den oberen Schichten des Plattenepithels nachweisen. Die Freisetzung kompletter Virionen erfolgt durch

die Abstreifung toter Hautschüppchen. Da die Produktion von HPV-Partikeln auf die suprabasalen Zellschichten beschränkt ist, bleiben die basalen Zellen von der Virusproduktion unberührt und können ihre Proliferation fortführen. So können infizierte Zellen jahrelang in der basalen Schicht persistieren.

Es existieren zwei Modelle, die den Mechanismus der differenzierungsabhängigen Aktivierung der späten Gene zu erklären versuchen. Das eine Modells beruht auf der Hypothese einer Induktion später Promotoren durch differenzierungsspezifische Transkriptionsfaktoren. In einem zweiten Modell geht man von der Vorstellung aus, daß die initiale Etablierung der Replikation zur Titration von Transkriptionsfaktoren in den Basalzellen führt, wodurch wiederum die Expression der späten Proteine reprimiert wird (Stubenrauch & Laimins, 1999).

1.3.2 Humanpathogene Papillomviren

Zur Gruppe der humanen Papillomviren (HPV) zählen heute über 100 verschiedene Typen, wobei 75 bereits näher charakterisiert sind (deVilliers, 1997). Für die meisten HPV-Typen können keine Virionen in ausreichenden Mengen aus natürlichen Läsionen gewonnen werden, sodaß die Unterscheidung einzelner Typen weniger auf serologischem Wege geschieht als durch Vergleich ihrer DNA-Sequenzen. Ein Isolat wird dann als neuer HPV-Typ definiert, wenn sein L1-Leserahmen weniger als 90% Homologie mit einem bereits bekannten HPV-Typ besitzt.

Entsprechend ihres Tropismus für Epithelien der Haut oder Schleimhaut unterscheidet man zwischen cutanen und mukosen HPV-Typen. Sie sind mit der Entwicklung gutartiger, aber auch maligner Läsionen der Haut und der Schleimhaut im anogenitalen Bereich oder im Respirationstrakt assoziiert. HPV1-Infektionen an Fußsohlen führen zu begrenzten, gutartigen Läsionen, den sogenannten Plantarwarzen. Ähnlich sind HPV2, 4 und 7 mit der Warzenentstehung an den Händen verbunden (Gissmann *et al.*, 1977). Die Übertragung findet über direkten Kontakt mit infiziertem Gewebe oder kontaminierten Gegenständen statt. Epidermodysplasia verruciformis (EV), eine genetisch bedingte Krankheit, geht mit der Entwicklung großflächiger Läsionen am ganzen Körper einher, die durch eine Vielzahl von HPV-Typen verursacht werden. Viele der HPV-Typen, wie HPV5 und HPV8 sind spezifisch für EV und werden in gesunden Individuen so gut wie nie gefunden. Bei etwa einem Drittel

aller EV-Patienten entarten die primär gutartigen Läsionen zu invasiven Hautkarzinomen, insbesondere an sonnenexponierten Stellen (Jablonska & Majewski, 1994). Man vermutet, daß die genetische Prädisposition einen immunologischen Defekt bewirkt, der die Entstehung persistierender Hautwarzen induziert und zusammen mit weiteren Faktoren (z.B. UV-Licht) schließlich zur Entwicklung von Hautkrebs führt (Shah & Howley, 1996). HPV5-DNA konnte kürzlich auch in Läsionen von Psoriasis-Patienten nachgewiesen werden (Favre *et al.*, 1998). In 25% der Fälle wurden zusätzlich Antikörper gegen HPV5 detektiert. Psoriasis oder Schuppenflechte zeichnet sich durch beschleunigte Proliferation der Epidermis aus. Als Folge bilden sich auf begrenzten Hautarealen Hautschuppen, verbunden mit Rötungen und Juckreiz. Die auslösenden Ursachen sind bislang nicht bekannt. Inwiefern HPV5 in die Pathogenese von Psoriasis involviert ist, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Eine große Gruppe von HPV-Typen konnten für die Infektion des Genitaltrakts verantwortlich gemacht werden. Dabei werden in gutartigen Warzen des Anogenitalbereichs (Condylomata acuminata) häufig die HPV-Typen 6 und 11 identifiziert. Da solche Warzen selten zur malignen Entartung neigen, zählt man diese HPV-Typen zur Niedrigrisikogruppe („low-risk“ HPV). Eine Infektion mit den sogenannten „high-risk“ HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 und 59 ist ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung zervikaler Neoplasien (Munoz *et al.*, 2000). DNA dieser HPV-Typen läßt sich in über 90% der untersuchten Biopsien von Zervixkarzinomen nachweisen (Schiffman *et al.*, 1993). Das humanpathogene Papillomvirus Typ 33 ist dabei mit 5-10% der genitalen Neoplasien und invasiven Karzinome assoziiert (Beaudenon *et al.*, 1986; zur Hausen, 1989).

In gutartigen Läsionen liegt die virale DNA extrachromosomal in den Kernen infizierter Zellen vor. Dagegen kann man in hochgradigen Dysplasien regelmäßig eine Integration der HPV-DNA ins Genom beobachten. Durch die Integration werden die Leserahmen der frühen Gene E1 und E2 zerstört. Vor allem die Inaktivierung des Transkriptionsregulators E2 trägt so indirekt zur Transformation der Zellen bei, da dadurch die Expression der Onkogene E6 und E7 nicht mehr reguliert werden kann.

Eine Infektion des Zervixepithels mit humanpathogenen Papillomviren führt zur Entstehung von Dysplasien. Dysplasien entsprechen zellulären Atypien des Epithels und Störungen des geweblichen Aufbaus. Da Dysplasien Vorläuferläsionen des invasiven Karzinoms darstellen, werden sie auch als Präkanzerosen bezeichnet. Je nach Schweregrad der zellulären Atypien

und Ausdehnung der Veränderung werden drei Grade unterschieden: CIN I (milde Dysplasie), CIN II (moderate Dysplasie) und CIN III (schwere Dysplasie). Leichte neoplastische Veränderungen der infizierten Zervixzellen (CIN I) prägen das Anfangsstadium der Krebserkrankung. In 55% der Fälle kommt es zur Rückbildung, davon mehr als die Hälfte innerhalb von 12 Monaten (Nasiell *et al.*, 1986). Diese Veränderungen können jedoch auch persistieren oder stufenweise (CIN II, CIN III) in eine schwere Dysplasie bzw. in ein Carcinoma in situ (CIS) übergehen (Shah & Howley, 1996).

Die Mehrzahl der HPV-Infektionen verläuft latent oder subklinisch (Schneider & Koutsky, 1992). Eine HPV-Infektion führt nicht *per se* zur Entwicklung invasiver Karzinome. Zusätzliche Kofaktoren, wie u.a. genetische Veränderungen oder erworbene Immunschwäche, sind für die Tumorentstehung notwendig. Als weitere Tumorpromotoren werden das Rauchen (Schiffman *et al.*, 1987), die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Franco, 1991) und Genitalinfektionen mit unterschiedlichsten Erregern diskutiert (Bonnez & Reichman, 2000). Insbesondere die wichtige Rolle des Immunsystems wird durch mehrere klinische Beobachtungen gestützt. HPV-bedingte Erkrankungen, wie anogenitale Warzen und Zervixkarzinome, treten bei immundefizienten oder immunsupprimierten Patienten vermehrt auf und gehören zu Sekundärkomplikationen einer HIV-Infektion oder einer Organtransplantation.

1.3.3 Strategien zur Vakzinentwicklung

Weltweit erkranken jährlich eine halbe Million Frauen an Gebärmutterhalskrebs (Shah & Howley, 1996). Die Entwicklung eines effizienten Impfstoffes gegen HPV-Typen der Hochrisikogruppe hätte einen positiven Einfluß auf die weltweite Krebsrate.

Historisch gesehen haben sich attenuierte Viren als effiziente Impfstoffe bewährt, da sie durch die Nachahmung einer natürlichen Infektion eine adäquate Immunantwort auslösen. Aufgrund des mit der Verwendung von inaktivierten Viren assoziierten Sicherheitsrisikos, vor allem da HPV ein hohes onkogenes Potential besitzen, und dem Sachverhalt, daß die Züchtung von Papillomviren nur sehr eingeschränkt möglich ist, kommen nur Immunisierungen mit viralen Untereinheiten in Frage. Die Möglichkeit zur Herstellung virusähnlicher Partikel (*virus-like-particle*: VLP) beschleunigte in hohem Maße die Entwicklung von HPV-Impfstoffen. Bei VLPs handelt es sich um leere Kapside, die sich nach der heterologen Expression von L1 spontan bilden (Kirnbauer *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994). Solche Partikel sind aufgrund

der Kapsidproteine immunogen, aber nicht onkogen und werden als attraktive Impfstoffkandidaten gehandelt. Gegenwärtig werden verschiedene Strategien zur Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer Vakzine verfolgt.

Prophylaktische Vakzine fokussieren auf die Produktion von neutralisierenden Antikörpern gegen die Strukturproteine L1 und L2, wodurch die Infektion der Wirtszelle verhindert werden soll. Als Impfstoff dienen VLPs, bestehend aus L1 alleine oder L1 und L2. Die Immunisierung mit gereinigten L1-VLPs induziert einen hohen Titer an neutralisierenden Antikörpern (Christensen *et al.*, 1994a), die in Tiermodellen vor einer experimentell herbeigeführten Infektion mit dem homologen Virus schützen (Suzich *et al.*, 1995; Breitbart *et al.*, 1995; Kirnbauer *et al.*, 1996). Kaninchen waren sogar ein Jahr nach der Immunisierung noch immun gegen eine experimentelle Infektion mit CRPV (Christensen *et al.*, 1996).

Eine humorale Immunantwort vermindert zwar die Wahrscheinlichkeit einer Neuinfektion, bereits bestehende Infektionen werden durch Antikörper gegen Kapsidproteine jedoch kaum beeinflusst. Therapeutische Impfstoffe sollen durch die Induktion der zellulären Immunantwort die Regression HPV-assoziiierter Läsionen bewirken. Die viralen Onkogene E6 und E7 dienen als Ausgangspunkte für die therapeutische Vakzinentwicklung, da sie in allen Stadien von Zervixneoplasien exprimiert werden und in infizierten Patienten eine zytotoxische T-Zell-Antwort hervorrufen (Stern *et al.*, 2000). Derzeitige Vakzinkandidaten sind: (i) rekombinant hergestelltes E6- und E7-Protein, (ii) synthetische Peptide, die an humanes HLA-A2 binden, wodurch dem Immunsystem besonders immunogene Epitope präsentiert werden, (iii) lebende Vektoren, wie rekombinantes Vacciniavirus und *Salmonella typhimurium*, die zur Expression des E6- und/oder E7-Proteins benutzt werden (Breitbart & Coursaget, 1999).

Chimäre VLPs, die zweite Generation von HPV-Vakzinen, sollen eine komplette Immunität gewähren, indem sie sowohl das Virus neutralisieren, als auch HPV-infizierte Zellen eliminieren. Bestandteile chimärer VLPs sind Fusionsproteine aus den Kapsidproteinen L1 oder L2 und den frühen Genprodukten E2, E6 und E7, wobei der Strukturproteinanteil die humorale Immunantwort stimulieren soll, während der „onkogene“ bzw. der E2-Part für das Auslösen der zellulären Immunantwort verantwortlich ist. In Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Immunisierung mit chimären HPV16L1/L2-E7-VLPs sowohl neutralisierende Antikörper induziert, als auch erfolgreich vor Tumorzellen schützt (Greenstone *et al.*, 1998).

Kapsomere stellen eine attraktive Alternative zur Verwendung von VLPs dar. Neuere Untersuchungen zeigen, daß durch die Immunisierung mit Kapsomeren hohe Titer an typspezifisch neutralisierenden Antikörpern induziert werden (Fligge *et al.*, 2001 im Druck; Rose *et al.*, 1998). Da Kapsomere in *E. coli* einfach herzustellen sind, könnten sie sich zukünftig als stabiler, kostengünstiger Impfstoff behaupten.

2. Problemstellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Aufgrund der bereits geschilderten Korrelation zwischen der Differenzierung des Wirtsgewebes und dem Reproduktionszyklus von Papillomviren ist die Züchtung von authentischen Papillomviren *in vitro* nur stark eingeschränkt möglich. Es gelingt bislang nur in komplexen Systemen, wie dem Maus-Xenograft-System (Kreider *et al.*, 1985) oder der organotypischen „Raft“-Kultur (Meyers *et al.*, 1992), die Differenzierungsstadien der Epithelzellen künstlich nachzuahmen und so die Reproduktion von Papillomviren in geringen Mengen zu erlauben. Bei der Maus-Xenograft-Methode wird athymischen Nacktmäusen HPV-infiziertes humanes Vorhautgewebe unter die Nierenkapsel implantiert. Innerhalb von 3-6 Monaten differenziert das Implantat aus und man kann daraus geringe Mengen an Papillomviren isolieren. Beim „Raft“-System gelingt die Produktion von Papillomviren durch die Kultivierung von infizierten Zervixzellen auf einer Schicht aus Fibroblasten und Typ I-Kollagen. Durch die Zugabe von Phorbolster wird die Differenzierung dieser Zellschicht und somit die Herstellung von Viren in einigen Wochen erreicht. Die beschriebenen Techniken sind sehr zeitintensiv und liefern Viruspartikel in geringen Mengen.

Die Schwierigkeiten der differenzierungsabhängigen Replikation von Papillomviren können durch die Herstellung von Pseudovirionen umgangen werden. Pseudovirionen werden durch die Verpackung eines Markerplasmids in virusähnliche Partikel erzeugt. Dies kann „*in vivo*“ durch die Expression der Kapsidproteine in Zellen erfolgen, die mit dem Markerplasmid transfiziert sind (Stauffer *et al.*, 1998; Unckell *et al.*, 1997), oder *in vitro* durch die Reassoziaton von Kapsomeren in Gegenwart des Markerplasmids (Kawana *et al.*, 1998; Touze & Coursaget, 1998). Mit diesen Pseudovirionen läßt sich aufgrund der differenzierungsunabhängigen Expression des Markergens eine Infektion in üblichen Zellkulturzellen nachweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die in unserem Labor eingeführte Herstellung von HPV33-Pseudovirionen vereinfacht und für die Herstellung von Pseudovirionen verschiedener HPV-Typen standardisiert werden. Im nächsten Schritt sollten unter Verwendung der neuen HPV-Pseudovirionen verschiedene Aspekte der frühen Phase der Papillomvirusinfektion untersucht werden. Insbesondere waren die Identifizierung und Charakterisierung des primären Rezeptors und des Aufnahmemechanismus, der zur Etablierung einer Infektion führt, von besonderem Interesse.

Studien zum viralen Rezeptor von Papillomviren beschränken sich bislang auf die Verwendung von VLPs (leere Kapside), die aber lediglich Aussagen über potentielle Rezeptoren ermöglichen. So wurde $\alpha_6\beta_4$ -Integrin als Rezeptorkandidat vorgeschlagen, nachdem eine Koimmunpräzipitation mit HPV6b-VLPs gelang (Evander *et al.*, 1997). Weiterhin konnte eine Bindung von HPV11-VLPs an Heparin/Heparansulfatproteoglykane (HSPG) demonstriert werden (Joyce *et al.*, 1999). Da aber eine Assoziation mit Oberflächenmolekülen der Zelle nicht zwangsläufig zu einer produktiven Infektion führt, sollte hier die funktionale Relevanz von α_6 -Integrin bzw. Heparin im Infektionstest mit HPV33-Pseudovirionen untersucht werden. In einem weiterführenden Schritt sollte das hier verwendete Infektionssystem für die Untersuchung der infektiösen Virusaufnahme mit Zellgiften adaptiert werden, und es sollten erste Hinweise gewonnen werden, welche Kompartimente und zellulären Prozesse für die Infektion mit Papillomviren wichtig sind.

Ein weiterer Schwerpunkt war die systematische Analyse der serologischen Verwandtschaft genitaler „high-risk“ HPV-Typen. Damit sollten Rückschlüsse über die idealen Eigenschaften möglicher prophylaktischer Vakzine gewonnen werden.

Eine Infektion mit den HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 ist kausal mit der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs assoziiert (Lorincz *et al.*, 1992). Da Erhebungen besagen, daß mindestens 50% der Erwachsenen bereits eine genitale HPV-Infektion hatten (Breitburd & Coursaget, 1999) und Gebärmutterhalskrebs weltweit die zweithäufigste Todesursache bei Frauen repräsentiert, ist die Entwicklung eines wirksamen HPV-Impfstoffes ein wichtiges Ziel bei der Prävention und Behandlung HPV-bedingter Erkrankungen. Aktuelle Bemühungen zur Entwicklung prophylaktischer Vakzine konzentrieren sich auf virusähnliche Partikel (VLPs) des majoren Kapsidproteins L1. Erste klinische Studien an Menschen zeigen, daß systemisch verabreichte L1-VLPs immunogen sind, gut toleriert werden und zur Erzielung einer Immunantwort keine zusätzlichen Adjuvantien notwendig sind (Harro *et al.*, 2000; Poland *et al.*, 2000; Fife *et al.*, 2000).

Demnach sind L1-VLPs vielversprechende Impfstoffkandidaten. Da jedoch eine Vielzahl von genitalen HPV-Typen mit einer malignen Entartung assoziiert ist, zudem häufig beim Gebärmutterhalskrebs simultane Infektionen mit verschiedenen HPV-Typen diagnostiziert werden (Rousseau *et al.*, 2000; Slavinsky *et al.*, 2000), sollte ein Impfstoff Schutz vor mehreren HPV-Typen bieten. Um die notwendigen Komponenten für eine multivalente Vakzine bestimmen zu können, ist es notwendig zu wissen, inwieweit die Impfung mit einem HPV-Typ vor einer Infektion mit einem heterologen Typ schützt.

Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die umfassende Untersuchung der Kreuzneutralisation zwischen genitalen HPV-Typen der Hochrisikogruppe. Da die Prävalenz von HPV16, 18 und 33 in malignen Läsionen besonders hoch ist, sollte die Neutralisation der entsprechenden Pseudovirionen durch Antiseren gegen VLPs heterologer HPV-Typen untersucht werden. Dazu sollten über die Herstellung weiterer HPV-rekombinanter Vacciniaviren neben HPV33-Pseudovirionen auch HPV16- und HPV18-Pseudovirionen generiert werden. Anschließend sollte im Infektionstest deren Neutralisation durch Kaninchenantiseren gegen VLPs der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 untersucht werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte und Labormaterialien

Analysenwaage	Mettler AE 100 (Mettler)
Autoklav	Modell 23 (Melag)
FACS-Gerät	FACSort (Becton Dickinson)
Geigerzähler	Modell LB 1210 B (Berthold)
Geltrockner	Modell SGD 4050 (Bachhofer)
Elektronenmikroskop	EM 900 (Zeiss)
ELISA-Lesegerät	Multiscan RC Modell 351 (Labsystems)
Heizblöcke	Dri-Block DB 1 (Techne), Multi-Block-Heater (Bachhofer)
Inkubatoren	Modell B 5050 E (Heraeus Christ), Modell B 5060 EK (Heraeus Christ)
Laborwaagen	Mettler PM 2000 (Mettler)
Magnetrührer	Ikamag REC-G (Janke und Kunkel), MC5-104S (Techne), KMO 2 electronic (Janke und Kunkel)
Mikroskop	Modell ID 02 (Zeiss)
Mikrowellenofen	MICRO-Chef FM 3510 (Moulinex)
Netzgeräte	Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia-LKB Biotechnology), Phero Stab 500 (Biotec-Fischer), Power Pack P25 (Biometra)
PCR-Gerät	Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research)
pH-Meter	WTW pH 522 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätte)
Photometer	Spectrophotometer 552 UV-Vis (Perkin Elmer)
Pipetten	(Gilson, Eppendorf)
Reinstwasseranlage	Milli-Q (Millipore)
Schüttelgerät	Vortex Genie 2 (Bender-Hobein)

Schüttelinkubator	Inkubator Shaker G25 (New Brunswick Scientific), Certomat HK Braun (Braun Melsungen)
Sofortbild-Kamera	CRT Instant Camera (Polaroid)
Sterile Werkbank	Vertikal Laminar Flow (Woetho GmbH)
Überkopfschüttler	REAX2 (Heidolph)
Ultraschallgerät	Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson)
Ultrazentrifuge	Modell L8 70 M UZ (Beckman)
UV-Transilluminator	IL-200 M, 302 nm (Bachofer)
Vakuumtrockner	Speed Vac Concentrator (Bachofer)
Wasserbäder	Modell W14 (Grant Instruments), Frigomix 1495 (Braun)
Wipp-Schüttelgerät	Rockomat (Tecnomara)
Zentrifugen	Modell 5415 (Eppendorf), Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments) Minifuge RF (Heraeus Christ), Megafuge 1.0 (Heraeus Christ)
Rotoren	GSA-, SS 34- und HB4-Rotor (für Sorvall RC-5B)

Glaswaren wurden von der Firma Schott (Mainz) bezogen. Es wurden Plastikwaren von Sarstedt (Heidelberg) und sterile Zellkultur-Materialien entweder von Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg) oder Greiner (Frickenhausen) verwendet. Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia-LKB Biotechnology (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen). Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden bei Life Technologies bezogen.

1.2 Enzyme und Puffer

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Boehringer und Pharmacia bezogen. Die Reaktionspuffer wurden zehnfach konzentriert mitgeliefert. Heparinase I wurde bei Sigma erworben.

1.3 Chemikalien für Inhibitionsstudien

Sämtliche Reagenzien wurden von Sigma bezogen. Stammlösungen von Nystatin, 12-Phorbol-13-myristataacetat (PMA) und Cytochalasin b wurden in den Konzentrationen 5mg/ml, 10 mM und 5mM frisch in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Stammlösungen von Chloroquin (10 mM) und Ammoniumchlorid (400 mM) wurden in Wasser hergestellt und auf pH 7 eingestellt. Stammlösungen von Natriumazid (10%) und 2-Desoxy-D-Glucose (1M) wurden ebenfalls in Wasser hergestellt. Die Inhibitoren wurden in DMEM auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt und auf die Zellen gegeben.

Heparin, Chondroitin- und Dermatansulfat wurden in PBS-Puffer (0,01% (w/v) BSA, pH 6,8) gelöst. Die NaClO₃-Stammlösung (1M) wurde in Wasser hergestellt und vor der Zugabe ins Kulturmedium sterilfiltriert.

1.4 Bakterien-, Virusstämme und Zelllinien

<i>E. coli</i> DH5 α (Hanahan, 1983)	ATCC: 53868
Vaccinia (WR-Stamm)	ATCC: VR-1354
COS7	ATCC: CRL-1651
HeLa	ATCC: CCL-2
HuTK ⁻ (Rhim <i>et al.</i> , 1975)	ATCC: CRL-8303
DG75 (Ben-Bassat <i>et al.</i> , 1977)	DSMZ: ACC 83
Sf9	ATCC: CRL-1711

1.5 Antikörper

Der α_6 -integrinspezifische Antikörper (GoH3) wurde von Serotec, der β_4 -Integrinspezifische Antikörper (3E1) von Gibco-BRL bezogen. Sekundäre, FITC-gekoppelte Antikörper wurden bei Sigma (Kaninchen anti-Ratte-Ig-Ak) und bei Dianova (Ziege anti-Maus-Ig-Ak) erstanden. Polyklonale Kaninchenantiseren gegen HPV33-VLPs (K53) und gegen HPV16-VLPs (K75, K76) wurden in unserem Labor hergestellt. Antiseren gegen HPV18, 31, 35, 39 und 45 wurden von R.C. Rose bereitgestellt.

Als monoklonaler L1- bzw. L2-spezifischer Antikörper wurde der Kulturüberstand von klonierten Hybridomen verwendet. Die Antikörper J3, B6, E12 und L11 wurden von N. Christensen zur Verfügung gestellt. Alle anderen Antikörper waren in unserem Labor vorhanden.

1.6 Vektoren und Oligonukleotide

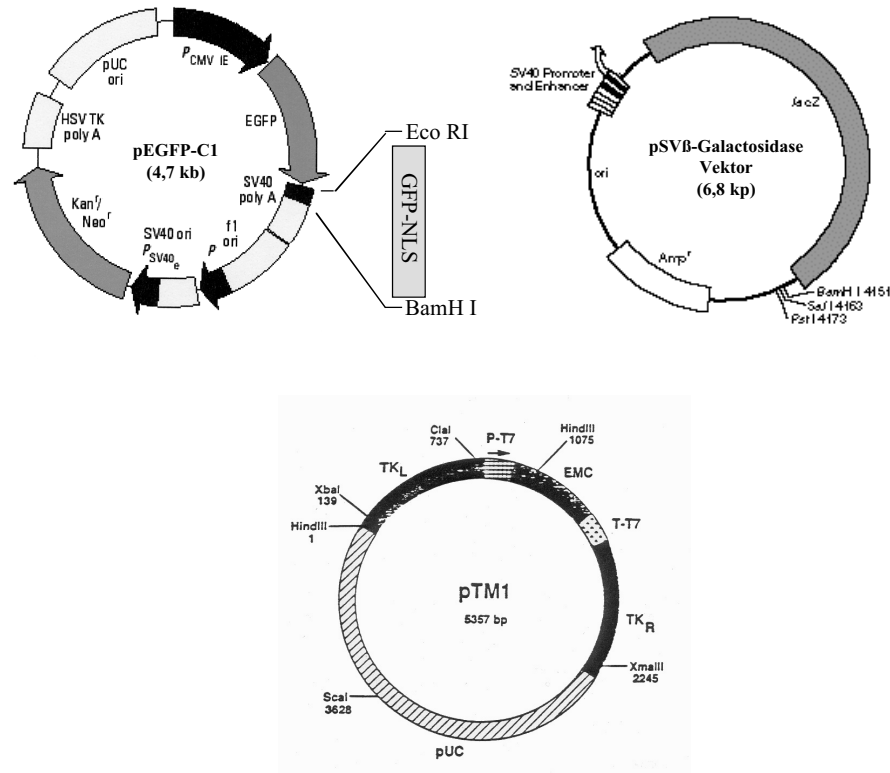


Abbildung 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Als Markerplasmid zur Herstellung von Pseudovirionen dienen die Plasmide pSVβ-Gal (Promega, Mannheim) und das von pEGFP-C1 (Clontech, Heidelberg) abgeleitete pEGFP-GFP-NLS (L. Florin). Der Vacciniavektor pTM1 (Moss *et al.*, 1990) wurde für die Konstruktion von HPV16L1- und L2-rekombinanten Vacciniaviren herangezogen. Dabei wurden die offenen Leserahmen von HPV16L1 und L2 unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Life Technologies) mittels PCR amplifiziert. Als Ausgangsmatrize diente HPV16L1- und L2-DNA, die von H.G. Köchel zur Verfügung gestellt wurde. Die verwendeten Primer besaßen eingebrachte Schnittstellen (Tabelle 1), sodaß eine gerichtete Klonierung in den pTM1-Vektor möglich war. Dabei wurde das HPV16L1-Fragment mit dem NcoI- und XhoI-geschnittenen pTM1-Vektor ligiert. HPV16L2 wurde mit dem gleichgeschnittenen Vektor pTM1 ligiert.

Tabelle 1: Bezeichnung und Sequenz der zur Klonierung von pTM-Konstrukten verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Verwendung
16L1-5'	5'-GCATTCATGACTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCC-3' BspHI	Klonierung von pTM16L1
16L1-3'	5'-GCATCTCGAGTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTT-3' XhoI	
16L2-5'	5'-GCATGAATTCATGCGACACAAACGTTCTGCAAAA-3' EcoRI	Klonierung von pTM16L2
16L2-3'	5'-GCATGGATCCCTAGGCAGCCAAAGAGACATCTGA-3' BamHI	

2. Methoden

Die grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Maniatis *et al.*, 1989 und nach Ausubel *et al.*, 1994 durchgeführt.

2.1 Expression von Proteinen im Baculovirus-Expressionssystem

2.1.1 Kultivierung von Insektenzellen (Sf9)

Sf9-Zellen wurden in Suspensionskulturen (60 rpm, 1 Liter Rührkulturflaschen) bei 27°C in TNMFH-Medium/10% FCS kultiviert. Bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml wurde die Kultur 1:4 mit frischem Insektenmedium verdünnt.

2.1.2 Kapsidproteinexpression im Baculovirus-Expressionssystem (Kapsidpräparation)

Die Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren und die Präparation von VLPs aus Kernextrakten mit Baculoviren infizierter Insektenzellen erfolgte nach Volpers *et al.*, 1994.

2.2 Expression von Proteinen im Vacciniavirus-Expressionssystem

2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von COS7-, HeLa-, HuTK⁻- und DG75-Zellen erfolgte in DMEM/10% FCS bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre. Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 mM EDTA (in PBS) behandelt. Nach Abrundung der Zellen wurde diese Lösung wieder entfernt, die Zellen in DMEM/10% FCS suspendiert und im Verhältnis 1:10 in eine neue Zellkulturschale umgesetzt. Die nicht adhärent wachsenden DG75-Zellen wurden abzentrifugiert, in DMEM/10% FCS aufgenommen und 1:10 in eine neue Schale überführt.

2.2.2 Amplifikation von Vacciniaviren

Zur Vermehrung von Vacciniaviren wurden HutK⁻-Zellen (20 große Zellkulturschalen, 15 cm Durchmesser), die einen zu 80% konfluenten Zellrasen bildeten, mit einer MOI von 0,1 für eine Stunde in DMEM (ohne FCS, mit 10 mM HEPES, pH 7,2) bei Raumtemperatur infiziert. Nach 48h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ -Atmosphäre) wurden die Zellen in je 1,5 ml (pro Platte) HEPES-Puffer (10mM, pH 7,2) aufgenommen und in sterile Röhrchen überführt. Durch dreimaliges Frieren im Gefrierschrank (-70°C) und Tauen im 37°C-Wasserbad konnte eine hochkonzentrierte Virussuspension gewonnen werden, die aliquotiert bei -70°C gelagert wurde.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden subkonfluente HutK⁻-Zellen (8×10^5) in einer „6-Well-Schale“ mit Verdünnungen der Virussuspension von 10^{-3} bis 10^{-8} infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Plaques ausgezählt.

2.2.3 Präparation von Vacciniavirus-DNA

18 große Schalen konfluenter HuTK⁻-Zellen wurden mit Wildtyp-Vacciniavirus infiziert (MOI von 0,1). Nach 48 h wurden die Zellen in insgesamt 10 ml PBS abgeschabt, zu je 1ml in Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -70°C gelagert. Zur Präparation der DNA wurden 30µl 10% Triton X-100, 1,5 µl β-Mercaptoethanol und 48 µl 250 mM EDTA (pH 8) je Reaktionsgefäß hinzugegeben und dieses während einer zehnminütigen Inkubation auf Eis 3 bis 6 Mal invertiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2,5 min mit 3000 rpm (Tischzentrifuge Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Pelletieren des Virus erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Das

Viruspellet wurde in 100 µl TE suspendiert. Zu je 200 µl dieser Suspension wurden nun 13,5 µl 3 M NaCl, 20 µl 10% SDS, 0,6 µl β-Mercaptoethanol und 3 µl Proteinase K (10mg/ml) hinzugegeben und es folgte eine einstündige Inkubation bei 56°C. Nach zwei aufeinanderfolgenden Phenol/Chloroform-Extraktionen wurde die DNA durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 6) und 400 µl Ethanol gefällt, mit einer ausgezogenen, abgeschmolzenen Pasteurpipette aufgewickelt und in 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde schließlich in 100-500 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4 Vacciniavirus Rekombination

HEBS-Puffer (2x) 1,6% (w/v) NaCl, 1% (w/v) HEPES, 0,2% (w/v) Glucose,
0,025% (w/v) Na₂HPO₄*2H₂O, 0,074% (w/v) KCl, pH 7,1

Subkonfluente HuTK⁻-Zellen (etwa 8x10⁵ Zellen) wurden in einer „6-well“-Schale zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer MOI von 0,1 mit dem temperatursensitiven Vacciniavirus ts7vv für eine Stunde bei RT infiziert. Anschließend wurde der Überstand gegen frisches DMEM ausgetauscht und die Zellen für 2 h bei 33°C inkubiert. Eine halbe Stunde vor Inkubationsende wurden 1 µg der zu rekombinierenden DNA (pTM-Konstrukt) und 1 µg Wildtyp-Vaccinia-DNA mit 125 µl HEBS-Puffer (2x) vorsichtig auf dem Vortexer gemischt, während gleichzeitig 125 µl 250 mM CaCl₂ zugetropft wurden. Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nun zweimal mit DMEM (ohne FCS, ohne HEPES) gewaschen und das Kalziumphosphatpräzipitat auf die Zellen aufgetropft. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT. Hiernach wurde der Überstand abgenommen, frisches DMEM (ohne FCS, ohne HEPES) zugegeben und die Zellen für 2 h bei 39°C kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden nun zur Inaktivierung des temperatursensitiven Vacciniavirus für zwei Tage bei 39°C kultiviert. Den infizierten Zellen wurde danach das Medium abgenommen, 900 µl 10 mM HEPES pH 7,2 zugegeben und in diesem Volumen wurden sie dann vom „well“ abgeschabt. Nach zwei „Gefrier-Tau-Zyklen“ wurde der Lösung 100 µl 10 x PBS zugefügt. Mit dieser Viruslösung wurden erneut HuTK⁻-Zellen in „6-well“-Schalen infiziert und im Anschluß mit DMEM, das zur Inaktivierung des Wildtyp-Vacciniavirus 0,2 mg/ml BrdU enthielt, versetzt. Nach ein bis zwei Tagen konnten Plaques beobachtet werden, die durch rekombinante

Vacciniaviren verursacht wurden. Zur Amplifikation wurden wiederholt Infektionen in Gegenwart von BrdU durchgeführt.

2.2.5 Plaquereinigung rekombinanter Vacciniaviren

Bevor die rekombinierten Vacciniaviren für die Herstellung von Pseudovirionen herangezogen wurden, fand eine Isolation einzelner Virusklone durch Plaquereinigung statt. Dazu wurden subkonfluente HuTK⁻-Zellen (etwa 8×10^5 Zellen) in einer „6-well“-Schale mit 5-10 pfu des rekombinanten Vacciniviruslysates für 1h bei RT infiziert. Währenddessen wurden 2,5% Agarose (in Wasser) und kurz vor Ablauf der Inkubation auch DMEM mit 0,2 mg/ml BrdU im 47°C-Wasserbad warmgehalten. Anschließend wurde die Agarose mit dem vorgewärmten DMEM gemischt (1:1), der infektiöse Überstand von den Zellen abgenommen, das Agarose-DMEM-Gemisch mit der gleichen Menge an raumtemperiertem DMEM (mit 0,2 mg/ml BrdU) gemischt und je 3 ml dieser Lösung auf die Zellen eines „wells“ gegeben. Nach zwei bis drei Tagen wurden Plaques sichtbar. Diese wurden mit einer blauen Pipettenspitze gepickt und in 1ml DMEM (ohne FCS) überführt und, nachdem die Agarose intensiv suspendiert wurde, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Suspension wurde zur erneuten Infektion und Vermehrung des Virusklons eingesetzt. Es folgte noch eine zweite Plaquereinigung, bevor die Viren zur Expression der Kapsidproteine verwendet wurden.

2.2.6 Transiente Expression im Vaccinia-T7-Expressionssystem

Das vTF7-3 Virus führt in infizierten Zellen zur Synthese der T7 RNA-Polymerase, die sich im Zytoplasma anreichert. Werden so infizierte Zellen später mit einem Plasmid transfiziert, das ein Fremdgen unter der Kontrolle des T7 Promotors enthält, so entsteht mRNA dieses Gens. Die Translationseffizienz wird durch ein Fragment des Encephalomyocarditisvirus (EMC) erhöht, welches ebenfalls transkribiert wird und die Cap-unabhängige Translation steigert. Ein etwa zu 80% konfluenter COS7-Zellrasen wurde mit vTF7-3 mit einer MOI von 5 in einem Volumen von 1 ml DMEM (ohne FCS, mit 10 mM HEPES, pH 7,2) infiziert. Eine Stunde nach der Infektion erfolgte die Transfektion der Zellen mit der jeweiligen Plasmid-DNA (pTM16L1, pTM16L2 etc.). Dazu wurden zunächst in getrennten Röhrchen 10 µl Lipofektamin (Life Technologies, Gibco BRL) in 100 µl OPTIMEM und 4 µg Plasmid-DNA in 100 µl OPTIMEM verdünnt. Beide Ansätze wurden anschließend vermischt und 30 min bei RT inkubiert, so daß die DNA an die Lipide binden konnte (Transfektionsansatz). In dieser Zeit wurde der Zellrasen zweimal mit Medium ohne FCS gewaschen, dann der

Transfektionsansatz mit OPTIMEM auf 1ml aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Nach drei Stunden wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit DMEM überschichtet. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen in Laemmlipuffer lysiert und die Kapsidproteine im SDS-PAGE analysiert.

