

***In vivo-* und *In vitro*-DNA-Verpackung
in virusähnliche Partikel
des Humanen Papillomvirus Typ 33:
Beteiligung der Kapsidproteine L1 und L2**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Frank Schäfer
geboren in Warstein

Mainz, 2002

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2002

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Papillomviren.....	1
1.1 Geschichtlicher Überblick.....	1
1.2 Klassifikation.....	2
1.3 Struktur der Papillomviren.....	2
1.4 Genomorganisation.....	2
1.5 Der Infektionszyklus.....	4
1.6 Die Funktion der viralen Proteine.....	6
1.6.1 Das Protein E1.....	6
1.6.2 Das Protein E2.....	6
1.6.3 Das Protein E4.....	7
1.6.4 Das Protein E5.....	8
1.6.5 Das Protein E6.....	9
1.6.6 Das Protein E7.....	10
1.6.7 Das Protein L1.....	10
1.6.8 Das Protein L2.....	11
1.7 Epidemiologie und Kanzerogenese humaner Papillomviren.....	12
1.8 Vakzine gegen Papillomviren.....	14
2. Zielsetzung.....	14
II. Material und Methoden	16
1. Material.....	16
1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	16
1.2 Radioaktive Materialien.....	16
1.3 Plasmide.....	16
1.4 Oligonukleotide.....	17
1.5 Bakterienstämme, Virusstämme und Zelllinien.....	18
1.5.1 Bakterienstämme.....	18
1.5.2 Virusstämme.....	18
1.5.2.1 Vaccinia-Virus.....	18
1.5.2.1.1 Rekombinante Vaccinia-Viren.....	18
1.5.2.2 Baculoviren.....	19
1.5.2.2.1 Rekombinante Baculoviren.....	19
1.5.3 Zelllinien.....	19
1.6 Antikörper.....	19
2. Methoden.....	20
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.1.1 Präparation von Gesamt-Zell-RNA.....	20
2.1.2 cDNA-Synthese.....	21
2.1.3 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR.....	21
2.1.4 Radioaktive Markierung von DNA.....	21
2.1.5 South-Western-Blot.....	22
2.1.5.1 PhosphorImaging.....	22
2.1.6 Herstellung von Pseudovirionen in Zellkultur (<i>in vivo</i>).....	23
2.1.6.1 Lipofektamin-Transfektion von COS7-Zellen.....	23

2.1.6.2	Expression der Kapsidproteine, Präparation und Reinigung von Pseudovirionen.....	23
2.1.7	Herstellung von Pseudovirionen in einem zellfreien System (<i>in vitro</i>).....	24
2.1.8	DNA-Extraktion aus Pseudovirionen.....	24
2.1.9	DNA-Extraktion aus VLPs nach Langzeit-Expression.....	25
2.1.10	Elektroporation von <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.1.11	Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren.....	26
2.1.12	Herstellung rekombinanter Baculoviren.....	27
2.2	Zellbiologische Methoden.....	27
2.2.1	Infektionsstudien.....	27
2.2.2	Zellbindungsstudien.....	27
2.2.3	Expression und Aufreinigung des Proteins GFP-GFP-NLS.....	28
2.2.3.1	Proteinaufreinigung	28
2.2.4	Proteinexpression im Baculovirussystem.....	29
2.3	Immunologische Methoden.....	30
2.3.1	Gewinnung polyklonaler Antisera.....	30
2.3.2	Nachweis des Kapsidproteins L1 im ELISA.....	30
2.3.3	Immunfluoreszenz-Analysen.....	31
2.3.3.1	HuTk-Zellen.....	31
2.3.3.2	High Five-Zellen.....	31

III. Ergebnisse.....32

1.	DNA-Größenbeschränkungen bei der Verpackung in VLPs.....	32
2.	DNA-Interaktion der Strukturproteine L1 und L2	33
3.	<i>In vitro</i> -DNA-Verpackung.....	36
3.1	Charakterisierung <i>in vitro</i> hergestellter Pseudovirionen.....	38
3.1.1	Elektronenmikroskopie.....	38
3.1.2	Grad der Kreuzvernetzung.....	39
3.1.3	DNA-Gehalt.....	40
3.1.4	Infektionsstudie.....	41
3.1.5	Trypsinsensitivität.....	41
3.2	<i>In vitro</i> -DNA-Verpackung in HPV33 wtL1-VLPs.....	42
3.2.1	DNA-Nachweis.....	44
3.2.2	Infektionsversuch.....	45
3.3	<i>In vitro</i> -DNA-Verpackung in mutierte HPV33 L1-Kapside.....	45
3.3.1	Charakterisierung der aus L1-Mutanten aufgebauten VLPs.....	45
3.3.1.1	Zellbindungsversuch.....	45
3.3.1.2	Immunisierungsstudie.....	46
3.3.2	<i>In vitro</i> -DNA-Verpackung in L1-1/492- und L1-1/477-VLPs.....	48
3.3.2.1	Mutante L1-1/492.....	48
3.3.2.2	Mutante L1-1/477.....	50
4.	<i>In vivo</i> -Pseudovirionen.....	51
4.1	Die Mutante L1-1/477M9.....	52
4.1.1	Charakterisierung der Mutante L1-1/477M9.....	53
4.1.2	Expression von L1-1/477M9 im Vaccinia-System.....	55
4.2	Die Mutante L1-1/470.....	56
4.3	<i>In vivo</i> -DNA-Verpackung	57
4.3.1	Die wt-Situation.....	57
4.3.2	Die Mutante L1-1/470.....	59

4.3.3	Die Mutante L1-1/477M9.....	61
5.	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> hergestellte Pseudovirionen: Ein Vergleich der Infektiösität	64
IV.	Diskussion.....	65
1.	Die DNA-Bindungseigenschaft des HPV L1-Proteins.....	65
2.	Die DNA-Bindungseigenschaft des HPV L2-Proteins.....	67
3.	Einschluss zellulärer DNA in VLPs.....	68
4.	Determinanten der Virusmorphogenese und Infektion.....	70
5.	<i>In vivo</i> - und <i>In vitro</i> -Herstellung von Pseudovirionen.....	72
6.	Infektiösität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> gewonnener Pseudovirionen.....	76
V.	Zusammenfassung.....	79
VI.	Abkürzungen.....	81
VII.	Literaturverzeichnis.....	83
	Anhang.....	94

I. Einleitung

1. Papillomviren

Papillomviren sind kleine hüllenlose DNA-Viren, die bei höheren Vertebraten benigne und maligne Läsionen induzieren. Sie sind strikt gewebs- und speziesspezifisch und infizieren ausschließlich die Basalzellen der Haut und Schleimhaut. Durch Hyperproliferation der infizierten Zellen werden Papillome (Warzen) und Kondylome (Genitalwarzen) ausgebildet. In der Humanmedizin sind Papillomviren von großer Bedeutung, da eine Korrelation zwischen bestimmten Papillomvirusinfektionen und Krebsarten, wie dem Zervixkarzinom, als gesichert gelten (zur Hausen and de Villiers, 1994).

1.1 Geschichtlicher Überblick

Das klinische Erscheinungsbild einer durch Papillomviren induzierten Infektion ist der Menschheit seit mehr als 2000 Jahren bekannt. Das von den Griechen eingeführte Wort Condyloma, welches historisch für eine kreisförmige Hautverdickung im Bereich des Anus stand, wurde von dem griechischen Arzt Galen zu dieser Zeit für die charakteristischen warzenförmigen Hautveränderungen im Genitalbereich verwendet. Es war Fallopius, der im 16. Jahrhundert den Begriff Condyloma acuminata (spitze Hautwarzen) prägte, um die durch Papillomviren hervorgerufenen Hautveränderungen gegenüber den durch Syphilis verursachten flachen Hautveränderungen abzugrenzen. Die virale Ätiologie dieser Hauttumoren wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts aufgrund von Selbstversuchen aufgeklärt. Dabei war es durch die Infektion von Testpersonen mit einem zellfreien Extrakt aus Warzen gelungen, neue Warzen zu induzieren (Ciuffo, 1907). Die Elektronenmikroskopie ermöglichte 1950 den Nachweis von Viruspartikeln in Hautwarzen. Erst die Entwicklung und Einführung von molekularbiologischen Techniken erlaubte es in den 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, das virale Genom zu klonieren. Von diesem Zeitpunkt an kam es zu einem drastischen Wissenszuwachs. Heute, mehr als 30 Jahre später, werden erste klinische Impfstudien durchgeführt. Einige fundamentale Abschnitte im Infektionszyklus von Papillomviren, wie z.B. die rezeptorvermittelte Aufnahme oder die Morphogenese des Virus, sind aber bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

1.2 Klassifikation

Papillomviren wurden geschichtlich mit den Polyomaviren zu der Familie der *Papovaviridae* gezählt. Der Name dieser Familie setzte sich aus den ersten zwei Anfangsbuchstaben der Viren zusammen, die zuerst in diese Familie eingeordnet wurden (Papillomviren, Polyomaviren, *simian vacuolating virus* (SV40)). Es waren die grundlegenden Eigenschaften dieser Viren, wie geringe Größe, doppelsträngiges, geschlossenes DNA-Genom und der Zellkern als Ort der Replikation, die diese Gruppierung bewirkten. Später wurde die Familie in zwei Genera aufgeteilt, die Papillomviren und die Polyomaviren (Polyomaviren und SV40). Die vergleichende Charakterisierung der Viren zeigte, dass allein in der Genomorganisation ein großer Unterschied zwischen Papillomviren und Polyomaviren besteht. Dies veranlasste im Jahr 2001 die Einteilung der Papillomviren in eine eigenständige Familie, die *Papillomaviridae* (Howley and Lowy, 2001).

1.3 Struktur der Papillomviren

Neben über hundert humanen Papillomviren sind auch mehr als zwanzig tierische Papillomviren (Papillomviren von Rind (BPV), Hund (COPV), Kaninchen (CRPV) usw.) charakterisiert (Sundberg, 1987). Bei allen Papillomviren handelt es sich um nicht umhüllte DNA-Viren ikosaedrischer Symmetrie (Finch and Klug, 1965). Das Kapsid der Viren ist aus

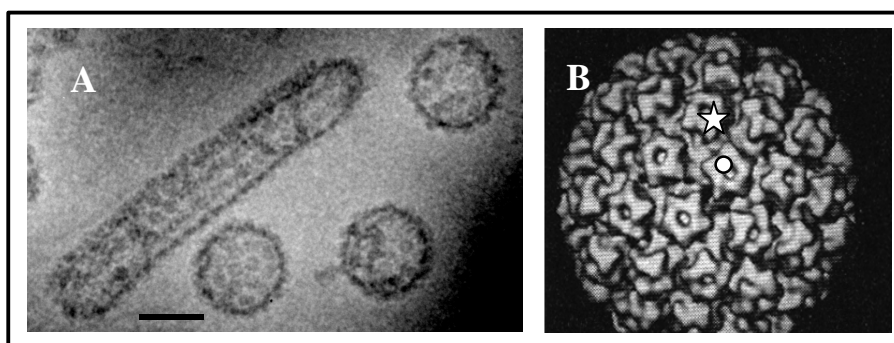


Abb. 1: Struktur humaner Papillomviren. Elektronenmikroskopische Aufnahme virusähnlicher Partikel des humanen Papillomvirus Typ 33 (A). Dreidimensionale Rekonstruktion einer kryoelektronenmikroskopischen Aufnahme humaner Papillomviren (B). Die einzelnen Kapsomere sind entweder pentavalent (weißer Stern) oder hexavalent (weißer Kreis) organisiert (verändert nach Baker *et al.*, 1991). Der schwarze Balken entspricht 50 nm.