Sollte die Proteinexpression durch Koinfektion untersucht werden, so wurden die Zellen mit dem jeweiligen rekombinanten Vacciniavirus und mit vTF7-3 mit einer gesamtem MOI von 5 infiziert und nach 16 Stunden in Laemmlipuffer lysiert und weiter analysiert.

2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Zum Nachweis einer Pseudoinfektion wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits aus maximal 10^7 „infizierten“ Zellen Gesamt-RNA nach Herstellerangaben extrahiert. Die RNA wurde auf der Säule durch die Behandlung mit DNase I (RNasefrei) für 30 Minuten bei RT von kontaminierender DNA befreit (RNase-free DNase Set, Qiagen). Hiernach wurde die RNA mit 60 µl DEPC behandeltem Wasser (0,1%) von der Säule eluiert und photometrisch quantifiziert (Ausubel *et al.*, 1994).

2.4 Reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion (RT-PCR)

Die Methode der reversen PCR basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (Synthese der komplementären DNA) und einer anschließenden PCR. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Zellen detektiert werden. Für die reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion wurden *Ready To Go* RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia) verwendet, wobei beide Reaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wurden. Die „Beads“ wurden mit je 2 µg Gesamt-RNA und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Als Initiator der cDNA-Synthese wurden 0,5 µg Oligo d(T)₁₂₋₁₈ -Primer (im Kit enthalten) eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde 30 Minuten bei 42° C durchgeführt. Es folgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95° C für 5 Minuten. Für die anschließende Amplifikation wurden 25pmol der GFP sequenzspezifischen Strang- und Gegenstrang-Primer zur Reaktion dazugegeben (5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-TGTTCAACC-3' und 5'-CTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT-3'). Die Amplifikation erfolgte über 35 Zyklen zu je 45 sek bei 95°C, 45 sek bei 60°C sowie 45 sek bei 72 °C und einer abschließenden Elongation für 10 min bei 72°C. Um die Spezifität des PCR-Produkts zu erhöhen, wurde eine Nachamplifikation mit 1µM interner Primer (*nested*

PCR) und 5 µl des ersten PCR-Produkts als Template in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt (*Ready To Go* PCR-Beads, Amersham Pharmacia). Dazu wurden die Oligonukleotide 5'-GACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTC-3' und 5'-GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG-3' verwendet. Die PCR fand nach einer fünfminütigen Inkubation bei 95°C über 20 Zyklen zu je 30 sek bei 95°C, 30 sek bei 60°C sowie 1 min bei 72°C statt. Als Negativkontrolle wurden jeweils Ansätze ohne RNA oder ohne Reverse Transkriptase (*Ready To Go* PCR-Beads, Amersham Pharmacia) durchgeführt. Jeweils 1/10 des PCR-Ansatzes wurde im 1%igen Agarosegel analysiert.

Als interne Kontrolle für die eingesetzte RNA-Menge und Qualität und als Kontrolle für eine erfolgte RT-PCR diente die Amplifikation eines α -Tubulinfragments. Dazu wurden nach der oben beschriebenen cDNA-Synthese 50 pmol der degenerierten, tubulinspezifischen Oligonukleotide (von C. Heimann erhalten) 5'-AGGGAATTCAAYCARATGGTNAA-RTGYGA-3' und 5'-ATCAAGCTTYTCNCCNACRTACCARTG-3' (wobei, r=a,g, y=c,t und n=a,c,t,g) eingesetzt. Die PCR erfolgte ebenfalls über 35 Zyklen wobei die *Annealing*-Temperatur 45°C betrug.

2.5 Herstellung einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde

[α -³²P] dATP (3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; Amersham)

Hexanukleotid-Mischung (10 x, Boehringer Mannheim)

dNTP (minus dATP)-Mix (je 2 mM)

Klenow-Enzym (1U/µl)

Klenow-Puffer (10 x, Boehringer Mannheim)

Das GFP-Fragment, das als Sonde dienen sollte, wurde durch den Restriktionsverdau von pEGFPGFP-NLS-DNA mit EcoRI und BamHI und anschließender Elution aus dem Agarosegel gewonnen. Die radioaktive Markierung wurde durch *random priming* mit Oligonukleotiden durchgeführt. Dazu wurden etwa 75 ng des Fragments mit der Hexanukleotid-Mischung für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit dem dNTP (minus dATP)-Mix samt 1U Klenow-Enzym, 10 µCi [α -³²P] dATP in Klenowpuffer gemischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Die radioaktive Sonde wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex-Säule (Nick Columns, Sephadex G-50; Pharmacia-LKB Biotechnology) von Nukleotiden und niedermolekularen Substanzen getrennt. Dazu wurde auf die mit 3 ml TE-Puffer äquilibrierte Säule der

Markierungsansatz aufgetragen und in vier Schritten mit je 400 µl TE-Puffer von der Säule eluiert. Der Hauptanteil der radioaktiven DNA befand sich in der zweiten Fraktion, während die Fraktionen 3 und 4 nicht eingebaute Nukleotide enthielten. Vor der Hybridisierung wurde die DNA durch 10minütiges Erhitzen bei 95°C einzelsträngig gemacht.

2.6 Southern Blot

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl, pH 7.5
20xSSC-Lösung	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7.0
Prähybridisierungslösung	5xSSC, 1% (w/v) SDS, 5x Denhardts-Lösung (+100µg/ml Lachsspermien-DNA)
Hybridisierungslösung	5xSSC, 1% (w/v) SDS, 5x Denhardts-Lösung (+100µg/ml Lachsspermien-DNA, + GFP-Sonde)
Denhardts-Lösung	2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon-360, 2% (w/v) BSA

Hybridisierungsanalysen nach Southern (1975) wurden durchgeführt, um die PCR-Fragmente mit speziellen GFP-Sequenzen zu identifizieren. Dazu wurden die PCR-Produkte im 1%igen Agarosegel zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Vor der Übertragung wurde die DNA im Gel denaturiert. Dazu wurde das Gel erst 30 min unter leichtem Schwenken mit 0,25 N HCl behandelt, danach kurz mit Wasser gespült und in Denaturierungslösung überführt. Nach Erneuern der Denaturierungslösung und insgesamt 50 min Inkubation wurde das Gel nach erneutem Waschen je 2 x 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert.

Die DNA-Fragmente wurden über Nacht durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran (Amersham) übertragen (Ausubel *et al.*, 1994). Als Träger diente 20xSSC, das über eine Brücke aus Fließpapier durch das Gel zur Membran gelangte. Die Membran wurde durch Erhitzen bei 80°C für 2 h fixiert, nachdem die Vollständigkeit der Übertragung durch UV-Licht überprüft worden war. Hiernach wurde die Membran in 6xSSC angefeuchtet und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit der Prähybridisierungslösung 3 h bei 68°C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen, und auf die Zugabe der denaturierten Sonde in frischer, vorgewärmter Prähybridisierungslösung folgte eine Inkubation über Nacht bei 68°C. Danach wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran 2 mal je 5 min mit 2xSSC/0,1% SDS gewaschen. Es folgten zwei weitere

zusammengefaßt und durch eine Saccharose-Sedimentationszentrifugation weiter aufgereinigt.

2.8 Reinigung von Pseudovirionen durch Gradientenzentrifugation

2.8.1 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Die CsCl-enthaltende Proteinlösung wurde in ein Polyallomerröhrchen (Quickseal, Beckman) überführt und in einem Vti-65-Rotor bei 55.000 rpm für 20 h bei 4°C zentrifugiert. Die durch Austropfen gewonnenen Fraktionen wurden bei 4°C gelagert.

2.8.2 Saccharose-Sedimentationszentrifugation

Die proteinhaltigen Fraktionen mit der entsprechenden Dichte wurden zusammengefaßt und mit PBS (pH 6,8) auf 7,5 ml aufgefüllt. Mit dieser Proteinlösung wurde ein Saccharose-Stufengradient aus 2 ml 70%iger- und 3 ml 30%iger Saccharoselösung (w/v in PBS, pH 6,8) überschichtet, der dann im SW40 Rotor (Beckman) bei 12 °C mit 40.000 rpm für 4 h zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Gradient zu je 500 µl fraktioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Infektionstest

Bindungspuffer 100 µg/ml BSA in PBS, pH 6,8

Vor der Zugabe auf Zellen wurden 10-15 µl der Pseudovirionen mit 2µg DNase I (Boehringer Mannheim) in Bindungspuffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In Studien zur Kreuzneutralisation bzw. zum Einfluß von Glykosaminoglykanen (GAG) enthielten die Versuchsansätze zusätzlich Antikörper und GAG in den angegebenen Konzentrationen. Anschließend wurde dieser Ansatz zu 200 µl in Bindungspuffer suspendierten Zellen (7×10^4) zugegeben und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in DMEM resuspendiert und in eine „24-well“-Schale ausgesät. Fand der Infektionstest mit adhärennten Zellen statt, so wurden die Pseudovirionen mit Bindungspuffer auf 200 µl aufgefüllt und auf den gewaschenen Zellrasen gegeben. Die Inkubation erfolgte eine Stunde auf Eis. Hiernach wurden ungebundene Pseudovirionen weggewaschen und die Zellen mit 1 ml DMEM überschichtet. Die Auswertung fand nach 72 h statt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen dünn mit PBS überschichtet und die Anzahl der fluoreszierenden Zellen unter dem

Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Je nach Präparation lag die Zahl der Infektionsereignisse zwischen 35 und 160. Wurden Pseudovirionen, die pSV β -Gal als Markerplasmid enthalten verwendet, so wurden die Infektionsereignisse nach einer X-Gal-Färbung der Zellen (Unckell *et al.*, 1997) bestimmt.

2.9.1 Heparinase I-Behandlung von COS7-Zellen

Die Heparinase I-Behandlung von adhärennten bzw. gelösten COS7-Zellen erfolgte in den angegebenen Enzymmengen in 300 μ l Heparinase I-Puffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0,01% BSA, pH 7,5) für 45-60 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit Pseudovirionen bei 4°C inkubiert. Danach wurden ungebundene Pseudovirionen gewaschen und die Zellen mit 1ml Kulturmedium versetzt. Kontrollzellen wurden mit Heparinase I-Puffer ohne Enzym vorbehandelt.

2.9.2 Kultivierung von COS7-Zellen in natriumchlorathaltigem Medium

Die Wirkung von Chlorat auf die Infektion wurde untersucht, indem COS7-Zellen in DMEM, dem die entsprechende Menge NaClO₃ zugesetzt worden war, für 24 h kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf „24-well“-Platten ausgesät und für weitere 16 h in chlorathaltigem Medium kultiviert. Vor dem Infektionstest wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen.

2.10 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Pseudovirionen

5 μ l Pseudovirionen (in 70%iger Saccharose gelöst) wurden auf ein kohlebedampftes Kupfernetz pipettiert und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Lösung mit Löschpapier abgesaugt und das Kupfernetz zur Entfernung der Saccharose mehrmals mit Wasser benetzt. Zur Kontrastierung wurden 2% Ammoniummolybdat ohne Trehalose benutzt. Die Untersuchung der Proben erfolgte im Elektronenmikroskop bei 30.000facher und 50.000facher Vergrößerung.

2.11 Immunologische Techniken

2.11.1 Gewinnung polyklonaler Antiseren

Zwei Kaninchen wurden auf mehrere Stellen mit je 200 µg CsCl-gereinigter HPV16-VLPs (1:1 in komplettem Freund's Adjuvans) subkutan injiziert. In Intervallen von drei bis vier Wochen folgten drei weitere Immunisierungen mit der gleichen Antigendosis, jedoch in inkomplettem Freund's Adjuvans. Jeweils 10 Tage nach der zweiten und jeder weiteren Immunisierung wurde den Kaninchen aus der Ohrvene Blut entnommen. Der Blutkuchen wurde von der Gefäßwand abgelöst und die Blutprobe 20 min bei 5000 rpm (Heraeus-Zentrifuge) abzentrifugiert. Das Serum wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Die so gewonnenen Antiseren erhielten die Bezeichnung K75 und K76.

2.11.2 Analytische Durchflußzytometrie (FACS)

Zur Analyse von zelloberflächenexprimierten Molekülen wurden je 1×10^6 Zellen nach dem Ernten in 100 µl PGB (20 mM Glucose, 1% BSA in PBS) resuspendiert und mit Antikörper (Anti-Integrin 1:100 ; Anti-Heparin (E12)1:10) oder in der Kontrolle nur mit PGB für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PGB wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper (1:50 in PGB) für weitere 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PGB wurden die Zellen optional zunächst in PGB + 0,5% Formaldehyd für 20 Minuten auf Eis fixiert, oder direkt in FACS-Puffer (0,1% BSA, 0,01% NaN₃, 5 mM EDTA in PBS) aufgenommen und in einem FACSort (Becton Dickinson) durchflußzytometrisch analysiert.

2.11.3 ELISA

Blockierungspuffer	10 µg/ml BSA in PBS
Substratlösung	3,3', 5, 5' Tetramethylbenzidine (TMB, Kirkegaard & Perry)

Je Vertiefung wurden 300 ng über zwei nachfolgende CsCl-Gradienten gereinigte VLPs in PBS an Mikrotiterplatten gebunden. Zur Denaturierung wurden die VLPs in 200 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 10,6) und 20 mM DTT für zwei Stunden bei RT inkubiert und in Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5) an die ELISA-Platten gebunden. Die Bindung erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei 37°C. Die Platten wurden anschließend dreimal mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem Blockierungspuffer

nachbeschichtet (1 h bei RT). Nach weiteren Waschschritten wurde der in PBS/0,1% Tween seriell verdünnte Antikörper zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Platten erneut gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Ig (1:5000) für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen wurde das Substrat TMB hinzugegeben und die Reaktion je nach Intensität der Färbung nach 5 bis 10 min mit 1 M Schwefelsäure abgebrochen. Die Extinktion wurde anschließend im ELISA-Lesegerät bestimmt.

2.11.4 Heparin-BSA-ELISA

Bindungspuffer	12,7 mM EDTA in 50 mM Tris pH 7,4
Blockierungspuffer	2% (w/v) Magermilchpulver in PBS/0,05% Tween 20
Substratlösung	3,3', 5, 5' Tetramethylbenzidine (TMB, Kirkegaard & Perry)

100 ng Heparin-BSA (gemessen am BSA-Gehalt) oder BSA allein wurden in Bindungspuffer an Maxi-Sorp Mikrotiterplatten (Nunc) bei 4°C über Nacht gekoppelt (100 µl/Vertiefung). Hiernach wurden die Platten dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und zur Absättigung unbesetzter Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (1 h bei RT) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit PBS/0,05% Tween 20. Gereinigte VLPs wurden in PBS verdünnt (0-100 ng) und zwei Stunden bei 37°C an die Mikrotiterplatten gebunden. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Platten mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer (polyklonales Antiserum 1:1000, monoklonaler Antikörper 1:100) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und mit den entsprechenden sekundären Antikörpern 1:5000 in Blockierungspuffer für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Immunreaktion durch Zugabe der Substratlösung sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde meist nach 5 bis 10 Minuten mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption bei 620 und 450 nm im Photometer gemessen.

III. Ergebnisse

Vor einigen Jahren gelang erstmals die Herstellung von HPV33-Pseudovirionen (Unckell *et al.*, 1997). Es handelte sich dabei um rekombinant hergestellte HPV33-VLPs, die das Markerplasmid pSV β -Gal trugen. Die Vorgehensweise bei dieser Methode ist in Abbildung 4 zu sehen. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Produktion von Pseudovirionen zu vereinfachen und sie zur Untersuchung der frühen Schritte im Infektionszyklus von HPV33 einzusetzen.

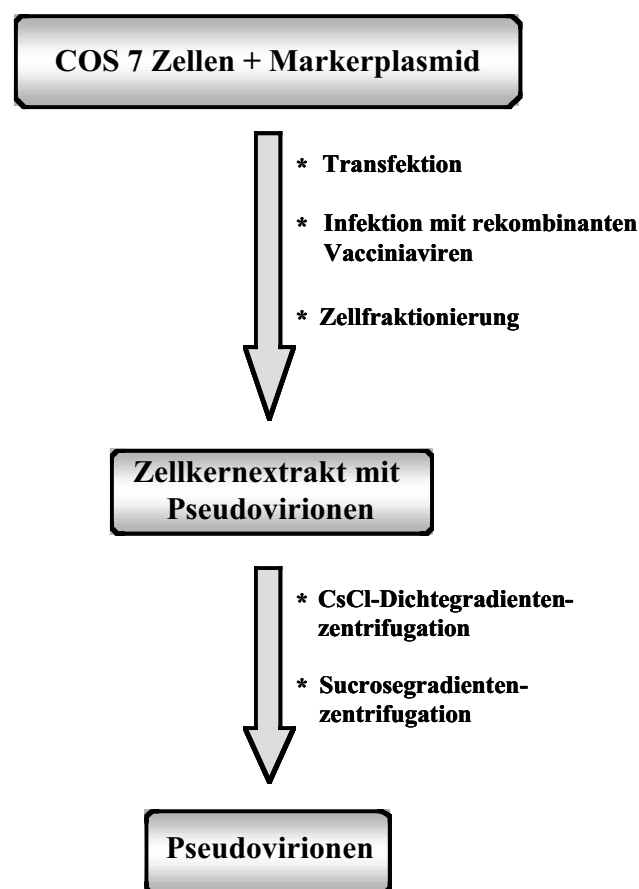


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pseudovirionenpräparation. COS7-Zellen werden mit dem zu verpackenden Plasmid, das einen nachweisbaren Marker trägt, mittels Elektroporation transfiziert und zur Expression der viralen Kapsidproteine L1 und L2 mit rekombinanten Vacciniaviren (vac33L1, vac33L2, vTF7-3) infiziert. In der Zelle wird die DNA von den HPV-Proteinen, die sich zu Kapsiden zusammenlagern, verpackt. Es entstehen Pseudovirionen. Die Zellen werden aufgebrochen und die Pseudovirionen durch eine Zentrifugation im CsCl-Dichte- und später im Saccharosegradienten aufgereinigt. Die in Saccharose gelösten Pseudovirionen werden im Infektionstest eingesetzt.

1. Herstellung und Charakterisierung von HPV33-Pseudovirionen mit pEGFPGFP-NLS als Markerplasmid

Für die Herstellung neuer HPV33-Pseudovirionen sollte ein Plasmid mit einem einfacher und zuverlässiger zu detektierenden Marker eingesetzt werden. Gewählt wurde der GFP-Expressionsvektor pEGFPGFP-NLS (L. Florin), der für ein GFP-Dimer mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS) des HPV33L1-Proteins kodiert. Aufgrund des NLS wird das GFP-Dimer in den Zellkern transportiert. Der Vorteil von GFP gegenüber dem Marker *lacZ* ist die Unabhängigkeit seiner Funktionalität von zusätzlichen Kosubstraten. Infektionsereignisse ließen sich damit schnell und ohne Vorbehandlung der Zellen nachweisen. Darüber hinaus zeigten Transfektionsexperimente mit pEGFPGFP-NLS, daß GFP aufgrund des CMV-Promotors in einer Reihe von Zelllinien (COS7, HeLa, DG75, X63) Zellen exprimiert wurde (nicht gezeigt).

Im ersten Schritt sollte versucht werden Pseudovirionen mit dem Markerplasmid pEGFPGFP-NLS zu erzeugen. In einem nachfolgenden Infektionstest sollte geklärt werden, ob die Pseudovirionen in der Lage sind, die DNA in einer DNase I-resistenten Form in COS7-Zellen zu überführen. Kritisch war die Frage, ob pEGFPGFP-NLS, das im Gegensatz zu pSV β -Gal (6,8 kb) nur 5,4 kb groß war, in Viruspartikel verpackt wird. Dazu wurden COS7-Zellen mit dem Markerplasmid transfiziert und anschließend mit HPV33-L1 und -L2 rekombinanten Vacciniaviren infiziert. 40 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen aufgebrochen und fraktioniert. Die Kernfraktion des Zellysates wurde zur Inaktivierung von Vacciniaviren mit 0,5% NP-40 inkubiert und einer CsCl-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen. Hiernach wurden die Kapsidproteine L1 und L2 in den einzelnen Fraktionen des Gradienten mittels Westernblot (α -L1, α -L2) bzw. im ELISA (α -L1) nachgewiesen (Abbildung 5). Das majore Kapsidprotein L1 verteilt sich über den gesamten Gradienten. Dabei findet man jedoch zwei Bereiche, in denen sowohl L1 als auch L2 konzentriert vorkommen. Die Maxima beider Kapsidproteine liegen im CsCl-Gradienten bei einer durchschnittlichen Dichte von 1,32 g/ml und 1,29 g/ml. Wie Abbildung 6A zeigt, konnten bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Fraktionen beider Dichten virusähnliche Partikel nachgewiesen werden. Dieser Befund läßt vermuten, daß die VLPs mit höherer Dichte mit DNA assoziiert sind, zumal DNA-haltige Virionen eine Dichte von 1,34 g/ml aufweisen (Zhao *et al.*, 1998).

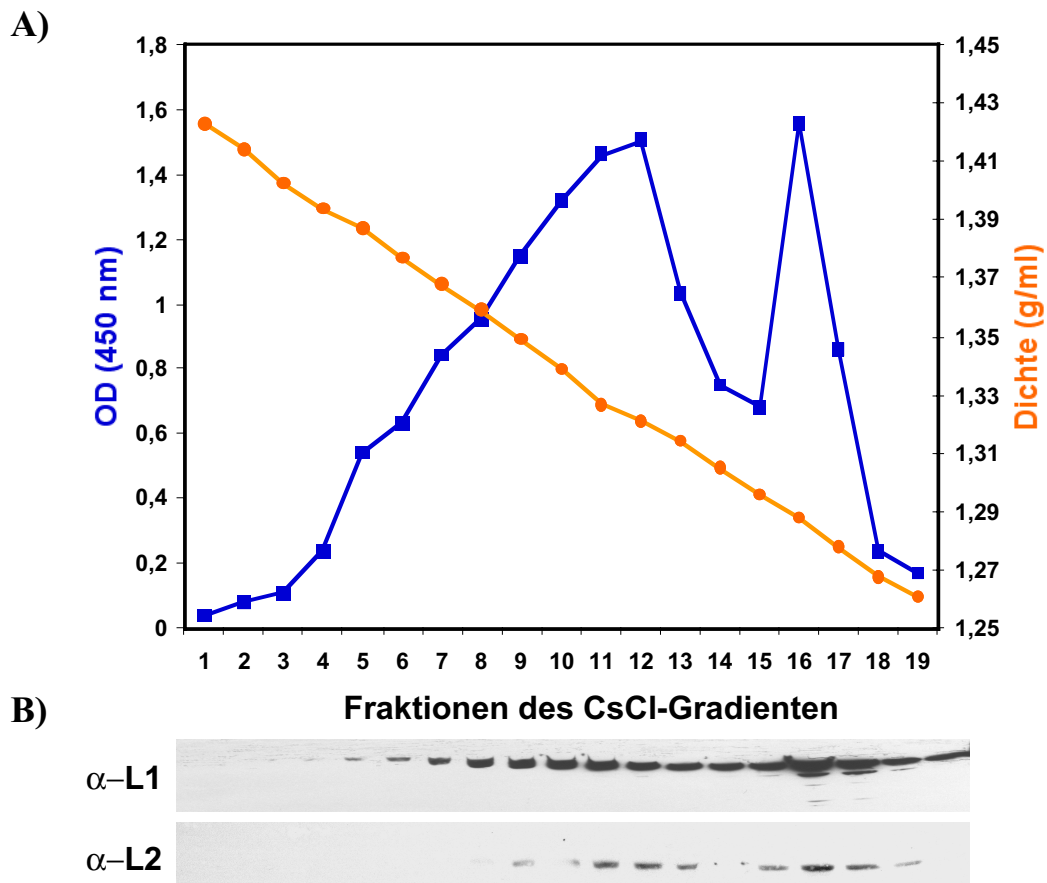


Abbildung 5: Analyse des CsCl-Gradienten. (A) HPV33L1-ELISA. 2 μ l jeder Fraktion wurden 5 Minuten in 0,5x Laemmli gekocht und über Nacht in insgesamt 100 μ l PBS an ELISA-Platten gekoppelt. Der L1-Nachweis erfolgte durch mAk L1-7 (blaue Linie). Von jeder Fraktion wurde die Dichte über die Messung des Brechungsindex bestimmt (orangefarbene Linie). (B) HPV33L1 und L2 Westernblotanalyse. Je 10 μ l der Fraktionen 1-19 wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot analysiert. HPV33L1 wurde mit mAk L1-7 und HPV33L2 mit mAk L2-1 detektiert.

Zur weiteren Reinigung und Konzentrierung wurden die einzelnen Fraktionen der „schweren“ (1,31-1,33 g/ml) und die der „leichten“ VLPs (1,28-1,30 g/ml) zusammengefaßt, in Saccharosegradienten zentrifugiert und anschließend erneut fraktioniert. Die Sedimentation der Partikel wurde durch Nachweis des L1-Proteins im Westernblot analysiert. Das L1-Protein war meist in der dritten und vierten Fraktion nachweisbar (nicht gezeigt). Jeweils 10 μ l der Fraktionen 3 und 4 sowohl von „leichten“ als auch „schweren“ VLPs wurden für den Infektionstest verwendet. Zur Eliminierung freier und unspezifisch mit Partikeln assoziierter Plasmide wurden die Aliquots eine Stunde mit DNase I vorbehandelt und anschließend mit COS7-Zellen in Suspension inkubiert. Hiernach wurden die Zellen ausgesät und nach einer dreitägigen Inkubation bei 37°C unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Wie in Abbildung 6B zu sehen, weisen infizierte COS7-Zellen, die mit „schweren“ Kapsiden inkubiert wurden, tatsächlich einen deutlich fluoreszierenden Kern auf.

Fluoreszierende Zellen wurden bei der Verwendung von „leichten“ VLPs nicht gefunden (nicht gezeigt). Neben dem Befund, daß sich VLPs mit einer Dichte von 1,32 g/ml nachweisen lassen, ist die DNase I-resistente Übertragung von GFP-DNA in COS7-Zellen ein weiteres Indiz für die Verpackung von pEGFPGFP-NLS in HPV33-Nukleokapside. Weiterhin zeigt die Expression von GFP, daß Pseudovirionen offenbar sowohl die Aufnahme als auch die Freisetzung der DNA in der Zelle vermitteln können. Desweiteren konnte ein erfolgreicher DNA-Transfer durch Pseudovirionen durch die stabile Transfektion von COS7-Zellen belegt werden. Dazu wurden Zellen nach der Infektion mit Pseudovirionen drei Wochen lang in neomycinhaltigem Medium kultiviert. Da die Neomycinresistenz ein weiterer Selektionsmarker des pEGFPGFP-NLS ist, sollten sich unter diesen Bedingungen nur die Zellen vermehren, die das Resistenzgen stabil in ihr Genom integrieren. In der Tat konnten in diesem Experiment fünf stabile Klone erzeugt werden (Abbildung 6C).

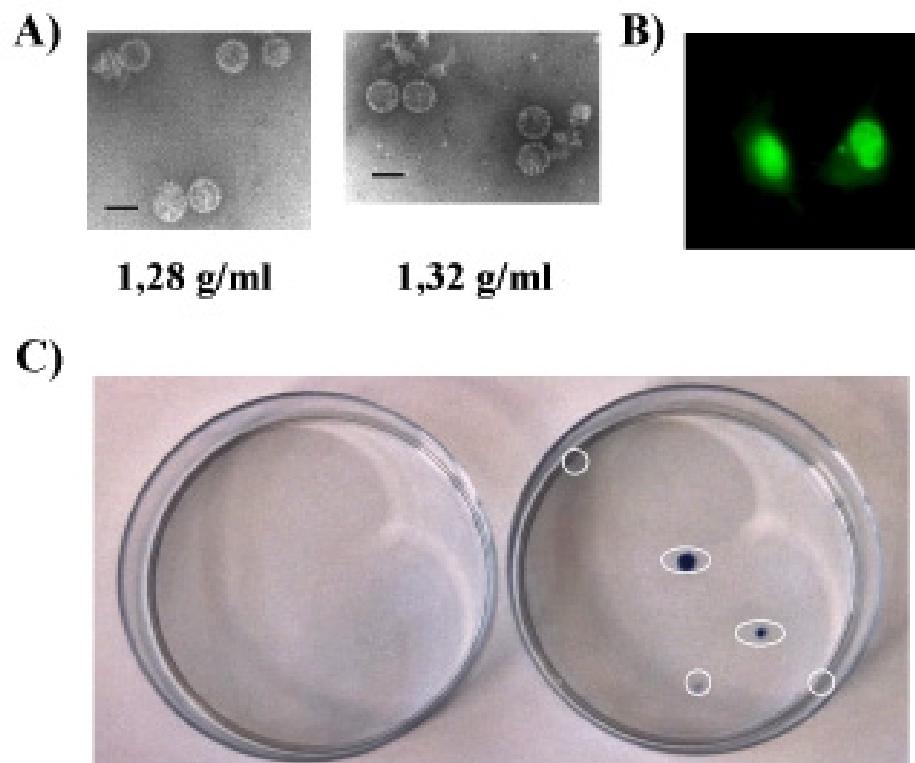


Abbildung 6: Eigenschaften der Pseudovirionen. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der VLPs aus unterschiedlichen Dichten des CsCl-Gradienten. Der Balken entspricht 50 nm. (B) Mit Pseudovirionen infizierte COS7-Zellen. Deutlich sind die fluoreszierenden Kerne in den Zellen zu erkennen. (C) COS7-Zellen wurden ohne (linke Platte) und nach Pseudoinfektion (rechte Platte) in Anwesenheit von 700 µg/ml Neomycin kultiviert. Eingekreiste Zellkolonien wurden mit Methyleneblau gefärbt.

2. Kreuzneutralisation von HPV-Pseudovirionen durch Antiseren gegen klinisch relevante HPV-Typen

Untersuchungen zur Kreuzneutralisation zwischen verschiedenen HPV-Typen können wichtige Daten für die Zusammensetzung zukünftiger Impfstoffe liefern. Da eine große Anzahl verschiedener HPV-Typen für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs verantwortlich ist und man durch Impfung eine Abdeckung aller riskanten HPV-Typen erreichen will, kann die Kenntnis über HPV-Serotypen die Zahl der zu applizierenden HPV-Typen verringern. Mit dem hier verwendeten Infektionstest sollte das kreuzneutralisierende Potential von VLP-Antiseren verschiedener HPV-Typen getestet werden. Zu diesem Zwecke wurden unter Verwendung des pEGFPGFP-NLS HPV16-, 18- und 33-Pseudovirionen hergestellt. Anschließend wurde im Infektionstest die Kreuzneutralisation dieser Pseudovirionen durch Antiseren gegen die klinisch relevanten HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 analysiert.

2.1 Konstruktion und Charakterisierung HPV16-rekombinanter Vacciniaviren

HPV16L1- und L2-DNA erhielt ich aus der Arbeitsgruppe H.-G. Köchel. Dieses HPV16-Isolat unterschied sich vom Prototyp (Seedorf *et al.*, 1985) in den Aminosäuren an Position 202 (H→D) und an Position 266 (T→A). Zur Herstellung von HPV16L1 und L2 Vacciniaviren wurden die offenen Leserahmen des HPV16L1 und L2 aus den entsprechenden Plasmiden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide führten bei HPV16L1 5'-terminal zum Startkodon eine BspHI-Schnittstelle und 3'-terminal zum Stopkodon eine XhoI-Schnittstelle ein. Die gewählte BspHI-Schnittstelle bedingt eine Punktmutation (S→T) im L1-Gen. Bei der Amplifikation von HPV16L2 wurde 5'-terminal zum Startkodon eine EcoRI- und 3'-terminal zum Stopkodon eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen BspHI und XhoI bzw. mit EcoRI und BamHI verdaut, und die entstandenen Fragmente mit den Enden des kompatibel-verdauten Vacciniavirusvektors pTM1 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden pTM16L1 und pTM16L2 benannt.

Die korrekte Expression der viralen Gene unter dem T7-Promoter des pTM1-Vektors wurde durch eine transiente Expression in COS7-Zellen getestet. Dazu wurden COS7-Zellen mit dem Helfervacciniavirus vTF7-3 infiziert und anschließend mit den Plasmiden pTM16L1, pTM16L2, und zur Kontrolle mit pTM18L1 und pTM18L2 transfiziert. Das Helfervirus

kodiert die T7-Polymerase, die für eine effiziente Transkription der offenen Leserahmen notwendig ist. Nach ~16 Stunden wurden die Zellen lysiert, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Kapsidproteine mittels typspezifischer Antikörper analysiert. Sowohl das L1- als auch das L2-Protein von HPV16 konnten nachgewiesen werden. Beide Proteine zeigten das in der Literatur beschriebene Laufverhalten (Kirnbauer *et al.*, 1993). Wie in Abbildung 7A zu sehen, wandert HPV16L1 im SDS-Polyacrylamidgel bei ~58 kD (Spur 1) und HPV16L2 (Spur 3) zwischen 80 und 90 kD. Im Vergleich zum minoren Kapsidprotein von HPV18 (Spur 4) scheint das HPV16L2-Protein weniger stark exprimiert zu werden.

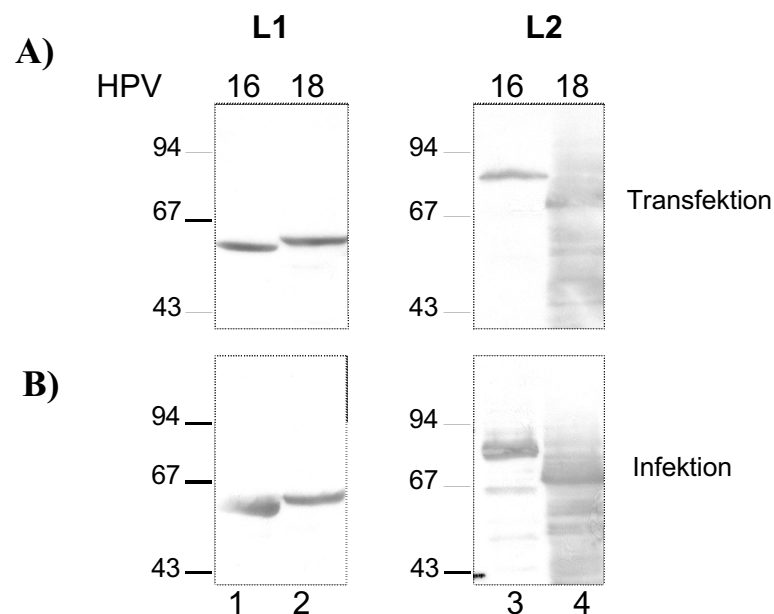


Abbildung 7: Expression der HPV-typspezifischen Kapsidproteine in COS7-Zellen. (A) Expression der viralen Proteine nach Transfektion mit rekombinanten Vacciniavektoren. COS7-Zellen wurden mit dem Vacciniahelpervirus vTF7-3 infiziert und anschließend mit je 4 µg pTM16L1, pTM16L2, pTM18L1 und pTM18L2 transfiziert. (B) Expression der viralen Proteine nach Koinfektion mit rekombinanten Vacciniaviren. COS7-Zellen wurden mit vTF7-3 und den Vacciniaviren vac16L1, vac16L2, vac18L1 und vac18L2 koinfiziert. In beiden Fällen wurden die Zellen ca. 16 Stunden nach der Infektion lysiert und der Gesamtextrakt in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Kapside wurden mittels Chemiluminiszenz unter Verwendung der monoklonalen Antikörper 16L1-212C, -312F, 33L2-1 (kreuzreaktiv mit 16L2), 18L1-1D, 18L2-28F, -412F, und -104 E detektiert.

Aufgrund der einwandfreien Expression der viralen Gene konnten pTM16L1 und pTM16L2 zur Herstellung rekombinanter Vacciniaviren (Kapitel II.2.2.4) herangezogen werden. Nach erfolgter Rekombination wurden die generierten Vacciniaviren mit der Benennung vac16L1 und vac16L2 zusammen mit vTF7-3 zur Koinfektion von COS-7 Zellen verwendet. Dies sollte zur Überprüfung der korrekten Expression durch die rekombinanten Vacciniaviren dienen. Das Zellysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und die Kapsidproteine L1 und

L2 wurden über Chemiluminiszenz mit typspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurden HPV18L1 und L2 mitgeführt. Wie aus Abbildung 7 B ersichtlich, wurden beide Proteine des HPV16 in nachweisbarer Menge exprimiert. Das Expressionsmuster unterschied sich nicht von demjenigen der Plasmide.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob mit den Konstrukten vac16L1, vac16L2, vac18L1 und vac18L2 (C. Fligge) die Herstellung von HPV16L1/L2- und HPV18L1/L2-Pseudovirionen möglich ist. Diese wurden analog zur Herstellung von HPV33-Pseudovirionen präpariert (Abbildung 4). EM-Aufnahmen L1-proteinhaltiger Fraktionen beider HPV-Typen zeigten virusähnliche Partikel (Abbildung 8).

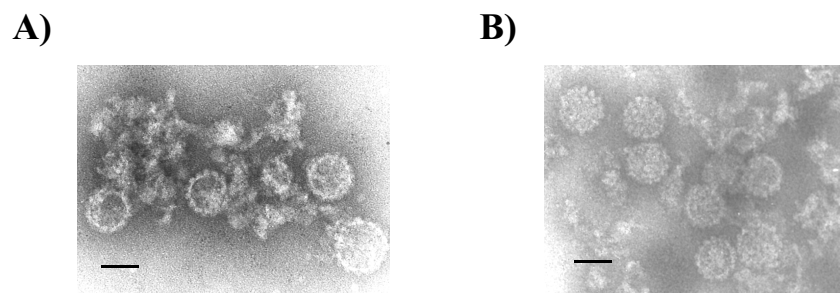


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV16- und HPV18-Pseudovirionen. Je 5 μ l der L1-haltigen Fraktion wurden auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfergitter aufgetragen und mit 2% Ammoniummolybdat gegengefärbt. Die Aufnahmen entstanden bei einer 50.000 fachen Vergrößerung. **(A)** HPV18-Pseudovirionen. **(B)** HPV16-Pseudovirionen. Der Balken entspricht 50 nm.

Im Infektionstest konnten diese Partikel Zellen infizieren, was durch den Nachweis von GFP bestätigt wurde. Dabei waren die Effizienzen ähnlich wie bei HPV33-Pseudovirionen. Offensichtlich ist die hier angewendete Methode zur Herstellung „infektiöser“ Partikel von verschiedenen HPV-Typen geeignet. Da das Plasmid keinerlei spezifische HPV-Sequenzen enthält, wird es offensichtlich unspezifisch von verschiedenen HPV-Typen verpackt.

2.2 Charakterisierung HPV-typspezifischer Kaninchenantiseren

Kaninchenantisera gegen die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 sollten hinsichtlich der Kreuzneutralisation von HPV16-, 18- und 33-Pseudovirionen untersucht werden. Gegen L1-VLPs der HPV-Typen 18, 31, 35, 39 und 45 gerichtete Antisera wurden von R.C. Rose bereitgestellt. Ein Antiserum gegen HPV33L1/L2-VLPs war in unserer Arbeitsgruppe bereits vorhanden. Durch die Immunisierung von Kaninchen mit HPV16L1/L2-VLPs konnte ich

HPV16-typspezifisches Antiserum gewinnen. Für die Herstellung des Antiserums wurde der HPV16-Subtyp 114/K verwendet. In Tabelle 2 sind die Endpunkttiter der Antiseren gegen das eigene typspezifische Antigen aufgeführt. Der Endpunkttiter gibt an, bis zu welcher Ak-Verdünnung die Extinktionskurve einen linearen Verlauf nimmt. Die von R.C. Rose für seine Antiseren bestimmten Endpunkttiter sind aufgrund unterschiedlicher ELISA-Verfahren mit denen von mir für die HPV16- und 33- Antiseren bestimmten Endpunkttiter nicht unmittelbar vergleichbar. Da wir in unserem Labor nur von einigen wenigen HPV-Typen VLPs herstellen können, war es auch nicht möglich alle Antiseren in einem System neu zu bestimmen. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde deshalb der Endpunkttiter des HPV39-Antiserums (von R. C. Rose) mit unserem System erneut bestimmt und daran die Werte für die HPV16- und 33 Antiseren (unser Labor) „geeicht“. Das HPV39-Antiserum zeigte dabei eine geringere Reaktivität als die HPV16- und 33-Antiseren, was darauf hindeutet, daß die Reaktivitäten unserer Antiseren in der Größenordnung mit denen von R.C. Rose übereinstimmen.

Tabelle 2: Endpunkttiter verschiedener Kaninchenantiseren. Endpunkttiter der verwendeten VLP-Antiseren gegen das jeweils homologe Antigen (zusammengestellt nach Giroglou *et al.*, 2001a). Endpunkttiter für die HPV18-, 31-, 35-, 39- und 45-Antiseren von R.C. Rose bestimmt. Endpunkttiter für die HPV16- und 33-Antiseren von mir bestimmt. Weitere Erläuterung im Text.

ANTIGEN	ANTISEREN (Anti-)						
	<u>HPV16</u>	<u>HPV18</u>	<u>HPV31</u>	<u>HPV33</u>	<u>HPV35</u>	<u>HPV39</u>	<u>HPV45</u>
HPV16-VLPs	>>13500	*	*	*	*	*	*
HPV18-VLPs	*	>40500	*	*	*	*	*
HPV31-VLPs	*	*	>13500	*	*	*	*
HPV33-VLPs	*	*	*	>>13500	*	*	*
HPV35-VLPs	*	*	*	*	>40500	*	*
HPV39-VLPs	*	*	*	*	*	>13500	*
HPV45-VLPs	*	*	*	*	*	*	>40500

2.3 Kreuzneutralisation von Pseudovirionen

HPV16-, HPV18- und HPV33-Pseudovirionen wurden mit Kaninchenantisera gegen HPV16, 18, 31, 33, 35, 39 vorinkubiert und anschließend zu COS7-Zellen gegeben. 72 Stunden nach der Bindung wurden die Infektionsereignisse gezählt. In Abbildung 9A ist die Kreuzneutralisation von HPV16-Pseudovirionen dargestellt. Man erkennt, daß lediglich das Antiserum gegen HPV16 die Infektion zu neutralisieren vermag. Dabei konnte bereits bei einer Verdünnung von 1:1000 ($-3 \log_{10}$) keine vollständige Inhibition mehr erreicht werden. Die Antiseren gegen andere HPV-Typen hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Infektion mit HPV16-Pseudovirionen. Selbst bei hohen Konzentrationen ($-1,5 \log_{10}$) hatte das Anti-HPV33-Antiserum keine Wirkung.

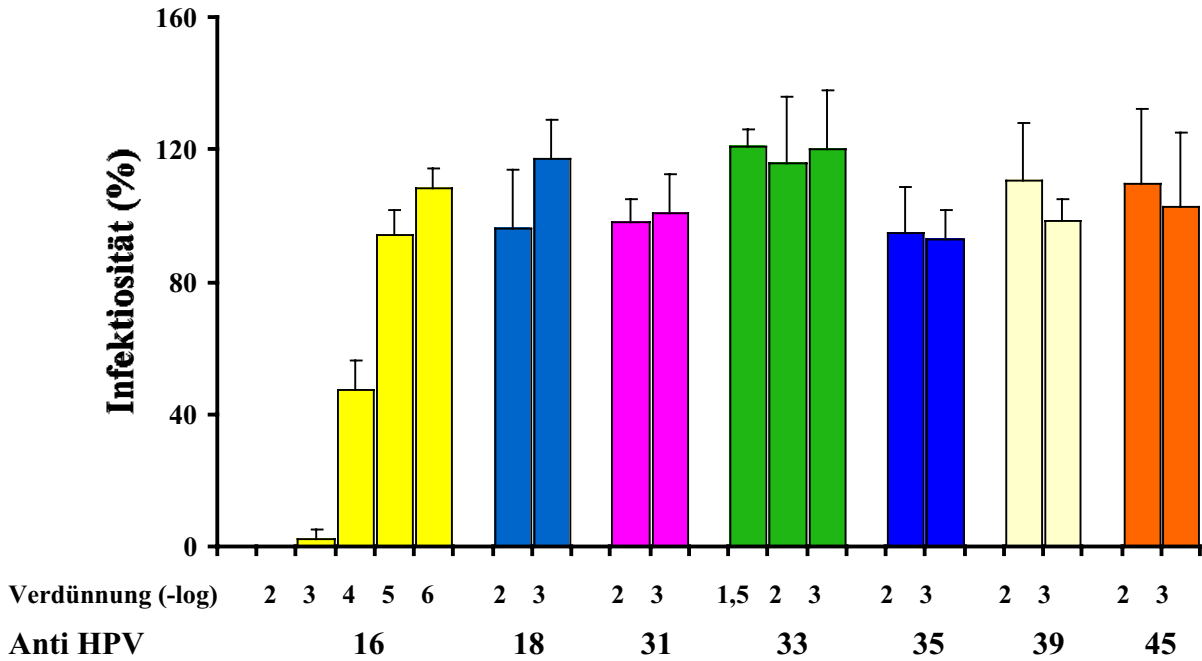
HPV18-Pseudovirionen wurden ebenfalls durch das homologe Antiserum effizient neutralisiert (Abbildung 9B). Bis zu einer Verdünnung von 1:1000 ($-3 \log_{10}$) konnte keine Infektion nachgewiesen werden, bei einer Verdünnung von 1:10.000 ($-4 \log_{10}$) betrug die Infektiosität lediglich 10% der Kontrolle. Des weiteren konnte eine Kreuzneutralisation zwischen HPV18 und HPV45 beobachtet werden. Im Vergleich zum homologen Antiserum bewirkte das Antiserum gegen HPV45 nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 ($-2 \log_{10}$) eine vollständige Neutralisation von HPV18-Pseudovirionen. Die übrigen Kaninchenantisera hatten keine signifikante Wirkung auf die Infektion mit HPV18-Pseudovirionen.

Bei der Untersuchung von HPV33-Pseudovirionen konnte eine Kreuzneutralisation zwischen HPV33 und HPV31 beobachtet werden (Abbildung 9C). Auch hier war erwartungsgemäß die Neutralisation durch das homologe Antiserum weitaus besser als mit dem Anti-HPV31-Antiserum. Letzteres bewirkte selbst bei einer Verdünnung von 1:30 ($-1,5 \log_{10}$) keine vollständige Hemmung der Infektion. Es konnte aber bis zu einer Verdünnung von 1:1000 ($-3 \log_{10}$) die Infektion auf 75% reduzieren. Das HPV33-Antiserum hingegen konnte selbst bei 1:10.000 ($-4 \log_{10}$) die Infektion komplett neutralisieren. Keines der anderen Antiseren hatte einen signifikanten Effekt auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen.

Die wirksame Neutralisation durch homologe Antiseren bestätigt die Spezifität des *In vitro*-Testsystems. Eine Kreuzneutralisation wurde lediglich zwischen HPV33-Pseudovirionen und dem HPV31-Antiserum und zwischen HPV18-Pseudovirionen und dem HPV45-Antiserum beobachtet.

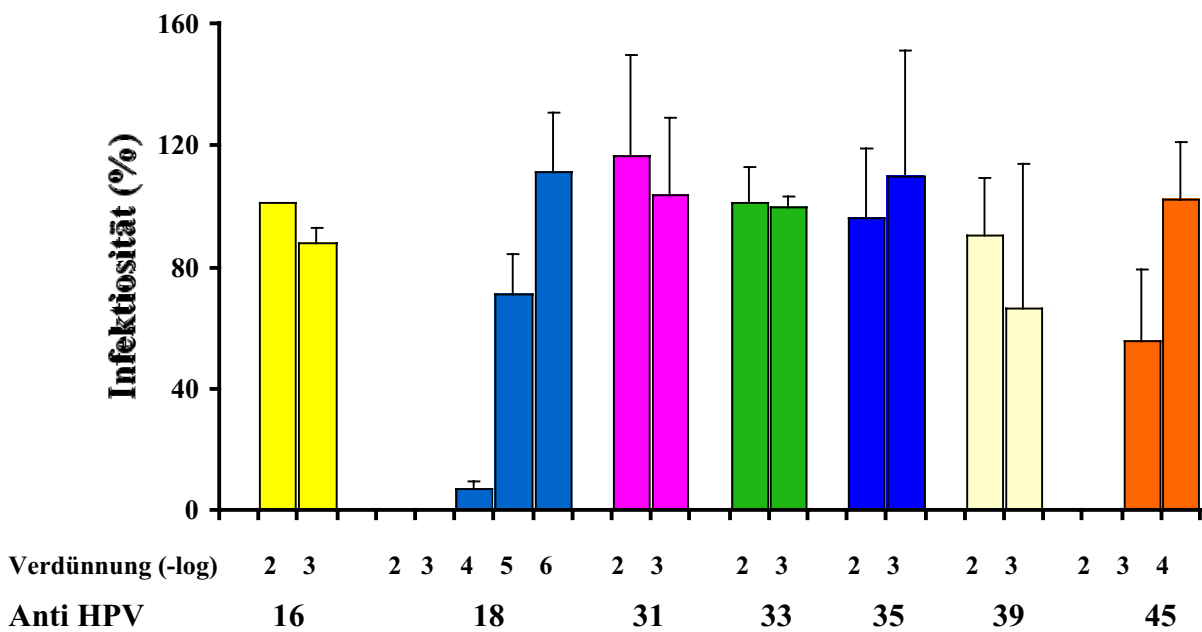
A)

HPV 16 Pseudovirionen



B)

HPV 18 Pseudovirionen



C)

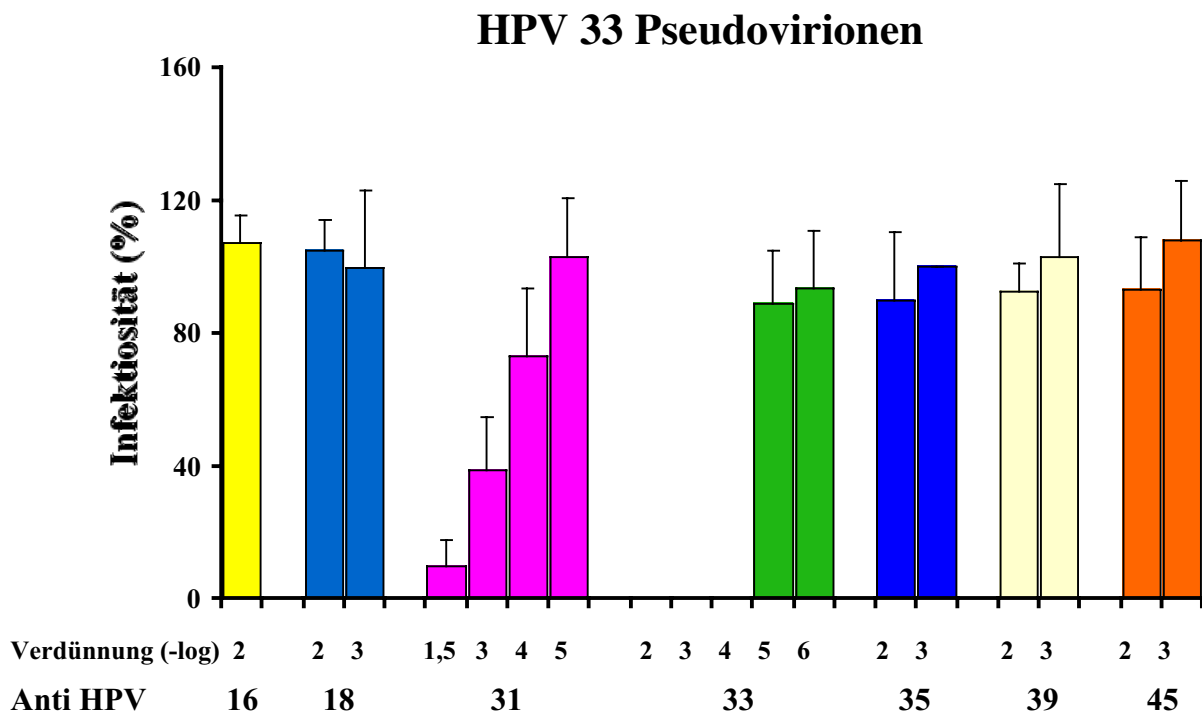


Abbildung 9: Analyse der Kreuzneutralisation von HPV-Pseudovirionen. HPV16- (A), HPV18- (B) und HPV33-Pseudovirionen (C) wurden mit den Antisera gegen HPV16-, 18-, 31-, 33-, 35-, 39- und 45-VLPs in der angegebenen Verdünnung vorinkubiert und im Infektionstest eingesetzt. Infektionsereignisse ohne Zugabe von Antiserum entsprechen einer Infektiosität von 100%.

3. Molekulare Analyse der Papillomvirus-Wirtszellinteraktion

Um eine Zelle erfolgreich zu infizieren, müssen Viren an einen spezifischen Zellrezeptor binden, die Plasmamembran penetrieren und das Genom in den Kern transferieren. Virale Rezeptoren können Proteine, Kohlenhydrate oder gar Glykolipide sein. Rezeptormoleküle können höchst spezifisch nur auf wenigen Zelltypen oder in hoher Anzahl und weitverbreitet vorkommen, wie es der Fall für Sialinsäure oder Heparansulfat ist. Mitglieder derselben Virusfamilie haben nicht zwangsläufig die gleichen oder ähnliche Rezeptoren. Das zeigt sich vor allem auch bei Papovaviren. Während Polyomaviren an Sialinsäure binden (Stehle *et al.*, 1994), bindet SV40 an den majoren Histokompatibilitätskomplex I (Breau *et al.*, 1992). Trotz intensiver Bemühungen ist der HPV-Rezeptor bis heute nicht bekannt. Bindungsstudien mit HPV6b deuten auf eine Rolle von α_6 -Integrin hin (Evander *et al.*, 1997). Integrine sind Heterodimere bestehend aus einer α - und einer β -Kette, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind. Sie sind Transmembranproteine, die die Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett herstellen. Auf der extrazellulären Seite binden sie an zahlreiche

Liganden, wie Laminin und Fibronectin und auf der zytoplasmatischen Seite sind sie über die Proteine Talin, Paxillin oder Vinkulin mit den Actinfilamenten verbunden. Integrine sind an zahlreichen Prozessen, wie Zelladhäsion, Wachstum, Differenzierung und Wundheilung beteiligt. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Signaltransduktion (Hynes, 1999).

Als weiterer Kandidat wird Heparansulfat diskutiert, welches für die Bindung von HPV11-VLPs essentiell ist (Joyce *et al.*, 1999). HSPG sind eine Gruppen von Proteinen, die mindestens eine kovalent gebundene Heparansulfatseitenkette besitzen. Die Grundstruktur der unverzweigten Heparansulfatseitenketten ist eine alternierende Folge von Glukuronsäure und N-Acetylglucosamin, die über β 1,4- und α 1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Das Polymer wird durch spezifische Enzyme an verschiedenen Stellen durch Sulfatierung und Epimerisierung modifiziert, wodurch eine größere Flexibilität in der Konformation und eine stark negative Ladung erzielt wird (Bernfield *et al.*, 1999). HSPG binden an eine Vielzahl von Molekülen, darunter Wachstumsfaktoren, Cytokine, Enzyme, Proteaseinhibitoren und Proteine der extrazellulären Matrix. Sie sind an der Zelladhäsion und der Regulation der Zellteilung beteiligt (Bernfield *et al.*, 1999).

Ob die mit VLPs beobachteten Bindungen für die produktive Infektion von Relevanz sind, wurde im Folgenden unter Verwendung von HPV33-Pseudovirionen untersucht.

3.1 Die Rolle von α 6-Integrin in der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

3.1.1 Einfluß des α 6-integrinspezifischen Antikörpers GoH3 auf die Infektion

Evander und Mitarbeiter (1997) haben mittels Bindungsstudien α 6-Integrin als möglichen Bindungspartner für HPV6b-VLPs identifiziert. Bei HaCaT-Zellen konnten sie durch Vorinkubation mit dem α 6-integrinspezifischen Antikörper GoH3 die Bindung von HPV6b-VLPs um 63% reduzieren. Um die Bedeutung von α 6-Integrin für den Infektionszyklus von Papillomviren zu überprüfen, wurden COS7-Zellen mit 20 μ g/ml des gleichen Antikörpers vorinkubiert. In einem Parallelansatz konnte ich mittels Durchflußzytometrie feststellen, daß GoH3 auch auf COS7-Zellen α 6-Integrin erkennt (Abbildung 20). Die so vorbehandelten Zellen wurden für den Infektionstest verwendet, wobei während des gesamten Experiments dem Kulturmedium die entsprechende Menge an Antikörper zugesetzt war, um eine nachträgliche Infektion über neusynthetisiertes α 6-Integrin zu verhindern. Als Kontrolle diente ein β 4-Integrin spezifischer Antikörper, da β 4-Integrin auf COS7-Zellen nicht

exprimiert wird (Evander *et al.*, 1997). Trotz hoher Antikörperkonzentration ergab der Infektionstest, daß die Blockierung von α_6 -Integrin keinen signifikanten Einfluß auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen hat (Abbildung 10). Offenbar geht die Blockierung von α_6 -Integrin nicht mit einer Reduktion der Infektion einher.

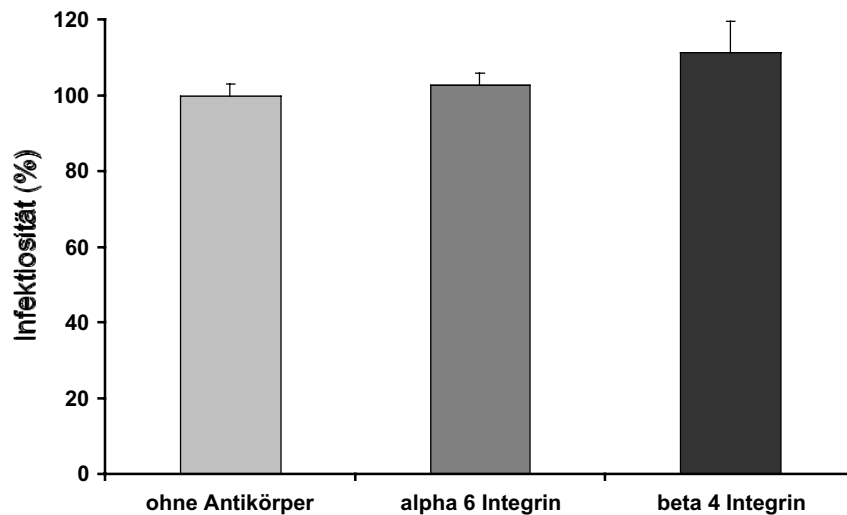


Abbildung 10: Einfluß α_6 - und β_4 -integrinspezifischer Antikörper auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. COS7-Zellen wurden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Antikörpers vorinkubiert, einem Infektionstest unterzogen und mit der entsprechenden Antikörperkonzentration weiterkultiviert. Nach insgesamt 72 Stunden wurde die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen bestimmt. Die Anzahl der Infektionsereignisse bei unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt.

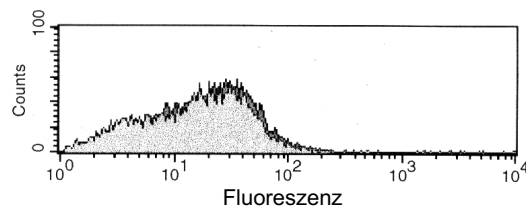
3.1.2 Infektion α_6 -integrinnegativer DG75-Zellen

Um den oben beschriebenen Befund zu bestätigen, sollte eine α_6 -integrinnegative Zelllinie im Infektionsansatz getestet werden. Die humane B-Zell-Lymphomlinie DG75 (freundlicherweise von I. Frazer bereitgestellt) exprimiert kein α_6 -Integrin auf der Oberfläche. Um diese Eigenschaft und damit die Identität der Zellen zu verifizieren, wurden die DG75-Zellen im Durchflußzytometer unter Verwendung von GoH3 untersucht (Abbildung 11A). Erwartungsgemäß zeigten sowohl die unbehandelten als auch die mit GoH3 inkubierten Zellen das gleiche Fluoreszenzprofil, was den Schluß nahelegt, daß die erhaltenen DG75-Zellen kein α_6 -Integrin auf der Oberfläche exprimieren.

Wenn α_6 -Integrin, wie für HPV6b postuliert, auch der Rezeptor für HPV33 wäre, sollte eine Infektion der DG75-Zellen mit HPV33-Pseudovirionen nicht möglich sein. Als Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen verwendet, die bekanntermaßen mit Pseudovirionen infizierbar sind (Rossi *et al.*, 2000). Vorversuche hatten gezeigt, daß Transfektionen mit dem

Markerplasmid in beiden Zelllinien zur GFP-Expression führten, sodaß die Transkription und Translation des Markers gewährleistet war. Dennoch war mit unserem Testsystem weder bei DG75- noch bei HeLa-Zellen eine Infektion nachweisbar. Vermutlich lag die GFP-Expression in diesen Zellen unter der optischen Nachweisgrenze, da aufgrund des fehlenden T-Antigens das Markerplasmid nicht amplifiziert wurde. Daher wurde zum Nachweis der GFP-Expression und folglich der Infektion die weitaus empfindlichere Methode der Reversen Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Aus mit HPV33-Pseudovirionen infizierten COS7-, HeLa- und DG75-Zellen wurde nach drei Tagen RNA isoliert, zuerst in der RT-PCR und anschließend in der *nested* PCR analysiert. In allen drei Zelllinien, auch in den α_6 -integrinnegativen DG75 konnte ein 600 bp großes Fragment amplifiziert werden (Abbildung 11B; Spuren 2, 4, 8). Ein weiteres etwa 1200 bp großes Fragment war bei infizierten COS7- und HeLa-Zellen (Spuren 2, 4) nachweisbar und entspricht der Größe des GFP-Dimers. Überprüfte man die RNA aus nichtinfizierten Zellen, konnte in der PCR kein Fragment nachgewiesen werden (Spuren 1, 3, 7). Dies gelang auch nicht bei der Verwendung von RNA aus HeLa-Zellen, die in Anwesenheit von Heparin (Spur 6, siehe auch Kapitel III.3.2.3) oder des neutralisierenden Antiserums K53 (Spur 5) mit Pseudovirionen inkubiert wurden. Diese Korrelation zeigt, daß der Nachweis des Transkripts eine erfolgreiche Infektion beweist. Das als Kontrolle mitamplifizierte, 354 bp lange Fragment des konstitutiv exprimierten α -Tubulins konnte in allen RNA-Präparationen nachgewiesen werden, wobei die Bande bei COS7-Zellen schwächer ausgeprägt war. Obwohl die Tubulinbande bei HeLa- und DG75-Zellen in etwa gleich stark ausgeprägt war, was auf eine vergleichbare Konzentration der eingesetzten RNA hinweist, war das PCR-Produkt der GFP-mRNA bei den letztgenannten weitaus schwächer zu sehen. Dies läßt jedoch keine qualitativen Rückschlüsse über die Infizierbarkeit von DG75-Zellen zu. Die niedrige Amplifikation könnte auch das Resultat einer schlechteren Expression in DG75-Zellen sein. Die Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, daß für eine Infektion mit HPV33-Pseudovirionen α_6 -Integrin nicht notwendig ist.

A)



B)

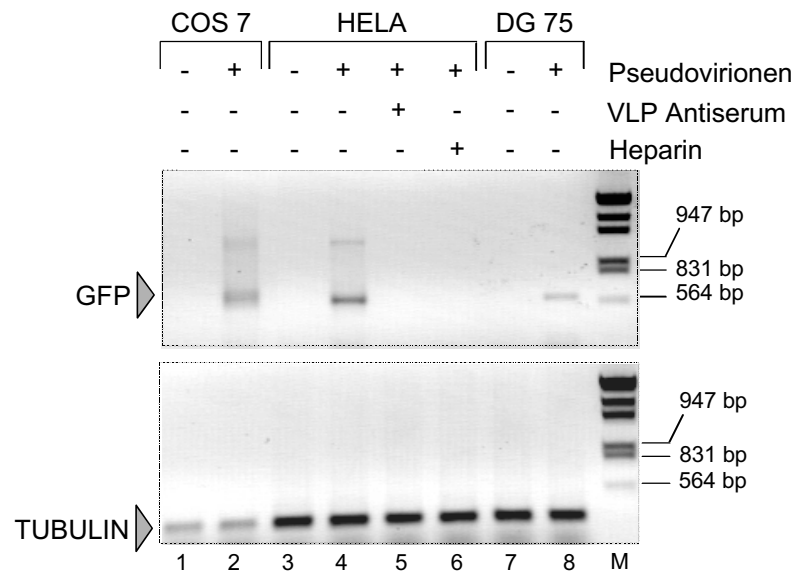


Abbildung 11: Infektion von COS7-, HeLa- und DG75-Zellen mit HPV33-Pseudovirionen. (A) DG75-Zellen exprimieren kein α_6 -Integrin. Im Durchflußzytometer zeigen Zellen, die mit dem α_6 -integrinspezifischen Antikörper GöH3 (dunkles Fluoreszenzprofil) und solche, die nur mit dem sekundären Antikörper (helles Fluoreszenzprofil) inkubiert wurden, das gleiche Fluoreszenzprofil. Die y-Achse des Histogramms stellt die Anzahl der Zellen, die x-Achse die Fluoreszenzintensität dar. (B) α_6 -Integrin ist für eine Infektion mit HPV33-Pseudovirionen nicht notwendig. RNA aus mit HPV33-Pseudovirionen infizierten (2, 4, 8) bzw. unbehandelten (1, 3, 7) COS7-, HeLa- und DG 75-Zellen wurde nach der RT-PCR einer *nested* PCR unterworfen. RNA aus HeLa-Zellen, die einer Infektion in Anwesenheit von Heparin (6) oder des neutralisierenden VLP-Antiserums K53 (5) unterzogen worden waren, wurde auf die gleiche Weise analysiert. Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Im unteren Abschnitt der Abbildung ist der Nachweis des Tubulins in den einzelnen RNA-Präparationen nach der RT-PCR dargestellt. M, Marker DNA (EcoRI/HindIII-geschnittene Lambda-Phagen-DNA).

3.1.3 Analyse der PCR-Produkte im Southernblot

Die Identität der PCR-Fragmente, die durch die Verwendung GFP-spezifischer Oligonukleotide erhalten wurden, sollte mit Hilfe der Technik des Southernblots zusätzlich verifiziert werden. Die *nested* PCR-Produkte aus infizierten und nicht behandelten Zellen wurden im Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot mit einer radioaktiv markierten GFP-Sonde hybridisiert (Abbildung 12). Die GFP-Sonde hybridisierte spezifisch mit allen PCR-Produkten aus den infizierten Zellen (Spuren 5, 7, 8) und dem GFP-Fragment, das als Sonde

diente (Spur 2), aber weder mit dem Tubulinfragment (Spur 3) noch mit Fragmenten des DNA-Markers (Spur 1).

Der Southernblot bestätigt, daß das DNA-Fragment, welches durch die *nested* PCR infizierter Zellen amplifiziert wird, eindeutig Sequenzen des GFP-Gens darstellt. Die RT-PCR eignet sich somit zum sensitiven Nachweis von Infektionsereignissen in Zelllinien, die durch das GFP-Reporterplasmid enthaltende Pseudovirionen infiziert wurden.

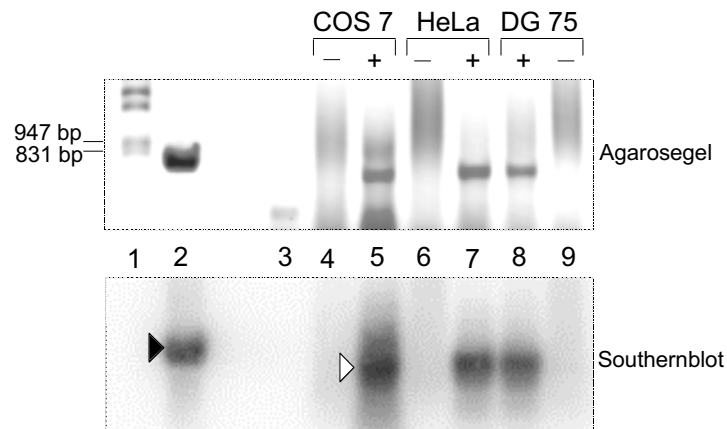


Abbildung 12: Southernblotanalyse der PCR-Produkte. PCR-Fragmente aus infizierten (5, 7, 8) bzw. nichtinfizierten (4, 6, 9) COS7-, HeLa- und DG75-Zellen wurden im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (Agarosegel) bzw. nach Transfer auf eine Nylonmembran mit einer GFP-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (Southernblot). Als Positivkontrolle diente DNA des GFP-Gens (Spur 2), die durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid pEGFP-C1 gewonnen wurde und nach radioaktiver Markierung als GFP-Sonde diente. Das Tubulinfragment (Spur 3) stellte die Negativkontrolle dar. Auf Spur 1 ist der Lambda-DNA-Marker aufgetragen. Dunkle Pfeilspitze: GFP-Sonde. Helle Pfeilspitze: PCR-Produkte.

3.1.3 Einfluß verschiedener VLPs auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

Die Diskrepanz zwischen meinen Ergebnissen und denen der Arbeitsgruppe von M. Evander warf die Frage auf, ob es einen allgemeingültigen Rezeptor für humane Papillomviren gibt, oder ob unterschiedliche Papillomvirustypen verschiedene Rezeptoren bevorzugen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Kompletionsversuch mit typspezifischen VLPs durchgeführt. COS7-Zellen wurden mit sättigenden Mengen (etwa $15 \mu\text{g}$ auf 7×10^4 Zellen) von VLPs der HPV-Typen 11, 16, 33 oder 39 vorinkubiert und anschließend mit HPV33-Pseudovirionen infiziert (Abbildung 13B). Alle getesteten HPV-Typen konnten die Infektion reduzieren. Daß das Ausmaß der Inhibition mit 61% (HPV11), 52% (HPV39), 47% (HPV16) und 32% (HPV33) unterschiedlich war, beruht wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Kapsidmengen (Abbildung 13A). Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, daß die Konkurrenz mit HPV33-VLPs den geringsten inhibierenden Effekt auf die Infektion mit

HPV33-Pseudovirionen hatte. Das Ergebnis zeigt, daß VLPs verschiedener HPV-Typen um die Bindungsrezeptoren von HPV33-Pseudovirionen kompetieren können.