72 Untereinheiten, den Kapsomeren, aufgebaut. Aufgrund der Symmetrieverhältnisse sind 60 Kapsomere hexavalent, d. h. sie sind von 6 Kapsomeren umgeben, wohingegen 12

Kapsomere nur 5 Kapsomere als Nachbarn haben und somit pentavalent sind (Abbildung 1). Jedes Kapsomer stellt ein Pentamer des majoren Kapsidproteins L1 dar. Das minore Kapsidprotein L2 ist wahrscheinlich nur mit 12 Kopien am Kapsidaufbau beteiligt und mit den pentavalenten Kapsomeren assoziiert (Trus *et al.*, 1997). Papillomviren haben einen Durchmesser von 55-60 nm und tragen in ihrem Inneren die virale DNA, die mit zellulären Histonen assoziiert ist und eine Art Minichromosom bildet (Pfister *et al.*, 1977).

1.4 Genomorganisation

Die Genomorganisation ist bei allen Papillomviren trotz unterschiedlicher Speziespezifität gut konserviert (Howley and Lowy, 2001) (Abbildung 2). Das doppelsträngige, zirkulär-geschlossene Genom der Papillomviren umfasst ca. 8000 bp, von dem aber nur ein DNA-Strang als Matrize für die Transkription aller viralen Proteine dient. Die Produkte dieser

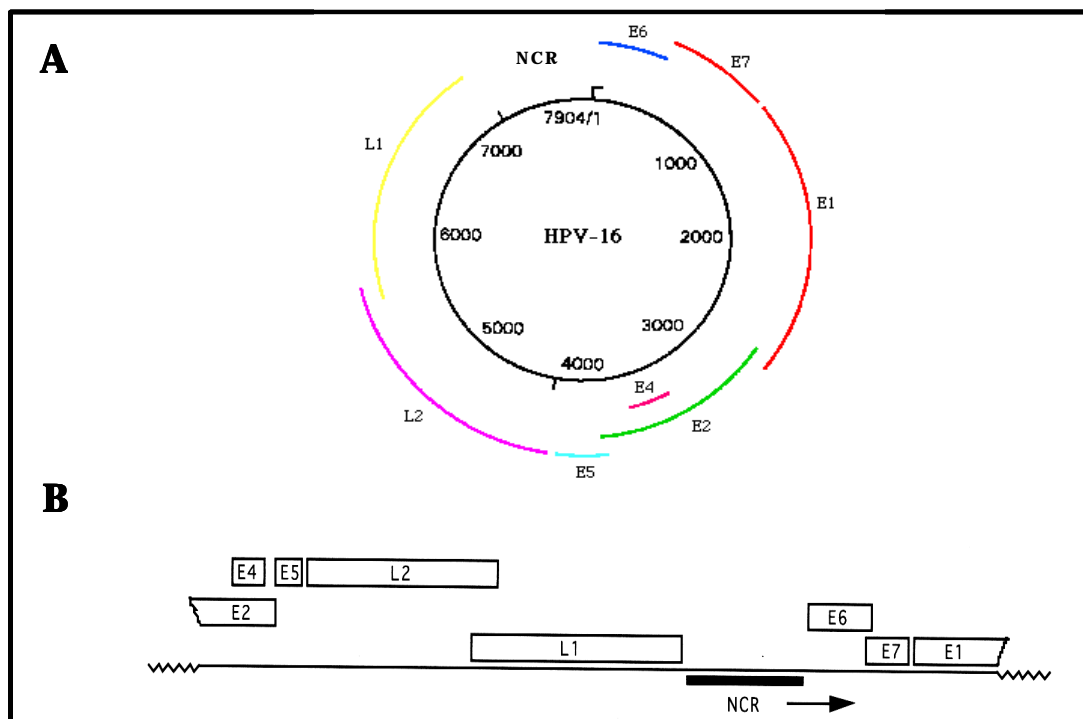


Abb. 2: Genomorganisation humaner Papillomviren, exemplarisch für HPV16 dargestellt. Das zirkuläre Genom umfasst 7904 Nukleotide, deren Positionen innerhalb des Kreises angegeben sind (A). Die offenen Leserahmen der frühen (E) Proteine und späten (L) Proteine sind außerhalb des doppelsträngigen, zirkulären Genoms dargestellt. Die Transkription aller Gene erfolgt nur von einem DNA-Strang im Uhrzeigersinn. NCR bezeichnet die nicht kodierende Region. Die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom erfordert die Linearisierung (B). Die Kästchen repräsentieren die offenen Leserahmen. Bei einer Integration werden die Leserahmen E1 und E2 zerstört.

offenen Leserahmen (*open reading frames* ORFs) werden aufgrund ihres zeitlichen Auftretens während einer Infektion in sogenannte frühe (E: *early*) und späte (L: *late*) Proteine eingeteilt. Zusätzlich enthält das Genom einen nicht kodierenden Bereich (NCR: *noncoding region*), der Promotoren, Enhancerelemente und den Replikationsursprung enthält (Chow and Broker, 1994; Fuchs and Pfister, 1994). Papillomviren haben sechs gut charakterisierte frühe Proteine (E1, E2, E4, E5, E6 und E7), die an der viralen Replikation, Transkription und der Transformation infizierter Zellen beteiligt sind. Die Transkripte können früh in HPV-Läsionen nachgewiesen werden und beschränken sich auf proliferativ aktive Zellen. Die zwei späten Proteine L1 und L2 werden nur in den terminal differenzierten Epithelzellen exprimiert und bauen gemeinsam das Viruskapsid auf (Stubenrauch and Laimins, 1999).

1.5 Der Infektionszyklus

Die Papillomviren unterscheiden sich in ihrer Epidemiologie und Gewebsspezifität, aber gemeinsam ist allen, dass ihr Produktionszyklus eng an die Differenzierung der Haut und Schleimhaut gekoppelt ist. Die Epidermis kann grob in zwei Bereiche geteilt werden, nämlich den mitotisch aktiven und den nicht proliferativen Bereich. Von den teilungsaktiven Zellen des Stratum germinativum werden laufend Zellen in die oberen Schichten abgegeben, wo sie fortschreitend differenzieren, bis sie als terminal differenzierte Keratinozyten absterben und in Form von Hautschuppen abgeschilfert werden (Abbildung 3). Genaue Erkenntnisse über den Eintritt der Viren in die Zellen des Stratum germinativum liegen nicht vor. Es ist aber bekannt, dass Papillomviren über Mikroläsionen der Haut bis zu diesen Zellen vordringen (Chow and Broker, 1997), an Zelloberflächenmoleküle (Proteoglykane) binden und in einer rezeptorvermittelten Endozytose von diesen aufgenommen werden (Joyce et al., 1999; Giroglou et al., 2001). In den Zellen des Stratum germinativum kommt es zur Freisetzung der viralen DNA und deren Replikation im Zellkern. Gleichzeitig werden die frühen Proteine exprimiert. Weil die virale DNA schneller repliziert wird als die zelluläre DNA, kommt es zu einer Amplifikation der viralen DNA. Die virale DNA liegt pro infizierter Zelle in bis zu 100 Kopien in episomaler Form vor und wird gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Während eine Tochterzelle im Stratum germinativum verbleibt und über Jahre hinweg persistieren kann, wird die andere in das Stratum spinosum abgegeben. In diesem Bereich der Epidermis kommt es aufgrund der Infektion zu einer verzögerten

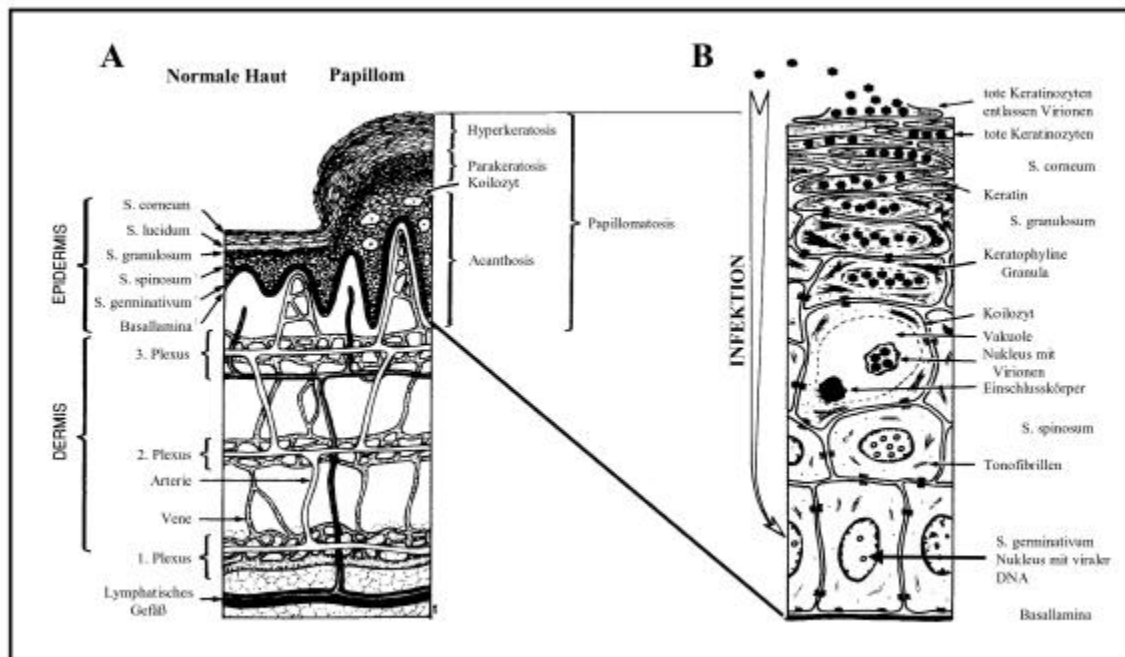


Abb. 3: Querschnitt durch die normale Haut mit einem Papillom. Gezeigt sind die einzelnen Schichten der Haut und ihre pathologischen Veränderungen nach der Entstehung eines Papilloms (A). Der Infektionszyklus der Papillomviren (B) wird im Text näher erläutert.

Differenzierung. Im Stratum germinativum hingegen bewirkt die Infektion eine Hyperproliferation der infizierten Zellen, so dass ständig Zellen in das Stratum spinosum abgegeben werden. Dies führt zu einer Verdickung dieser Schicht und hat die Ausbildung eines Papilloms (Warze) zur Folge. Im Stratum spinosum erfolgt eine starke Amplifikation des viralen Genoms. Gleichzeitig kommt es zur Zellvergrößerung, Einlagerung von Einschlusskörpern und Vakuolisierung der Zellkerne. Die Folge ist das Auftreten von Koilozyten. Koilozyten werden als Marker für eine Papillomvirusinfektion in der Differenzialdiagnostik verwendet. Ebenfalls im Stratum spinosum wird die Expression der späten Gene initiiert. Die episomal vorliegende virale DNA wird nach Expression der Kapsidproteine in das entstehende Viruskapsid eingeschlossen. Im oberen Bereich des Stratum spinosum sowie in allen darüber liegenden Zellschichten sind Virionen nachzuweisen. Im angrenzenden Stratum granulosum und Stratum corneum entstehen weitere Nukleokapside, so dass eine starke Vermehrung der Viren erfolgt. Die Zellen verlieren mit Erreichen höherer Zellschichten mehr und mehr ihre Funktionsfähigkeit und sterben ab. Papillomviren sind nicht lytisch und werden deshalb erst mit der Abgabe der toten Keratinozyten freigesetzt.