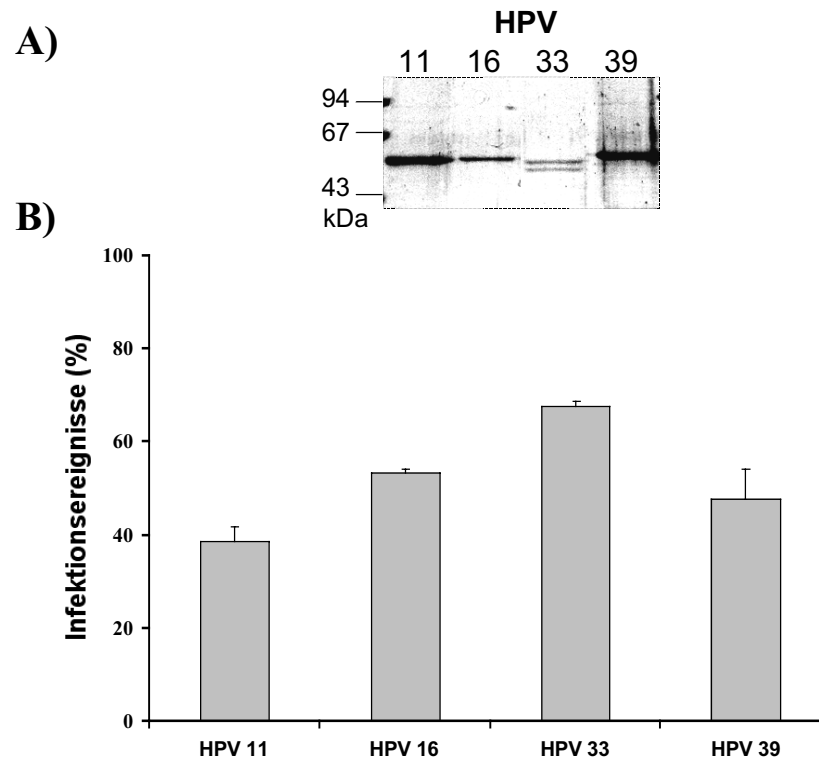


Abbildung 13: Inhibition der HPV33-Infektion durch VLPs verschiedener HPV-Typen. (A) comassiegefärbtes Polyacrylamidgel der HPV11-, HPV16-, HPV33- oder HPV39-Kapside. Zu sehen ist das jeweilige, typspezifische L1-Protein. (B) Konkurrenz der Kapside im Infektionstest. COS7-Zellen wurden mit HPV11-, 16-, 33-, und -39-VLPs eine Stunde auf Eis vorinkubiert und danach mit HPV33-Pseudovirionen infiziert. Nach 72 Stunden erfolgte die Auswertung. Die Anzahl der Infektionsereignisse ohne Zugabe von VLPs wurde mit 100% Infektiosität festgelegt.

3.2 Die Rolle von Heparansulfatproteoglykanen bei der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

3.2.1 Bindung von HPV-VLPs an Heparin-BSA

Heparansulfatproteoglykane (HSPG) werden von vielen Viren als primäre Interaktionspartner auf der Zelloberfläche genutzt (Bernfield *et al.*, 1999). Die Bedeutung von HSPG im Infektionszyklus von Papillomviren sollte mit Hilfe von Pseudovirionen überprüft werden. Zunächst wurde die Interaktion zwischen Heparin und HPV33-VLPs mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens *in vitro* untersucht. Steigende Mengen an HPV33-VLPs wurden auf Heparin-

BSA-beschichtete Mikrotiterplatten gegeben und gebundene Kapside mit Hilfe des polyklonalen, HPV33-spezifischen Antiserums K53, bzw. mit dem monoklonalen Antikörper J3 nachgewiesen (Abbildung 14). Mit zunehmender VLP-Menge stieg die Bindung an die Heparin-BSA-Platten linear an. Gebundene VLPs konnten sowohl mit K53 als auch mit J3 nachgewiesen werden. Da K53 durch die Immunisierung mit VLPs aus Insektenzellen gewonnen worden war und die hier verwendeten VLPs ebenfalls aus Insektenzellen präpariert wurden, konnte durch den Nachweis mit J3 ausgeschlossen werden, daß die mit K53 beobachtete Reaktivität auf einer unspezifischen Interaktion mit kontaminierendem Protein beruht. Eine signifikante Interaktion zwischen VLPs und BSA-beschichteten Kontrollplatten konnte nicht nachgewiesen werden.

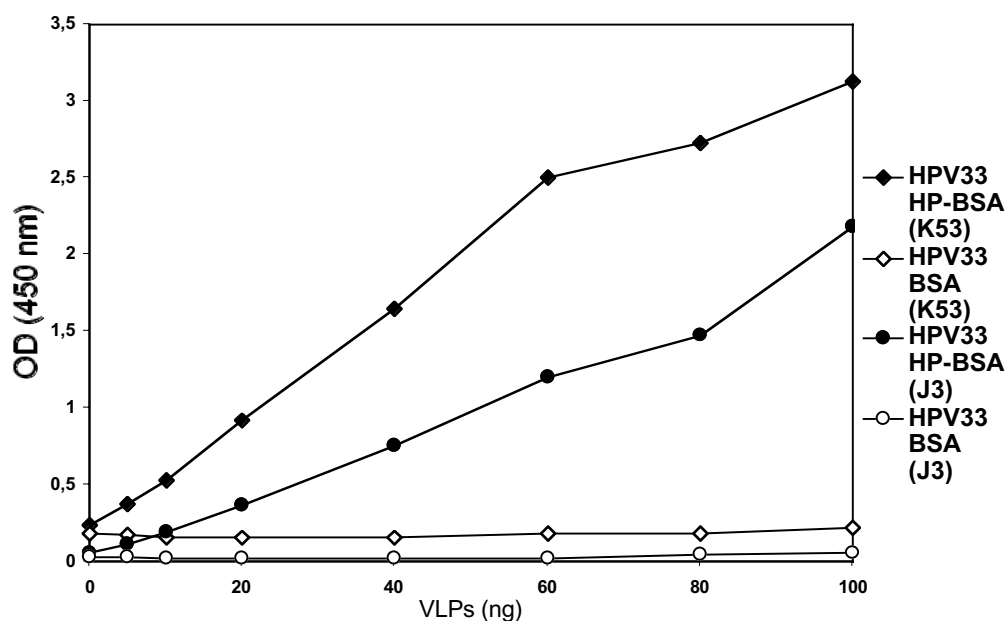


Abbildung 14: HPV33-VLPs interagieren spezifisch mit Heparin. HPV33-VLPs wurden in steigenden Mengen mit Heparin-BSA- bzw. BSA-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Gebundene VLPs wurden mit dem HPV33-spezifischen, polyklonalen Antiserum K53 und mit dem monoklonalen Antiserum J3 in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. 1:100 detektiert.

Durch die Verwendung des Heparin-BSA-ELISAs konnte eine Bindung von HPV33-VLPs an immobilisiertes Heparin demonstriert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Interaktion HPV33-spezifisch ist, oder ob andere HPV-Typen ebenfalls an Heparin binden können. Dazu wurden neben HPV33-VLPs auch HPV16- und HPV39-VLPs in steigenden Mengen auf Heparin-BSA beschichtete Platten gegeben und mit typspezifischen Antiseren nachgewiesen. Wie in Abbildung 15 demonstriert, können sowohl HPV16- als auch HPV39-VLPs an Heparin binden. Während bei HPV16 die Bindung linear ansteigt, verläuft

die Kurve bei HPV39 sigmoidal. Ferner zeigt das HPV39-Antiserum eine erhöhte Reaktivität mit BSA-beschichteten Platten. Offensichtlich ist die Bindung an Heparin keine HPV33-spezifische Eigenschaft, sondern auch für andere HPV-Typen charakteristisch.

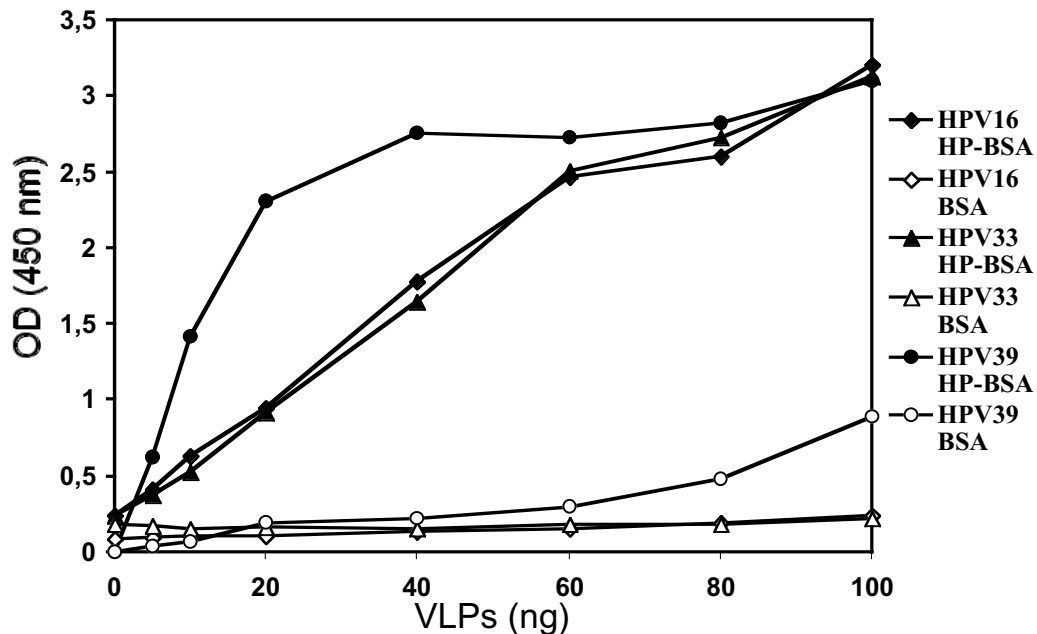


Abbildung 15: Die Bindung von HPV an Heparin ist nicht typspezifisch. HPV16-, 33- und 39-VLPs wurden in steigenden Mengen mit Heparin-BSA-, bzw. BSA-beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert und mit den polyklonalen Antiseren K53 (Anti-HPV33), K58 (Anti-HPV16) und Anti-HPV39 in einer 1:1000 Verdünnung nachgewiesen.

3.2.2 Einfluß von Glykosaminoglykanen auf die Interaktion zwischen HPV33-VLPs und Heparin

Um die Spezifität der Wechselwirkung zwischen HPV und Heparin weiter zu charakterisieren, wurde die Bindung von HPV33-VLPs in Anwesenheit von gelöstem Heparin, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat durchgeführt. Dazu erfolgte eine einstündige Vorinkubation der VLPs mit den entsprechenden Konzentration der Glykosaminoglykane (GAG), gefolgt von einer Bindung an Heparin-BSA-ELISA-Platten in Anwesenheit der GAG (Abbildung 16). Allein Heparin zeigt eine nennenswerte Reduktion der Bindung. Bereits 2,5 µg/ml Heparin reduzierten die Bindung um 50% ($IC_{50}=125$ nM). Dermatansulfat zeigte nur einen geringen Einfluß auf die Bindung. Chondroitinsulfat hingegen hatte keinen Effekt auf die Interaktion zwischen VLPs und Heparin-BSA. Die Heparinbindung der HPV33-VLPs konnte auch mit einer Konzentration von 200 µg/ml GAG nicht über die Hintergrundbindung

hinaus reduziert werden (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß HPV33-VLPs spezifisch an Heparin-BSA binden und daß diese Interaktion durch gelöstes Heparin, nicht aber Chondroitin- oder Dermatansulfat inhibiert werden kann. Offenbar findet zwischen HPV33-VLPs und den anderen GAG keine oder nur eine schwache Interaktion statt.

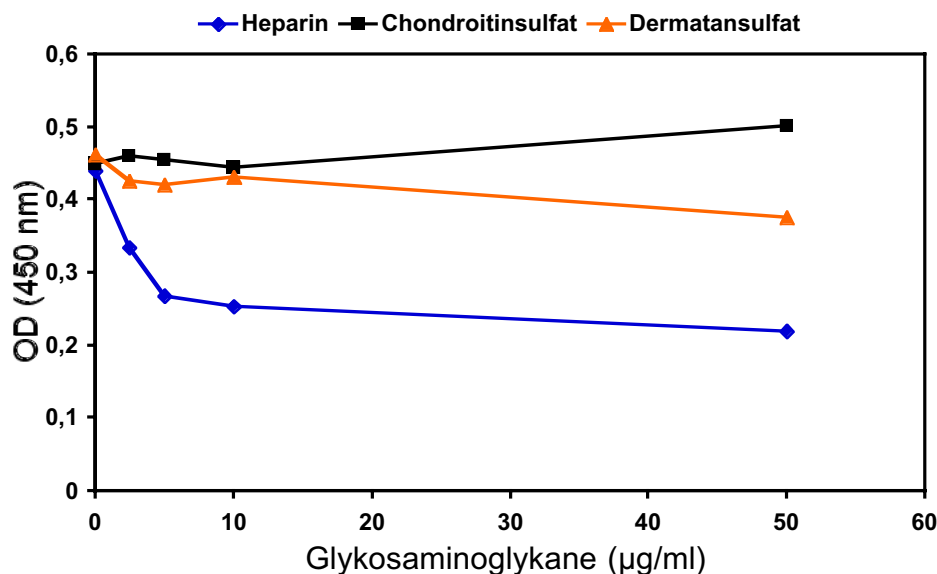


Abbildung 16: Heparin, aber nicht Chondroitin- oder Dermatansulfat, kann die Bindung von HPV33-VLPs an Heparin inhibieren. 15 ng VLPs wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Heparin, Chondroitin- und Dermatansulfat eine Stunde bei 37° C vorinkubiert und anschließend an Heparin-BSA gebunden. Der Nachweis gebundener VLPs erfolgte mit dem polyklonalen Antiserum K53.

3.2.3 Einfluß von Glykosaminoglykanen auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

Nachdem „*in vitro*“ eine Interaktion zwischen VLPs und Heparin nachgewiesen werden konnte, sollten die Ergebnisse im Infektionsnachweis überprüft werden. Dies sollte Auskunft darüber geben, inwieweit die beobachtete Bindung für die Infektion relevant ist. Analog zum Heparin-BSA-ELISA wurden Pseudovirionen mit steigenden Konzentrationen an GAG vorinkubiert und anschließend im Infektionstest eingesetzt (Abbildung 17). Heparin hatte einen eindeutig inhibierenden Effekt auf die Infektion. Bei einer Konzentration von 40 µg/ml im Infektionstest (Endkonzentration !) konnte kein Infektionsereignis mehr nachgewiesen werden. Chondroitinsulfat hingegen hatte auch bei höheren Konzentrationen keinen, Dermatansulfat nur einen minimal inhibierenden Effekt. Für Heparin konnte ein IC₅₀ von ~450 nM (9 µg/ml) abgeleitet werden. Auch HPV16-Pseudovirionen, die mit Heparin

vorinkubiert wurden, zeigten eine reduzierte Infektiosität. Eine vollständige Inhibition konnte erst bei 80 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden. Der IC_{50} betrug hier ~ 650 nM (13 $\mu\text{g/ml}$).

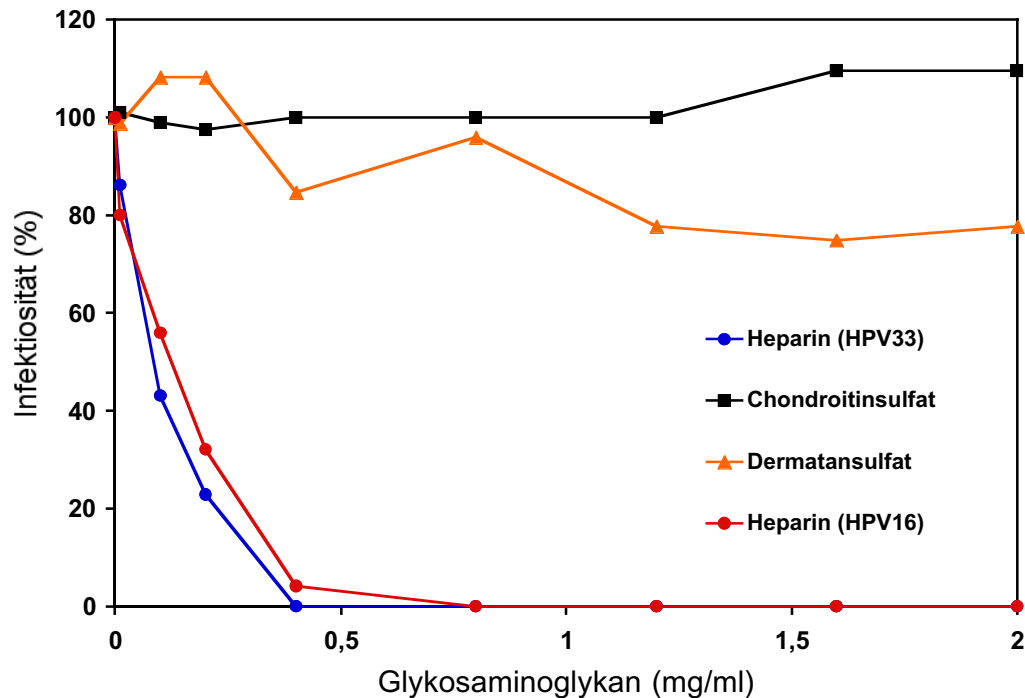


Abbildung 17: Heparin inhibiert die Infektion mit HPV33- und HPV16-Pseudovirionen. Pseudovirionen wurden mit steigenden Mengen an GAG eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert und anschließend 1:10 in PBS/BSA verdünnt und für die Infektion von COS 7-Zellen verwendet. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Vorinkubation. Die Anzahl der infizierten Zellen ohne Inhibitor wurde gleich 100% gesetzt.

3.2.4 Einfluß von Heparin auf die Infektion bei einer Applikation vor, während und nach der Pseudovirionenbindung

Um auszuschließen, daß der Einfluß von Heparin auf die Infektion mit Pseudovirionen durch eine nachteilige Beeinflussung der Zellvitalität oder -funktion bewirkt wird, wurde Heparin zu verschiedenen Zeitpunkten im Versuchsablauf appliziert. Die Zellen wurden vor, während und nach der Adsorption der Pseudovirionen mit Heparin inkubiert. Wurden die Zellen mit Heparin vorbehandelt, so wurde ungebundenes Heparin vor Zugabe der Pseudovirionen gewaschen. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, hatte die Inkubation der Zellen mit Heparin vor der Zugabe der Pseudovirionen keinen nennenswerten Einfluß auf die Infektion. War Heparin jedoch während und sogar nach der Bindung der Pseudovirionen anwesend, so wurde die Infektion konzentrationsabhängig inhibiert. Dabei führte die Anwendung während und nach der Adsorption zur vergleichbaren Reduktion der Infektionsereignisse.

Heparin hat somit keinen schädlichen Einfluß auf die Zellen. Da der Einfluß der GAG in der

Infektion vollständig mit den vorhergehenden Ergebnissen im Heparin-BSA-ELISA übereinstimmt, kann man vermuten, daß die Reduktion der Infektiosität auf der Inhibition der Interaktion zwischen Pseudovirionen und dem Heparinanalogen auf der Zelloberfläche beruht. Diese Wechselwirkung scheint anfänglich so schwach zu sein, daß sie nachträglich durch Zugabe von Heparin rückgängig gemacht werden kann.

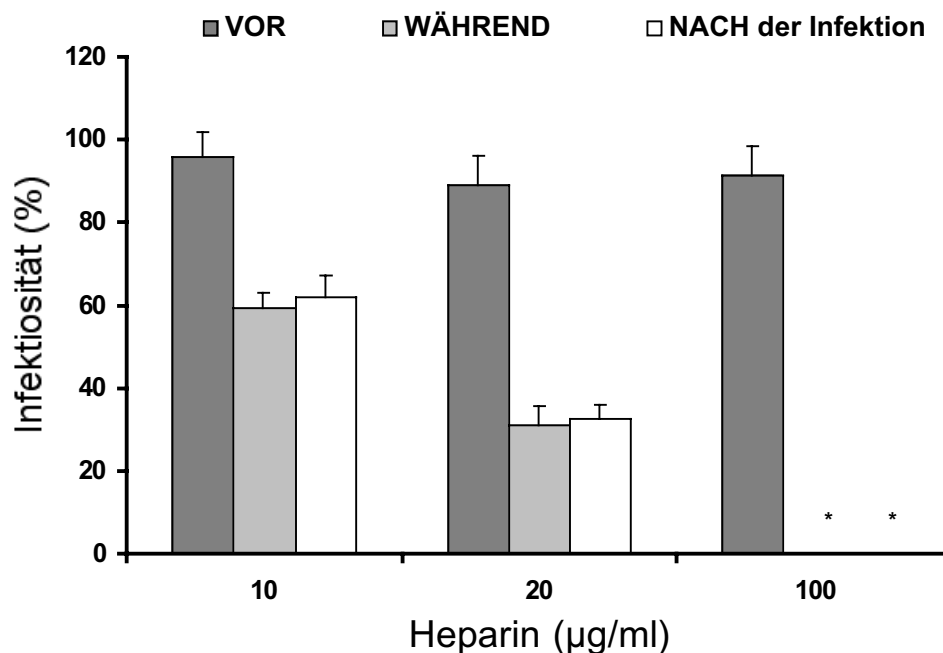


Abbildung 18: Heparin inhibiert die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen, wenn es während und nach der Bindung zugegen wird. Adhärente COS 7-Zellen wurden mit den entsprechenden Heparinmengen vor, während und nach der Pseudovirionenbindung behandelt. Nach der Heparininkubation wurden die Zellen mit Bindungspuffer gewaschen. *: vollständige Hemmung der Infektion.

3.2.5 Einfluß von Heparinase I auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

Bei Heparin handelt es sich um ein aus Mastzellgranula gereinigtes Proteoglykan, das in dieser Form auf der Zelloberfläche nicht vorkommt. Daher sollte untersucht werden, ob die chemisch mit Heparin verwandte Heparansulfatkomponente von Proteoglykanen der Zelloberfläche, für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen wichtig ist. Dazu wurden COS7-Zellen mit steigenden Konzentrationen an Heparinase I inkubiert (1-20 U), einem Enzym, das spezifisch Heparansulfatketten abspaltet (Ernst *et al.*, 1998; Linhardt *et al.*, 1986), intensiv mit PBS gewaschen und im Infektionstest eingesetzt (Abbildung 19). Bereits die Inkubation der Zellen mit einer Einheit (U) Heparinase I bewirkte eine Reduktion der Infektion auf 8%. 2,5U waren ausreichend, um eine Infektion der Zellen durch Pseudovirionen vollständig zu

unterbinden. In der FACS-Analyse konnte die Abspaltung des Heparansulfats mit dem heparinreaktiven Antikörper E12 nachgewiesen werden (Abbildung 20).

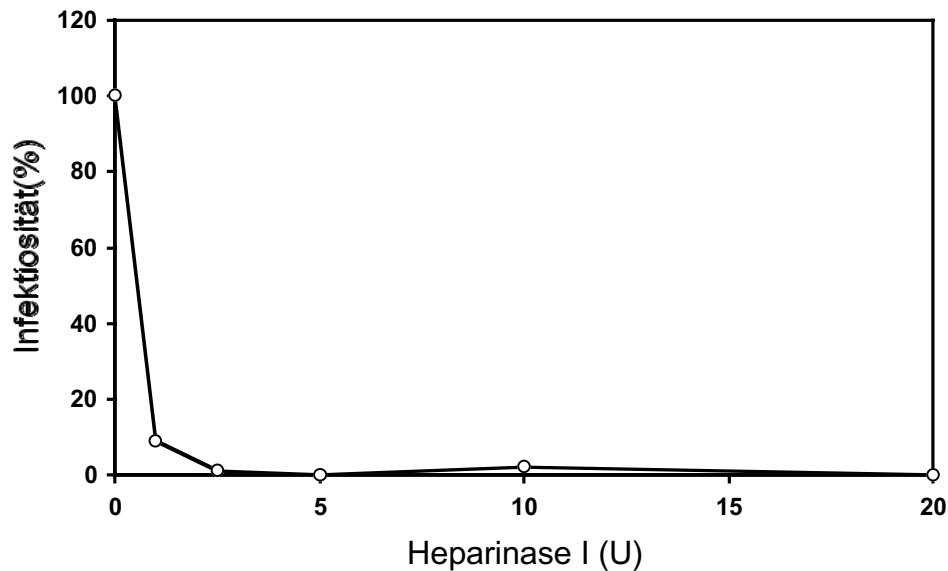


Abbildung 19: Heparinase I-behandelte COS 7-Zellen werden durch HPV33-Pseudovirionen nicht infiziert. COS 7-Zellen wurden mit Heparinase I in den angegebenen Einheiten eine Stunde bei 37° C inkubiert und anschließend im Infektionstest eingesetzt. Die Infektionsereignisse ohne Heparinase I wurden gleich 100% gesetzt.

Die Hemmung der Infektion durch die enzymatische Behandlung der Zellen ist ein deutlicher Beleg für die Wichtigkeit von Heparansulfatproteoglykanen bei der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. Die Behandlung der Zellen mit Heparinase I hatte keinen Einfluß auf die Präsenz von α_6 -Integrin, wie durch FACS-Analysen bestätigt wurde (Abbildung 20). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß α_6 -Integrin allein für eine Infektion nicht ausreichend ist und daß die Reduktion der Infektiosität tatsächlich auf dem Verlust von Heparansulfatketten auf der Zelloberfläche beruht.

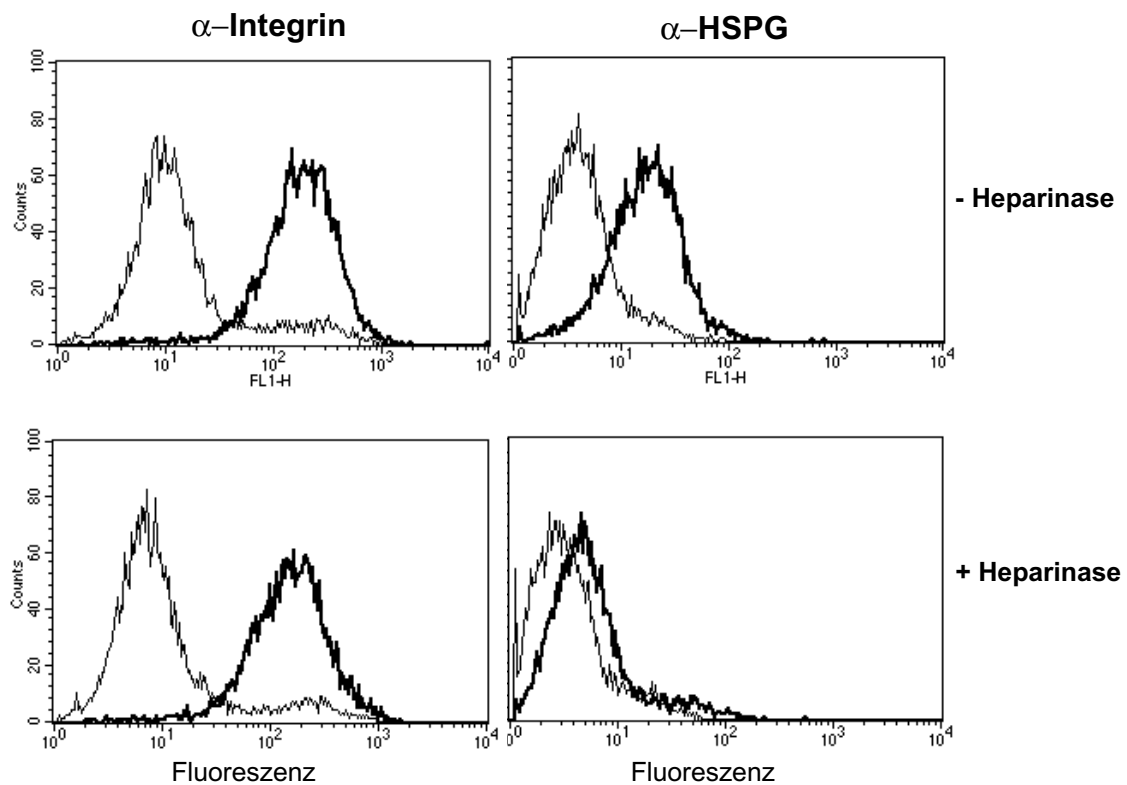


Abbildung 20: Die Heparinase I-Behandlung von COS7-Zellen führt zum Abbau von Heparansulfat, hat aber keinen Einfluß auf die Menge von α_6 -Integrin. (oben) Expression von α_6 -Integrin auf Heparinase I behandelten und unbehandelten Zellen. COS 7-Zellen wurden unbehandelt bzw. mit 10 U Heparinase I behandelt und anschließend nur mit dem sekundären (dünne Linie) oder zusätzlich mit dem integrinspezifischen Antikörper (dicke Linie) inkubiert. (unten) Präsenz von Heparansulfat auf Heparinase I-behandelten COS7-Zellen. COS 7-Zellen wurden unbehandelt bzw. mit 10 U Heparinase I behandelt und anschließend nur mit dem sekundären (dünne Linie) oder zusätzlich mit dem heparinreaktiven Antikörper E12 (dicke Linie) inkubiert.

3.2.6 Einfluß von NaClO_3 auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen

Da Chondroitin- und Dermatansulfat im Vergleich zu Heparin einen geringeren Grad an Sulfatierung besitzen, könnte der Sulfatgehalt für die Interaktion von Bedeutung sein. Verwendet man sulfatfreies Medium zur Kultivierung von Zelllinien, so beobachtet man eine reduzierte Sulfatierung der Proteoglykane. Da Serum reich an Sulfat ist, muß man die Zellen in serumfreiem Medium halten. Dadurch werden die Zellen bei suboptimalen Bedingungen gehalten, zudem ist die Kultivierung nur zeitlich begrenzt möglich. Durch Inhibitoren des 3'-Phosphoadenylylphosphosulfats (PAPS), der biologisch aktiven Form des Sulfats, läßt sich ebenfalls effizient eine Untersulfatierung erreichen. Chlorat ist solch ein Inhibitor, der zudem auch in serumhaltigem Medium wirkt. Zur besseren Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen HSPG und HPV33-Pseudovirionen wurde untersucht, inwieweit chloratbehandelte Zellen infizierbar sind. Adhärenz Zellen wurden 40 Stunden in Medium mit NaClO_3 -Konzentrationen von 20-80 mM kultiviert und anschließend im Infektionstest verwendet. Die

Zellen wiesen auch bei hohen Salzkonzentrationen keine erkennbaren morphologischen Veränderungen auf. Ein intensives Waschen der Zellen mit PBS sollte gewährleisten, daß Salzreste gänzlich entfernt werden und den Infektionstest nicht beeinflussen. Wie in Abbildung 21 gezeigt, reichten 20 mM Chlorat aus, um die Infektion merklich zu reduzieren. Bei einer Konzentration von 40 mM wurde die Infektion um 73% reduziert. Trotz Erhöhung der Salzkonzentration konnte keine vollständige Inhibition der Infektion erzielt werden.

Die Sulfatierung von Proteoglykanen spielt offensichtlich bei der Infektion eine Rolle. Vermutlich beruht die Interaktion zwischen HSPG und HPV33-Pseudovirionen auf elektrostatischen Wechselwirkungen.

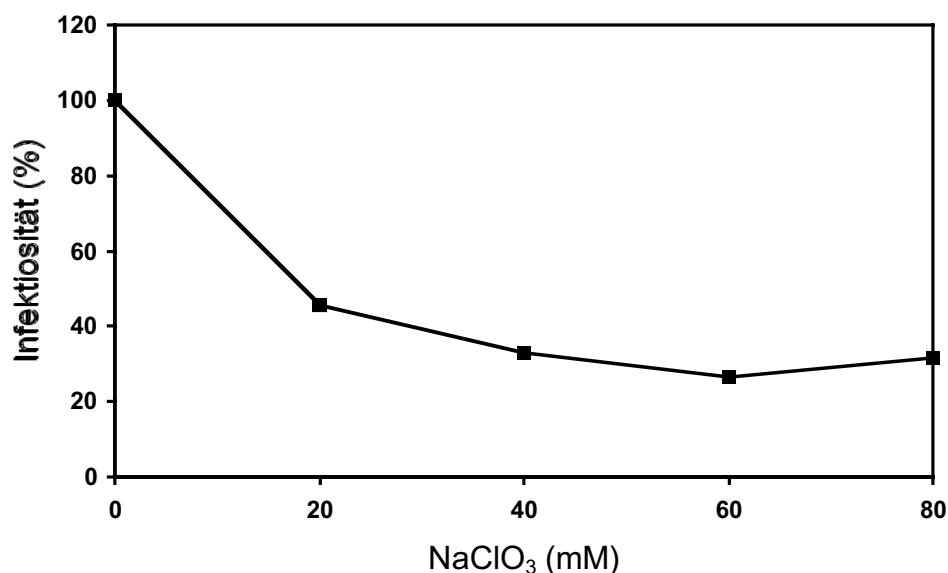


Abbildung 21: Eine Verminderung der Sulfatierung von HSPG reduziert die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. COS 7-Zellen wurden 40 Stunden in DMEM mit den entsprechenden NaClO₃-Konzentrationen kultiviert und nach mehrmaligem Waschen mit HPV33-Pseudovirionen infiziert. Infektionsereignisse bei unbehandelten Kontrollzellen wurden gleich 100% gesetzt.

3.2.7 Die Funktion des C-Terminus von HPV33-L1 bei der Interaktion mit HSPG

Der C-Terminus von HPV33-L1 weist durch eine Anhäufung basischer Aminosäuren eine hohe positive Ladungsdichte auf. Da, wie bereits beschrieben, die Sulfatierung und somit die negative Ladung der HSPG für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen wichtig ist, kann man vermuten, daß die Interaktion auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Heparansulfatketten und den positiv geladenen C-Termini der L1-Proteine in Pseudovirionen beruht. Nach Sequenzvergleich der C-terminalen Region verschiedener Papillomviren postulierten Joyce und Mitarbeiter (1999) für HPV11 ein basisches

Heparinbindungsmotiv (BBXB, wobei B eine basische Aminosäure bedeutet). Im L1-Protein des HPV33 findet sich ebenfalls eine solche Konsensussequenz (Abbildung 22).

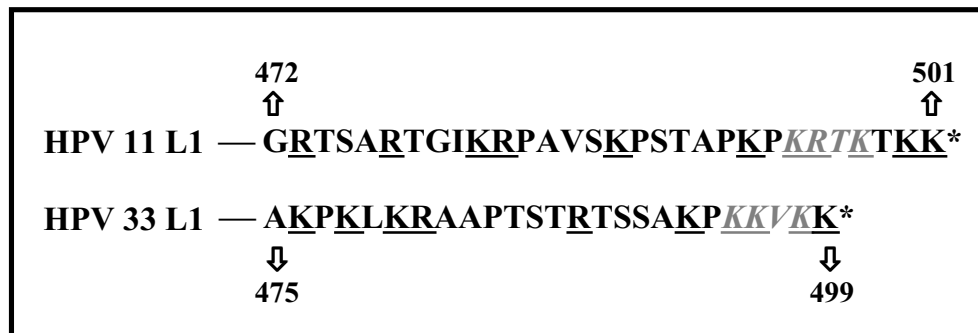
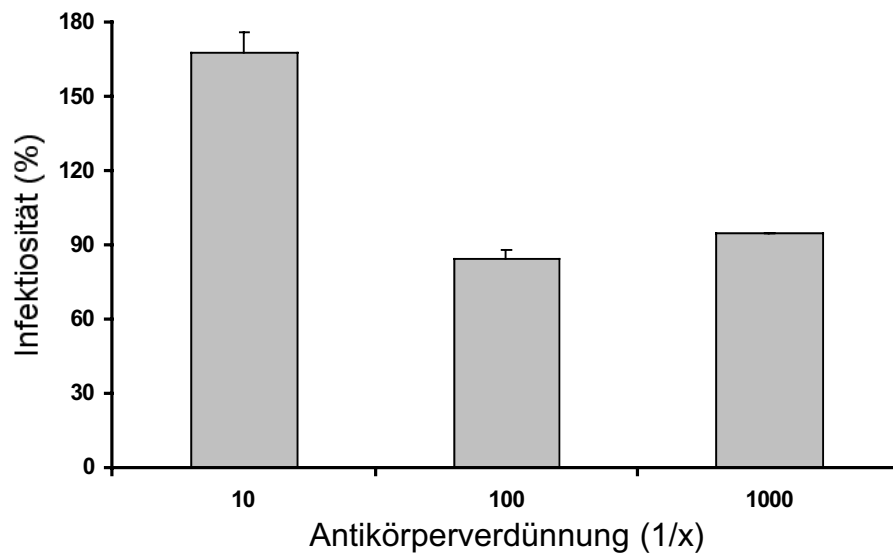


Abbildung 22: Sequenz der letzten 25 Aminosäuren des HPV11 und HPV33L1-Proteins. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt (Codeschlüssel siehe Anhang). Die basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) sind unterstrichen. Die Zahlen an der Pfeilspitze geben die jeweilige Position der Aminosäure im L1-Protein an. Demnach ist HPV33L1 499 und HPV11L1 501 Aminosäuren lang. Graue, kursive Buchstaben kennzeichnen Aminosäuren, die das Heparinbindungsmotiv (BBXB) bilden. Sternchen signalisieren das Proteinende.

Um die Rolle dieser Aminosäuresequenzen für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen zu untersuchen, wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt.

Ein synthetisches Peptid (Firma BioScience) aus den letzten 15 Aminosäuren des HPV33L1-Proteins wurde in einem Competitionsexperiment verwendet. COS7-Zellen wurden eine Stunde mit dem synthetischen Peptid vorinkubiert und mit HPV33-Pseudovirionen für eine weitere Stunde infiziert (Abbildung 23A). Parallel dazu wurden Pseudovirionen mit dem polyklonalen Kaninchenantiserum K890 in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubiert und im Infektionstest mit nicht vorbehandelten COS7-Zellen eingesetzt (Abbildung 23B). Das Antiserum wurde nach Immunisierung mit dem C-terminalen Peptid gewonnen (Firma BioScience). Obwohl dieses Antiserum im Westernblot HPV33-L1 erkennt (C. Fligge, persönliche Mitteilung) und die ebenfalls C-terminal lokalisierte DNA-Bindungsaktivität von HPV33-L1 inhibiert (F. Schäfer, persönliche Mitteilung), zeigen die Infektionstests, daß weder die Competition mit dem Peptid, noch die Anwendung des Antiserums zu einer signifikanten Reduktion der Infektion führt.

A)



B)

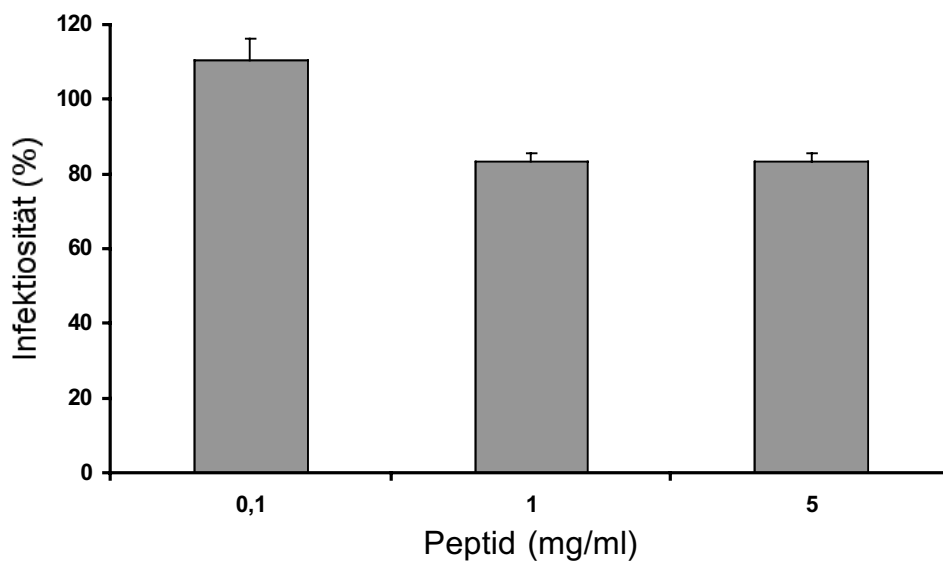


Abbildung 23: Einfluß des C-terminalen Peptids und des dagegen gerichteten Antiserums auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. (A) Einfluß des Peptid-Antiserums auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. Pseudovirionen wurden mit dem Antiserum K 890 in der entsprechenden Verdünnung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Infektionstest eingesetzt. (B) Einfluß des C-terminalen Peptids auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. COS 7-Zellen wurden mit dem C-terminalen Peptid in den oben genannten Konzentrationen vorinkubiert und mit HPV33-Pseudovirionen infiziert. In beiden Versuchen erfolgte die Auswertung nach 72 Stunden. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen ohne Vorbehandlung wurde gleich 100% gesetzt.

Deletiert man im C-Terminus von HPV33L1 die letzten 7 bzw. 22 Aminosäuren, sind die Proteine immer noch in der Lage, VLPs zu bilden (L. Florin, persönliche Mitteilung). Durch die Verwendung dieser L1-Deletionsmutanten sollte der Befund, daß der C-Terminus im L1-Protein bei der Interaktion mit Heparin und somit bei der Infektion keine Rolle spielt,

erhärtet werden. Dazu habe ich die C-terminal deletierten 1/477- und 1/492-VLPs (von F. Schäfer bereitgestellt) im Heparin-BSA-ELISA auf ihre Fähigkeit zur Heparinbindung untersucht. Dazu wurden steigende Mengen der VLPs auf die Heparin-BSA-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und anschließend mit Hilfe des HPV33-spezifischen Antiserums K53 nachgewiesen. BSA-beschichtete ELISA-Platten dienten als Kontrolle (Abbildung 24). Die graphische Auswertung der Daten zeigt deutlich, daß sowohl 1/492- als auch 1/477-VLPs Heparin binden können. Die höhere Reaktivität der 1/477 VLPs ist vermutlich auf die bessere Qualität der Kapsidpräparation zurückzuführen, da diese VLPs stabiler sind als die 1/492-VLPs.

Für die Interaktion mit Heparin, bzw. mit HSPG ist der C-Terminus des HPV33L1-Proteins trotz einer vermeintlichen Heparinbindungssequenz allein nicht ausreichend.

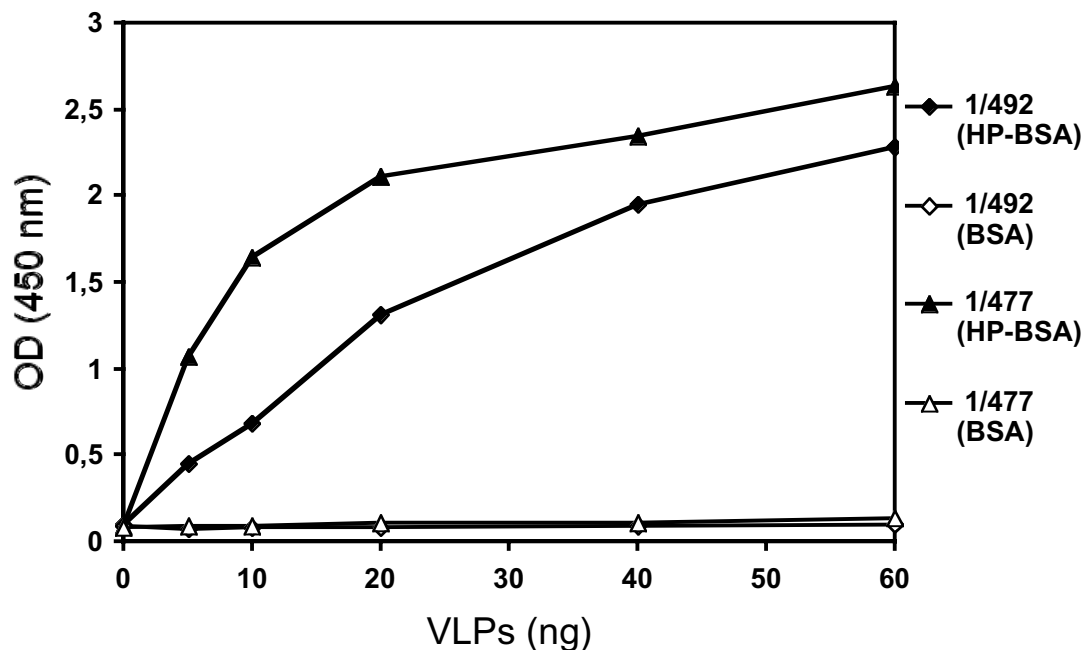


Abbildung 24: Bindung der C-terminal deletierten VLPs 1/477 und 1/492 an Heparin-BSA. Jeweils steigende Mengen der Deletionsmutanten wurden mit Heparin-BSA oder BSA-beschichteten ELISA-Platten inkubiert. Gebundene VLPs wurden mit Hilfe des Kaninchenantiserums K53 nachgewiesen.

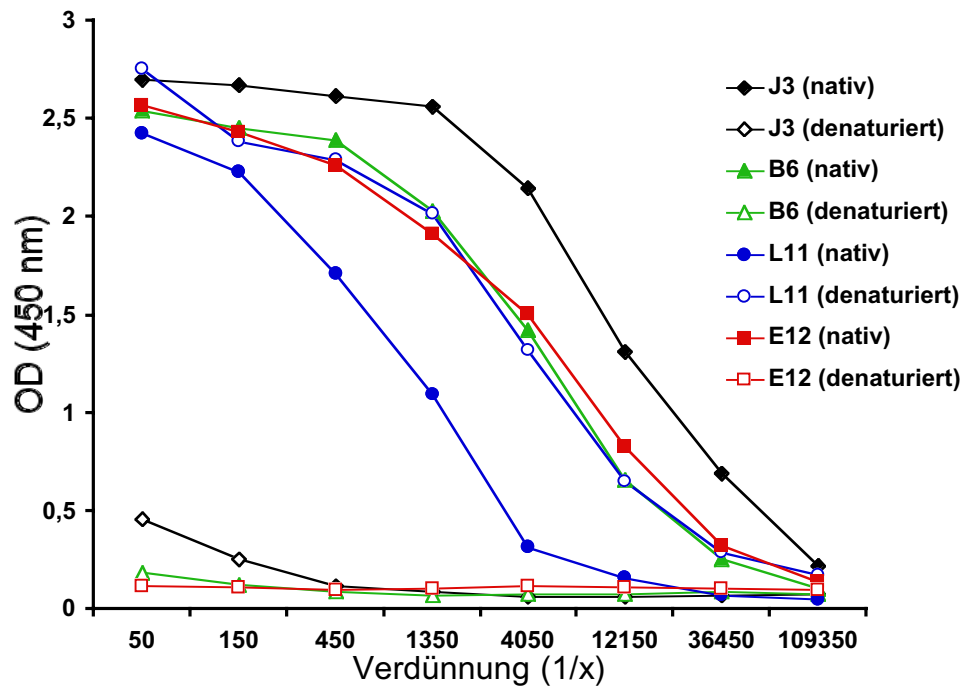
3.2.8 Die antikörpervermittelte Inhibition der HSPG-Interaktion als möglicher Mechanismus der Virusneutralisation

Ein Hinweis auf die Authentizität von Pseudovirionen als Modell für echte Virionen ist die Neutralisation der Pseudoinfektion durch typspezifische Antikörper. Die Neutralisation ist auf zwei Ebenen möglich. Der Antikörper kann die Bindung des Virions an die Zelle unterbinden oder in spätere, postadsorptive Mechanismen eingreifen und dadurch eine Infektion verhindern. Mit Hilfe von HPV33-spezifischen, monoklonalen Antikörpern sollte untersucht werden, ob das Besetzen der Heparinbindungsstelle am Virion möglicherweise ein Mechanismus der Neutralisation ist. Erkennt der Antikörper diese Bindungsstellen, so wird der erste Schritt der Infektion blockiert, nämlich die Bindung an die Zelle über Heparansulfatproteoglykane. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Heparin-BSA-ELISA-Verfahren herangezogen.

Die Reaktivität von vier monoklonalen, HPV33L1-typspezifischen Antikörpern (J3, B6, E12 und L11) mit HPV33-VLPs wurde zunächst im ELISA überprüft (Abbildung 25A). Hier reagierten alle vier Antikörper mit nativen HPV33-VLPs, während L11 im Gegensatz zu den anderen Antikörpern zusätzlich auch mit denaturiertem L1 reagierte. Anschließend wurden die Antikörper im Infektionstest auf ihr neutralisierendes Potential untersucht (Abbildung 25B). Dabei zeigte sich, daß B6 und E12 sehr gut, J3 nur teilweise und L11 nicht neutralisierend auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen wirkte. B6 und E12 wirkten noch bei einer 1:100 Verdünnung vollständig neutralisierend, während J3 selbst bei der höchsten Konzentration eine Infektion mit HPV33-Pseudovirionen nicht vollständig unterbinden konnte. Der monoklonale Antikörper L11, der im ELISA auch denaturierte VLPs erkannte, hatte keinerlei neutralisierende Wirkung.

Die Versuche bestätigen, daß neutralisierende Antikörper konformationelle Epitope erkennen. Während die monoklonalen Antikörper B6, E12 und J3, die nur mit nativen VLPs interagierten, eine Infektion mit HPV33 neutralisieren konnten, hatte L11, das offenbar gegen ein lineares Epitop gerichtet ist, keinen Einfluß auf die Infektion.

A)



B)

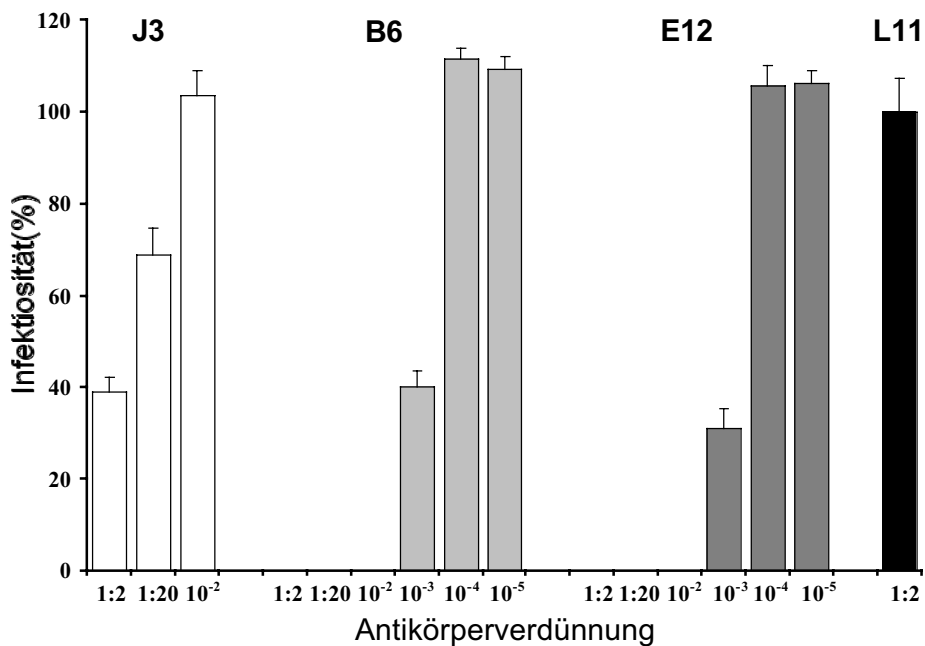


Abbildung 25: Charakterisierung der monoklonalen Antikörper J3, B6, E12 und L11. (A) Reaktivität mit HPV33-VLPs im ELISA. 300 ng HPV33-VLPs wurden über Nacht an ELISA-Platten gekoppelt. Hiernach wurden die Platten mit den Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen inkubiert und photometrisch ausgewertet. (B) Neutralisation von HPV33-Pseudovirionen. Pseudovirionen wurden mit den Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen vorbehandelt und anschließend mit COS7-Zellen inkubiert. Der Infektionstest wurde nach 72 h ausgewertet. Die Infektiosität ohne Zugabe von Antikörper wurde gleich 100% gesetzt.

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit HPV33-VLPs, die mit den neutralisierenden Antikörpern J3, B6 und E12 vorinkubiert wurden, noch mit Heparin-BSA interagieren können (Abbildung 26). In der Positivkontrolle wurden die VLPs zunächst an Heparin-BSA gekoppelt und erst im zweiten Schritt mit den Antikörpern inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde der nicht neutralisierende Antikörper L11 mitgeführt. Ferner wurde geprüft, inwieweit die Antikörper allein mit Heparin-BSA reagieren (Negativkontrolle).

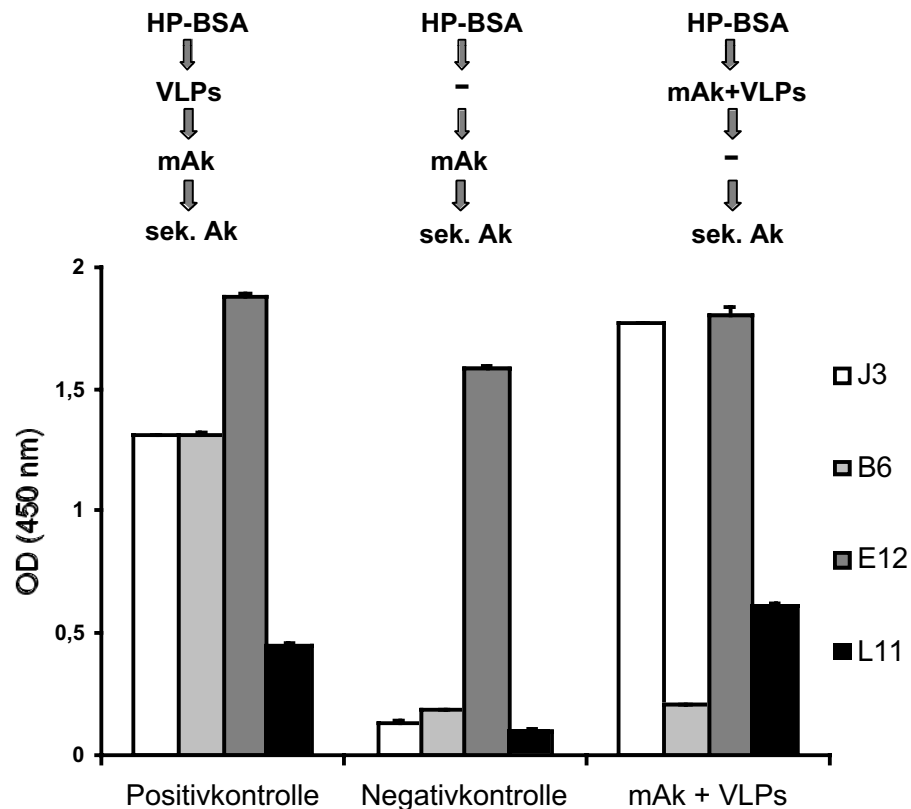


Abbildung 26: B6, aber nicht J3, E12 oder L11 inhibiert die Interaktion zwischen HPV33-VLPs und Heparin-BSA. 50 ng VLPs wurden mit den verschiedenen Antikörpern in einer Verdünnung von 1:100 bei 4° C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde untersucht, ob die so vorbehandelten VLPs an Heparin-BSA binden können. Als Positivkontrolle dienten 50 ng VLPs (ohne Antikörpervorinkubation), die nach der Kopplung an Heparin-BSA durch Zugabe der mAk nachgewiesen wurden. Entsprechend enthielt die Negativkontrolle anstelle der VLPs nur PBS (siehe dazu das aufgeführte Fließdiagramm).

Erwartungsgemäß zeigte L11 keinen signifikanten Unterschied im Versuchsansatz und in der Positivkontrolle. L11 hat anscheinend keinen Einfluß auf die Heparinbindung. Dementsprechend binden VLPs mit und ohne Antikörper ähnlich gut an Heparin-BSA. Der gut neutralisierende Antikörper B6 hingegen interferiert deutlich mit der Bindung der VLPs an Heparin. Die mit dem Antikörper vorinkubierten VLPs banden nur in sehr viel geringerem Maße an Heparin-BSA als die VLPs allein in der Positivkontrolle. J3 verhielt sich im

wesentlichen wie L11, indem zwischen Positivkontrolle und dem Versuchsansatz kein wesentlicher Unterschied festzustellen war. J3 beeinflußt somit nicht die Bindung an Heparin. Dies gilt vermutlich auch für E12. Erstaunlicherweise reagierte dieser Antikörper bereits allein mit Heparin-BSA (Negativkontrolle), während die restlichen Antikörper nur eine vernachlässigbare Bindung an Heparin-BSA aufweisen. Offenbar zeigt E12 eine Kreuzreaktivität mit Heparin (vergleiche auch Abbildung 20). Eine Bindung an BSA-beschichtete Platten konnte weder mit E12 noch mit den anderen Antikörpern nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Neutralisation durch den monoklonalen Antikörper B6 beruht wahrscheinlich auf der Inhibition der HSPG-Bindung. Die übrigen, neutralisierenden Antikörper interferieren vermutlich mit einem späteren Schritt der Infektion.

3.2.9 Kinetik der Pseudovirioneninfektion

Von einigen Viren ist bekannt, daß sie bei der Aufnahme in einem mehrstufigen Prozeß nacheinander verschiedene Rezeptoren nutzen (Haywood, 1994). Die Frage nach der Beteiligung sekundärer Rezeptoren bei der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Neutralisation gebundener Pseudovirionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bindung untersucht. Hierbei wurden Heparin und das Antiserum K53 bzw. der Antikörper E12 miteinander verglichen. Während Heparin lediglich die Bindung von Pseudovirionen aufhebt, sollte das Antiserum auch mit späteren Schritten im Infektionszyklus interferieren, also auch mit möglichen weiteren Rezeptoren. Die Neutralisation gebundener Pseudovirionen durch Antikörper kann dabei über mehrere Mechanismen erfolgen: (i) über das Verhindern des „uncoating“ des Virus (Virgin *et al.*, 1994), womit die Freisetzung des Nukleokapsids bzw. des viralen Genoms ins Zytoplasma gemeint ist, (ii) über antikörperbedingte Funktionsausfälle der viralen Proteine, deren einwandfreie Funktion zur Etablierung einer Infektion unabdingbar sind, (iii) über die Verhinderung der Endozytose (Virgin *et al.*, 1994) oder (iv) Neutralisation durch Virusaggregation (Dimmock, 1993). Da ein Virus nach der Penetration durch die Zellmembran für Antikörper nicht mehr zugänglich ist (Fukuhara *et al.*, 1988; Dimmock, 1993), kann die Restinfektiosität nach Zugabe des Antikörpers zu gebundenen Pseudovirionen als Internalisationsrate gewertet werden (Abbildung 27). Die Kinetik der Infektion weist auf eine sehr langsame Aufnahmerate für HPV33-Pseudovirionen hin. Sogar vier Stunden nach der Bindung konnte das Antiserum die Infektion vollständig unterdrücken. Bemerkenswerterweise waren zehn Stunden nach der

Pseudovirionenbindung erst 20% der maximal möglichen Infektionsereignisse realisiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers E12 erzielt. Die beiden Antikörper weisen nur geringfügige Unterschiede im zeitlichen Verlauf ihrer inhibierenden Wirkung auf. Wurde jedoch Präimmunsrum auf gebundene Pseudovirionen gegeben, konnte keine Hemmung der Infektion beobachtet werden. Die Heparinkurve hingegen ist gegen die Antikörperkurven um etwa vier Stunden verschoben. Bereits nach zwei Stunden beginnt die Pseudovirionenbindung gegenüber Heparin resistent zu werden.

Während Heparin mit der Bindung von Pseudovirionen an Heparansulfat interferiert, zeigt dieser Versuch, daß der neutralisierende Antikörper E12 einen späteren Schritt der Infektion inhibieren muß. Ferner legt der Versuch nahe, daß die Infektion von COS7-Zellen mit Pseudovirionen in wenigstens zwei klar voneinander abgrenzbaren, aufeinanderfolgenden Schritten erfolgt, die mit unterschiedlichen Agenzien gestört werden können.

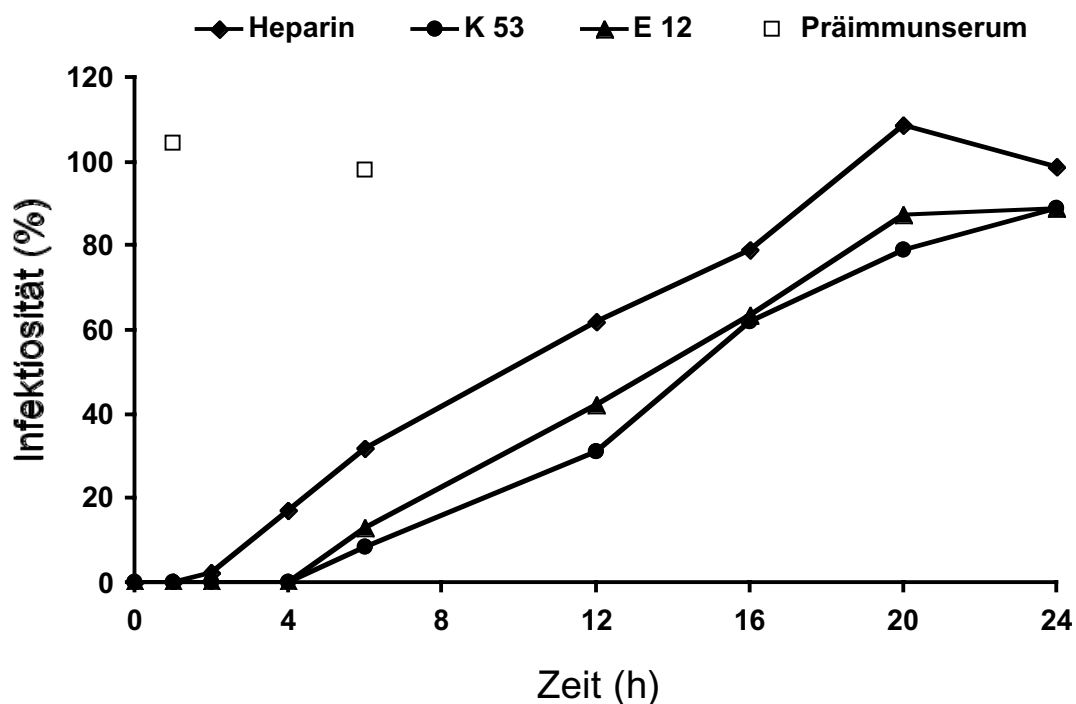


Abbildung 27: Postadsorptive Neutralisation von HPV33-Pseudovirionen durch Heparin, E12 und K53. Subkonfluente COS7-Zellen wurden für eine Stunde bei 4°C mit Pseudovirionen inkubiert, gewaschen und nachfolgend bei 37°C kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Heparin (100 µM), K53 (1:500) und E12 (1:10) für eine Stunde auf Eis zugegeben und anschließend entfernt. Nach 72 Stunden wurde der Versuch ausgewertet. Als Kontrolle diente Kaninchenpräimmunsrum (1:500), das eine und sechs Stunden nach Pseudovirionenbindung eingesetzt wurde. Die Anzahl der Infektionsereignisse ohne Zugabe von Heparin oder Antikörper wurde gleich 100% gesetzt.

4. Der infektiöse Aufnahmeweg von Pseudovirionen in COS7-Zellen

Die Bindung an den Rezeptor und die nachfolgende Penetration in die Zelle kennzeichnen die frühe Phase einer Virusinfektion. Mit Hilfe von Pseudovirionen konnte ich die Bedeutung von Heparansulfatproteoglykanen für den ersten Schritt der Virusinfektion nachweisen. Nun sollten die nachfolgenden Mechanismen untersucht werden, die zur Etablierung einer Infektion führen. Dazu sollte der Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen geprüft werden. Die verwendeten Substanzen greifen in verschiedene zelluläre Prozesse ein (Tabelle 3) und können daher zur Charakterisierung der Schritte dienen, die bei der Virusaufnahme ablaufen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung mußte der bestehende Infektionstest adaptiert werden. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 28 schematisch dargestellt. Angesichts der Zytotoxizität der Inhibitoren sollte der Inkubationszeitraum einerseits möglichst kurz sein, andererseits erforderte der ungewöhnlich langsame Verlauf der HPV-Infektion (Kapitel III.3) einen möglichst langen Untersuchungszeitraum. Die Kinetik der HPV-Infektion zeigte, daß in den ersten vier Stunden nach der Bindung keine Aufnahme von Pseudovirionen stattfindet und nach zehn Stunden etwa 20-30% der Gesamtinfektion erreicht werden (Abbildung 27). In der Praxis bedeutete dies 10-15 Infektionsereignisse, eine Größenordnung die noch auswertbar war. Eine geringere Expositionszeit hätte eine Interpretation der Ergebnisse erschwert. Da Vorversuche außerdem gezeigt hatten, daß die Zellen eine sechsstündige Exposition durchaus überstehen können, wurden die Zellen in den hier beschriebenen Versuchen jeweils zwischen der 4. und der 10. Stunde nach Bindung der Pseudovirionen mit den Inhibitoren inkubiert.

Für die Auswertung der Experimente waren mehrere Aspekte wichtig. Es mußte sichergestellt sein, (i) daß vor Zugabe der Chemikalien keine Aufnahme der Pseudovirionen stattgefunden hat, (ii) daß nach Entfernung des Inhibitors keine Pseudovirionen nachträglich internalisiert werden und (iii) daß eine etwaige Reduktion der Infektiosität nicht das Resultat einer irreversiblen Schädigung der Zellen und/oder der Pseudovirionen ist. Ersteres wurde kontrolliert, indem vier Stunden nach der Bindung nicht aufgenommene Pseudovirionen durch die Zugabe des Antiserums K53 inaktiviert wurden (Abbildung 28B). In diesen Kontrollansätzen konnten generell keine Infektionsereignisse festgestellt werden. Durch die Zugabe von K53 nach Entfernung des jeweiligen Inhibitors konnte eine nachträgliche Internalisation verhindert werden (Abbildung 28E).

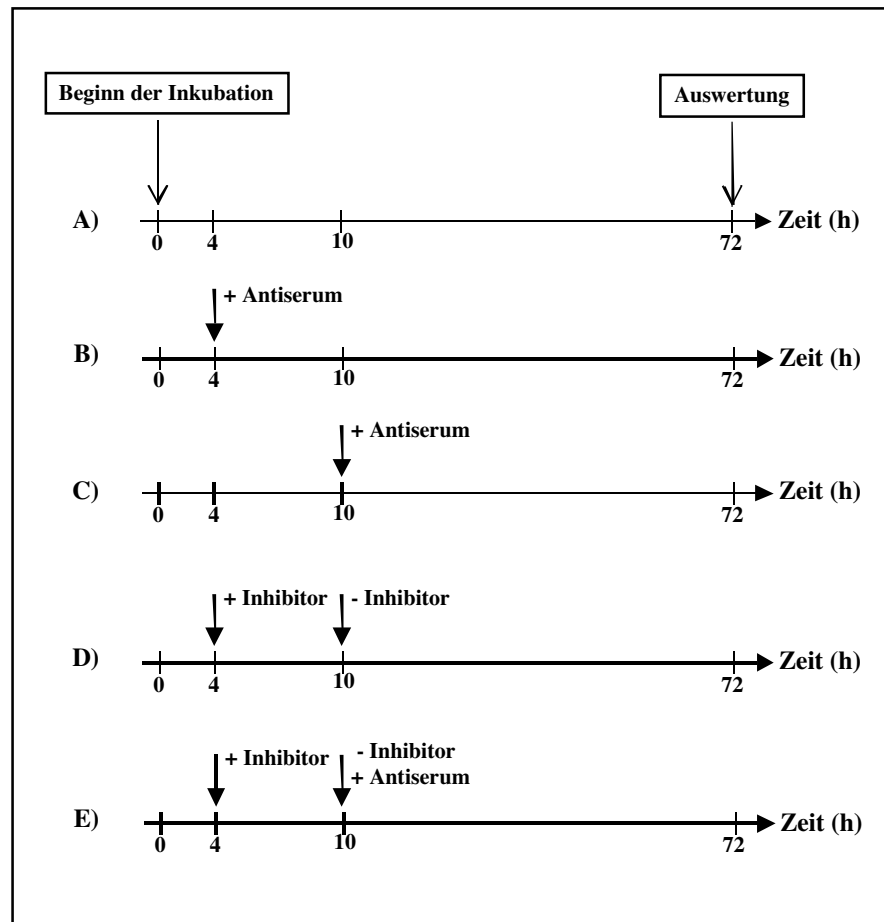


Abbildung 28: Vorgehensweise zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die HPV33-Infektion. Zu jeder getesteten Chemikalie wurden fünf Versuchsansätze parallel durchgeführt. **(A)** Infektionstest ohne Inhibitor. Dieser Ansatz gibt Auskunft über die Infektionsrate während der gesamten Dauer. Die Zellen erhalten keinen Inhibitor, werden aber zu den entsprechenden Zeiten mit den jeweiligen Puffern inkubiert. Zur Ermittlung der Infektionsereignisse im sechsständigen Zeitraum ohne Inhibitor, wird die Aufnahme von Pseudovirionen zur Stunde 4 **(B)** und zur Stunde 10 **(C)** durch Zugabe eines VLP-spezifischen Antiserums abgebrochen. Die ermittelten Infektionsereignisse voneinander subtrahiert ergeben die Infektionsrate im Zeitfenster. Ansatz **(E)** gibt Auskunft über den Effekt der Inhibitoren auf die Infektion im betrachteten Zeitraum. Zur Stunde 4 wird die Substanz zugegeben, nach sechs Stunden entfernt und die Aufnahme von Pseudovirionen durch die Zugabe von Antiserum gestoppt. Wird die Infektion nicht unterbrochen **(D)**, so sollte bei unbeschädigten Zellen die Infektionsrate von Ansatz A erreicht werden.

Die Vitalität der Zellen wurde überprüft, indem nach Entfernung der Substanzen kein Antiserum zur Inaktivierung externer Pseudovirionen hinzugefügt wurde (Abbildung 28D). In diesen Kontrollansätzen war die Zahl der Infektionsereignisse in der Regel deutlich höher als in den Versuchsansätzen (Abbildung 29B). Das belegt, daß die Wirkung der Inhibitoren reversibel war, sodaß die Zellen auf der Oberfläche verbliebene Pseudovirionen nachträglich internalisierten. Für die einzelnen Inhibitoren und Konzentrationen ergaben sich durchaus Unterschiede in der Erholungsrate. So konnte im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren nach der Behandlung mit PMA keine signifikante Zunahme der Infektionsrate nach Entfernung des

Inhibitors beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Vitalität auch durch regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie untersucht (Tabelle 3). Nur unter dem Einfluß von 10 µM Cytochalasin b (höchste verwendete Konzentration) und der gleichzeitigen Anwendung von Natriumazid und 2-Desoxy-D-Glucose (0,1%/50mM) konnten leichte morphologische Veränderungen beobachtet werden, die nach Inkubationsende wieder vollständig verschwanden. Lediglich unter Einfluß von 100 und 150 µM Chloroquin starben die Zellen vorzeitig. Desweiteren führte eine sechsstündige Ansäuerung des Zytosols (nach Sandvig *et al.*, 1987), wodurch die Abschnürung von *coated pits* verhindern werden sollte ebenfalls zum Absterben der Zellen. Diese Ansätze wurden deshalb nicht ausgewertet.

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkung auf die Zellvitalität. J:ja, n: nein.

Inhibitor	Wirkung	Konzentration	Zellvitalität		
			Zelltod	Morphol. Veränderung	Infektionserhöhung nach Entfernung des Inhibitors?
Cytochalasin b	Inhibition der Mikrotubuli-bildung	1 µM	n	n	j
		5 µM	n	n	j
		10 µM	n	j/reversibel	j
Chloroquin	Erhöhung des lysosomalen pH	50 µM	n	n	j
		100 µM	j	-	-
		150 µM	j	-	-
NH ₄ Cl	Erhöhung des lysosomalen pH	10 mM	n	n	j
		20 mM	n	n	j
PMA	Inhibition von Caveolae	1 µM	n	n	n
		10 µM	n	n	n
Nystatin	Inhibition von Caveolae	10 µg/ml	n	n	j
		25 µg/ml	n	n	j
NaN ₃	Blockierung der Atmungskette	0,1%	n	n	j
NaN ₃ /2-Desoxy-D-Glucose	Blockierung der Atmungskette und Glykolyse	0,1%/50 mM	n	j/reversibel	j
NH ₄ Cl/Amiloride	Inhibition von <i>coated pits</i>	10 mM/1 mM	j	-	-

Der Einfluß der Inhibitoren auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen ist innerhalb des untersuchten Zeitraumes in Abbildung 29A dargestellt. Cytochalasin b verhindert die Polymerisierung von Actin-Microfilamenten, indem es sich an das Plusende der Actinketten anlagert. Schon bei einer Konzentration von nur 1 μM vermochte Cytochalasin b die Infektion auf 22% der Kontrolle zu reduzieren. Eine erfolgreiche Infektion mit HPV33-Pseudovirionen benötigt offensichtlich actinvermittelte Bewegungsprozesse.

Die lysosomotrophen Agenzien Ammoniumchlorid und Chloroquin erhöhen den lysosomalen pH-Wert und wirken ebenfalls stark infektionshemmend. Chloroquin verhinderte bei 50 μM eine Infektion sogar vollständig.