1.6 Die Funktion der viralen Proteine

1.6.1 Das Protein E1

Das E1-Protein ist ein nukleär lokalisiertes Protein (Thorner *et al.*, 1993; Ustav *et al.*, 1991). Es besitzt den größten offenen Leserahmen im Papillomvirusgenom und ist relativ konserviert. Im Aufbau zeigt es große Ähnlichkeit zu dem großen T-Antigen von SV40. Das große T-Antigen ist wie das E1-Protein ein essentielles Protein für die virale DNA-Replikation (Clertant *et al.*, 1984). E1 bindet spezifisch an den Replikationsursprung, wobei seine Bindung allein nur schwach ausgeprägt ist. Diese Bindung wird deutlich verstärkt, wenn das frühe Protein E2 mit diesem Komplex interagiert und seinerseits an die E2-Bindungsstellen im Replikationsursprung bindet (Mohr *et al.*, 1990). Das E1-Protein besitzt eine DNA-abhängige ATPase- und Helikase-Aktivität. Diese bedingen die Initiation und Elongation der viralen Replikation (Bream *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1993). Darüber hinaus ist auch eine Bindung des E1-Proteins an die p180 Untereinheit der zellulären DNA-Polymerase α -Primase beschrieben. Diese Interaktion hat die Rekrutierung der zellulären Replikationsmaschinerie zum viralen Replikationsursprungs zur Folge (Park *et al.*, 1994; Bonne-Andrea *et al.*, 1995). Weitere zelluläre Proteine wie das Ubc9 (Rangasamy *et al.*, 2000) und Cyclin E-Cdk2 (Ma *et al.*, 1999) werden als Bindungspartner in der Literatur beschrieben. Dabei soll die Interaktion mit dem Komplex Cyclin E-Cdk2 für die zellphasenabhängige Replikation des Papillomvirusgenoms verantwortlich sein (Cueille *et al.*, 1998). Die E1-Bindung an Ubc9 führt zu einer SUMO-1 Modifizierung und bedingt die Akkumulation des E1-Proteins im Zellkern (Rangasamy *et al.*, 2000).

1.6.2 Das Protein E2

Das E2-Protein ist ein wichtiger Regulator für die virale Replikation und Transkription. Funktionell lässt es sich in drei Domänen einteilen. Der aminoternale Teil des Proteins umfasst die Transaktivierungsdomäne, während der carboxyterminale Bereich eine sequenzabhängige DNA-Bindungsdomäne und eine Dimerisierungsdomäne enthält. Eine Scharnierregion (*hinge*) trennt die zwei Bereiche voneinander (Giri and Yaniv, 1988; McBride *et al.*, 1989). Das E2-Protein bindet als Dimer an die Konsensus-Sequenz ACC(N₆)GGT (Androphy *et al.*, 1987) und kann somit die Transkription durch E2-

Bindungsstellen enthaltende Promotoren regulieren (Haugen *et al.*, 1988; Hirochika *et al.*, 1988). Das BPV1-Genom enthält 17 E2-Bindungsstellen, allein 12 davon in der nicht kodierenden Region (Li *et al.*, 1989). Die nicht kodierende Region der genitalen high-risk HPV-Typen 16 und 18 enthält die Promotoren der Onkoproteine E6 und E7, sowie vier E2-Bindungsstellen (Thierry and Yaniv, 1987). Promotoranalysen in humanen Zellen zeigten, dass diese Promotoren eine Basalaktivität aufweisen (Romanczuk *et al.*, 1990). Bindet das E2-Protein an die den E6 und E7-Promotoren vorgelagerten E2-Bindungsstellen, wird diese Aktivität herabgesetzt. Der entgegengesetzte Effekt zeigt sich aber bei einer Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle. Dabei werden die Leserahmen der E1- und E2-Proteine zerstört. Die Folge ist, dass die Onkoproteine E6 und E7 nicht durch das E2-Protein in ihrer Expression reguliert werden können und die Zelle entartet.

In die virale Replikation greift das E2-Protein über eine Interaktion mit dem E1-Protein ein. Dabei verstärkt es die sonst nur schwache Bindung von E1 an die DNA.

Neben den erwähnten Funktionen bindet das E2-Protein verschiedene zelluläre Faktoren und ist für den episomalen Erhalt des viralen Genoms bei der Zellteilung verantwortlich. Dabei bindet es an E2-Bindungsstellen, die im Replikationsursprung enthalten sind und dirigiert das virale Genom zum Chromatin der Wirtszelle. Dort kommt es zu einer Wechselwirkung, die zu einer gleichmäßigen Aufteilung der viralen DNA auf die Tochterzellen führt (Skiadopoulos and McBride, 1998; Bastien and McBride, 2000).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das E2-Protein die virale DNA zu bestimmten nukleären Stellen dirigiert, den sogenannten *Promyelocytic leukemia protein (PML) oncogenic domains (PODs)* (Day *et al.*, 1998). Diese Stellen werden als Keimzelle für die Papillomvirus-Morphogenese diskutiert. Das E2-Protein kann eventuell die für eine Morphogenese nötige Konzentration der DNA-Moleküle an den Orten der Viruszusammenlagerung bewirken.

1.6.3 Das Protein E4

Der Leserahmen des E4-Proteins liegt im Bereich der frühen Gene und überlappt vollständig mit dem des E2-Proteins, benutzt aber ein anderes Leseraster. Das E4-Protein ist nur gering konserviert. Obwohl es zu den frühen Proteinen zählt, ist seine Expression nur in den differenzierenden Zellschichten des Epithels nachzuweisen (Doorbar *et al.*, 1997). Die Expression des E4-Proteins erfolgt zusammen mit der der Kapsidproteine (Crum *et al.*,

1990). Die genaue Funktion des E4-Proteins ist noch nicht aufgeklärt. Man geht aber davon aus, dass es weder transformierend auf die infizierten Zellen wirkt noch in die virale Replikation eingreift (Neary *et al.*, 1987). Für den HPV-Typ 16 konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass das E4-Protein mit dem Keratin-Zytoskelett der Wirtszelle interagiert und einen Zusammenbruch dieser Struktur induziert (Doorbar *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993). Da Papillomviren nicht lytisch sind, könnte diese Funktion zur Freisetzung der Virionen beitragen. Eine solche Funktion konnte für das HPV1 E4-Protein nicht gezeigt werden (Rogel-Gaillard *et al.*, 1993) und lässt vermuten, dass es sich nicht um eine generelle Funktion handelt.

1.6.4 Das Protein E5

Das E5-Protein der Papillomviren ist ein relativ kleines Protein und zählt neben den Proteinen E6 und E7 zu den Onkoproteinen. Es trägt am Aminoterminus einen hydrophoben Abschnitt, zwei Cysteine zur Dimerisierung und am Carboxyterminus ein hydrophiles Segment (Schlegel *et al.*, 1986). Das E5-Protein integriert als Dimer in intrazelluläre Membranen und kann vorrangig im Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden, obwohl es nicht sezerniert wird (Burkhardt *et al.*, 1987; Burnett *et al.*, 1992). Die Transformation der Wirtszelle erfolgt bei BPV über eine Wechselwirkung mit dem *platelet-derived growth factor* (PDGF) β -Rezeptor. Dabei kommt es zur Bindung eines E5-Proteindimers mit je einem Protein des PDGF β -Rezeptors. Dies führt neben der Dimerisierung des Rezeptors auch zu dessen Aktivierung. Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosine bedingt die Rekrutierung von zellulären Proteinen mit SH2-Domänen und einer Aktivierung der Signalkaskade (Petti and DiMaio, 1992; Petti and DiMaio, 1994; DiMaio *et al.*, 1994). Die Wirtszelle ist somit ligandenunabhängig aktiviert und transformiert.

Weiterhin kann das E5-Protein die Ansäuerung des Golgi-Apparates durch eine Proteininteraktion mit einem zellulären Protein (16 kDa Untereinheit der vakuolären ATPase) stören und somit den pH-Wert erhöhen. Da viele wachstumsregulierende Proteine das Golgi-Netzwerk durchlaufen, werden diese in ihrer Funktion beeinträchtigt, was zur Transformation der Zelle beiträgt (Schapiro *et al.*, 2000).

1.6.5 Das Protein E6

Während das E7-Protein der Papillomviren Nagerzellen wie z.B. 3T3-Zellen selbständig transformieren kann, sind für eine Transformation von primären humanen Keratinozyten hingegen die Proteine E6 und E7 in Kombination notwendig. Diese Kombination kann das Auswachsen von immortalisierten Klonen induzieren, die ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989). Der auf das E6-Protein zurückzuführende Mechanismus der Transformation beruht auf einem induzierten Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 (Kesis *et al.*, 1993). p53 ist für die DNA-Reparatur der Zelle verantwortlich. Es reguliert die Expression des proapoptischen Proteins bax und des Zellzyklus kontrollierenden Gens p21. Dadurch kann der Zellzyklus vor der S-Phase arretiert werden. Der p53-Expressionsspiegel ist in nicht gestressten Zellen niedrig, steigt aber durch externe Toxine oder während einer viralen Infektion stark an. Dies bewirkt entweder, dass die Expression des bax-Gens induziert wird und die Zelle den apoptotischen Weg einschlägt, oder dass nach induzierter Expression von p21 der Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase gestoppt wird. Eine Arretierung des Zellzyklus ermöglicht der Zelle vorhandene DNA-Schäden zu beheben, bevor sie in die S-Phase eintritt und sich Mutationen manifestieren. Während einer HPV-Infektion bindet das E6-Protein das Protein E6-assoziiertes Protein (E6-associated protein (E6AP)). Dieses wiederum ubiquitiniert das p53-Protein, welches durch das 26S Proteasom degradiert wird (Hershko and Ciechanover, 1998).

Zusätzlich mehren sich Hinweise auf eine p53-unabhängige Transformation durch das E6-Protein. Dabei bindet das E6-Protein z.B. zelluläre Faktoren wie p300/CBP, einen Transkriptionskoaktivator. Zudem kann es das Enzym Telomerase oder Proteine mit PDZ-Domänen, die als Regulatoren der Proliferation beschrieben sind, aktivieren (Klingelhutz *et al.*, 1996; Kiyono *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000).

Werden die E6-Proteine von *high-risk* und *low-risk* HPV-Typen verglichen, so fällt auf, dass die E6-Proteine der *low-risk* HPV-Typen nur eine sehr geringe Affinität zu den oben genannten Proteinen aufweisen. Dies erklärt vielleicht die Assoziation von *high-risk* HPV-Typen mit Karzinomen.

1.6.6 Das Protein E7

Das E7-Protein ist im Zellkern lokalisiert und trägt wie das E5- und E6-Protein zur Transformation der Zelle bei. Dazu bindet es das Retinoblastom-Protein (pRB) sowie die Proteine p107 und p130, die eine homologe Bindungsstelle für das E7-Protein besitzen (Dyson *et al.*, 1992). Das Tumorsuppressorprotein pRB wird durch cyclinabhängige Kinasen während der G1-S-Phase phosphoryliert. Bis zur M-Phase bleibt das pRB-Protein phosphoryliert und wird erst beim Eintritt in die G0/G1-Phase des Zellzyklus dephosphoryliert und somit aktiviert. In diesem Zustand bildet das pRB-Protein einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F und wirkt dadurch als Transkriptioninhibitor. Bei einer HPV-Infektion kommt es zu einer Bindung des E7-Proteins an den E2F/pRB-Komplex. Diese Interaktion bewirkt eine Degradation des pRB-Proteins. Gleichzeitig wird das E2F-Protein freigesetzt und kann als Transkriptionsaktivator dienen (Nevins, 1992; Boyer *et al.*, 1996). Die Folge ist eine unkontrollierte DNA-Synthese und Proliferation der Zelle.

Vergleicht man die E7-Proteine von *high-* und *low-risk* HPV-Typen, fällt auf, dass in der pRB-Bindungsstelle nur eine AS ausgetauscht ist (Sang *et al.*, 1992). Dieser geringe Unterschied bedingt aber bei *low-risk* HPV-Typen eine auf 1/10 herabgesetzte Affinität des E7-Proteins zum pRB-Protein. Aufgrund der niedrigeren Affinität zu pRB haben *low-risk* HPV-Typen nur ein geringes Potential, ihre Wirtszelle zu transformieren (Heck *et al.*, 1992).