Obwohl Natriumazid den Elektronentransport in der Atmungskette blockiert, hat es alleine keinen hemmenden Einfluß auf die Infektion. In Kombination mit dem Glykolysehemmer 2-Desoxy-D-Glucose wird die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen aber vollständig verhindert. Der Energiebedarf der Virusaufnahme kann also offenbar über die Glykolyse allein gedeckt werden.

Den Substanzen PMA und Nystatin wird in der Literatur eine caveolenhemmende Wirkung zugeschrieben (Anderson *et al.*, 1996). Sie haben auch in höheren Konzentrationen von 10 μM bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ nur einen relativ geringen Einfluß auf die Infektionsrate. Offenbar sind Caveolen an der Infektion mit HPV33-Pseudovirionen nicht maßgeblich beteiligt.

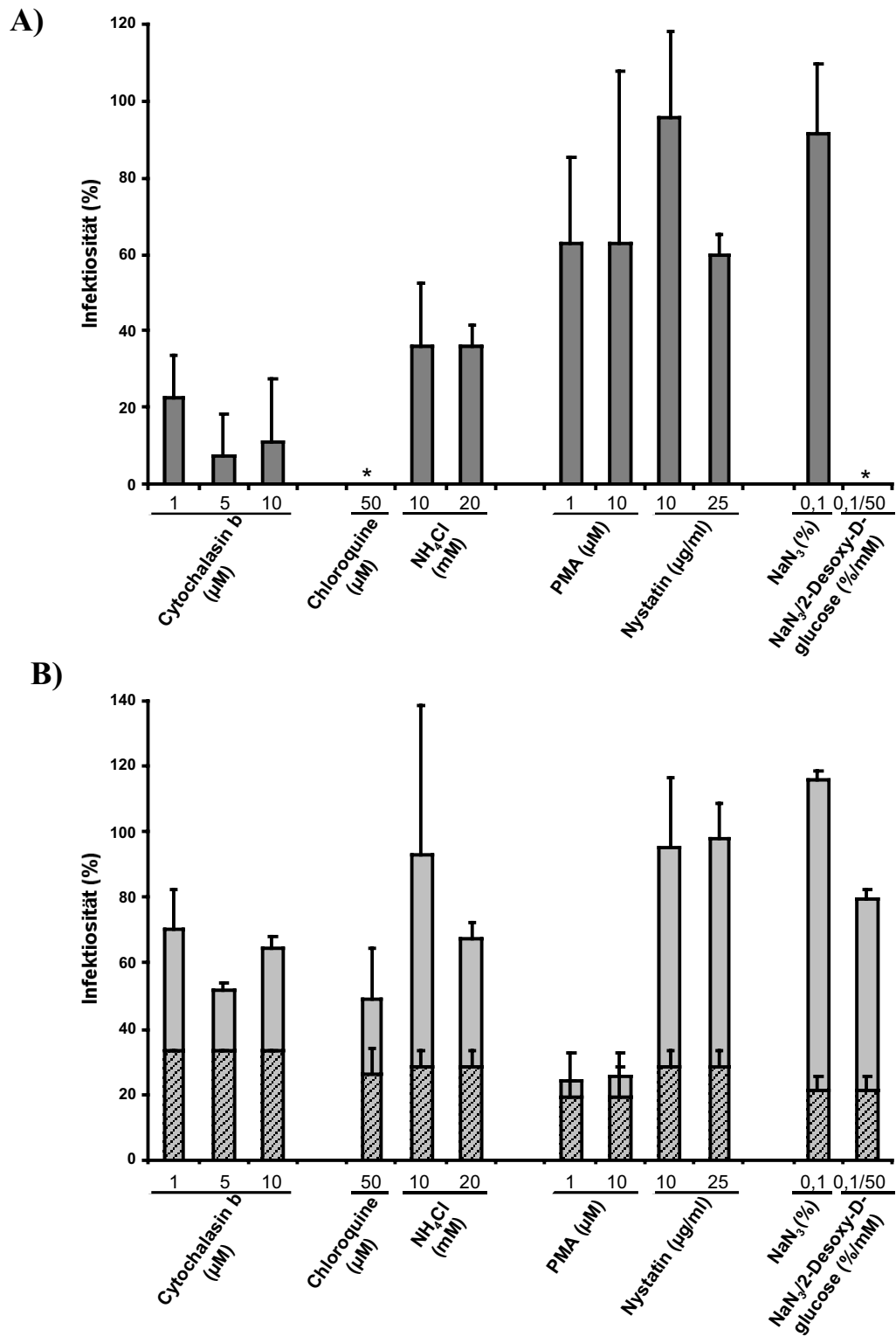


Abbildung 29: Einfluß von Inhibitoren auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. (A) Auswirkung der Inhibitoren auf die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. Zwischen der vierten und zehnten Stunde nach Bindung der Pseudovirionen wurden COS7-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Nach Entfernung der Substanzen, wurden externe Pseudovirionen durch Zugabe von Antiserum neutralisiert. Die Auswertung erfolgte nach insgesamt 72 h. Die maximale Infektionsrate ist gleich 100% gesetzt. (B) Einfluß der Inhibitoren auf die Vitalität der Zellen. Nach sechsstündiger Inkubation mit dem Inhibitor wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt (keine Inaktivierung externer Pseudovirionen). Die schraffierten Säulen zeigen die Infektionsrate nach Inaktivierung der an der Zelloberfläche verbliebenen Pseudovirionen durch K53. Die Auswertung erfolgt nach insgesamt 72 h. PMA: 12-Phorbol-13-myristatacetat; *: 100% Inhibition.

IV. Diskussion

1. Pseudovirionen: Virenanaloge Partikel mit *gfp* als Reportergergen

Herkömmliche Zellkulturzellen lassen sich durch Papillomviren nicht produktiv infizieren, da die Virusmorphogenese vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängig ist. HPV-bedingte Läsionen enthalten in der Regel nur geringe Mengen an Virionen, sodaß die Gewinnung von Virionen in präparativen Maßstäben durch Extraktion aus solchen Geweben ebenfalls nicht möglich ist. Folglich können authentische Virionen zur Untersuchung des HPV-Vegetationszyklus praktisch nicht herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Pseudovirionen im Vacciniavirus-Expressionssystem durch die Expression der Kapsidproteine L1 und L2 erstmals in Gegenwart des Markerplasmids pEGFPGFP-NLS hergestellt. Das Markerplasmid pEGFPGFP-NLS hat gegenüber dem bislang verwendeten Plasmid pSV β -Gal (Unckell *et al.*, 1997), welches für die β -Galaktosidase von *E. coli* (*lacZ*-Gen) kodiert, mehrere Vorteile: (i) Der Infektionsnachweis gelingt schnell und ohne Vorbehandlung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Zeitintensive Fixierungs- und Färbungsschritte, wie sie für den Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität notwendig sind, erübrigen sich. (ii) Der GFP-Nachweis ist unabhängig von Kosubstraten. Färbungsartefakte, wie sie durch Präzipitatbildung des Substrats X-Gal beim Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität häufig auftraten, kommen daher nicht vor. Falsch-positive Signale können so ausgeschlossen werden.

Die Nachweisgrenze für GFP bei Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops liegt bei 30 nM, das entspricht \sim 4000 zytoplasmatischen Molekülen pro Zelle (Niswender, 1995). Da pEGFPGFP-NLS für ein GFP-Dimer kodiert, und die Lokalisation des Dimers sich weitestgehend auf den Zellkern beschränkt, liegt die Nachweisgrenze wahrscheinlich noch deutlich unter 4000 Kopien. Aufgrund der SV40-restringierten Replikation des Markerplasmids (SV40 ori) wird diese Anzahl an Transkripten in COS 7-Zellen vermutlich eher erreicht als in Zellen, die kein SV40 T-Antigen haben. Um auch Infektionsereignisse erfassen zu können, die unter der optischen Nachweisgrenze liegen, wurde ein Nachweis mittels RT-PCR etabliert. Dadurch gelang es, die Sensitivität unseres Infektionssystems weiter zu erhöhen. So konnte demonstriert werden, daß HPV33-Pseudovirionen neben COS7- auch HeLa-Zellen infizieren können. Die Verwendung des ubiquitär einsetzbaren GFP-

Expressionsvektors pEGFPGFP-NLS ermöglichte, die Infizierbarkeit von verschiedenen Zellen zu überprüfen. Dies ist insofern von Bedeutung, da die Auffindung nichtpermissiver Zelltypen die Identifikation möglicher Rezeptoren erleichtern kann.

Trotz der artifiziellen Natur der Partikel, gibt es mehrere Beobachtungen, die Pseudovirionen als Modell für echte Virionen geeignet erscheinen lassen. Dazu gehören, wie ich und andere zeigen konnten, die Kinetik der Infektion (Giroglou *et al.*, 2001b), die Neutralisation durch typspezifische Antikörper (Giroglou *et al.*, 2001a; Kawana *et al.*, 1999; Touze & Coursaget, 1998), und die Abhängigkeit der Etablierung einer Infektion vom L2-Protein (Unckell *et al.*, 1997). Somit können Pseudovirionen und das hier verwendete Infektionssystem als authentisches Modell für die Infektion mit echten Papillomviren angesehen werden.

2. Untersuchungen zur Kreuzneutralisation zwischen den HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45

VLPs sind hoch immunogen (Christensen *et al.*, 1994a; Sapp *et al.*, 1994) und induzieren in Tiermodellen eine Immunantwort, die vor einer experimentell provozierten Infektion mit dem homologen Virus schützt (Suzich *et al.*, 1995; Breitburd *et al.*, 1995; Kirnbauer *et al.*, 1996). Da neueste Studien zeigen, daß VLPs auch für Menschen geeignete Impfstoffkandidaten sind, ist es für die weitere Impfstoffentwicklung wichtig zu wissen, inwieweit die Immunisierung mit VLPs eines HPV-Typs auch kreuzneutralisierende Antikörper gegen nah verwandte HPV-Typen induziert. Der Mangel an infektiösen Viren und einem geeigneten Infektionsmodell beschränkte lange Zeit solche Untersuchungen zur Typspezifität HPV-induzierter Antiseren. Als Ersatz dienten Daten zur Kreuzreaktivität von VLP-Antiseren im ELISA (Rose *et al.*, 1994) oder im Hämagglutinationstest (Roden *et al.*, 1996a; Roden *et al.*, 1995). Die Aussagekraft der so erzielten Daten ist allerdings begrenzt. Eine Kreuzreaktivität im ELISA kann auch auf nicht-neutralisierenden Antikörpern beruhen. Die Inhibition einer VLP-induzierten Agglutination von Erythrozyten erfaßt dagegen lediglich Antikörper, die eine Bindung inhibieren, während neutralisierende Antikörper, die die Infektion in einem späteren Schritt hemmen, mit diesem Test nicht erkannt werden. Somit kann bei den genannten Testverfahren das kreuzneutralisierende Potential der getesteten Antikörper über- bzw. unterschätzt werden. Erst die Überprüfung von Antiseren in einem geeigneten Infektionsmodell kann Klarheit verschaffen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit HPV16-, HPV18- und HPV33-Pseudovirionen generiert und deren Neutralisation im

Infektionstest durch VLP-Antisera gegen die nah verwandten HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 untersucht (Abbildung 30). Dabei spielt die Tatsache, daß zur Gewinnung der Antisera unterschiedlich zusammengesetzte VLPs (L1 alleine bzw. L1 und L2) verwendet wurden, nur eine untergeordnete Rolle für die Analyse der Kreuzneutralisation. Denn obwohl L2 neutralisierende Epitope enthält (Kawana *et al.*, 1999; Roden *et al.*, 2000), erkennen neutralisierende Antikörper, die durch die Immunisierung mit L1/L2-VLPs gewonnen werden, nur L1 (Roden *et al.*, 2000; Lowy *et al.*, 1994). Da im VLP auf ein L2-Protein 30 L1-Proteine entfallen (Kirnbauer *et al.*, 1993), reicht die Antigenkonzentration zur Induktion hoher Antikörpertiter offenbar nicht aus.

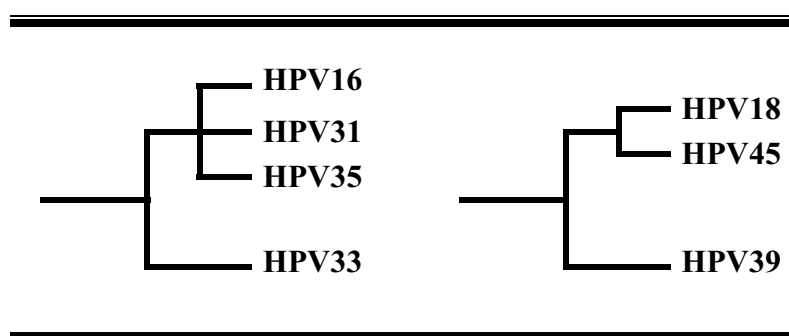


Abbildung 30: Kladogramm zur phylogenetischen Beziehung der getesteten HPV-Typen. Auszug aus dem auf Homologien des L1-Proteins basierenden HPV-Stammbaum (Shah & Howley, 1996).

VLP-Antisera gegen HPV16, 18 und 33 bewirkten eine effiziente Neutralisation der homologen Pseudovirionen. Kreuzneutralisation wurde nur innerhalb nah verwandter HPV-Typen beobachtet. Konkret konnte hier erstmals gezeigt werden, daß HPV31-VLPs Antikörper induzieren, die auch eine Infektion mit HPV33 neutralisieren können. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der beiden Antisera (R.C. Rose, unser Labor) und der damit verbundenen Schwierigkeit einer Quantifizierung ist doch offensichtlich, daß die Kreuzneutralisation jeweils schwächer ausgeprägt war, als die Neutralisation durch das homologe Antiserum. Diese Beobachtung machten auch Christensen und Mitarbeiter (1994b), die eine Kreuzneutralisation zwischen den „low-risk“-Typen HPV6 und 11 nachwiesen. In einer weiteren Studie (White *et al.*, 1998) konnten HPV16-Virionen durch Antikörper gegen HPV16- und HPV33-VLPs neutralisiert werden. Auch hier war die Neutralisation durch das heterologe HPV33-Antiserum um ein Vielfaches geringer. Die Kreuzneutralisation von HPV16-Virionen durch HPV33-Antikörper konnte allerdings in unserem Infektionssystem und auch in anderen Studien (Roden *et al.*, 1996b; Combita *et al.*, 2000) nicht bestätigt werden. Unterschiedliche Testsysteme (RT-PCR bei White *et al.*, 1998; Transformationstest

bei Roden *et al.*, 1996b; Fluoreszenztest in der vorliegenden Arbeit) und die Verwendung verschiedener HPV16-Isolate (mit einzelnen Aminosäureaustauschen) könnten für diese Divergenz verantwortlich sein. Obwohl die Immunisierung mit einem HPV16-Subtyp stets effizient eine Infektion durch andere Subtypen neutralisiert (Roden *et al.*, 1996b), könnten dennoch Unterschiede im Kreuzneutralisationspotential bestehen.

Auch die Kreuzneutralisation zwischen HPV18 und HPV45 wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit belegt, wobei im Hämagglutinationstest erste Hinweise dafür vorlagen (Roden *et al.*, 1996a). Aufgrund der 87,6%igen Sequenzhomologie (Roden *et al.*, 1996a) war die Kreuzneutralisation in gewisser Hinsicht nicht überraschend. Andererseits ist ein hoher Grad an Sequenzhomologie nicht gleichbedeutend mit der Fähigkeit kreuzneutralisierende Antikörper zu induzieren. Obwohl HPV31L1 eine größere Ähnlichkeit mit HPV16L1 (83,1%) als mit HPV33L1 (78,4%) besitzt, vermochte das entsprechende Antiserum HPV33-, aber nicht HPV16-Pseudovirionen zu neutralisieren.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen der L1-Proteine kreuzneutralisierender HPV-Typen mit denen nicht-kreuzneutralisierender HPV-Typen lassen sich Sequenzbereiche oder spezifische Aminosäuren eingrenzen bzw. identifizieren, die möglicherweise an neutralisierenden Epitopen beteiligt sind. Wie in Abbildung 31 demonstriert, findet man beim Vergleich der L1-Proteine die gleichen Aminosäuren an den Positionen 51, 59, 77, 106, 127, 140, 160, 260, 412, 430, 437, 492 und 495 bei HPV31 und HPV33, während bei HPV16 und HPV35 an diesen Stellen andere Aminosäuren vorkommen (Die Positionsnummern beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des HPV33L1). Die gleiche Analyse der L1-Proteine von HPV18, 45 und 39 ergibt ein komplexeres Bild. Insgesamt 76 Aminosäuren sind bei HPV18 und 45 identisch, unterscheiden sich aber von HPV39. Diese Aminosäuren konzentrieren sich auf vier Regionen zwischen den Aminosäuren 47-59, 118-136, 342-350, und 484-498. Inwieweit die so identifizierten Aminosäuren an der Ausbildung neutralisierender Epitope beteiligt sind, müssen weitere Experimente unter Verwendung von Punktmutationen zeigen. Gegenwärtig sind nur für die L1-Proteine des HPV11 (Ludmerer *et al.*, 1997; Ludmerer *et al.*, 1996) und des HPV16 (White *et al.*, 1999; Roden *et al.*, 1997) essentielle Aminosäuren innerhalb neutralisierender Epitope kartiert. Die Region zwischen den Aminosäuren 129-138, ferner die Aminosäuren an Position 144, 148 und 353 sind für die Bindung HPV11 neutralisierender Antikörper essentiell.

35	-MSLWRSNEATVYLLPPVSVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSSRLLAVGHPY A IKKODS- N	58
16	QMSLWLPS E ATVYLLPPVPVSKVSTDEYVARTNIYYHAGTSRLLAVGHPY F PKKPN N - N	84
31	-MSLWRPSEATVYLLPPVPVSKVSTDEYVTRTNIYYHAGSARLLTVGHPY S IPKSDN P K	59
33	-MSVWRPSEATVYLLPPVPVSKVSTDEYVSRSTIYYAGSSRLLAVGHPY S IKNPT N A K	59
45	Q M ALWRP S DS T VYLLPPPSV A R V VSTDDYVSR T S I F Y HAGSSRLLTVG N PY F R V V P NG A G N	85
18	Q M ALWRP S DN T VYLLPPPSV A R V VSTDDYVTP T S I F Y HAGSSRLLTVG N PY F R V V P AG G G N	119
39	- M AMWR S SD S M VYLLPPPSV A K V VNTDDYVTR T G I Y YAGSSRLLTVG H PY F K - V G M N G G R	58
D - E		
35	KIAVPKVSGLQYRVFRV K LPDPNKFGFPDTSFYDPCQLQRLVWACT G VEVGRGQPLGV G IS	118
16	KILVPKVSGLQYRVFR I HLDPDNKFGFPDTSFYNPDTQRLVWACV G VEVGRGQPLGV G IS	144
31	KIVVPKVSGLQYRVFRV R LPDPNKFGFPDTSFYNPETQRLVWACV L EVGRGQPLGV G IS	119
33	KLLVPKVSGLQYRVFRV R LPDPNKFGFPDTSFYNPDTQRLVWACV L EIGRGQPLGV G IS	119
45	KQAVPKVSA Y QYRVFRV A LDPDNK F GLPD T S I YNPETQRLVWACV M E I GRGQPLG I GL S	145
18	KQDIPKVS A YQYRVFRV Q LPDPNK F GLPD T S I YNPETQRLVWACV A G V E I GRGQPLG V GL S	179
39	KQDIPKVS A YQYRVFRV T LPDPNK F S I P DA S L Y NPETQRLVWACV G VEVGRGQPLG V GL S	118
D - E		
35	GHPLL N K L DDTENLNKYVGN S NGSGTDNRECI S MDYKOTQ L CL I GCRPP I GEHWGKG T PC	178
16	GHPLL N K L DDTENASAYA A AG---VDNRECI S MDYKOTQ L CL I GCKPP I GEHWGKG S PC	201
31	GHPLL N K F DDTENS N RYAG G PG---TDNRECI S MDYKOTQ L CL I GCKPP I GEHWGKG S PC	176
33	GHPLL N K F DDTETGNKY P GG P G---ADNRECI S MDYKOTQ L CL L GCKP P TGEHWGKG V AC	176
45	GHP F YN K LDDTE S HA A ATAV I T---QV R DNV S VDYKOTQ L CL L GC V PA I GEHW A K G T L C	202
18	GHP F YN K LDDTE S HA A TS N VS---ED V RDNV S VDYKOTQ L CL L GC A PA I GEHW A K G T A C	236
39	GHP L YN R QDDTENS - PF S ST T N---K D S R DNV S VDYKOTQ L CL I GC V PA I GEHW G K G K A C	174
F - G		
35	NANOVKAGECPPELLELNTVLQDGMVD T GFGAMDF T TLOANKSDVPLD I CSSICKY P PDY L	238
16	TNAVNP G DCPPLELINTVIQDGMVD T GFGAMDF T TLOANKSEVPLD I CT S ICKY P PDY I	261
31	SNNAI T PGDCPPLELKN S VIQDGMVD T GFGAMDF T ALQDTK S NVPLD I CNSICKY P PDY L	236
33	TN-AAPAND C PPLELINT I IEDGDMVD T GFGCMDF K TLOANKSDV P DI D ICG S TCKY P PDY L	235
45	KPAQ L OP G DCPPLEL K NT I IEDGDMVD T GYGAMDF S T L QDT K CEVPLD I C S ICKY P PDY L	262
18	KSR F L S Q G DCPPLEL K NT V LEDGDMVD T GYGAMDF S T L QDT K CEVPLD I C S ICKY P PDY L	296
39	KPN N V S T G DCPPLEL V NT P IEDGDM I D T GYGAMDF G ALQ E T K SEVPLD I C S ICKY P PDY L	234
F - G		
35	KMVSEPYGDMLFFYLRR E QMFVR H L F NRAG T VG E TV P ADLY I K G ---T T GT L P S T S Y F P	294
16	KMVSEPYGDSLFFYLRR E QMFVR H L F NRAG A V G EN V PDDLY I K G S---G S TAN L ASS N Y F P	319
31	KMVAEPY G DTLFFYLRR E QMFVR H L F NRSG T VG S VP T DLY I K G S---G S TAN L AN S T S Y F P	294
33	KMTSEPYGDSLFFFLRR E QMFVR H L F NRAG T L G E A V P DDLY I K G S---G T T A S I Q S A F F P	293
45	QMSAD P Y G DS M FF L RR E Q L FAR H F W NR A G M GD T V P TDLY I K G T S AN M R E T P G S C V S P	322
18	QMSAD P Y G DS M FF L RR E Q L FAR H F W NR A G T M G D T V P Q S L Y I K G T ---G M P S P G S C V S P	354
39	QMSAD V Y G DS M FF L RR E Q L FAR H F W NR G M V G D A I PAQ L Y I K G T---D I RAN P G S S V Y C P	292
F - G H - I		
35	TPSGSMVTS D AQ I F N KPY W L Q R A Q G H N NG I C W S N Q L F V T V D T T R S T N M S V C S A V S S - S D	353
16	TPSGSMVTS D AQ I F N KPY W L Q R A Q G H N NG I C W G N Q L F V T V D T T R S T N M S L C A A I S T - S E	378
31	TPSGSMVTS D AQ I F N KPY W M Q R A Q G H N NG I C W G N Q L F V T V D T T R S T N M S V C A A I A N - S D	353
33	TPSGSMVTS E S Q L F N K P Y W L Q R A Q G H N N G I C W G N Q V F V T V D T T R S T N M T L C Q V T -- S D	351
45	SPSGS I I T S D S Q L F N K P Y W L H K A Q G H N N G I C W H N Q L F V T V D T T R S T N L T L C A S T Q N V P	382
18	SPSGS I V T S D S Q L F N K P Y W L H K A Q G H N N G V C W H N Q L F V T V D T T P S T N L T I C A S T Q S V P	414
39	SPSGS M V T S D S Q L F N K P Y W L H K A Q G H N N G I C W H N Q L F L T V D T T R S T N F T L S T S I E S S I P	352
H - I		
35	STYKNDNFKEYLRHGEEYD L Q F I F OL C K I TL T AD V M T Y I H S M N P S I L ED W N F L T PP P S G	413
16	TT Y K N T N F K E Y L R H G E E Y D L Q F I F OL C K I T L T AD V M T Y I H S M N S T I L ED W N F L Q PP P G G	438
31	T T F K S S N F K E Y L R H G E E F D L Q F I F OL C K I T L S A D I M T Y I H S M N P A I L ED W N F L T PP P S G	413
33	T T P K N E N F K E Y I R H V E E Y D L Q F V F Q L C K V T L T A E V M T Y I H A M N P D I L E D W Q F L T PP P S A	411
45	S T Y D P T K F K Q Y S R H V E E Y D L Q F I F OL C T I T L T A E V M S Y I H S M N S S I L E N W N F G V P PP P T T	442
18	G Q Y D A T K F K Q Y S R H V E E Y D L Q F I F OL C T I T L T A D V M S Y I H S M N S S I L E D W N F G V P PP P T T	474
39	S T Y D P S K F K E Y T R H V E E Y D L Q F I F OL C T V L T T D V M S Y I H T M N S S I L D N W N F A V A PP P S A	412
F - G		
35	TLED T Y R F V T S Q A I T C Q K P S A P K P K - D D P L K N Y T F W E V D L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q	472
16	TLED T Y R F V T S Q A I A C Q K H T P P A P K E D - P L K K Y T F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q	497
31	SLED T Y R F V T S Q A I T C Q K T A P Q K P K - E D P F K D Y V F W E V N L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q	472
33	SLQD T Y R F V T S Q A I T C Q K T V P P K E K - E D P L G K Y T F W E V D L K E K F S A D L D Q F P L G R K F L L Q	470
45	SLVD T Y R F V Q S V A I T C Q K D T T P E K - Q D P Y D K L K F W T V D L K E K F S D L D Q Y P L G R K F L V Q	501
18	SLVD T Y R F V Q S V A I T C Q K D A P A E N - K D P Y D K L K F W N V D L K E K F S L D L D Q Y P L G R K F L V Q	533
39	SLVD T Y R Y L Q S A A I T C Q K D A P A E K - K D P Y D G L K F W N V D L R E K F S L E L D Q F L G R K F L L Q	471
35	AGL K A R P N F R L G R R A P A S T S K K S S T K R R K V K S -----505	
16	AGL K A K P K F T L G K R K A P T T S T S T T A K R K R K L-----531	
31	AG Y R A R P K F K A G K R S A P - S A S T T P A K R K T K K -----504	
33	AGL K A K P K L--- K R A A P - T S T R T S S A K R K V K K-----499	
45	AG L R R R P T I G R K R P A A S T S T A S T A S R P A K R V R I R S K K 539	
18	AG L R R K P T I G R K R --- S A P S A T T S S K P A K R V R R A R K568	
39	AR V R R R P T I G R K R P--- A A S T S S S A T K H K R K R V S K--505	

Abbildung 31: L1-Sequenzvergleich von HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, und 45. Der Sequenzvergleich wurde über das im Internet verfügbare Programm CLUSTAL W (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>, Thompson *et al.*, 1994) erzeugt. Die Proteinsequenzen stammen aus der EMBL-Datenbank. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des hier verwendeten HPV16-Isolats. Aminosäuren, die sich vom HPV16-Prototyp (Seedorf *et al.*, 1985) unterscheiden sind fett gedruckt. Aminosäuren, die für die Kreuzneutralisation zwischen HPV31 und 33 wichtig sein könnten, sind rot, die für HPV18 und 45 blau dargestellt. Grün unterlegte Positionen sind für die Neutralisation von HPV16 (White *et al.*, 1999; Roden *et al.*, 1997), gelb unterlegte für die Neutralisation von HPV11 (Ludmerer *et al.*, 1997; Ludmerer *et al.*, 1996) wichtig. Graue Balken symbolisieren Regionen, die variable Schleifen („loops“) ausbilden (Chen *et al.*, 2000).

Untersuchungen zur Neutralisation verschiedener HPV16-Isolate durch vier monoklonale Antikörper führten zur Identifizierung von wichtigen Aminosäuren an den Positionen 50, 266, 271 und 282. Chen und Mitarbeiter (2000) konnten kürzlich durch die Strukturanalyse von HPV16-VLPs aufzeigen, daß die besagten Aminosäuren auf besonders oberflächenexponierten „loops“ lokalisiert sind (Abbildung 31, loops D-E, F-G, H-I). Tatsächlich liegen die hier bei HPV31 und 33 durch Sequenzvergleich identifizierten Aminosäuren an den Positionen 51, 127, 140 und 260 in der Nähe der bereits erwähnten Regionen, die für die Bindung neutralisierender Antikörper wichtig sind.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, daß eine Kreuzneutralisation nur zwischen HPV31 und 33 einerseits und zwischen HPV18 und HPV45 andererseits möglich ist. Da die Kreuzneutralisation jedoch weniger effizient ist als die direkte Neutralisation durch homotypische Antikörper, sollte ein multivalenter Impfstoff daher VLPs aller HPV-Typen enthalten, vor denen ein Schutz erwünscht ist. Die Übereinstimmung zwischen den hier durch Sequenzvergleich ermittelten Regionen und den bislang in der Literatur charakterisierten Epitopen zeigt, daß Studien zur Kreuzneutralisation Anhaltspunkte für Folgeuntersuchungen geben können. Die Identifizierung neutralisierender Epitope ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Es könnten zum einen gezielt VLPs hergestellt werden, die über immundominante, kreuzreaktive Epitope verfügen. Andererseits könnten Peptide, die diese Epitope nachahmen, unter Umständen geeignetere Impfstoffe sein als VLPs der verschiedenen HPV-Typen.

3. Untersuchungen zum Infektionszyklus von Papillomviren

Aus Mangel an geeigneten Infektionssystemen haben die Bemühungen um die Identifizierung des viralen Rezeptors bisher hauptsächlich Studien hervorgebracht, die eine Adhäsion von VLPs an Zellen untersuchen (Qi *et al.*, 1996; Volpers *et al.*, 1995, Roden *et al.*, 1995, Müller *et al.*, 1995). Dabei konnte gezeigt werden, daß VLPs an Zellen unterschiedlichster Herkunft binden können. Untersuchungen mit anderen Viren haben jedoch gezeigt, daß eine Bindung an sich nicht zwangsläufig zur Internalisierung führt (Montgomery *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). So können Herpesviren zwar an CHO-Zellen binden, sie jedoch nicht infizieren (Montgomery *et al.*, 1996). Für die Etablierung der Infektion ist letztendlich die erfolgreiche Aufnahme in die Zelle maßgebend. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit durch die

Verwendung des bereits beschriebenen Infektionssystems die Relevanz von möglichen Bindungsrezeptoren für die Infektion untersucht.

3.1 Die Rolle von α_6 -Integrin

Es konnte gezeigt werden, daß der Rezeptorkandidat α_6 -Integrin (Evander *et al.*, 1997) für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen nicht essentiell ist. Dies konnte zum einen durch die Infektion der α_6 -integrindefizienten Zelllinie DG75 demonstriert werden. Zum anderen hatte die Behandlung von COS7-Zellen mit dem α_6 -integrinspezifischen Antikörper GoH3 keinen Einfluß auf die Infektiosität von HPV33-Pseudovirionen. Für den gleichen Antikörper konnte gezeigt werden, daß er die Bindung von HPV6b-VLPs an HaCaT-Zellen um 63% inhibiert (Evander *et al.*, 1997). Diese Divergenz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Bindung von HPV6b-VLPs an Zellen zwar über Integrine vermittelt werden kann, diese Bindung aber nicht zur produktiven Infektion führt. Ferner zeigt die unvollständige Inhibition, daß an der Bindung noch weitere Komponenten beteiligt sind. Möglicherweise ist gerade diese α_6 -integrinunabhängige Restbindung für die Etablierung der Infektion maßgebend.

Die Schlußfolgerung, daß α_6 -Integrin nicht der obligate Rezeptor für HPV33 ist, spricht nicht dagegen, daß α_6 -Integrin auf der Zelloberfläche mit einer anderen Komponente kooperiert, die den eigentlichen Rezeptor darstellt. Der Befund, daß erst die Expression des humanen α_6 -Integrin-Gens in DG75-Zellen eine Bindung von HPV6b-VLPs ermöglicht (McMillan *et al.*, 1999), könnte dadurch erklärt werden, daß α_6 -Integrin solche Rezeptoren induziert bzw. bestehende stabilisiert. Dadurch könnte die Bindung von HPV6b-VLPs verstärkt worden sein, sodaß eine Assoziation, die vorher unter stringenten Waschbedingungen nicht nachweisbar war, nun demonstriert werden konnte. Eine enge Verknüpfung mit Integrinen konnte für Dystroglykane (Hynes, 1999) und Heparansulfatproteoglykane (HSPG) (Couchman & Woods, 1999) gezeigt werden. Beide Proteingruppen können Laminin binden (Henry & Campbell, 1998; Jackson *et al.* 1991). Daher kann die Beobachtung, daß Laminin die Bindung von HPV6b-VLPs inhibiert (Evander *et al.*, 1997), auch auf einer Interferenz mit den oben genannten Proteinen beruhen.

Inzwischen wurde auch für BPV4 gezeigt, daß α_6 -Integrin für die Infektion nicht notwendig ist (Sibbet *et al.*, 2000). BPV4-Virionen konnten α_6 -integrinnegative Keratinozyten sowohl binden als auch infizieren. Es ist nicht auszuschließen, daß α_6 -Integrin einen HPV6b-

spezifischen Rezeptor darstellt, während HPV33 und BPV4 andere Rezeptoren benutzen. Es gibt jedoch mehrere Beobachtungen, die gegen einen solchen Sonderfall und für einen gemeinsamen PV-Rezeptor sprechen. (i) In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß VLPs der HPV-Typen 11, 16 und 39 mit HPV33-Pseudovirionen um die Bindungsstellen auf der Zelle kompetieren können. In einer anderen Studie konnte die Aufnahme eines HPV6b VLP-Reporterplasmidkomplexes durch BPV-VLPs und VLPs der HPV-Typen 11, und 16 kompetiert werden (Müller *et al.*, 1995). (ii) Schließlich können BPV-Virionen sowie HPV16-Pseudovirionen, die das BPV-Genom tragen, Nagerzellen gleichermaßen gut infizieren (Roden *et al.*, 1996b). Auf der Basis dieser Beobachtungen kann man annehmen, daß verschiedene Papillomviren höchstwahrscheinlich einen identischen Rezeptor benutzen. Es bedarf weiterer Experimente, um die Rolle von α_6 -Integrin im Infektionszyklus von HPV6b zu klären. Für die Infektion mit HPV33 und BPV4 ist es offenbar nicht notwendig.

3.2 Die Rolle von Heparansulfatproteoglykanen

Eine direkte Assoziation zwischen VLPs und Heparin konnte im neu etablierten Heparin-BSA-ELISA demonstriert werden. Diese Methode, ursprünglich zur Untersuchung von Interaktionen zwischen GAG und Chemokinen entwickelt (Hasan *et al.*, 1999; Najjam *et al.*, 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Bindung von VLPs an Heparin angepaßt. Die Vorzüge dieses Systems gegenüber Heparinsäulen liegen in der Schnelligkeit und in der Einfachheit der Durchführung. Durch die Kopplung von Heparinbindung und Proteinnachweis entfallen zeitraubende Arbeitsschritte, wie Proteinfällung und Westernblot.

Es zeigte sich, daß neben HPV33- auch HPV16- und HPV39-VLPs an Heparin binden, wodurch die Annahme eines gemeinsamen Rezeptors für Papillomviren weiter untermauert wird. Offenbar binden Kapside effizient an Heparin, aber nicht an andere Glykosaminoglykane (GAG), da die Bindung nicht durch Chondroitin- und Dermatansulfat kompetitiv inhibiert wurde. Etwa 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin waren notwendig, um die Bindung um 50% zu inhibieren. Diese Menge ist, trotz unterschiedlicher Testsysteme, vergleichbar mit den Werten von 5,1 $\mu\text{g/ml}$ und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ für die Inhibition der Heparinbindung von HPV11-VLPs bzw. dem Glykoprotein gIII des Tollwutvirus (Joyce *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1993).