1.6.7 Das Protein L1

Das majore Kapsidprotein L1 wird nur in den differenzierten Zellschichten des infizierten Epithels exprimiert. Es ist 499 AS (bei HPV33) lang und trägt an seinem Carboxyterminus ein Kernlokalisierungssignal. Das L1-Protein akkumuliert diffus im Zellkern, wenn es allein exprimiert wird. Bei einer Koexpression mit dem minoren Kapsidprotein L2 wird es in spezifische Domänen im Zellkern, den PODs, geleitet (Day *et al.*, 1998). L1 ist mit 360 Molekülen am Aufbau des Viruskapsids beteiligt und stellt somit das Hauptstrukturprotein der Papillomviren dar. Durch die Herstellung L1-rekombinanter Baculoviren, Vaccinia-Viren oder Expressionsvektoren ist es möglich, das L1-Protein in Bakterien, Hefen, Insekten- und Säugerzellen zu exprimieren (Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1993;

Rose *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994). Nach der Expression assoziiert es spontan zu Kapsomeren, eine Struktur, die aus 5 identischen L1-Proteinen aufgebaut ist. Kapsomere haben die Fähigkeit, sich zusammenzulagern und ein Kapsid aufzubauen. Dazu erwiesen sich zwei konservierte Cysteine im L1-Protein als essentiell (Li *et al.*, 1998; Sapp *et al.*, 1998). Durch die rekombinante Expression des L1-Proteins ist es gelungen DNA-freie Viruspartikel (VLPs: *virus-like particles*) herzustellen (Kirnbauer *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994). Dies ermöglichte die strukturelle und immunologische Analyse der Papillomviren. Für das HPV11 L1-Protein wurde eine DNA-Bindungsdomäne beschrieben, die die letzten 11 AS des Carboxyterminus umfasst. Eine andere Arbeitsgruppe fand für das HPV16 L1-Protein keine DNA-Bindungseigenschaft, weshalb es fraglich ist, ob L1 DNA binden kann und somit die virale DNA-Verpackung bedingt.

Der Carboxyterminus des L1-Proteins wurde auch als Bindungsstelle für die durch Proteoglykan vermittelte Virusaufnahmen beschrieben (Joyce *et al.*, 1999). Neuere Daten sprechen aber gegen eine solche Theorie, da der Carboxyterminus des L1-Proteins in der viralen Struktur unzugänglich ist (Fligge *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001).

1.6.8 Das Protein L2

Das minore Kapsidprotein L2 ist wie das L1-Protein in infizierten Zellen nukleär lokalisiert und nur in differenzierten Zellen nachweisbar. Es ist annähernd so groß wie das L1-Protein und trägt mit etwa 12 Molekülen zum Kapsidaufbau bei. Das L2-Protein kann eigenständig weder ein Kapsid aufbauen noch geordnete Unterstrukturen ausbilden. Im Kapsid ist es wahrscheinlich mit den 12 pentavalenten Kapsomeren assoziiert. Dem minoren Kapsidprotein werden vielfältige Funktionen zugeordnet. So dirigiert es zum einen das majore Kapsidprotein L1 sowie das frühe Protein E2 zu den Zellkerndomänen PODs (Day *et al.*, 1998). Andererseits wurde im L2-Protein eine Domäne charakterisiert, die an der Bindung von VLPs an Zielzellen und deren Aufnahme beteiligt ist (Kawana *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde berichtet, dass das minore Kapsidprotein die Infektiosität von Pseudovirionen (rekombinante virenanaloge Partikel) erhöht (Roden *et al.*, 1996; Unckell *et al.*, 1997, Kawana *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 2001) Weiterhin wurde für das L2-Protein von HPV-16 eine DNA-Bindungsdomäne beschrieben, die auf den Aminoterminus kartiert wurde (Zhou *et al.*, 1994).

1.7 Epidemiologie und Kanzerogenese humaner Papillomviren

Das Genom von ungefähr 80 humanen Papillomviren ist gut charakterisiert, und über 70 weitere humane Papillomviren sind durch Teilsequenzen identifiziert worden (de Villiers, 1997). Zur Charakterisierung gehört die vollständige Sequenzanalyse des Genoms und der Vergleich der Nukleotidsequenz des L1-Gens mit allen bisher charakterisierten HPV-Typen. Liegt bei der Nukleotidsequenz des „neuen L1-Gens“ und den bisher charakterisierten L1-Genen eine Homologie von weniger als 90% vor, so gilt das Isolat als neuer HPV-Typ. Bei einer Homologie von mehr als 90% wird von einem Subtyp zum nächst verwandten Typ gesprochen. Die HPV werden aufgrund ihrer Gewebsspezifität in zwei große Gruppen eingeteilt, die Schleimhaut-Typen und die Haut-Typen. Die kutanen Typen infizieren die verhornende Haut außerhalb des Anogenital- und Respirationstrakts. Dies sind z.B. die HPV-Typen 1, 2, 4, 10, 27 und 57, die vor allem mit gemeinen Warzen der Extremitäten und Plantarwarzen in Verbindung gebracht werden (Gissmann *et al.*, 1977). Nach neueren Erkenntnissen sind Papillomviren bei der Genese des nichtmelanozytären Hautkarzinoms beteiligt. Auch die Beteiligung bestimmter Papillomviren (HPV5 und HPV8) an der Entstehung von Hauttumoren bei Patienten mit der Erkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* ist lange bekannt (Jablonska and Majewski, 1994). Weiterhin gilt als gesichert, dass immunsupprimierte Patienten eine größere Anfälligkeit für die Infektion mit HPV zeigen und an einer erhöhten Inzidenz an Hauttumoren leiden. Bei ungefähr 60% dieser Hauttumoren wurde HPV-DNA nachgewiesen. Neben der DNA noch nicht charakterisierter HPV-Typen wurde auch die DNA bekannter HPV-Typen und sogar die DNA von genitalen HPV-Typen, wie z.B. die des HPV33, in Hauttumoren nachgewiesen. HPV33, der Virustyp, der dieser Arbeit zugrunde liegt, gehört zu der Gruppe der Schleimhaut- bzw. genitalen HPV-Typen. Diese infizieren die Haut und Schleimhaut des Anogenitaltrakts. Man unterscheidet bei dieser Gruppe die sogenannten *high-risk* von den *low-risk* Typen. Zu den *low-risk* Typen zählen HPV6 und 11, die in der Regel Kondylome (Genitalwarzen) induzieren. Sie sind nur extrem selten in Karzinomen der äußeren Genitale zu finden. Zu den *high-risk* Typen gehören vorrangig HPV16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52, -58 und -59. Diese HPV-Typen sind regelmäßig in Vorstadien des Zervixkarzinoms und in invasiven Karzinomen der Zervix nachzuweisen (Munoz *et al.*, 2000; Schiffman *et al.*, 1993). Anogenitale HPV-Infektionen gehören zusammen mit den durch Chlamydien und Herpes-Viren induzierten Infektionen zu den häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Der wichtigste Risikofaktor ist die Anzahl der Sexualpartner. So können in den USA und

Europa bei ca. 1% der sexuell aktiven Erwachsenen (15 bis 45 Jahre) Warzen im Anogenitalbereich diagnostiziert werden. Subklinische Infektionen lassen sich bei ca. 4% der sexuell aktiven Personen feststellen. Latente Infektionen werden auf 10% und der Anteil der Bevölkerung, der aufgrund einer früheren oder aktuellen Infektion HPV-Antikörper besitzt, auf 60% geschätzt.

Die meisten HPV-Infektionen verlaufen subklinisch und werden von den Betroffenen oftmals nicht bemerkt. Bei den benignen Tumoren (Warzen, Kondylome) wird die Virusvermehrung nicht von Nekrosen oder Entzündungsvorgängen begleitet. Somit werden die Infektionen vom Immunsystem oft nicht ausreichend erkannt und persistieren. Nur ein geringer Prozentsatz der Erstinfektionen resultiert in benignen Karzinomen der Haut und Schleimhaut. Diese heilen aber größtenteils spontan nach wenigen Monaten bis Jahren aus. Dem gegenüber stehen die malignen Tumoren, wie z.B. das Zervixkarzinom. Jährlich erkranken weltweit 500.000 Frauen, und ca. 200.000 Frauen sterben aufgrund des Zervixkarzinoms (Shah and Howley, 1996). Damit stellt es in den Entwicklungsländern die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen dar. In den EU-Ländern wird seit Jahrzehnten durch ein zytologisches Präventivprogramm die Zahl der zervixkarzinom-assoziierten Todesfälle reduziert, wenngleich auch nicht verhindert. Die zytologische Diagnose beruht auf dem 1941 von Papanicolaou eingeführten vaginalen Abstrich mit anschließender zytologischer Auswertung (Pap-Test). Bei den Routineuntersuchungen gab es immer wieder viele falsch-negative Fälle, die sich rasch zu Karzinomfällen entwickelten. Daher wurde die Diagnostik durch den Nachweis der viralen DNA und RNA erweitert. Zusätzlich kann derzeit auch die Expression viraler Proteine in Biopsiematerial nachgewiesen werden.

Der Unterschied zwischen den Infektionen mit *low-risk* und *high-risk* HPV-Typen beruht darauf, dass die virale DNA der *high-risk* Typen in das Genom der Wirtszellen integriert. Dabei kommt es zur Zerstörung des E1- und E2-Leserahmens. Das E2-Protein ist aber gerade das Protein, das die Expression der Onkogene E6 und E7 reguliert. Aufgrund des Ausfalls von E2 kommt es zu einer unkontrollierten Expression von E6 und E7, die ihrerseits mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb interagieren. Es kommt zur Entartung der Zelle. Die Folge ist ein Karzinom, das unbehandelt auch metastasieren kann. Häufig verlaufen aber auch Infektionen selbst mit *high-risk* HPV-Typen subklinisch oder heilen spontan aus (Schneider and Koutsky, 1992). Es gilt als gesichert, dass neben der Infektion mit Papillomviren externe Stimuli erfolgen müssen, damit es zur Transformation kommt. Diese Stimuli können neben dem Genuss von Tabak, z.B. auch auf eine

Immunsuppression, HIV-Infektion oder dem Gebrauch von hormonellen Kontrazeptiva basieren (Franco, 1991; Schiffman *et al.*, 1987).

1.8 Vakzine gegen Papillomviren

Der Grundstein für die Entwicklung von HPV-Vakzinen wurde durch die rekombinante Herstellung von VLPs gelegt (Kirnbauer *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994). Da VLPs alle Oberflächenantigene tragen, kann auf eine Immunisierung mit attenuierten Viren verzichtet werden. Bei der Impfstoffentwicklung unterscheidet man die prophylaktischen von den therapeutischen Impfstoffen. Als prophylaktischer Impfstoff werden VLPs in klinischen Studien getestet. Sie sind aus den Strukturproteinen L1 allein oder zusammen mit L2 aufgebaut und induzieren neutralisierende Antikörper. Diese sollen bei einer Infektion das Virus binden und eine Anheftung an Zielzellen verhindern. Therapeutische Impfstoffe müssen aber schon persistierende Infektionen bekämpfen und dürfen deshalb nicht nur aus den Strukturproteinen bestehen. Da die Kapsidproteine nur in terminal differenzierten Keratinozyten exprimiert werden, würden nur die obersten, schon teils abgestorbenen Zellen erkannt. Die Zellen, in denen die frühen Gene exprimiert werden und zur Transformation der Wirtszelle beitragen, werden nicht erkannt. Deshalb wählte man als Antigen eine Kombination aus Strukturprotein und frühen Proteinen. Man stellte chimäre Kapside her. Diese bestehen aus dem Kapsidprotein L1, dem z.B. immunogene Anteile des E2-, E6- oder E7-Proteins angefügt wurden. Diese chimären L1-Proteine können ein Kapsid aufbauen und werden als Impfstoff erprobt (Greenstone *et al.*, 1998). Die Immunreaktion induziert nun eine Immunantwort gegen die frühen Proteine, weshalb tiefere infizierte Zellschichten auch erkannt werden. Gleichzeitig bieten sie aber auch einen Schutz gegenüber einer Neuinfektion.

Die Impfstudien waren im Tiermodell (Hund, Kaninchen) so erfolgreich (Christensen *et al.*, 1994; 1996; Breitburd *et al.*, 1995), dass man schnell zu klinischen Studien übergang und derzeit einige Vakzine in Studien der Phase III sind.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Genese des Nukleokapsids des humanen Papillomvirus Typ 33 untersucht werden. Das zentrale Thema sollte dabei die DNA-Verpackung in das

virale Kapsid sein. Zunächst sollte untersucht werden, welchen Größenbeschränkungen die DNA beim Einschluss in das Kapsid unterliegt. Wenn möglich, sollte eine Aussage erzielt werden, die diesbezüglich eine minimale und maximale DNA-Größe benennen kann. Ziel war es weiterhin, die direkte Beteiligung der Kapsidproteine L1 und/oder L2 an der DNA-Interaktion zu analysieren. Hierzu lagen widersprüchliche Literaturdaten für andere HPV-Typen vor. Abhängig von der publizierenden Arbeitsgruppe wurde einerseits das HPV11 L1-Protein als das DNA-bindende Strukturprotein favorisiert und andererseits das L2-Protein von HPV16 als DNA-bindendes Protein charakterisiert. Deshalb sollte zu Beginn für das humane Papillomvirus Typ 33, dem exemplarischen Papillomvirus unserer Arbeitsgruppe, mittels South-Western-Blot-Analysen gezeigt werden, welches der Kapsidproteine mit DNA interagieren kann. Im Fall einer Interaktion eines oder beider Strukturproteine sollte die DNA-Bindungsstelle durch den Einsatz von Kapsidproteinmutanten kartiert und deren Sequenzspezifität überprüft werden.

In weiterführenden Analysen sollten Mutanten, denen die DNA-Bindungsdomäne fehlt, in DNA-Verpackungsstudien getestet werden. Der Umstand, dass das Papillomvirus während seines Replikationszyklus auf differenzierendes Epithel angewiesen ist, macht es fast unmöglich, Papillomviren in Zellkultur herzustellen. Dieses Problem wird umgangen, indem alternativ *in vivo* virenanaloge Partikel (Pseudovirionen), die ein Markerplasmid tragen, hergestellt werden. Die DNA-Verpackung wird dann durch Infektion von Kulturzellen mit diesen Pseudovirionen überprüft. Dieses *In vivo*-Verpackungssystem sollte hier dazu dienen, DNA-verpackungsdefiziente L1- und/oder L2-Proteine von verpackungskompetenten zu differenzieren.

Ein weiterer Aspekt dieser Dissertation sollte sich mit der Frage beschäftigen, ob zelluläre Faktoren die DNA-Verpackung und die daraus resultierenden Pseudovirionen essentiell beeinflussen. Es sollte untersucht werden, ob es möglich ist, adäquate Pseudovirionen in einem zellfreien System herzustellen. Dazu musste ein System etabliert werden, DNA in bereits synthetisierte leere VLPs, sozusagen nachträglich, *in vitro* zu verpacken. Dazu sollten in Kulturzellen hergestellte VLPs dissoziiert und in Anwesenheit von Markerplasmid-DNA wieder reassoziert werden. Diese *in vitro* hergestellten Pseudovirionen sollten dann kritisch mit *in vivo* generierten Pseudovirionen verglichen werden. Wenn es möglich ist vergleichbare Pseudovirionen *in vitro* herzustellen, sollten auch die Mutanten der Strukturproteine im *In vitro*-System getestet werden, denen die DNA-Bindungsdomäne fehlt. Dies sollte klären, ob die DNA-Verpackung sich in Abwesenheit des zellulären Umfeldes von der *In vivo*-DNA-Verpackung unterscheidet.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht ausdrücklich erwähnt, von den Firmen Merck/Darmstadt, Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg und Sigma/Deisenhofen bezogen.

1.2 Radioaktive Materialien

Radioaktiv markiertes dATP stammte von der Firma ICN/Eschwege. α -³²P-dATP wurde mit einer spezifischen Aktivität von 3000Ci/mmol eingesetzt.

1.3 Plasmide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

Plasmidbezeichnung	Plasmidbeschreibung
pVL 1392	Baculotransfervektor (Invitrogen)
pTM1	Vacciniatransfervektor (Moss <i>et al.</i> , 1990)
pUC 19	Klonierungsvektor (Life Technologies Inc)
pEGFPGFP-NLS	Das Plasmid pEGFP (Invitrogen) wurde mit einer Expressionskassette für ein „Tandem-gfp“ mit dem NLS des HPV33 L1-Proteins versehen (L. Florin).

Folgende Plasmide wurden von mir hergestellt:

Plasmidbezeichnung	Plasmidbeschreibung
pVL1392-33L1-1/477	Das HPV33 L1-Gen wurde mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (siehe Tabelle Oligonukleotide) amplifiziert und das 3'-verkürzte Produkt (33L1-1/477) über die eingefügten <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> -Schnittstellen in den Vektor pVL1392 eingefügt.
pVL1392-33L1-1/477M9	Das Kernlokalisierungssignal des hnRNP A1-Proteins (M9 genannt) wurde über RT-PCR und Gesamtzell-RNA von 293-Zellen amplifiziert (Oligonukleotide 3 und 4, siehe Tabelle Oligonukleotide). Das Amplifikat wurde über die eingefügten Schnittstellen in die <i>BamHI</i> -Schnittstelle des Vektors pVL1392-33L1-1/477 kloniert.
pTM1-33L1-1/477M9	Mit den Oligonukleotiden 1 und 5 (siehe Tabelle Oligonukleotide) und dem Vektor pVL1392-33L1-1/477M9 als Matrize wurde das rekombinante HPV33 L1-1/477M9-Gen amplifiziert. Das Produkt wurde über die eingefügten <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i> -Schnittstellen in die <i>EcoRI</i> (5')-Schnittstelle und <i>BamHI</i> (3')-Schnittstelle des Vektors pTM1 kloniert.

1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

Oligonukleotid Nr.	Sequenz 5'-3'	Schnittstellen
1	TTAGAATTCATGTCCGTGTGGCGGCCT	<i>EcoRI</i>

Oligonukleotid Nr.	Sequenz 5'-3'	Schnittstellen
2	ACCGGATCCAGGTTTTGCTTTAAG	<i>Bam</i> HI
3	GAATGGATCCAATCAGTCTTC	<i>Bam</i> HI
4	GCTGGATCCTTAATAGCCACC	<i>Bam</i> HI
5	CAGGAAAAGATCTTTAATAGCC	<i>Bg</i> III

1.5 Bakterienstämme, Virusstämme und Zelllinien

1.5.1 Bakterienstämme:

Escherichia-coli DH5 α (Hanahan, 1983); ATCC: 53868

1.5.2 Virusstämme:

1.5.2.1 Vaccinia-Virus

WR-Stamm: ATCC: VR-1354

1.5.2.1.1 Rekombinante Vaccinia-Viren

vac33L1 (Unckell *et al.*, 1997)

vac33L2 (Unckell *et al.*, 1997)

VTF7-3 (Moss *et al.*, 1990)

vac33L1-1/470 (L. Florin)

vac33L1-1/477M9 (diese Arbeit)

1.5.2.2 Baculoviren

1.5.2.2.1 Rekombinante Baculoviren

bac33L1 (Volpers *et al.*, 1994)

bac33L2 (Volpers *et al.*, 1994)

bac16L1/L2 entspricht K-L1/L2 (J.T. Schiller)

bac18L1 (Sapp *et al.*, 1998)

bac18L2 (Sapp *et al.*, 1998)

bac33L1-21/499 (L. Florin)

bac33L1-1/492 (L. Florin)

bac33L1-1/477 (L. Florin)

bac33L1-1/477M9 (diese Arbeit)

1.5.3 Zelllinien

HuTk⁻ (Rhim *et al.*, 1975), ATCC: CRL-8303

Sf9, ATCC: CRL-1711

High FiveTM; (Wickham *et al.*, 1992)

COS7; (Gluzman, 1981), ATCC: CRL-1651

293; (Graham and Smiley, 1977), ATCC: CRL-1573

Alle verwendeten Zelllinien wurden gemäß der von ATCC erhaltenen Angaben kultiviert.

1.6 Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung
L1-7	Monoklonaler Maus-AK gegen HPV33/16/18 L1 (Sapp <i>et al.</i> , 1994)
L2-1	Monoklonaler Maus-AK gegen HPV33 L2 (Volpers <i>et al.</i> , 1995)

L2-2	Monoklonaler Maus-AK gegen HPV33 L2 (Volpers <i>et al.</i> , 1995)
α -GFP	Monoklonaler Maus-AK gegen <i>gfp</i> (Clontech)
K28	Polyklonales Kaninchenserum gegen HPV33 L2
K53	Polyklonales Kaninchenserum gegen HPV33 L1/L2 VLPs
K890	Polyklonales Kaninchenserum gegen ein C-terminales Peptid (letzten 15 AS) von HPV33 L1
α -Maus mAK IgG	Monoklonaler anti-Maus-IgG-AK mit Meerrittich-Peroxidase gekoppelt (Bio-Rad)
α -Maus mAK IgG DTAF	Monoklonaler anti-Maus-IgG-AK aus Ziege mit DTAF gekoppelt (Dianova)
α -Kaninchen mAK IgG RRX	Monoklonaler anti-Kaninchen-IgG-AK aus Ziege mit Rhodamin Red-Ex (RRX) gekoppelt (Dianova)
α -Kaninchen mAK IgG Cy3	Monoklonaler anti-Kaninchen IgG-AK aus Ziege mit Cy3 gekoppelt (Dianova).

2. Methoden

Grundlegende Methoden, die hier nicht beschrieben wurden, sind in Anlehnung an Maniatis und Kollegen (1989) und Ausubel und Mitarbeiter (1994) durchgeführt worden.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation von Gesamt-Zell-RNA

Für die Klonierung des Kernlokalisierungssignals des hnRNP A1-Proteins (M9 genannt) wurde Gesamt-Zell-RNA der Zelllinie 293 präpariert. Es wurden dafür 10^7 Zellen nach

Herstellerangaben (Qiagen RNeasy Mini Kit) verwendet und die extrahierte RNA über eine Säule von der DNA abgetrennt und gereinigt. Die RNA lag in destilliertem Wasser vor und wurde photometrisch quantifiziert (Ausubel *et al.*, 1994).

2.1.2 cDNA-Synthese (1. Strang)

Das Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese bildete die zuvor präparierte Gesamt-Zell-RNA aus 293-Zellen. Zur Synthese wurden RT-PCR Kugeln der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Diese Kugeln ermöglichen die cDNA-Synthese und die anschließende PCR-Reaktion in einem Reaktionsgefäß. Es wurden 2 µg Gesamt-Zell-RNA mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl gebracht und die Oligonukleotide Nr. 3 und 4 (siehe Tabelle Oligonukleotide) zugesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert (95°C, 5 min).

2.1.3 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Das bei der cDNA-Synthese entstandene cDNA-Fragment wurde mittels PCR (Saiki *et al.*, 1988) amplifiziert. Dazu wurde der cDNA-Syntheseansatz direkt nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 30 Zyklen (30 sek 95°C ; 45 sek 55°C, 30 sek 72°C) in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 inkubiert.

Wurde als Matrize Plasmid-DNA verwendet, so wurden *ready to go* PCR Kugeln der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Die Matrizen-DNA wurde mit H₂O und den spezifischen Oligonukleotiden nach Angaben des Herstellers auf 50 µl aufgefüllt und zu den Kugeln gegeben. Das Temperaturprofil während der Amplifikationszyklen wurde auf das jeweils verwendete Oligonukleotid-Paar abgestimmt.