Erwartungsgemäß konnte Heparin die Infektion von COS7-Zellen sowohl durch HPV33- als auch durch HPV16-Pseudovirionen hemmen. Für eine 50%ige Hemmung der Infektion wurden 9-13 $\mu\text{g/ml}$ benötigt. Diese im Vergleich zur Heparinbindung in ELISA erhöhte

Konzentration ist vermutlich durch unspezifische, sekundäre Interaktionen des Heparins mit der Zelloberfläche und durch die unterschiedlichen Testsysteme bedingt. Chondroitin- und Dermatansulfat hatten keinen signifikanten Effekt auf die Infektion. Analog zum Heparin-BSA-ELISA inhibiert Heparin vermutlich die Bindung an die Zelle, wodurch eine Infektion verhindert wird. Die Hemmung durch Heparin ist nicht auf einen nachteiligen Effekt auf die Zellvitalität oder -funktion zurückzuführen, da die Vorinkubation der Zellen mit Heparin vor der Zugabe der Pseudovirionen keinen Einfluß auf die Infektion hat. Die übereinstimmenden Ergebnisse zwischen dem Heparin-BSA-ELISA und dem Infektionstest weisen auf eine Interaktion zwischen Pseudovirionen und Heparansulfatproteoglykanen auf der Zelloberfläche hin. Die Tatsache, daß gelöstes Heparin die Infektion blockiert, lässt vermuten, daß PV eher an die GAG- als an die Proteinkomponente der HSPG binden. Diese Annahme konnte durch die Infektionsresistenz Heparinase I-behandelter Zellen belegt werden. Somit konnte hier erstmals die Wichtigkeit von HSPG für die Infektion mit Pseudovirionen demonstriert werden. Untersuchungen im FACS bestätigten den Abbau der Heparansulfatketten durch Heparinase I-Behandlung, ohne gleichzeitig die Präsenz von α_6 -Integrin zu beeinflussen.

Die Sulfatierung der Heparansulfatketten ist ein wichtiger Parameter für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. Dies konnte durch die chloratbedingte Verringerung der Sulfatgruppen von Proteoglykanen auf COS7-Zellen gezeigt werden. Eine Behandlung der Zellen mit 20 mM Chlorat reduzierte die Infektion auf 45%, eine weitere Erhöhung der Chloratkonzentration zeigte keine signifikante Zunahme der Inhibition. Bemerkenswerterweise scheint die Infektionsrate mit dem Grad der Sulfatierung zu korrelieren. Bei Endothelzellen reduzierte die Kultivierung in 30 mM Chlorat die Sulfatierung von Heparansulfat auf 40% (Humphries & Silbert, 1988). Es gibt mehrere Anhaltspunkte dafür, daß die inhibierende Wirkung von Chlorat auf eine reduzierte Bindung von Pseudovirionen zurückzuführen ist: (i) toxische Nebeneffekte sind für niedrige Konzentrationen (bis 80mM) nicht zu erwarten, (ii) die Wirkung von Chlorat ist innerhalb von zwei Stunden reversibel (Humphries & Silbert, 1988). Da Pseudovirionen eine langsame Aufnahmerate haben und die Zellen nach der Pseudovirionenbindung in chloratfreiem Medium gehalten wurden, kann eine derart reduzierte Infektion nur über eine verminderte Bindung erklärt werden, (iii) schließlich wurde bei HPV11-VLPs eine reduzierte Bindung an chloratbehandelte Keratinozyten beobachtet (Joyce *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen HSPG und Pseudovirionen ist also elektrostatischer Natur. Das könnte erklären, warum keine signifikante Interaktion mit Chondroitin- und Dermatansulfat beobachtet wurde. Diese

unterscheiden sich von Heparin durch ihre Zuckerzusammensetzung und durch einen geringeren Sulfatgehalt. Ob neben der elektrostatischen Wechselwirkung auch eine sequenzspezifische Bindung stattfindet, kann aus den Daten nicht geschlossen werden. Antithrombin III beispielsweise bindet spezifisch an ein Pentasaccharid, das auf Heparin/Heparansulfat vorhanden ist (Jin *et al.*, 1997). Der Befund, daß etwa 2×10^4 Viruspartikel an eine Zelle binden (Volpers *et al.*, 1995), es jedoch 10^5 - 10^6 HSPG auf der Zelloberfläche gibt (Yanagishita & Hascall 1992), könnte ein Hinweis für eine sequenzspezifische Interaktion bei HPV33 sein.

Zur Charakterisierung der Kapsidkomponenten, die für die Bindung an Heparin/Heparansulfat wichtig sind, wurde die Beteiligung des C-Terminus untersucht. Durch die Anhäufung von basischen Aminosäuren liegt hier eine hohe positive Ladungsdichte vor. Joyce und Mitarbeiter (1999) postulierten die C-terminale Sequenz **BBXB** als Heparinbindungsmotiv für HPV, wobei **B** eine basische Aminosäure repräsentiert, während X gewöhnlich eine ungeladene, hydrophobe Aminosäure darstellt. Nach einer Trypsinbehandlung, die zur Abspaltung des C-Terminus diente, waren HPV11-VLPs nicht mehr in der Lage, an Zellen zu binden (Joyce *et al.*, 1999). Eine Abhängigkeit der Heparinbindung von der postulierten Erkennungssequenz konnte in unserem System jedoch nicht beobachtet werden. Weder die Konkurrenz mit dem C-terminalen Peptid, noch die Zugabe eines dagegen gerichteten Antikörpers konnte die Infektion mit Pseudovirionen reduzieren. Desweiteren belegt die Heparinbindung der C-terminal deletierten HPV33-VLPs, denen das besagte Heparinbindungsmotiv fehlt, daß der C-Terminus nicht allein für die Bindung verantwortlich sein kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Heparinbindung nicht auf die lineare Sequenzabfolge **BBXB** limitiert ist, sondern weitere Faktoren, wie Konformation und Zugang von Heparin an basische Aminosäuren von Bedeutung sind. Neueste Strukturanalysen für HPV16-VLPs unterstützen diesen Befund. Sie zeigen, daß der C-Terminus des L1-Proteins ins Kapsidinnere zeigt und vermutlich von außen nicht zugänglich ist (Chen *et al.*, 2000). Desweiteren konnte auch bei anderen Viren beobachtet werden, daß die Heparininteraktion von konformationellen Domänen abhängt (Feldman *et al.*, 1999; Klimstra *et al.*, 1998).

Die Untersuchung von monoklonalen Antikörpern im Heparin-BSA-ELISA gab weiteren Aufschluß über die Wechselwirkung zwischen HSPG und Papillomviren. Vier HPV33 spezifische Antikörper (J3, B6, E12, L11) wurden zunächst im Infektionstest auf neutralisierende Eigenschaften hin untersucht. J3, B6 und E12 neutralisierten

HPV33-Pseudovirionen. Prinzipiell können Antikörper auf zweierlei Weise neutralisierend wirken: (i) sie können eine Virusneutralisation bewirken, indem sie die Anheftung an die Zelle verhindern oder (ii) indem sie Ereignisse hemmen, die nach der Bindung stattfinden (Dimmock, 1993). Es stellte sich die Frage, ob die beobachtete Neutralisation von der Blockierung der Heparinbindungsstelle auf der Virusoberfläche herrühren kann. Monoklonale Antikörper, die eine Bindung an Heparin inhibieren, wurden bereits für andere HSPG-abhängige Viren, wie dem bovinen Herpesvirus 1 (BHV-1) und dem Tollwutvirus (Pseudorabiesvirus: PRV) beobachtet (Okazaki *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1993). Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden HPV33-VLPs mit den monoklonalen Antikörpern vorinkubiert und im Heparin-BSA-ELISA untersucht. B6 verhinderte die Anheftung der VLPs an Heparin. Eine unspezifische, sterische Behinderung als Ursache ist unwahrscheinlich, da sie bei den anderen Antikörpern nicht beobachtet wurde. Eine Möglichkeit ist die Bindung an eine wahrscheinlich konservierte Heparinbindungsdomäne. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß HPV16-Pseudovirionen zwar durch die Inkubation mit Heparin, aber nicht mit B6 neutralisiert werden (nicht gezeigt). Wahrscheinlicher ist, daß B6 nicht direkt die Bindungsstelle erkennt, sondern durch die Anheftung eine konformationelle Änderung dieser Region bedingt, wodurch eine Bindung an Heparin verhindert wird. Strukturveränderungen an Viren nach Bindung neutralisierender Antikörper sind für das Sindbisvirus (Clegg *et al.*, 1983) und das Maul- und Klauenseuche-Virus (McCullough *et al.*, 1987) bereits beschrieben.

Erstaunlicherweise zeigte E12 eine Kreuzreaktivität mit Heparin. FACS-Analysen demonstrierten ferner eine Bindung von E12 an COS7-Zellen, vermutlich über eine Interaktion mit Heparansulfat. Untersuchungen zur Neutralisation gebundener HPV33-Pseudovirionen zeigen, daß E12 jedoch nicht mit der Heparinbindung interferiert. Ein denkbarer Mechanismus für die Neutralisation gebundener Pseudovirionen durch E12 wäre eine Kreuzvernetzung zwischen Pseudovirionen und HSPG. Dadurch könnte der Übergang auf den Aufnahmerezeptor blockiert werden. Bei der Neutralisation gebundener Pseudovirionen verläuft die E12-Kurve zeitlich etwas vor der K53-Kurve. Man kann spekulieren, daß dieser kleine zeitliche Unterschied den Zeitraum zwischen Bindung an den Aufnahmerezeptor und der Aufnahme in die Zelle widerspiegelt.

Die Analyse HPV33-spezifischer Antikörper zeigt, daß die Hemmung der HSPG-Interaktion ein möglicher Mechanismus der Neutralisation ist und somit im Infektionszyklus von

Relevanz ist. Das hier dargestellte Anwendungsfeld des Heparin-BSA-ELISA kann die Identifizierung von Antikörpern ermöglichen, die die Heparinbindungsstelle erkennen. Solche Antikörper könnten dann zur Charakterisierung von Heparinbindungsdomänen auf der Virusoberfläche beitragen.

3.2 Untersuchung zur Aufnahmekinetik

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand folgender Befunde belegt werden, daß HSPG für die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen essentiell sind: (i) Heparin, nicht aber Chondroitin oder Dermatan sulfat hemmt die Infektion mit Pseudovirionen. (ii) Heparinase I- und chlorat-behandelte COS7-Zellen sind vollständig bzw. teilweise resistent gegen eine Infektion mit Pseudovirionen. (iii) Antikörper können Pseudovirionen neutralisieren, indem sie die Bindung an Heparansulfat inhibieren. HSPG sind in unterschiedlicher Form Bestandteile der Zelloberfläche verschiedener Zelltypen (Höök *et al.*, 1984). In Übereinstimmung hiermit können Papillomviren an eine Vielzahl unterschiedlichster Zellen binden. Da auch HSPG durch milde Trypsinierung von der Zelloberfläche entfernt werden können (Hovingh *et al.*, 1993), ist es verständlich, warum keine VLP-Bindung an trypsinierte Zellen beobachtet werden kann (Volpers *et al.*, 1995; Roden *et al.*, 1995). Papillomviren infizieren die Basalzellen der Epidermis. Um in diese tieferen Hautschichten gelangen zu können, dienen Verletzungen der Haut oder Schleimhaut als Eintrittspforte. Interessanterweise wird die Expression von Syndecan-4, einem ubiquitär vorkommenden HSPG, als Folge einer Hautverletzung bei proliferierenden Zellen hochreguliert (Bernfield *et al.*, 1999). Damit erfüllen HSPG durchaus Anforderungen eines Papillomvirusrezeptors. Bezüglich der Signifikanz der Interaktion zwischen HSPG und Papillomviren sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Zum einen kann die Bindung an HSPG lediglich zur Konzentration des Virus auf der Zelle dienen. Dies könnte die Kooperation mit Hilfsrezeptoren auf der Zelloberfläche erleichtern, möglicherweise unter Ausbildung eines ternären Komplexes. Alternativ kann die Wechselwirkung mit HSPG eine Konformationsänderung des Kapsids induzieren, die eine Bindung an den Aufnahmerezeptor bzw. einen weiteren Rezeptor erlaubt. Eine Vielzahl von Viren, darunter Herpesviren (Flynn & Ryan, 1995, WuDunn & Spear, 1989), HIV (Roderiquez *et al.*, 1995), Flaviviren (Chen *et al.*, 1997) und Alphaviren (Byrnes & Griffin, 1998) nutzen Heparansulfatproteoglykane zur initialen Bindung an die Wirtszelle, werden aber über spezifische sekundäre Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. Die Frage nach der

Beteiligung sekundärer Rezeptoren bei HPV33 wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Neutralisation gebundener Pseudovirionen einerseits durch Heparin und andererseits durch Antikörper untersucht. Während Heparin lediglich die Bindung von Pseudovirionen aufhebt, sollte das Antiserum auch mit späteren Schritten im Infektionszyklus, also auch mit möglichen weiteren Rezeptoren interferieren. Im Vergleich zum Antiserum zeigte sich in Gegenwart von Heparin eine um etwa vier Stunden vorverschobene Infektionskinetik. Die Bindung ging im Laufe der Infektion von einem heparinsensitiven in einen heparinresistenten Zustand über, während die Pseudovirionen immer noch auf der Oberfläche und somit für das Antiserum zugänglich waren. Ein Wechsel von einer heparinsensitiven zu einer heparinresistenten Bindung wurde auch bei Herpesviren beobachtet (Compton *et al.*, 1993). Eine Erklärung für diesen Befund wäre eine Veränderung in der Qualität der Heparansulfatbindung. Pseudovirionen könnten anfänglich lose an ein HSPG binden, dann aber durch zusätzlich rekrutierte HSPG komplexiert werden. Dies könnte die Bindung stabilisieren und heparinresistent machen. Eine Konformationsänderung wäre auch denkbar, ist aber unwahrscheinlich, da das Antiserum, aber auch der monoklonale Antikörper, weiterhin die Pseudovirionen erkannte. Alternativ kann analog zu anderen heparinbindenden Viren der Verlust der Heparinsensitivität auf den Übergang auf sekundäre (nicht-HSPG) Rezeptoren hindeuten. Somit könnten HSPG den anfänglichen Rezeptor für Papillomviren darstellen und eine schnelle Assoziation zwischen Virus und Zelle ermöglichen, und nachfolgende Rezeptoren für langsamere Interaktionen, wie verstärkte Adhäsion oder Viruspenetration verantwortlich sein.

Die Virusbindung und -internalisation läuft bei vielen Viren in einigen Minuten ab (Bodaghi *et al.*, 1999; Hefferon *et al.*, 1999; Leopold *et al.*, 1998; Wild *et al.*, 1998; Hase *et al.*, 1990; Kaljot *et al.*, 1988; Portis *et al.*, 1985; Nemerow & Cooper, 1984) und ist bei den meisten Viren gewöhnlich bereits nach 2-3 Stunden abgeschlossen (Hung *et al.*, 1999; Fukuhara *et al.*, 1988; Keljo & Smith, 1988; Anderson & Nexo, 1983). Dahingegen ist die Aufnahme von HPV33-Pseudovirionen außergewöhnlich langsam. Dieser Befund ist vermutlich nicht methodisch bedingt, da die Neutralisation gebundener Partikel zur Ermittlung der Infektionskinetik beim Rotavirus (Kaljot *et al.*, 1988), dem Adenovirus (Varga *et al.*, 1991) und SV40 (Anderson *et al.*, 1996) ebenfalls zum Einsatz kam. Keines dieser Viren zeigte jedoch solch eine langsame Aufnahmerate. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Daten zur Aufnahmekinetik authentischer Virionen von BPV-1, CRPV und HPV11 (Christensen *et al.*, 1995) übereinstimmen, kommt die Verwendung von Pseudovirionen als

Ursache ebenfalls nicht in Frage. Über die Gründe der langsamen Aufnahme können mehrere Vermutungen angestellt werden: (i) die Anzahl der Aufnahmerezeptoren ist limitiert, möglicherweise wird dieser erst durch die Virusbindung induziert. Diese Vermutung könnte erklären, warum die Heparinase I-Behandlung die Infektion vollständig hemmt. (ii) die Affinität für den zweiten Rezeptor ist niedrig, (iii) die Migration des Virus-Rezeptor-Komplexes zur Aufnahmestelle (z.B. *coated pits*) ist der zeitlimitierende Faktor, oder (iv) der Aufnahme-prozeß an sich ist sehr langsam.

Die hier dargelegten Daten deuten darauf hin, daß bei der Infektion mit Pseudovirionen eine qualitative Änderung der Bindung stattfindet und daß möglicherweise sekundäre bzw. weitere Rezeptoren an der Infektion beteiligt sind. Doch solange diese Rezeptoren nicht eindeutig identifiziert sind, kann man nicht ausschließen, daß HSPG als einzige Rezeptoren dienen, zumal es Shukla und Mitarbeitern (1999) gelang, Zellen, die Herpes-Simplex-Viren binden, aber nicht aufnehmen können, durch eine spezifische Sulfatierung von HSPG infizierbar zu machen. Die langsame Infektionskinetik von HPV33-Pseudovirionen könnte ferner auch aus einer HSPG-vermittelten Endozytose resultieren. In der Regel ist die HSPG vermittelte Aufnahme mit einer Halbwertszeit von 5-10 Minuten (über *coated pits*) und 1 Stunde (*coated pits*-unabhängig) zwar ein relativ schneller Vorgang. Als Ausnahme gilt hier jedoch Perlecan, das eine langsame Endozytose ($t_{1/2} \sim 6$ Stunden) der Liganden bedingt (Fuki *et al.*, 2000).

Für das Maul- und Klauenseuche-Virus und das Sindbisvirus konnte gezeigt werden, daß die Bindung an Heparansulfat eine Anpassung an die Zellkulturbedingungen darstellt (Sa-Carvalho *et al.*, 1997; Klimstra *et al.*, 1998). So führte die Propagierung des heparinunabhängigen Wildtyp-Sindbisvirus in Zellkulturzellen schnell zur Selektion von Mutanten die mit hoher Affinität an Heparin banden. Während die Infektion durch die ursprünglichen Viren nicht durch Heparin beeinflusst wurde, konnte eine Infektion durch passagierte Viren mit Heparin bzw. Heparinase inhibiert werden. Eine Sequenzanalyse der passagierten Viruspopulation ergab einen Aminosäureaustausch (E→K) im E2-Protein, der mit einer verstärkten Bindung an Zellen über Heparansulfat einherging. Im Gegensatz zu den oben geschilderten Viren, werden HPV33-Pseudovirionen nicht passagiert, sondern jedesmal neu im Vacciniavirus-Expressionssystem synthetisiert. Sicherlich könnten Vacciniaviren im Laufe ihrer Amplifikation Mutationen anhäufen. Doch da Mutationen im L1- oder L2-Gen, die mit einer erhöhten Bindung an Heparansulfat einhergehen könnten, für das Vacciniavirus keinen Selektionsvorteil bringen, ist es unwahrscheinlich, daß die HS-Bindung von

Pseudovirionen in diesem Sinne zellkulturbedingt ist. Andererseits kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß die Infektion der natürlichen Wirtszelle (primäre Keratinozyten) über alternative, HS-unabhängige Mechanismen verläuft. Interessant wäre es deshalb zu prüfen, ob im *In vivo*-Modell eine Vorinkubation von natürlichen Viren mit Heparin vor einer Infektion schützt.

3.3 Die infektiöse Aufnahme von Pseudovirionen

Um eine Zelle erfolgreich zu infizieren, müssen Viren an einen spezifischen Zellrezeptor binden und die Plasmamembran penetrieren, um ihr Genom in den Kern zu transferieren. Während bei umhüllten Viren detaillierte Informationen über diesen Vorgang bestehen (Marsh 1984), ist das Wissen über die Mechanismen, mit denen Viren ohne Hülle die Zellmembran penetrieren, lückenhaft. Für den größten Teil der nichtumhüllten Viren wird eine infektiöse Aufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose mit anschließender Penetration durch saure Vesikel postuliert. Durch die Verwendung von Inhibitoren konnten wichtige Erkenntnisse über die verschiedenen Aufnahmewege erzielt werden (Tabelle 4).

Zur Untersuchung der Papillomvirusaufnahme wurden bislang nur morphologische und ultrastrukturelle Studien durchgeführt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen VLPs in glatten, 70-80 nm großen Vesikeln (Volpers *et al.*, 1995). Es ist aber nicht geklärt, ob leere VLPs über den gleichen Mechanismus in die Zelle gelangen wie DNA-haltige Partikel. Unter Verwendung authentischer BPV-1 Virionen finden Zhou und Mitarbeiter (1995), daß eine Aufnahme über große, glatte Vesikel (400-800 nm Durchmesser) stattfindet. Bei dieser Untersuchung fällt jedoch auf, daß hohe Mengen an BPV-1 Virionen (500-2000 ng) auf die Zellen gegeben wurden, sodaß der beobachtete Transportmechanismus nicht zwangsläufig mit einer infektiösen Aufnahme übereinstimmt. Zur partiellen Charakterisierung des infektiösen Aufnahmewegs von HPV33-Pseudovirionen wurde in der vorliegenden Arbeit die Infektion durch Pseudovirionen in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren untersucht. Aufgrund der langsamen Aufnahmekinetik wurde der Untersuchungszeitraum auf sechs Stunden begrenzt.

Tabelle 4: Einfluß von Inhibitoren auf die Aufnahme verschiedener Viren. Aufgeführt wurden nur diejenigen Inhibitoren, die ich ebenfalls zur Charakterisierung des Aufnahmewegs von HPV-33 herangezogen habe. +/- zeigen an, ob der Inhibitor die Infektion beeinflusst oder nicht. Hinter dem Virusnamen ist in Klammern die Virusfamilie aufgeführt. PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; ss: singlestrand (Einzelstrang), ds: doublestrand (Doppelstrang); ER: Endoplasmatisches Reticulum.

Virus	Aufnahmeweg	Inhibitoren		Literatur
Rabies Virus (Rhabdoviridae) ss-RNA-Virus mit Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-abhängig -energieunabhängig	20 mM NH ₄ Cl: 100 µM Chloroquin: 10 mM NaN ₃ : 50 mM 2-Desoxyglucose:	+ + - -	Superti <i>et al.</i> , 1984
Rotavirus (Reoviridae) dsRNA-Virus ohne Hülle	<i>Zellmembranpenetration</i> -pH-unabhängig -energieunabhängig (Endozytose nur von nichtinfektiösen Virionen)	30 mM NH ₄ Cl: 230 µM Chloroquin: 10 mM NaN ₃ :	- - -	Kaljot <i>et al.</i> , 1988
Herpes Simplex Virus (Herpesviridae) dsDNA-Virus mit Hülle	<i>Zellmembranfusion</i> -pH-unabhängig -energieunabhängig	10-30 mM NH ₄ Cl: 100 µM Chloroquin: 0,1% NaN ₃ / 50 mM 2- Desoxyglucose: 2, 10 µM Cytochalasin b:	- - - - +	Wittels & Spear, 1990; Köck <i>et al.</i> , 1996; Perez & Carrasco, 1994 Rosenthal <i>et al.</i> , 1985
Adenovirus (Adenoviridae) dsDNA-Virus ohne Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-unabhängig -energieabhängig -dynaminabhängig	40 mM NH ₄ Cl: 400 µM Chloroquin: 10, 50 mM NaN ₃ : 50 mM 2-Desoxyglucose: 12,5 µM Cytochalasin b:	- - + - -	Svensson & Persson, 1984 Wang <i>et al.</i> , 1998
Poliovirus (Picornaviridae) ssRNA-Virus ohne Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-unabhängig	10, 200 µM Chloroquin:	-	Perez & Carrasco, 1993; Gromeier & Wetz, 1990
Semliki Forest Virus (Togaviridae) ssRNA-Virus mit Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-abhängig -energieabhängig	200 µM Chloroquin: 10 mM NaN ₃ :	+ +	White & Helenius, 1980; Marsh & Helenius 1980
Simian Virus 40 (Papovaviridae) dsDNA-Virus ohne Hülle	<i>Caveolaeabhängige</i> <i>Endozytose ins ER</i> -pH-unabhängig	1, 10, 100 µM Chloroquin: 1, 2, 6 µM Cytochalasin b: 1, 10 µM PMA: 10, 25 µM Nystatin :	- - + +	Anderson <i>et al.</i> , 1996 Shimura <i>et al.</i> , 1987
Polyomavirus (Papovaviridae) dsDNA-Virus ohne Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-unabhängig -dynaminunabhängig -caveolaeunabhängig	1-25 mM NH ₄ Cl: 10 µM PMA:	- -	Gilbert & Benjamin, 2000; Pho <i>et al.</i> , 2000
Humanes Papillomvirus Typ 33 (Papovaviridae) dsDNA-Virus ohne Hülle	<i>Endozytose</i> -pH-abhängig -energieabhängig	10 mM, 20 mM NH ₄ Cl: 50 µM Chloroquin: 0,1% (~15 mM) NaN ₃ : 0,1% NaN ₃ /50 mM 2- Desoxyglucose: 1,5,10 µM Cytochalasin b: 1, 10 µM PMA: 10, 25 µM Nystatin:	+ + - + + - -	Vorliegende Arbeit

Ammoniumchlorid und Chloroquin vermindern die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen. Da die Hauptauswirkung dieser schwachen Basen die Erhöhung des vesikulären pHs ist (De Duve *et al.*, 1974; Ohkuma & Poole, 1978), liegt der Schluß nahe, daß diese Substanzen den lysosomenabhängigen Teil der Infektion beeinträchtigen. Die höhere Wirksamkeit von Chloroquin ist vermutlich auf eine zusätzliche Beeinträchtigung während der Endozytose zurückzuführen (Berg & Tolleshaug, 1980). Die Hemmung der Infektion durch diese Substanzen belegt, daß die Infektion mit Pseudovirionen über endosomale/lysosomale Kompartimente vermittelt wird. Ein niedriger pH, wie er in Lysosomen vorliegt, ist für die Infektiosität zahlreicher Viren wichtig (Marsh & Helenius, 1989). Die pH-abhängige Aktivierung von Peptidasen und somit die Proteolyse viraler Proteine ist eine Voraussetzung für die Infektiosität von Reoviren (Canning & Fields, 1983). Beim SFV (Semliki Forest Virus) induziert ein niedriger pH die Fusion zwischen der viralen Hülle und der lysosomalen Membran, wodurch das Nukleokapsid ins Zytoplasma gelangt (White & Helenius, 1980). Man nimmt an, daß das saure Milieu eine Konformationsänderung der viralen Proteine auslöst, wodurch maskierte, hydrophobe Epitope exponiert werden, die eine Fusion mit der Vesikelmembran in Gang setzen. Wie es Papillomviren gelingt, aus den Vesikeln zu entkommen, ist bislang nicht bekannt. Die N-terminale Myristilierung des VP2-Proteins scheint bei den zur gleichen Familie wie Papillomviren gehörenden Polyomviren für die Freisetzung ins Zytoplasma wichtig zu sein (Chen *et al.*, 1998). Doch weder ist das HPV L1-Protein myristiliert (Fang *et al.*, 1999) noch findet sich beim L2-Protein eine geeignete Signalsequenz für solch eine Modifikation. Nach neuesten Erkenntnissen könnte HPV33L2 eine fusogene Aktivität besitzen (M.Sapp, persönliche Mitteilung). Dies würde Daten erklären, wonach L2 zwar nicht für die Zellbindung benötigt wird, aber die Infektion um ein Vielfaches erhöht (Unckell *et al.*, 1997). Der Transport in den Kern ist ebenfalls noch ungeklärt. BPV1-Virionen scheinen im Zytoplasma mit Mikrotubuli zu assoziieren (Liu *et al.*, 2001). Andererseits deuten Untersuchungen zum Kerntransport von HPV11 und HPV45L1 auf einen energieabhängigen Transport in Form von Kapsomeren über Karyopherin $\alpha_2\beta_1$ Heterodimere hin (Nelson *et al.*, 2000; Merle *et al.*, 1999).

Der Befund, daß Papillomviren über Endosomen aufgenommen werden, wird auch durch die metabolische Inhibition der Infektion gestützt. Natriumazid und 2-Desoxy-D-Glucose, Inhibitoren der Atmungskette und der Glykolyse (Hotchkiss, 1944; Webb, 1966) verhinderten bei kombinierter Zugabe eine Infektion mit Papillomviren. Die Ursache für die Unwirksamkeit von Natriumazid alleine ist möglicherweise darin zu sehen, daß durch diese Substanz eine vollständige Energiedepletion in der Regel nicht möglich ist (Sorensen *et al.*, 1999). Der Energiebedarf der Zelle kann weiterhin durch Glykolyse gedeckt werden. Dies gilt wahrscheinlich auch in unserem System, da unser Kulturmedium hohe Konzentrationen an Glukose enthält. Erst durch die Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose, einem kompetitiven Inhibitor der Glykolyse, erhält man nahezu ATP-freie Zellen. Der energieabhängige endosomale Aufnahmeweg ist dann vollständig blockiert.

Die Verwendung von Cytochalasin b resultierte in einer erheblich reduzierten HPV-Infektion. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Daten von Zhou und Mitarbeitern (1995), die mittels Immunfluoreszenz zeigen konnten, daß BPV-1 Virionen durch Cytochalasin b-behandelte Zellen nicht aufgenommen werden. Offenbar ist die Endozytose von HPV33-Pseudovirionen mikrofilamentabhängig. Dieses Ergebnis ist nicht erstaunlich, da das Zytoskelett nicht nur für die Form und Motilität der Zelle verantwortlich ist, sondern auch gezielte Vesikelbewegungen ermöglicht. Dennoch konnte durch Cytochalasin b keine vollständige Hemmung der Infektion erreicht werden. Da das Zytoskelett für die Beförderung ins Zellinnere eine physikalische Barriere darstellt, könnte durch dessen Schwächung der passive Eintritt in die Zelle erleichtert werden (Sodeik, 2000).

Caveolen sind kleine (70-100 nm) kolbenförmige Vertiefungen der Plasmamembran, die in die Pinozytose involviert sind. Charakteristisch sind hohe Mengen an Cholesterol und Glykosphingolipiden und die Anwesenheit von Caveolin, einem 20-24 kDa großen, integralen Membranprotein (Anderson, 1998). Die Behandlung von COS7-Zellen mit PMA und Nystatin, zwei selektiven Inhibitoren des caveolenabhängigen Aufnahmewegs (Anderson *et al.*, 1996; Smart *et al.*, 1994), zeigte keine signifikante Beeinträchtigung der HPV33-Infektion während des sechsständigen Inkubationszeitraumes. Erstaunlicherweise stieg jedoch die Infektionsrate nach Entfernung von PMA nicht weiter an. Möglicherweise beeinträchtigt PMA langfristig die Stabilität der Partikel. Beide Inhibitoren bewirken in der gleichen Konzentration eine drastische Senkung der SV40 Infektion (Anderson *et al.*, 1996). Obwohl sowohl Papillomviren als auch SV40 Angehörige der Papoviridae sind, scheinen beide Viren

unterschiedliche Aufnahmewege zu benutzen. Dies wird auch dadurch deutlich, daß die Infektion mit SV40 im Gegensatz zur Infektion mit HPV33-Pseudovirionen durch Cytochalasin b nicht beeinträchtigt wird (Shimura *et al.*, 1987). Offenbar wird der Zelleintritt mittels Caveolen über andere Komponenten des Zytoskeletts vermittelt, als für die Aufnahme von HPV33-Pseudovirionen notwendig sind.

Inhibitoren können Nebeneffekte haben, insbesondere wenn sie, wie im vorliegenden Fall, über einen längeren Zeitraum auf die Zellen einwirken. Um zu zeigen, daß die beobachtete Hemmung der Infektion auf die spezifische Blockierung von Prozessen beruht, die für den Viruseintritt in die Zelle wichtig sind und nicht auf der unspezifischen Beeinträchtigung der Zellvitalität, wurde in Kontrollansätzen nach Entfernung des Inhibitors kein Antiserum zugegeben. Bei unbeschädigten, funktionsfähigen Zellen sollte die weitere Aufnahme bereits gebundener Viruspartikel möglich sein. Bis auf PMA konnte für alle Inhibitoren gezeigt werden, daß der beobachtete Effekt reversibel war. In den Kontrollansätzen war eine Zunahme der Infektion feststellbar. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die Wirkung der Chemikalien in der Regel weder auf die Schädigung der Viren noch auf die generelle Beeinträchtigung der Zellvitalität beruhen. Dennoch konnte in den meisten Fällen die Infektionsrate unbehandelter Zellen nicht erreicht werden. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise das Ergebnis einer abortiven Infektion unter Inhibitoreinfluß sein. In diesem Fall würden Pseudovirionen zusätzlich über einen nichtinfektiösen Aufnahmeweg in die Zelle gelangen.

Mit der Abwandlung des Infektionstests gelang eine einführende Untersuchung zu der infektiösen Aufnahme von HPV33-Pseudovirionen in COS7-Zellen. Die vorliegenden Daten befürworten eine mikrofilamentabhängige Endozytose, in der ein niedriger pH für das funktionelle „uncoating“ wichtig ist. Caveolen scheinen an der Aufnahme nicht beteiligt zu sein. Es bedarf jedoch weiterer Experimente, um den Aufnahmeweg vollständig zu charakterisieren. So konnte die Rolle von *coated pits*, die gelegentlich bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurden (Zhou *et al.*, 1995), nicht eindeutig geklärt werden. Die Ansäuerung des Zytosols ist eine effektive Methode zur Unterscheidung von *coated pits*-abhängigen und -unabhängigen Aufnahmewegen, da der erniedrigte pH die Abschnürung der umhüllten Vesikel unterbindet (Sandvig *et al.*, 1987). Da COS7-Zellen eine sechsstündige pH-Senkung nicht vertragen, konnte nicht geklärt werden, inwieweit die Aufnahme über clathrinumhüllte Vesikel für die Infektion mit PV von

Bedeutung ist. Über die Wirkung von Cytochalasin b auf die *coated pits*-abhängige Aufnahme herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Sandvig & van Deurs (1990) finden keine Hemmung der *coated pits*-abhängigen Aufnahme durch Cytochalasin, während in einer weiteren Studie Cytochalasin b zwar keinen Einfluß auf die Einstülpung von *coated pits* hat, die weitere Translokation der Vesikel ins Zellinnere jedoch mikrofilamentabhängig ist (Salisbury & Keller, 1983). Zukünftige Versuche mit weiteren *coated pits*-spezifischen Inhibitoren, wie Monodansylcadaverine (Phonpok & Rosenthal, 1991) oder die Verwendung von Zelllinien mit mutiertem Dynamin (Damke *et al.*, 1994) könnten die Rolle dieser Vesikel bei der Aufnahme und Infektion mit Pseudovirionen klären. Schließlich läßt die hier gewählte Untersuchungsmethode teilweise offen, ob der Inhibitor ausschließlich die Zellpenetration oder auch nachfolgende Schritte in der Infektion beeinflusst. So könnte sich die hemmende Wirkung der Energiedepletion auch auf den zytoplasmatischen Transport der HPV-Partikel erstrecken.

In einem Modell zur frühen Phase der HPV33-Pseudovirioneninfektion stellen sich die Bindung und Aufnahme wie folgt dar (Abbildung 32): Pseudovirionen binden über den primären Rezeptor HSPG an die Zelle (I.). Aufgrund der schwachen Interaktion „rollen“ sie dann über die Zelloberfläche bis sie von weiteren HSPG-Molekülen komplexiert werden oder auf den sekundären Rezeptor übergehen (II.). In diesem Zustand ist die Bindung durch gelöstes Heparin nicht mehr kompetitiv hemmbar. Nach der Bindung an den Aufnahmerezeptor werden Pseudovirionen durch eine mikrofilamentabhängige Endozytose aufgenommen (III.). Dieser Prozeß erfordert zelluläre Energie. Auf dem Weg ins Zellinnere reifen die Endosomen zu Lysosomen heran, bzw. fusionieren mit bereits bestehenden Lysosomen. Hier kommt es zum sogenannten „uncoating“ der Pseudovirionen, welches durch pH-Erhöhung verhindert wird (IV.). Wie das Virus bzw. die virale DNA, aus den Vesikeln gelangt und in den Kern transportiert wird, ist bislang unbekannt.