2.1.4 Radioaktive Markierung von DNA

Für South-Western-Blot-Analysen wurden die DNA-Sonden derart radioaktiv markiert, dass durch Restriktionen entstandene einzelsträngige DNA-Enden in Anwesenheit von $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP zum Doppelstrang aufgefüllt wurden. Für diese Reaktion wurde das Klenow-

Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* als Enzym und dNTPs als Cosubstrate nach folgendem Ansatz verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

Der Reaktionsansatz wurde auf:

- 100 μ M dGTP, dCTP, dTTP, 50 μ Ci α^{32} P-dATP
- 5 mM DTT
- 1 U Klenow-Enzym pro μ g DNA
- 1x Klenow-Puffer eingestellt.

Die markierte DNA wurde durch eine Gelfiltration mit Sephadex® G-50 Säulen (Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers von den nicht-inkorporierten Nukleotiden abgetrennt.

2.1.5 South-Western-Blot

Im South-Western-Blot sollte überprüft werden, ob die eingesetzten Proteine DNA-bindende Eigenschaften aufweisen. Dafür wurden partiell gereinigte VLPs auf einem SDS-PAA Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach 30 minütiger Inkubation der Nitrozellulosemembran in PBS, 2% BSA, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran zur Renaturierung der gebundenen Proteine über Nacht in Renaturierungspuffer inkubiert. Darauffolgend wurde die Membran mit Bindungspuffer gewaschen und für eine halbe Stunde in Bindungspuffer mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4x 15 Minuten mit Bindungspuffer bei RT gewaschen, bevor sie feucht, in Frischhaltefolie eingepackt, mit einem PhosphorImager-Film über Nacht exponiert wurde.

Renaturierungspuffer: 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4

Bindungspuffer: 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 30 mM HEPES, pH 7,4

2.1.5.1 PhosphorImaging

Die Auswertung von PhosphorImager-Filmen erfolgte am PhosphorImager Storm 840 (Molecular Dynamics, Krefeld). Für die Verarbeitung der erhaltenen Daten wurde das Programm ImageQuant Version 1.2 verwendet.

2.1.6 Herstellung von Pseudovirionen in Zellkultur (*in vivo*)

In Zellkultur wurden Pseudovirionen nach einem modifizierten Protokoll von Unckell und Mitarbeitern (Unckell *et al.*, 1997) hergestellt. Die Änderungen sind hier in Kürze dargestellt:

2.1.6.1 Lipofektamin-Transfektion von COS7-Zellen

Die Lipofektamin-Transfektion beruht auf der Zusammenlagerung von DNA und Lipiden, was zu einer effizienten Aufnahme der DNA in die Zielzelle führt. Im Vergleich zur Elektroporation, bei der ebenfalls hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden, beeinträchtigt die Lipofektamin-Transfektion die Vitalität der Zellen nur gering.

Für die Transformation einer Kulturschale (15cm Durchmesser) wurden 15 µg DNA (pEGFP-GFP-NLS) und 60 µl Lipofektamin (GIBCO BRL) eingesetzt. Dazu wurden 5ml OptiMem-Medium (GIBCO BRL) mit 15 µg DNA und in einem getrennten Ansatz 60 µl Lipofektamin mit 5 ml OptiMem-Medium gemischt. Danach wurden beide Ansätze vereinigt, gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Vor der Zugabe des Transfektionsansatzes zu den ca. 80% konfluenten COS7-Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit FCS-freiem Medium gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Transfektionsansatz überschichtet und für 8 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde 15 ml DMEM-Medium, welches mit 20% FCS versetzt war, zugegeben und der Ansatz für weitere zwei Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.1.6.2 Expression der Kapsidproteine, Präparation und Reinigung von Pseudovirionen

Für die Expression der Kapsidproteine in prätransfizierten COS7-Zellen wurden, abhängig von der Fragestellung, die rekombinanten Vaccinia-Viren vac33L1, vac33L2, vac33L1-1/470, vac33L1-1/477M9 in Verbindung mit dem Helfervirus VTF7-3 verwendet. Nach der Infektion der Zellen wurden diese für weitere 2-3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die entstandenen Kapside aus den Zellkernen isoliert.

Nachfolgend wurden die Kapside in einem CsCl-Dichtegradienten aufgetrennt (Unckell *et al.*, 1997).

2.1.7 Herstellung von Pseudovirionen in einem zellfreien System (*in vitro*)

Die *In vitro*-Herstellung von Pseudovirionen erfolgte modifiziert nach dem von Kawana und Mitarbeitern (Kawana *et al.*, 1998) publizierten Protokoll. Es basiert darauf, dass partiell gereinigte VLPs in wässriger Lösung dissoziiert und in Anwesenheit von Plasmid-DNA reassoziert werden. Hierbei erfolgt der Einbau von DNA in VLPs. Es entstehen DNA-haltige VLPs, d.h. Pseudovirionen.

Dazu wurden HPV33-VLPs im Baculovirus-Expressionssystem synthetisiert und durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und konzentriert (Volpers *et al.*, 1994). Die L1-Proteinkonzentration in den Hauptfraktionen wurde nach einer Dialyse gegen PBS über Nacht auf ca. 1 mg/ml eingestellt. Die zu verpackende Plasmid-DNA (2 mg pEGFP-GFP-NLS) wurde mit Ethanol gefällt und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde nachfolgend in 950 µl der eingestellten Kapsidlösung resuspendiert und mit 50 µl β-Mercaptoethanol versetzt (Endkonzentration 5%). Der Ansatz wurde über Nacht, aber nicht länger als 16 Stunden, bei 4°C inkubiert und anschließend in einen Dialyseschlauch überführt. Die Dialyse erfolgte in 1 l PBS (NaCl-Konzentration 0,5 M) für 24 Stunden. Der Dialysepuffer wurde viermal gewechselt. Danach wurde die Probe dem Dialyseschlauch entnommen und mit CsCl auf eine Dichte von ca. 1,32 g/cm³ eingestellt. Eine anschließende Dichtezentrifugation (Ultrazentrifuge LM8, Beckmann) für 18h bei 55000 rpm und 10°C (vti 65 Rotor, Beckmann) trennte DNA-haltige Pseudovirionen von leeren VLPs ab. Der entstandene Gradient wurde mit einem Fraktionsvolumen von ca. 200 µl fraktioniert.

2.1.8 DNA-Extraktion aus Pseudovirionen

Für Restriktionsanalysen oder Quantifizierungsstudien der in Pseudovirionen verpackten DNA war es notwendig, diese vor der jeweiligen Analyse zu isolieren.

Dazu wurden Pseudovirionen verwendet, die sich nach der Dichtezentrifugation noch in CsCl-Lösung befanden. Die Dialyse erfolgte in Mikrodialysegefäßen (Bio-Tech Inc), welche in eine Dialysemaschine (Bio-Tech Inc) eingesetzt wurden. Die Pseudovirionen

enthaltenden Fraktionen (je 100 μl) wurden 6 Stunden gegen H_2O dialysiert. Während dieser Zeit wurden drei Pufferwechsel vorgenommen. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Fraktionen aus den Dialysegefäßen entnommen und jeweils mit DNase I (Endkonzentration 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 10 mM Mg^{2+}) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit SDS-Lösung auf 500 μl aufgefüllt (Endkonzentration 2%), mit 500 μl Phenol versetzt, durch Invertieren gemischt und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurde die wässrige Phase zweifach mit Phenol/Chloroform, dann zweimal mit Chloroform extrahiert und die anschließende Ethanol-Fällung bei -20°C über Nacht durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 15 μl H_2O aufgenommen.

2.1.9 DNA-Extraktion aus VLPs nach Langzeit-Expression

Insektenzellen (Sf9) wurden mit Baculoviren, rekombinant für die HPV-Kapsidproteine L1 und L2, infiziert und über einen Zeitraum von 3 Wochen bei RT kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen vom Kulturmedium (Sf900, Life Technologies) entfernt, und das Medium wurde mit CsCl auf eine Dichte von 1,30 g/cm^3 eingestellt. Nach einer CsCl -Gleichgewichtszentrifugation bei 45.000 rpm für 12h bei 12°C (Beckmann LM8 Zentrifuge, vti50 Rotor) wurde der Gradient mit einer Fraktionsgröße von 1,4 ml fraktioniert. Die Dichten der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und Fraktionen der Bereiche 1,35 g/cm^3 bis 1,30 g/cm^3 (DNA-haltige VLPs) sowie 1,30 g/cm^3 bis 1,27 g/cm^3 (leere VLPs) vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden ausgiebig gegen PBS dialysiert und dann mit Magnesiumchlorid und DNase I versetzt (Endkonzentration 10 mM MgCl_2 und 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I). Nach einer Inkubation für 90 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit EDTA (Endkonz.: 200 mM) gestoppt und der Ansatz nach Zugabe von Proteinase K für 12h bei RT inkubiert. Nachdem die zugängliche DNA und die VLPs abgebaut waren, wurde die geschützte DNA mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und mit Ethanol präzipitiert. Die isolierte DNA wurde mit $^{32}\text{PdATP}$ markiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.1.10 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen wurden dann durch Elektroporation transformiert, wenn nur geringe DNA-Mengen zur Verfügung standen und deshalb eine hocheffiziente Transformationsmethode benötigt wurde.

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen (ELECTROMAX™DH5 α -E™, GIBCO BRL) verwendet. Es wurden 3 μ l Proben-DNA und 20 μ l *E. coli*-Zellen auf Eis gemischt und in eine vorgekühlte Mikro-Elektroporationskammer (GIBCO BRL) überführt. Die sich anschließende Elektroporation erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem Gibco BRL Cellporator. Der Elektroporationsansatz wurde umgehend aus der Elektroporationskammer entnommen, zu 1 ml RT-warmem S.O.C.-Medium gegeben und bei 37°C für eine Stunde bei 180 rpm geschüttelt. Danach wurde der Ansatz abzentrifugiert, und alle Zellen wurden auf einer selektionierenden Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Inkubation von mindestens 12 Stunden bei 37°C wurden die Kolonien gezählt.

Die Transformationseffizienz wurde bestimmt, indem 20 μ l *E. coli*-Zellen mit 5 pg des Plasmids pUC19 gemischt und durch Elektroporation transformiert wurden. Nach der Elektroporation wurde die Hälfte des Ansatzes zu 1 ml RT warmen S.O.C.-Medium gegeben und bei 37°C für eine Stunde bei 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz 1:100 verdünnt und 100 μ l der Verdünnung auf einer selektionierenden Agarplatte ausgestrichen. Die sich anschließende Inkubation und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

S.O.C.-Medium: 97 ml destilliertes H₂O, 2 g Peptone, 0,55 g Hefeextrakt, 1 ml 1 M Natriumchlorid, 1 ml 1 M Kaliumchlorid, autoklavieren, Lösung auf 55°C abkühlen lassen, 1 ml 2 M Mg²⁺ (1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄) und 1 ml 2 M Glucose zugeben und steril filtrieren.

2.1.11 Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren

Die Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren erfolgte nach dem publizierten Protokoll von Unckell und Kollegen (Unckell *et al.*, 1997).

2.1.12 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die Herstellung rekombinanter Baculoviren erfolgte nach den Angaben von Volpers und Mitarbeitern (Volpers *et al.*, 1994).

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Infektionsstudien

In Infektionsstudien wurde überprüft, ob die hergestellten Pseudovirionen ihre inkorporierte DNA DNase-resistent auf Zielzellen übertragen können.

Für diesen Versuchsansatz wurden die Fraktionen untersucht, deren Dichte nach der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation im Bereich 1,31-1,34 g/cm³ lag und somit Pseudovirionen enthalten sollten. Es wurden je 100 µl dieser Fraktionen über Nacht gegen PBS (pH 6,8) in einer Dialysemaschine (Bio-Tech Inc) mit Mikrodialysegefäßen (Bio-Tech Inc) dialysiert. Der Puffer wurde viermal gewechselt. Anschließend wurde der Ansatz mit DNase I (Endkonzentration 250 µg/ml, 10 mM Mg²⁺) versetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert, mit PBS (pH 6,8) auf 250 µl aufgefüllt und mit BSA versetzt (Endkonzentration 100 µg/ml). Danach wurden COS7-Zellen, die am Vortag mit einer Dichte von 5x10⁴ Zellen/Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät wurden, einmal mit PBS (pH 6,8) gewaschen und mit dem Infektionsansatz überschichtet. Die darauffolgende Inkubation erfolgte bei 4°C für eine Stunde. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden mit 1 ml FCS-haltigem DMEM-Medium überschichtet und für 72 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Infizierte Zellen waren an der für das GFP-Protein typischen, grünen Fluoreszenz zu erkennen. Die positiven Zellen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200, Zeiss) ausgezählt.

2.2.2 Zellbindungsstudien

Bei diesem Versuchsansatz wurde getestet, wie gut VLPs, die aus HPV33 L1-Mutanten aufgebaut sind, an Zellen binden können. Dazu wurden COS7-Zellen und humane Keratinozyten in 24-Loch-Platten ausgesät. Wenn die Zellen konfluent waren, wurde das

Medium abgenommen, und die Zellen wurden viermal mit PBS (pH 6,8) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 200 μ l PBS (100 μ g/ml BSA) (pH 6,8), in dem verschiedene Mengen an gereinigten VLPs gelöst waren, für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde der Ansatz über die ganze Zeit konstant geschwenkt. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen abgenommen, und diese wurden viermal mit PBS (pH 6,8) gewaschen. Die Zellen wurden in 40 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 Minuten gekocht und auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Gebundene VLPs wurden durch die Detektion des L1-Proteins im Western-Blot nachgewiesen.

Laemmli-Puffer: 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8

2.2.3 Expression und Aufreinigung des Proteins GFP-GFP-NLS

COS7-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Plasmid pEGFP-EGFP-NLS transient transfiziert. Dazu wurden pro Elektroporation 5×10^6 Zellen in 800 μ l HBS-Puffer aufgenommen und mit 15 μ g DNA (in 200 μ l TE pH 7,5 gelöst) gemischt. Die Elektroporation erfolgte in Elektroporationsküvetten bei RT mit einem Cellporator (Life Technologies). Das Gerät war wie folgt eingestellt: Kapazität 1600 μ F, Spannung 200 V, Feldstärke 500 V/cm. Die Zellen wurden nach der Elektroporation in DMEM-Medium aufgenommen und mit einer Zellzahl von 1×10^7 in eine große Zellkulturschale (15 cm Durchmesser) ausgesät.

HBS-Puffer: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2PO_4 , 6 mM Glucose, 21 mM HEPES, pH 7,05

2.2.3.1 Proteinaufreinigung

Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die COS7-Zellen für die Aufreinigung des Proteins verwendet. Die Aufreinigung erfolgte modifiziert nach einem Protokoll von Harlow und Lane (1988). Vorbereitend wurde Protein-G-Sepharose mit Waschpuffer 1 äquilibriert und mit dem polyklonalen Kaninchenserum K890 für 2 Stunden bei 4°C im

Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Sepharose gewaschen, bis im Eluat kein Protein mehr nachweisbar war. Waschschritte mit Natriumborat schlossen sich an, bis der pH-Wert bei 9 lag. Daraufhin wurde die Sepharose in Natriumborat/Dimethylpimelidat aufgenommen und für 30 Minuten im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde mit Ethanolamin gewaschen, für 2 Stunden in Ethanolamin im Überkopfschüttler inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die COS7-Zellen wurden mit PBS gewaschen, in KE-Puffer aufgenommen und 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden im Douncer aufgebrochen und die Zellkerne anschließend abzentrifugiert. Das Pellet wurde in KE-Puffer aufgenommen, sonifiziert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht mit der vorbereiteten Sepharose bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde mit Waschpuffer 2 gewaschen und mit Elutionspuffer das gebundene Protein eluiert. Das Protein wurde bei -20°C gelagert.

Waschpuffer 1:	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Waschpuffer 2:	500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
Natriumborat:	0,2 M Natriumborat, pH 9,0
Dimethylpimelidat/Natriumborat:	20 mM Dimethylpimelidat, 0,2 M Natriumborat, pH 9,0
Ethanolamin:	0,2 M Ethanolamin, pH 8,0
KE-Puffer:	300 mM NaCl, 0,25% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer:	4 M LiCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5

2.2.4 Proteinexpression im Baculovirussystem

Die Infektion von Sf9-Zellen sowie die Präparation von VLPs aus infizierten Insektenzellen erfolgte nach Volpers *et al.*, 1994.

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Gewinnung polyklonaler Antisera

Zwei Mäusen (BALB/cAn, weiblich) wurde intraperitoneal 10 µg HPV33 L1-1/477- bzw. HPV33 L1-21/499-VLPs 1:1 in komplettem Freund`s Adjuvans gespritzt. Im Abstand von je zwei Wochen erfolgten zwei weitere Immunisierungen mit der gleichen Antigendosis in inkompletten Freund`s Adjuvans. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere getötet und das Blut entnommen. Der Blutkuchen wurde abzentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert.

2.3.2 Nachweis des Kapsidproteins L1 im ELISA

Nachdem die Auftrennung von Pseudovirionen und VLPs im CsCl-Dichtegradienten erfolgt war, wurde dieser fraktioniert und von jeder Fraktion 2 µl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert. Die Proben wurden durch Zugabe von 100 µl Carbonatpuffer (pH 9,6) bei RT über Nacht denaturiert und an die Platte gebunden. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS 0,1% Tween 20 gewaschen, bevor sie mit Blockierungspuffer für eine Stunde bei RT nachbeschichtet wurden. Die Platten wurden erneut gewaschen und der primäre Antikörper (in PBS 0,1% Tween 20 verdünnt) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Platten gewaschen, mit dem sekundären Antikörper beschichtet und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen der Platten entfernt und das Substrat (TMB) zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei RT und wurde nach etwa 2 bis 5 Minuten durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktion wurde in einem *ELISA*-Messgerät (Multiscan RC Modell 351, Labsystems) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Blockierungspuffer: 10 µg/ml BSA in PBS

Substrat (TMB): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Kirkegaard & Perry)

2.3.3 Immunfluoreszenz-Analysen

2.3.3.1 HuTK⁻-Zellen

HuTK⁻-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, einen Tag später mit rekombinanten Vaccinia-Viren für 1h bei RT infiziert und für 12 weitere Stunden mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen, und die Zellen wurden mit Methanol (0,02 M EGTA) für 30 Minuten bei -20°C fixiert. Danach wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und mit Ziegen-Normalserum enthaltendem PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem zusätzlichen Inkubationsschritt mit HPV33 L1 (L1-7) und/oder L2 (K28)-spezifischen Antikörpern für eine Stunde bei 37°C wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und mit Cy3 konjugiertem Ziegen-anti-Kaninchen oder DTAF konjugiertem Ziegen-anti-Maus Antikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser mehrfach gewaschen, mit Einbettmedium überschichtet und auf Objektträger gelegt. Die Auswertung erfolgte am Leica DM RBE Fluoreszenzmikroskop. Immunfluoreszenzen wurden freundlicher Weise von L. Florin durchgeführt.

2.3.3.2 High Five-Zellen

Die oben beschriebene Methode wurde auch bei Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit High Five-Zellen durchgeführt. Einzige Ausnahme: Die Insektenzellen wurden erst zwei Tage nach der Infektion mit rekombinanten Baculoviren fixiert und untersucht.

III. Ergebnisse

Über humane Papillomviren wurden in den letzten Jahrzehnten viele strukturelle und immunologische Untersuchungen durchgeführt. Weitgehend unbekannt geblieben ist hierbei die Morphogenese dieser Virionen im Zellkern. Die Virusbildung erfordert die Verpackung des viralen Erbguts durch das Kapsid. Die Interaktion der Kapsidproteine mit der viralen DNA ist bisher nicht zweifelsfrei aufgeklärt. Es ist erstens unbekannt, ob die zu verpackende DNA einer Größenbeschränkung unterliegt, und zweitens umstritten, ob das majore Kapsidprotein L1, das minore Kapsidprotein L2 oder sogar beide Proteine den Kontakt zwischen Kapsid und DNA herstellen. Diesbezügliche Literaturberichte sind widersprüchlich und favorisieren einerseits das L2-Protein als das Protein, welches den Kontakt zwischen der viralen DNA und dem entstehenden Kapsid vermittelt (Zhou *et al.*, 1994). Andererseits wurde auch das L1-Protein als Kandidat für die DNA-Interaktion beschrieben (Li *et al.*, 1997).

Zuerst sollte untersucht werden, ob ausschließlich DNA einer definierten Größe von den Kapsidproteinen verpackt wird. Weiter sollte dann aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur für das humane Papillomvirus Typ 33 geklärt werden, welche Kapsidproteine, L1 und/oder L2, mit DNA interagieren können. Bei Identifikation DNA-bindender Eigenschaft eines oder beider Kapsidproteine sollte die DNA-bindende Sequenz eingegrenzt werden.

1. DNA-Größenbeschränkungen bei der Verpackung in VLPs

Für die Charakterisierung einer DNA-Größenlimitierung bei VLPs machte ich mir ein bei der Expression der Kapsidproteine durch Baculoviren auftretendes Phänomen zunutze. Werden Sf9-Zellen über einen langen Zeitraum (2-3 Wochen) mit für die Kapsidproteine rekombinanten Baculoviren infiziert und die in den Überstand abgegebenen Kapside anschließend in einem CsCl-Gradienten aufgetrennt, so zeigt sich folgendes Bild: Das L1-Protein akkumuliert nicht ausschließlich bei einer Dichte von $1,29 \text{ g/cm}^3$, sondern auch in einem dichteren Bereich bei $1,32 \text{ g/cm}^3$ (Fligge *et al.*, 2001). Dieser Bereich entspricht der Dichte von Virionen in CsCl. Um die Größe der verpackten DNA zu untersuchen, wurde die DNA aus den Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ isoliert und mit Hilfe eines

radioaktiven Nukleotids markiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch eine Sepharose-Säule von den freien Nukleotiden abgetrennt und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dieses wurde anschließend getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

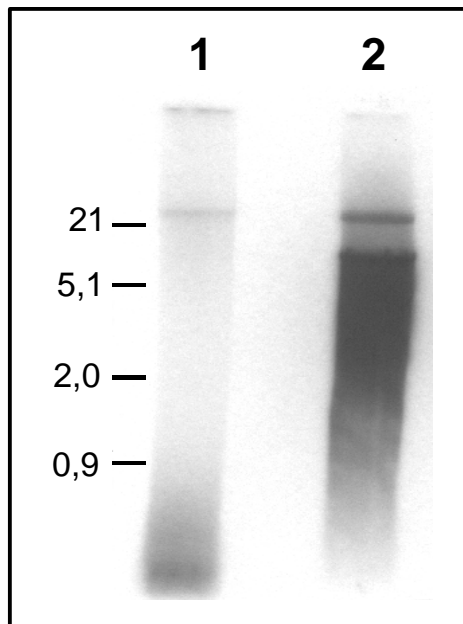


Abb. 4: DNA-Nachweis bei virusähnlichen Partikeln von HPV33 nach Langzeitexpression in Insektenzellen. Die Kapsidproteine L1 und L2 wurden über 3 Wochen in Sf9-Zellen exprimiert und die VLPs aus dem Überstand durch eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Aus den schweren (Spur 2) und leichten Fraktionen (Spur 1) wurde die DNA isoliert, radioaktiv markiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Größe der Marker-DNA ist in kb angegeben.