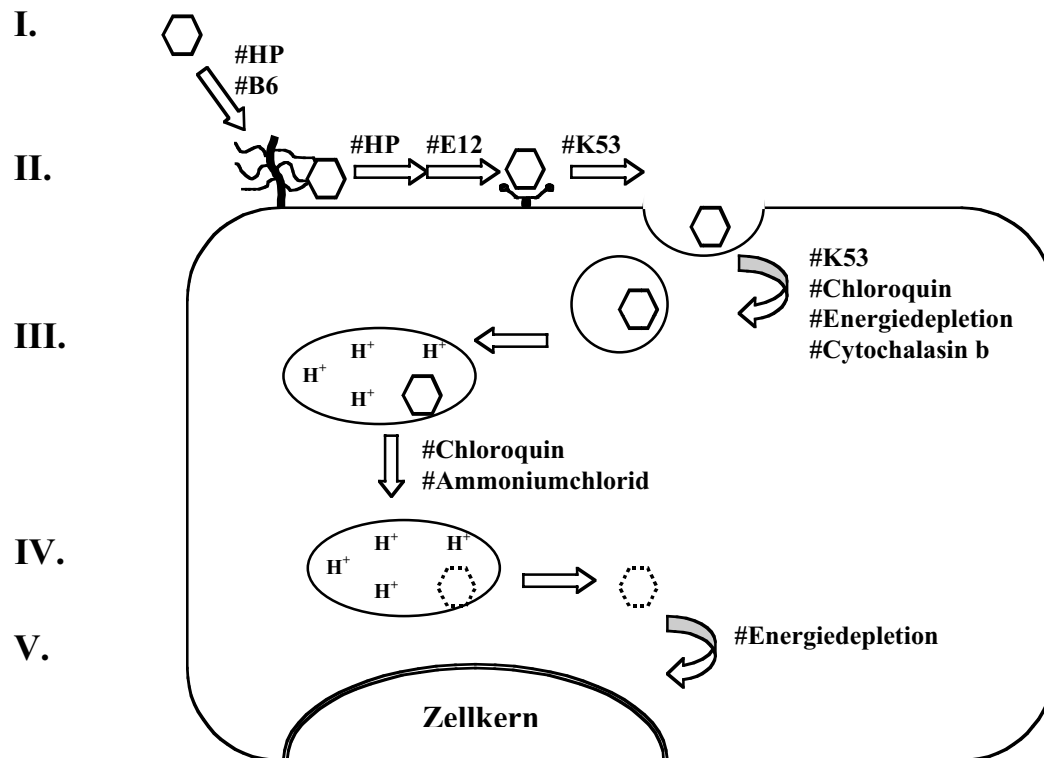


Abbildung 32: Die frühen Abschnitte der Papillomvirusinfektion. Dargestellt sind die verschiedenen Stufen im Infektionsgeschehen und die Antikörper bzw. Drogen die diese Schritte hemmen. (I.) Bindung an die Zelloberfläche. (II.) Bindung an weitere Rezeptoren. (III.) Aufnahme über Endosomen. (IV.) Uncoating. (V.) Translokation des Kapsids/Kapsomers in den Kern. HP: Heparin; E12, B6: monoklonale Antikörper; K53: polyklonales Antiserum, #: Hemmung.

V. Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA-Viren, die strikt wirts- und gewebespezifisch die basalen Epithelzellen von Haut und Schleimhäuten infizieren. Je nach Virustyp führt die Infektion zur Induktion gutartiger Warzen oder ist mit der Entstehung von malignen Tumoren im Anogenitalbereich assoziiert. HPV33 gehört zur einer Gruppe von HPV-Typen, die wesentlich an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt sind.

Humanpathogene Papillomviren lassen sich *in vitro* nur in komplexen Systemen und in geringen Mengen propagieren, da der Replikationszyklus des Virus stark an die einzelnen Differenzierungsstadien des Gewebes adaptiert ist. Das bedingt auch, daß Informationen über die frühen Infektionsschritte, wie Bindung an den Rezeptor und Penetration der Zelle weitestgehend fehlen. Pseudovirionen, die durch die Synthese der Strukturproteine L1 und L2 in Gegenwart eines Markerplasmids im Vacciniavirus-Expressionssystem generiert werden, sind ein adäquater Ersatz für native Virionen. Durch die Verwendung eines Markers ist ein DNA-Transfer und somit eine Infektion in üblichen Zellkulturzellen nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HPV-Pseudovirionen mit *gfp* als Reporter genen generiert und zur Charakterisierung verschiedener Aspekte der HPV-Infektion verwendet. Dabei war die Identifizierung des viralen Rezeptors von besonderem Interesse. Es konnte erstmals anhand mehrerer Befunde belegt werden, daß Heparansulfatproteoglykane (HSPG) für die Infektion mit Pseudovirionen essentiell sind: (i) Heparin, nicht aber Chondroitin- oder Dermatansulfat inhibiert die Infektion, (ii) Heparinase I- oder chloratbehandelte COS7-Zellen sind vollständig bzw. teilweise resistent gegen eine Infektion, (iii) monoklonale Antikörper können Pseudovirionen neutralisieren, indem sie die Bindung an Heparin verhindern. Eine Bindung von Viruspartikeln an Heparin konnte mit Hilfe eines Heparin-BSA-ELISAs nachgewiesen werden. Offenbar ist diese Bindung auch für andere HPV-Typen charakteristisch, da neben HPV33- auch HPV16- und HPV39-VLPs an Heparin-BSA banden. Die Bindung an Heparin wird durch ein konformationelles Epitop vermittelt, da weder die Konkurrenz mit einem C-terminalen Peptid des HPV33-L1, das ein mögliches Heparinbindungsmotiv (**BBXB**) enthält, noch die Vorinkubation mit einem dagegen gerichteten Peptidantiserum, die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen zu hemmen vermochte. Desweiteren belegt die Heparinbindung von C-terminal deletierten HPV33-VLPs, denen das lineare Heparinbindungsmotiv fehlt, daß der C-Terminus des L1-Proteins nicht allein für die Bindung verantwortlich sein kann.

Daß α_6 -Integrin kein obligater Rezeptor für HPV33-Pseudovirionen ist, konnte durch die Infektion der α_6 -integrinnegativen Zelllinie DG75 demonstriert werden. Desweiteren hatte die Behandlung von COS7-Zellen mit einem α_6 -integrinspezifischen Antikörper keinen Einfluß auf die Infektiosität von Pseudovirionen. Die Infektion mit HPV33-Pseudovirionen wies eine erstaunlich langsame Kinetik auf, wie aus der Neutralisation gebundener Pseudovirionen geschlossen werden konnte. Auch vier Stunden nach der Bindung waren noch alle Pseudovirionen auf der Zelloberfläche und somit für die vollständige Neutralisation durch ein Antiserum zugänglich. Im Vergleich dazu zeigte sich in Gegenwart von Heparin eine um etwa vier Stunden vorverschobene Kinetik. Der Wechsel von einer heparinsensitiven zur einer heparinresistenten Bindung auf der Zelloberfläche könnte ein Hinweis auf die Beteiligung weiterer Rezeptoren bei der HPV-Infektion sein. Desweiteren gelang durch die Adaption des *In vitro*-Infektionssystems eine partielle Charakterisierung der infektiösen Aufnahme von HPV33-Pseudovirionen in COS7-Zellen. Die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren auf die Pseudoinfektion lassen schließen, daß Pseudovirionen über eine mikrofilamentabhängige Endozytose mit anschließender Penetration durch saure Vesikel aufgenommen werden. Dieser Prozeß erfordert zelluläre Energie. Offenbar sind Caveolen an der Aufnahme nicht beteiligt, da die Behandlung von COS7-Zellen mit spezifischen Inhibitoren der caveolenabhängigen Aufnahme keine signifikante Beeinträchtigung der Pseudoinfektion zeigte.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der serologischen Verwandtschaft unter genitalen „high-risk“ HPV-Typen. Um Rückschlüsse über die idealen Eigenschaften möglicher prophylaktischer Vakzine zu gewinnen, wurden zusätzlich zu HPV33-Pseudovirionen auch HPV16-, und HPV18-Pseudovirionen hergestellt und deren Neutralisation durch Kaninchenantisera gegen VLPs der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39 und 45 untersucht. Eine Kreuzneutralisation wurde nur zwischen HPV31 und HPV33 einerseits und zwischen HPV18 und HPV45 andererseits beobachtet. Da die Kreuzneutralisation jedoch weniger effizient war, als die Neutralisation durch das homotypische Antiserum, sollte ein multivalenter Impfstoff VLPs aller HPV-Typen enthalten, vor denen ein Schutz erwünscht ist.

VI. Literatur

- Anderson, H.A., Chen, Y. and Norkin, L.C.** (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1825-1834.
- Anderson, K.B. and Nexø, B.A.** (1983). Entry of murine retrovirus into mouse fibroblasts. *Virology* **125**, 85-98.
- Anderson, R.G.W.** (1998). The caveolae membrane system. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 199-225.
- Androphy, E.J., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1987). Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* **325**, 70-73.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, F.K., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1994). Current protocols in molecular biology, Vol. 1-3. John Wiley and Sons, New York.
- Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain-Hobson, S. and Orth, G.** (1986). A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246-249.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J.M., Cohen, M.M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E. and Klein, G.** (1977). Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int. J. Cancer* **19**, 27-33.
- Berg, T. and Tolleshaug, H.** (1980). The effects of ammonium ions and chloroquine on uptake and degradation of 125I-labeled asial-fetuin in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 917-925.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. and Zako, M.** (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 729-777.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunnen, M.E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R.C., van Dam-Mieras, M.C., Zipeto, D., Virelizier, J.L., LeHoang, P., Bruggeman, C.A. and Michelson, S.** (1999). Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2598-2607.
- Bonnez, W. and Reichman, R.C.** (2000). Papillomaviruses. In „Principles and Practice of Infectious Diseases“ (Mandell, G.L., Bennet, J.E., Dolin, R., eds.), Churchill Livingstone, New York. 1630-1644.
- Breau, W.C., Atwood, W.J. and Norkin, L.C.** (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J. Virol.* **66**, 2037-2045.
- Breitbart, F. and Coursaget, P.** (1999). Human papillomavirus vaccines. *Sem. Cancer Biol.* **9**, 431-445.
- Breitbart, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N.L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J.T. and Lowy, D.R.** (1995). Immunization with virus like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* **69**, 3959-3963.

- Broker, T.R. and Botchan, M.** (1986). Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. *Cancer Cells* **4**, 17-36.
- Byrnes, A.P. and Griffin, D.E.** (1998). Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**, 7349-7356.
- Campo, M.S.** (1995). Cell transformation by animal papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 217-219.
- Canning, W.M. and Fields, B.N.** (1983). Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science* **219**, 987-988.
- Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., Harrison, S.C.** (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell.* **5**, 557-567.
- Chen, X.S., Stehle, T. and Harrison, S.C.** (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* **17**, 3233-3240.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J. and Marks, R.M.** (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**, 866-871.
- Chow, L.T. and Broker, T.R.** (1997). Small DNA Tumor Viruses. In *Viral Pathogenesis*, N. Nathanson et al., (eds.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 267-301.
- Christensen, N., Kirnbauer, R., Schiller, J.T., Ghim, S.J., Schlegel, R., Jenson, A.B. and Kreider, J.W.** (1994b). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* **205**, 329-335.
- Christensen, N.D., Cladel, N.M. and Reed, C.A.** (1995). Postattachment neutralization of papillomaviruses by monoclonal and polyclonal antibodies. *Virology* **207**, 136-142.
- 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.** (1994a). 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**, 2271-2276.
- Christensen, N.D., Reed, C.A., Cladel, N.M., Han, R. and Kreider J.W.** (1996). Immunization with virus-like particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* **70**, 960-965.
- Ciuffo, G.** (1907). Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare. *G. Ital. Mal. Venereol.* **48**, 12-17.
- Clegg, J.C.S., Chanas, A.C. and Gould, E.A.** (1983). Conformational changes in sindbis virus E1 glycoprotein induced by monoclonal antibody binding. *J. Gen. Virol.* **64**, 1121-1126.
- Combata, A.-L., Touze, A., Bousarghin, L., El Mehdaoui, S. and Coursaget, P.** (2000). Detection of cross-reactive Antibodies and type specific neutralizing antibodies in high risk HPV types. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Compton, T., Nowlin, D.M. and Cooper, N.R.** (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841.

- Conrad, M., Bubb, V.J. and Schlegel, R.** (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16 -kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.*, **67**, 6170-6178.
- Couchman, J.R. and Woods, A.** (1999). Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J. Cell Sci.* **112**, 3415-3420.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. and Schmid, S.L.** (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell. Biol.* **127**, 915-934.
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**, 142-150.
- De Duve, C., De Barse, T., Poole, B., Tronet, A., Tulkens, P. and Van Hoof, F.** (1974). Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 2495-1531.
- De Villiers, E.M.** (1997). Papillomavirus and HPV-Typing. *Clin. Dermatol.* **15**, 199-206.
- DiMaio, D., Guralski, D. and Schiller, J.T.** (1986). Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *PNAS* **83**, 1797-1801.
- Dimmock, N.J.** (1993). Neutralization of animal viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **183**, 1-149.
- Doorbar, J., Ely, S. and Sterling, J.** (1991). Specific interaction between HPV16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824-827.
- Ernst, S., Rhomberg, A.J., Biemann, K. and Sasisekharan, R.** (1998). Direct evidence for a predominantly exolytic processive mechanism for depolymerization of heparin-like glycosaminoglycans by heparinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4182-4187.
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K. and McMillan, N.** (1997). Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**, 2449-2456.
- Fang, N.X., Frazer, I.H., Zhou, J. and Fernando, G.J.** (1999). Post translational modifications of recombinant human papillomavirus type 6b major capsid protein. *Virus Res.* **60**, 113-121
- Favre, M., Orth, G., Majewski, S., Baloul, S., Pura, A. and Jablonska, S.** (1998). Psoriasis: a possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 311-317.
- Feldman, S.A., Hendry, R.M. and Beeler, J.A.** (1999). Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J. Virol.* **73**, 6610-6617.
- Fife, K.H., Brown, D.R., Wheeler, C.M., Schiff, M.A., Jansen, K.U., Smith, J.F., Dicello, A., Chiacchierini, L. and Smith, P.R.** (2000). A dose-ranging study of the safety and immunogenicity profiles of an HPV 11 L1 VLP candidate vaccine in young healthy women. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Fligge, C., Giroglou, T., Streeck, R.E. and Sapp, M.** (2001). Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology*, in press.

- Flynn, S.J. and Ryan, P.** (1995). A heterologous heparin-binding domain can promote functional attachment of a pseudorabies virus gC mutant to cell surfaces. *J. Virol.* **69**, 834-839.
- Franco, E.L.** (1991). Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 1195-1206.
- Fuki, I.V., Iozzo, R.V. and Williams, K.J.** (2000). Perlecan Heparan sulfate proteoglycan: a novel receptor that mediates a distinct pathway for ligand catabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 25742-25750.
- Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. and Konno, T.** (1988). Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *J. Virol.* **62**, 2209-2218.
- Gilbert, J.M. and Benjamin, T.L.** (2000). Early steps of polyomavirus entry into cells. *J. Virol.* **74**, 8582-8588.
- Giri, I. and Yaniv, M.** (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.* **7**, 2823-2829.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R.E. and Sapp, M.** (2001b). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**, 1565-1570.
- Giroglou, T., Sapp, M., Lane, C., Fligge, C., Christensen, N.D., Streeck, R.E. and Rose, R.C.** (2001a). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* **19**, 1783-1793.
- Gissmann, L., Pfister, H. and Zur Hausen, H.** (1977). Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**, 569-580.
- Greenstone, H.L., Nieland, J.D., DeVisser, K.E., DeBruijn, M.L.H., Kirnbauer, R., Roden, R.B.S., 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. *PNAS* **95**, 1800-1805.
- Gromeier, M. and Wetz, K.** (1990). Kinetics of Poliovirus uncoating in HeLa cells in an nonacidic environment. *J. Virol.* **64**, 3590-3597.
- Hanahan, D.**, (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harro, C.D., Pang, S., Roden, R.B., Hildesheim, A., Wang, Z., Dillner, J., Robinson, R., Schiller, J.T. and Lowy, D.R.** (2000). A safety and immunogenicity trial of a human papillomavirus type 16 L1 virus-like particle vaccine in healthy young adult human volunteers. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Hasan, M., Najjam, S., Gordon, M.Y., Gibbs, R.V. and Rider, C.C.** (1999). IL-12 is a heparin-binding cytokine. *J. Immunol.* **162**, 1064-1070.
- Hase, T., Summers, P.L. and Ray, P.** (1990). Entry and replication of japanese encephalitis virus in cultured cells. *J. Virol. Methods* **30**, 205-214.
- Haywood, A.M.** (1994). Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J. Virol.* **68**, 1-5.
- Hefferon, K.L., Oomens, A.G., Monsma, S.A., Finnerty, C.M. and Blissard G.W.** (1999). Host cell receptor binding by baculovirus GP 64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**, 455-468.

- Henry, M.D. and Campbell, K.P.** (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* **95**, 859-870.
- Höök, M., Kjellen, L., Johansson, S. and Robinson, J.** 1984. Cell-surface glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 847-869.
- Hotchkiss, R.D.** (1944). Gramicidin, Tyrocidin and tyrothrocine. *Adv. Enzymol.* **4**, 153-199.
- Hovingh, P., Piepkorn, M. and Linker, A.** (1993). Differentially expressed patterns of glycosaminoglycan structure in heparan sulfate proteoglycans and free chains. *Eur. J. Biochem.* **211**, 771-779.
- Humphries, D.E. and Silbert, J.E.** (1988). Chlorate: A reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 365-371.
- Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L. and King, C.C.** (1999). Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* **25**, 156-167.
- Hynes, R.O.** (1999). Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* **9**, M33-37.
- Jablonska, S., and Majewski, S.** (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. In „Humanpathogenic Papillomaviruses“ (zur Hausen, H., ed.). Heidelberg, Springer. 157-175.
- Jackson, R.L., Busch, S.J. and Cardin, A.D.** (1991). Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* **71**, 481-539.
- Jenkins, O., Earnshaw, D., Sarginson, G., DelVecchio, A., Tsai, J., Kallender, H., Amegatzie, B. and Browne, M.** (1996). Characterization of the helicase and ATPase activity of human papillomavirus 6b E1 protein. *J. Gen. Virol.* **77**, 1805-1809.
- Jin, L., Abrahams, J.P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R.N. and Carrell, R.W.** (1997). The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *PNAS* **94**, 14683-14688.
- Joyce, J.G., Tung, J.-S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U. and Keller, P.M.** (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5810-5822.
- Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H. and Greenberg, H.B.** (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**, 1136-1144.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, 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**, 10298-10300.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda, T.** (1999). Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J. Virol.* **73**, 6188-6190.
- Keljo, D.J. and Smith, A.K.** (1988). Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **7**, 249-256.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R. and Campo, M.S.** (1996). Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* **219**, 37-44.

- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**, 6929-36.
- Klimstra, W.B., Ryman, K.D. and Johnston, R.E.** (1998). Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* **72**, 7357-7366.
- Köck, J., Borst, E.-M. and Schlicht, H.-J.** (1996). Uptake of Duck Hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J. Virol.* **70**, 5827-5831.
- Kreider, J.W., Howett, M.K., Wolfe, S.A., Bartlett, G.L., Zaino, R.J., Sedlacek, T. and Mortel, R.** (1985). Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. *Nature* **317**, 639-641.
- Lechner, M.S. and Laimins L.A.** (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **68**, 4262-4273.
- Leopold, P.L., Ferris, B., Grinberg, I., Worgall, S., Hackett, N.R., Crystal, R.G.** (1998). Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum. Gene Ther.* **10**, 367-378.
- Li, M., Cripe, T.P., Estes, P.A., Lyon, M.K., Rose, R.C. and Garcea, R.L.** (1997). Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J. Virol.* **71**, 2988-2995.
- Li, R. and Botchan, M.R.** (1994). Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of BPV-1 DNA replication. *PNAS* **91**, 7051-7055.
- Li, R., Knight, J.D. and Jackson, S.P.** (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* **65**, 493-505.
- Liang, X, Babiuk, L.A. and Zamb, T.J.** (1993). Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* **194**, 233-243.)
- Linhardt, R.J., Galliher, P.M. and Cooney, C.L.** (1986). Polysaccharide lyases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **12**, 135-176.
- Liu, W.J., Qi, Y.M., Zhao, K.N., Liu, Y.H., Liu, X.S. and Frazer, I.** (2001). Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules. *Virology* **282**, 237-244.
- Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W.D. and Kurman, R.J.** (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.* **79**, 328-337.
- Lowy, D.R., Kirnbauer, R. and Schiller, J.T.** (1994). Genital human papillomavirus infection. *PNAS* **91**, 2436-2440.
- Ludmerer, S.W., Benincasa, D. and Mark, G.E.** (1996). Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11. *J. Virol.* **70**, 4791-4794.
- Ludmerer, S.W., Benincasa, D., Mark, G.E. and Christensen, N.D.** (1997). A neutralizing epitope of human papillomavirus type 11 is principally described by a continuous set of residues which overlap a distinct linear, surface-exposed epitope. *J. Virol.* **71**, 3834-3839.

- Lusky, M., Hurwitz, J., and Seo, Y.S.** (1993). Cooperative assembly of the bovine papillomavirus E1 and E2 proteins on the replication origin requires an intact E2 binding site. *J. Biol. Chem.* **268**, 15795-15803.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marsh M. and Helenius A.** (1989). Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* **36**, 107-151.
- Marsh, M.** (1984). The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis. *Biochem. J.* **218**, 1-10.
- Marsh, M., and Helenius, A.** (1980). Absorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J. Mol. Biol.* **142**, 439-454.
- McCullough, K.C., Smare, C.J., Carpenter, W.C., Crowther, J.R., Brocchi, E. and De Simone, F.** (1987). Conformational alteration in foot-and-mouth disease virus virion capsid structure after complexing with monospecific antibody. *Immunology* **60**, 75-82.
- McMillan, N.A., Payne, E., Frazer, I.H. and Evander, M.** (1999). Expression of the $\alpha 6$ integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**, 271-279.
- Merle E., Rose, R.C., LeRoux, L. and Moroianu, J.** (1999). Nuclear Import of HPV 11 Capsid Protein is mediated by Caryopherein $\alpha 2\beta 1$ heterodimers. *J. Cell. Biochem.* **74**, 628-637.
- Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B. and Laimins, L.A.** (1992). Biosynthesis of human papillomaviruses from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* **257**, 971-973.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J. and Spear, P.G.** (1996). Herpes simplex virus 1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A. and Fuerst, T.R.** (1990). New mammalian expression vectors. *Nature* **348**, 91-92.
- Müller, 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**, 948-954.
- Munoz, N., Bosch, F.X., Chichareon, S., Eluf-Neto, J., Ngelangel, C., Caceres, E., Rolon, P.A., Bayo, S., Chaouki, N., Shah, K.V., Walboomers, J.M.M. and Meijer, C.J.L.M.** (2000). A multinational case-control study on the rise of cervical cancer linked to 25 HPV Types: which are the high risk types ? 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Najjam, S., Gibbs, R.V., Gordon, M.Y., Rider, C.C.** (1997). Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach. *Cytokine* **9**, 1013-1022.
- Nasiell, K., Roger, V. and Nasiell, M.** (1986). Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet. Gynecol.* **67**, 665-669.

- Nelson, L.M., Rose, R.C., LeRoux, L., Lane, C., Bruya, K. and Moroianu, J.** (2000). Nuclear Import and DNA Binding of Human papillomavirus Type 45 L1 Capsid protein. *J. Cell. Biochem.* **79**, 225-238.
- Nemerow, G.R. and Cooper, N.R.** (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* **132**, 186-198.
- Niswender, K.D.** (1995). Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: Comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J. Microsc.* **180**, 109-116.
- Ohkuma, S., and Poole, B.** (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH and the perturbation of pH by varying agents. *PNAS* **75**, 3327-3331.
- Okazaki, K., Matsuzaki, T., Sugahara, Y., Okada, J., Iwamura, Y., Ohnishi, M., Kanno, T., Shimizu, M., Honda, E. and Kono, Y.** (1991). BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparin like moiety on the cell surface. *Virology* **181**, 666-670.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. and Mohr, I.J.** (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *PNAS* **91**, 8700-8704.
- Perez, L. and Carrasco, L.** (1993). Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J. Virol.* **67**(8), 4543-4548.
- Perez, L. and Carrasco, L.** (1994). Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* **75**, 2595-2606.
- Pho, M.T., Ashok, A., and Atwood, W.J.** (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Virol.* **74**, 2288-2292.
- Phonpok, Y. and Rosenthal, K.S.** (1991). Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadin and other hydrophobic amines. *FEBS Letter* **281**, 188-190.
- Poland, G.A., Hagensee, M.E., Koutsky, L.A., Garrett, S., Suhr, G., Smith, J.F., Dicello, A., Jansen, K.U. and Barr, E.** (2000). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the immunogenicity and reactogenicity of a novel HPV 16 vaccine: preliminary results. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Portis, J.L., McAtee, F.J. and Evans, L.H.** (1985). Infectious entry of murine retroviruses into mouse cells: evidence of a postadsorption step inhibited by acidic pH. *J. Virol.* **55**, 806-812.
- Qi, Y.M., Peng, S.W., Hengst, K., Evander, M., Park, D.S., Zhou, J. and Frazer, I.H.** (1996). Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 Capsid protein. *Virology* **216**, 35-45.
- Rhim, J.S., Cho, H.Y. and Huebner, R.J.** (1975). Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. *Int. J. Cancer* **15**, 23-29.
- Roden, R.B., Armstrong, A., Haderer, P., Christensen, N.D., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., Schiller, J.T. and Kirnbauer, R.** (1997). Characterization of a human papillomavirus type 16 variant-dependent neutralizing epitope. *J. Virol.* **71**, 6247-6252.
- Roden, R.B., Greenstone, H.L., Kirnbauer, R., Booy, F.P., Jessie, J., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1996b). *In vitro* generation and type specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* **70**, 5875-5883.

- Roden, R.B., Hubbert, N.L., Kirnbauer, R., Breitburd, F., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1995). Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J. Virol.* **69**, 5147-5151.
- Roden, R.B., Hubbert, N.L., Kirnbauer, R., Christensen, N.D., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (1996a). Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J. Virol.* **70**, 3298-3301.
- Roden, R.B., Yutzy, W.H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** (2000). Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* **270**, 254-257.
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H., Norcross, M.A.** (1995). Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* **69**, 2233-2239.
- Rose, R.C., Bonnez, W., Da Rin, C., McCance, D.J. and Reichmann, R.C.** (1994). Serological differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **75**, 2445-2449.
- Rose, R.C., White, W.I., Li, M., Suzich, J.A., Lane, C. and Garcea, R.L.** (1998). Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J. Virol.* **72**, 6151-6154.
- Rosenthal, K.S., Perez, R. and Hodnichak, C.** (1985). Inhibition of herpes simplex virus type 1 penetration by cytochalasins B and D. *J. Gen. Virol.* **66**, 1601-1605.
- Rossi, J.L., Gissmann, L., Jansen, K. and Müller, M.** (2000). Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1165-1176.
- Rousseau, M.-C., Franco, E.L. and Villa, L.L.** (2000). Natural history of cervical infections with multiple HPV types. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. and Mason, P.W.** (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* **71**(7), 5115-5123.
- Salisbury, J.L. and Keller, G.A.** (1983). Structural investigations on the role of microfilaments in ligand translocation. *Meth. Enzymol.* **98**, 368-375.
- Sandvig, K. and van Deurs, B.** (1990). Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. *J. Biol. Chem.* **265**, 6382-6388.
- Sandvig, K., Olsnes, S., Petersen, O.W. and van Deurs B.** (1987). Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell Biol.* **105**, 679-689.
- Sapp, M., Kraus, U., Volpers, C., Snijders, P.J.F., Walboomers, J.M.M. and Streeck, R.E.** (1994). Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein. *J. Gen. Virol.* **75**, 3375-3383.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibrigste, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M.** (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.

- Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., Glass, A.G., Cadell, D.M., Rush, B.B., Scott, D.R., Sherman, M.E., Kurman, R.J. and Wacholder S.** (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 958-964.
- Schiffman, M.H., Haley, N.J., Felton, J.S., Andrews, A.W., Kaslow, R.A., Lancaster, W.D., Kurman, R.J., Brinton, L.A., Lannom, L.B. and Hoffmann, D.** (1987). Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res.* **47**, 3886-3888.
- Schneider, A. and Koutsky, L.A.** (1992). Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. In „The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus“ (Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V. and Meheus, A., EDS.) pp 25-52. IARC, London.
- Sedman, J. and Stenlund, A.** (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* **72**, 6893-6897.
- Seedorf, K., Krammer, G., Dürst, M., Suhai, S. and Rowekamp, W.G.** (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**, 181-185.
- Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M. and Hurwitz, J.** (1993). Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *PNAS* **90**, 702-706.
- Shah, K.V. and Howley, P.M.** (1996). Papillomaviruses. In ”Virology” (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., eds), pp. 2077-2109. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Shimura H., Umeno Y. and Kimura G.** (1987). Effects of inhibitors of the cytoplasmic structures and functions on the early phase of infection of cultured cells with simian virus 40. *Virology* **158**, 34-43.
- Shope, R.** (1933). Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* **58**, 607-624.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D. and Spear, P.G.** (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.
- Sibbet, G., Romero-Graillet, C., Meneguzzi, G. and Campo, M.S.** (2000). α_6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J. Gen. Virol.* **81**, 327-334.
- Slavinsky, J., Mire, K.M., Brinkman, J., Daigle, J., Jones, E., Kissinger, P. and Hagensee, M.E.** (2000). Women multiply infected with human papillomavirus. 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Smart, E.J., Foster, D.C., Ying, Y.S., Kamen, B.A. and Anderson, R.G.W.** (1994). Protein kinase-C activators inhibit receptor mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* **124**, 307-313.
- Sodeik, B.** (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* **8**, 465-472
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A.** (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007-10021.
- Sorensen, M., Sehested, M. and Jensen, P.B.** (1999). Effect of cellular ATP depletion on topoisomerase II poisons. Abrogation of cleavable-complex formation by etoposide but not by amsacrine. *Mol. Pharmacol.* **55**, 424-431.

- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spalholz, B.A., Yang, Y.C. and Howley, P.M.** (1985). Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* **42**, 183-191.
- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. and Beard P.** (1998). Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J. Mol. Biol.* **283**, 529-536.
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L. and Harrison, S.C.** (1994). Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* **369**, 160-163.
- Stenlund, A. and Botchan, M.** (1990). The E2 trans-activator can act as a repressor by interfering with a cellular transcription factor. *Genes Dev.* **4**, 123-126.
- Stern, P.L., Brown, M., Stacey, S.N., Kitchener, H.C., Hampson, I., Abdel-Hady, E.S, and Moore, J.V.** (2000). Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J. Clin. Virol.* **19**, 57-66.
- Stubenrauch, F. and Laimins, L.A.** (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 379-86.
- Superti, F., Derer, M. and Tsiang, H.** (1984). Mechanism of Rabies virus entry into CER cells. *J. Gen. Virol.* **65**, 781-789.
- Suzich, J.A., Ghim, S., Palmer-Hill, F.J., White, W.I., Tamura, J.K., Bell, J., Newsome, J.A., Jenson, A.B. and Schlegel, R.** (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *PNAS* **92**, 11553-11557.
- Svensson, U. and Persson, R.** (1984). Entry of adenovirus 2 into HeLa cells. *J. Virol.* **51**, 687-694.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Touze, A. and Coursaget, P.** (1998). *In vitro* gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1317-1323.
- Touze, A., Mahe, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combita-Rojas, A.L., Bousarghin, L., Sizaret, P.Y. and Coursaget, P.** (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 121-127.
- Trus, B.L., Roden, R.B., Greenstone, H.L., Vrhel, M., Schiller, J.T. and Booy, F.P.** (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by three-dimensional reconstruction to a 9A resolution. *Nature Struct. Biol.* **4**, 413-420.
- Unckell, F., Streeck, R.E. and Sapp, M.** (1997). Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* **47**, 2934-2939-
- Ustav, M. and Stenlund, A.** (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**, 449-457.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A.** (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* **10**, 4321-4329.

- Varga, M.J., Weibull, C. and Everitt, E.** (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.* **65**, 6061-6070.
- Virgin, H.W. 4th, Mann, M.A. and Tyler, K.L.** (1994). Protective antibodies inhibit reovirus internalization and uncoating by intracellular proteases. *J. Virol.* **68**, 6719-6729.
- Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R.E. and Sapp, M.** (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* **200**, 504-512
- 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**, 3258-3264.
- Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A. and Nemerow, G.** (1998). Adenovirus Internalization require dynamin. *J. Virol.* **72**, 3455-3458.
- Webb, J.L.** (1966). In Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. 2, 383-403. New York and London: Academic Press.
- Werness, B.A., Levine, A.J. and Howley, P.M.** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Science* **248**, 76-79.
- White, J. and Helenius, A.** (1980). PH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes. *PNAS* **77**, 3273-3277.
- White, W.I., Wilson, S.D., Bonnez, W., Rose, R.C., Koenig, S. and Suzich, J.A.** (1998). *In vitro* infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **72**, 959-964.
- White, W.I., Wilson, S.D., Palmer-Hill, F.J., Woods, R.M., Ghim, S.J., Hewitt, L.A., Goldmann, D.M., Burke, S.J., Jenson, A.B., Koenig, S. Suzich, J.A.** (1999). Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* **73**, 4882-4889.
- Wild, P., Schraner, E.M., Peter, J., Loepfe, E. and Engels, M.** (1998). Novel entry pathway of Bovine Herpesvirus 1 and 5. *J. Virol.* **72**, 9561-9566.
- Wittels, M. and Spear P.** (1990). Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low ph-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* **18**, 271-290.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J.** (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp 120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183.
- WuDunn, D. and Spear, P.G.** (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**, 52-58.
- Yanagishita, M. and Hascall, V.C.** (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **267**, 9451-9454.
- Yang, L., Li, R., Mohr, I., Clark, R. and Botchan, M.R.** (1991). Activation of BPV-1 replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Nature* **353**, 628-633.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D.A., Nohaile, M. and Botchan, M.** (1993). The E1 protein of the papillomavirus BPV-1 is an ATP dependent DNA helicase. *PNAS* **90**, 5086-5090.

Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B. and Jansen-Durr, P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* **69**, 6389-6399.

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**, 482-491.

Zhou, J., Gissmann, L., Zentgraf, H., Müller, H., Picken, M. and Müller, M. (1995). Early Phase in the infection of cultured cells with Papillomavirus virions. *Virology* **214**, 167-176.

Zhou, J., Sun, X.Y., Louis, K., Frazer, I.H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* **68**, 619-625.

zur Hausen, H. (1989). Papillomaviruses in anogenital cancers as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* **49**, 4677-4681.

VII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
BrdU	5-Bromo-2'Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Ci	Curie (1Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
CIN	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
cpm	Zählereignis pro Minute (counts per minute)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CRPV	Kaninchen-Papillomvirus (cottontail rabbit papillomavirus)
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemiluminiszenz (enhanced chemiluminescence)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorbenttest (enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	Elektronenmikroskop
EV	Epidermodysplasia verruciformis
FACS	Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykane
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)

GST	Glutation S-Transferase
h	Stunde (hour)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPV	humanpathogenes Papillomvirus
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IC ₅₀	Konzentration, die für eine 50%ige Inhibition notwendig ist
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MOI	Vielfaches der Infektion (multiplicity of infection)
NCR	Nicht-codierende Region
N-Terminus	Amino-Terminus
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replikation)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	infektiöse Einheiten (plaque forming unit)
PMA	12-Phorbol-13-myristataacetat
PV	Papillomvirus
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
Sf9	Spodoptera frugiperda 9

SV40	simian virus 40
TE	Tris-EDTA
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
rpm	Umdrehungen pro minute (rounds per minute)
U	Einheit (unit)
UV	ultraviolett
VLP(s)	virusähnliche Partikel (virus like particle)

Symbole für Aminosäuren

A (Ala)	Alanin	M (Met)	Methionin
C (Cys)	Cystein	N (Asn)	Asparagin
D (Asp)	Asparaginsäure	P (Pro)	Prolin
E (Glu)	Glutaminsäure	Q (Gln)	Glutamin
F (Phe)	Phenylalanin	R (Arg)	Arginin
G (Gly)	Glycin	S (Ser)	Serin
H (His)	Histidin	T (Thr)	Threonin
I (Ile)	Isoleucin	V (Val)	Valin
K (Lys)	Lysin	W (Trp)	Tryptophan
L (Leu)	Leucin	Y (Tyr)	Tyrosin