Das Autoradiogramm (Abbildung 4) zeigt in beiden Fraktionen ($1,29 \text{ g/cm}^3$ und $1,32 \text{ g/cm}^3$) eine hochmolekulare DNA-Bande. Diese ist wahrscheinlich auf die im CsCl-Gradienten koakkumulierenden Baculoviren zurückzuführen, deren DNA ebenfalls isoliert und markiert wurde. Niedermolekulare Signale sind aber nur in der Fraktion mit der Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ zu erkennen. Das Signal zeigt vorrangig DNA von ca. 8 kb und zusätzlich kleinere DNA-Fragmente bis ca. 1,5 kb. Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass es möglich ist zelluläre DNA in VLPs zu verpacken und andererseits, dass das Papillomvirus über ein weites Größenspektrum bei der zu verpackenden DNA verfügt. Das obere Limit liegt bei ca. 8 kb, der Größe des viralen Genoms, wohingegen es im unteren Bereich keine Größenbeschränkungen zu geben scheint.

2. DNA-Interaktion der Strukturproteine L1 und L2

Zur Aufklärung der Frage, welches der Kapsidproteine des „intermediate risk“ HPV-Typ 33 an der Interaktion mit der viralen DNA beteiligt ist, wurden South-Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Carboxyterminus des HPV33 L1-Proteins enthält eine Sequenz positiv geladener AS, die eine DNA-Bindung ermöglichen könnte. Deswegen sollten bei der Bindungsstudie außer dem wtL1-Protein von HPV33 auch verschiedene C-terminale

Deletionsmutanten getestet werden. Dabei handelte es sich um HPV33 L1-Mutanten, denen entweder 7 AS (L1-1/492) oder 22 AS (L1-1/477) am Carboxyterminus fehlen. Zusätzlich wurde eine HPV33 L1-Mutante mit einer Deletion von 20 AS am Aminoterminus untersucht (L1-21-499). Die wtL1-Proteine der HPV-Typen 16 und 18 wurden in die Untersuchung miteinbezogen, um einen Hinweis auf ein HPV-typübergreifendes Prinzip zu erhalten. Da die AS-Sequenz des HPV33 L2-Proteins keinen Hinweis auf eine mögliche DNA-Interaktion lieferte, sollte vorab nur das wtL2-Protein untersucht werden.

Die Proteine wurden mit Hilfe rekombinanter Baculoviren in Insektenzellen hergestellt. Das synthetisierte majore Kapsidprotein L1 sowie die L1-Mutanten waren in der Lage, sich spontan zu VLPs zusammenzulagern. Hierdurch wurde es ermöglicht, diese Proteine (HPV16 wtL1, HPV18 wtL1, HPV33 wtL1, L1-1/492, L1-1/477, L1-21/499) in Form von VLPs aus den Insektenzellen zu isolieren und über eine Dichtezentrifugation partiell zu reinigen. Das wtL2-Protein, welches nur in geringer Kopienzahl im Kapsid vorliegt, kann sich eigenständig nicht zu Kapsiden zusammenlagern. Deshalb konnte das L2-Protein nicht wie L1 in Form von VLPs isoliert werden. Das L2-Protein akkumuliert aber in den Zellkernen der infizierten Insektenzellen und konnte aus diesen isoliert und partiell aufgereinigt werden. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach einer Renaturierungsphase wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten HPV-DNA Sonde oder einer unspezifischen Plasmid-DNA Sonde inkubiert, gewaschen und einem Phosphorimager-Film exponiert.

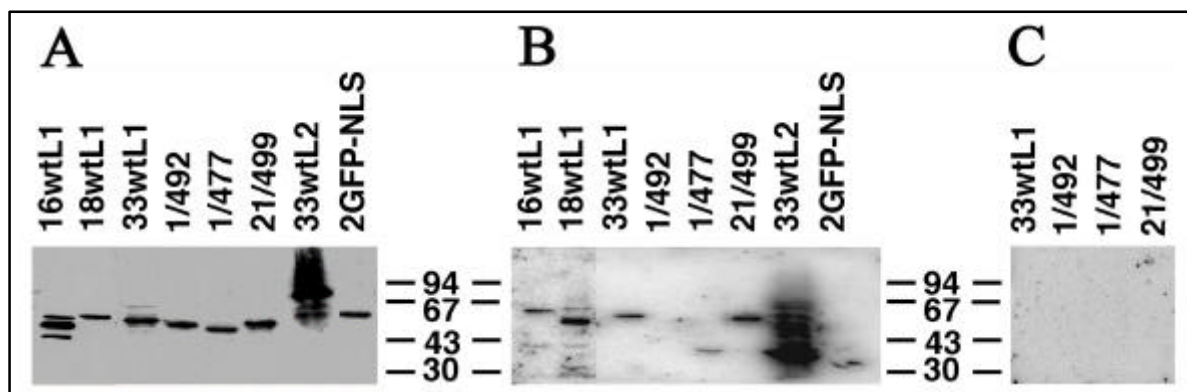


Abb. 5: South-Western-Blot Analyse zum Nachweis DNA-bindender Domänen von HPV Kapsidproteinen. Western-Blot Analyse der eingesetzten Proteine (A). South-Western-Blot Analyse (B und C): Wt Kapsidproteine von HPV16, 18 und 33 sowie amino- und carboxyterminal verkürzte L1-Proteine von HPV33 wurden mit dem Baculovirus-Expressionssystem synthetisiert. Die Proteine wurden über CsCl-Dichtezentrifugation oder Immunpräzipitation (2GFP-NLS) aufgereinigt, auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden blockiert, renaturiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Eine Membran wurde über Nacht mit dem L1-spezifischen Antikörper K890 inkubiert, bevor die DNA-Sonde zugegeben wurde (C). Gebundene DNA wurde über PhosphorImaging nachgewiesen. Die Membranen wurden anschließend mit einer Mischung aus L1-, L2- und GFP-spezifischen Antikörpern inkubiert und die Proteine im Western-Blot nachgewiesen (A). Die Zahlen in der Mitte geben das Molekulargewicht von Markerproteinen in Kilodalton wieder.

Nachfolgend wurden die Proteine derselben Membran in einem Western-Blot nachgewiesen, um sicherstellen, dass in allen Proben annähernd gleiche Proteinkonzentrationen vorlagen und Unterschiede in der DNA-Bindung nicht auf Konzentrationsunterschieden in den verwendeten Proben beruhten. Wie in Abbildung 5A zu sehen ist, ist in allen Proben der Proteingehalt annähernd gleich. Das HPV33 wtL1-Protein umfasst 499 AS und läuft bei einer Größe von 55 kDa. Etwas darüber befindet sich das wtL1-Protein von HPV16, das vier AS länger ist. Weitere vier AS größer ist das HPV18 wtL1-Protein, welches knapp über dem des HPV16 zu sehen ist. Die Mutanten, denen am Aminoterminus 20 AS (HPV33 L1-21/499) oder am Carboxyterminus 7 (HPV33 L1-1/492) bzw. 22 AS (HPV33 L1-1/477) fehlen, laufen unterhalb des HPV33 wtL1-Proteins. Das HPV33 wtL2-Protein umfasst 467 AS, läuft aber bei ca. 80 kDa. In Abbildung 5B ist zu erkennen, dass sowohl das HPV33 wtL1-Protein, als auch das aminoterminal verkürzte HPV33 L1-Protein (L1-21/499) DNA binden können. Die zwei carboxyterminal verkürzten HPV33 L1-Proteine, denen 7 (L1-1/492) bzw. 22 AS (L1-1/477) fehlen, zeigen keine DNA-bindende Eigenschaft. Ebenso wurde für das HPV33 wtL2-Protein kein Signal erhalten. Die Signale, die sich unterhalb des HPV33 wtL2-Proteins befinden, beruhen auf einer Bindung an zelluläre Proteine, die bei der Extraktion des wtL2-Proteins mitaufgereinigt wurden. Die DNA-Bindungseigenschaft ist somit auf den Carboxyterminus von HPV33 L1 beschränkt. Die Unfähigkeit der Mutante L1-1/492, mit DNA zu interagieren, führt zu dem Schluss, dass die letzten sieben AS notwendig sind, um die DNA-Bindungseigenschaft des HPV33 L1-Proteins zu erhalten. Die Eigenschaft, DNA zu binden, ist nicht auf das majore Kapsidprotein von HPV33 beschränkt. In der Analyse weisen vielmehr auch die wtL1-Proteine von HPV16 und 18 eine DNA-Bindung auf. Auch wenn die Effizienz der Bindung bei HPV18 wtL1 geringer ist, deutet dies daraufhin, dass die DNA-Bindungseigenschaft des L1-Proteins ein HPV-typübergreifendes Prinzip ist.

Um zu klären, ob die letzten sieben AS von HPV33 wtL1 ausreichen, einem HPV-fremden, nicht DNA-bindenden Protein DNA-Bindungseigenschaften zu verleihen, wurde ein GFP-Dimer verwendet, dem diese sieben C-terminalen AS von HPV33 L1 angefügt wurden. Wie in Abbildung 5B zu erkennen, ist dieses Fusionsprotein nicht in der Lage, DNA zu binden. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass das DNA-Bindungsmotiv über die fusionierten sieben AS hinausgeht und eine Deletion der sieben AS dieses Motiv zerstört.

In einem weiterführenden Versuch wurde die Nitrozellulose-Membran, vor der Hybridisierung mit der radioaktiven DNA-Sonde, mit einem HPV33 L1-spezifischen Peptid-Antiserum inkubiert. Dabei sollte untersucht werden, ob ein spezifisches L1-Antiserum die

DNA-Bindung inhibieren kann. Das verwendete Antiserum ist gegen ein Peptid gerichtet, das die letzten 15 AS des HPV33 L1-Proteins umfasst. Wie die Abbildung 5C zeigt, war es mit diesem Antiserum möglich, die DNA-Bindung sämtlicher HPV33 L1-Proteine zu blockieren. Dies zeigt nochmals deutlich, dass der Carboxyterminus des HPV33 L1-Proteins für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Weil eine spezifische HPV-DNA-Sonde und eine unspezifische Plasmid-DNA-Sonde die gleichen Ergebnisse lieferten, handelt es sich um eine sequenzunspezifische DNA-Bindung.

3. *In vitro*-DNA-Verpackung

Die neu charakterisierte DNA-Bindungsdomäne des HPV33 L1-Proteins warf die Frage auf, ob Virionen, die aus L1-Mutanten aufgebaut sind, denen diese Sequenz fehlt, DNA verpacken können. Die Tatsache, dass Papillomviren für eine Vermehrung auf differenzierende Epidermis angewiesen sind, macht es fast unmöglich, sie zu züchten. Zwei Methoden (raft culture (Meyers *et al.*, 1992); xenograft (Keider *et al.*, 1985)), um Papillomviren unter Laborbedingungen zu züchten, liefern unter großem Aufwand nur geringe Mengen an Virionen. Alternativ ist ein Ansatz beschrieben, der es ermöglicht, Markerplasmid-DNA in VLPs zu verpacken (Unckell *et al.*, 1997). Dazu werden die Kapsidproteine L1 und L2 in Markerplasmid-prätransfizierten Zellen exprimiert. Während der Synthese der Strukturproteine und deren Zusammenlagerung zu Kapsiden im Zellkern kommt es zum Einschluss der Plasmid-DNA in VLPs. Das Resultat sind Pseudovirionen, die in der Lage sind, Zielzellen zu infizieren. Die Herstellung solcher Pseudovirionen ist im Vergleich zu den oben erwähnten Systemen einfacher und fordert einen geringeren Zeitaufwand. Die Charakterisierung der Pseudovirionen zeigte, dass sie mit natürlichen Virionen vergleichbar sind.

Der Umstand, dass der Carboxyterminus von HPV33 L1 sowohl das Kernlokalisierungssignal als auch die AS umfasst, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind, macht es unmöglich die L1-Mutanten in diesem *In vivo*-System zu testen. Die Proteine würden im Zytoplasma zurückgehalten und nicht mit der Plasmid-DNA im Kern in Kontakt kommen. Es musste demzufolge ein System gefunden werden, in dem es möglich ist, die DNA außerhalb des Zellkerns zu verpacken.

Kawana und Mitarbeiter beschrieben 1998 ein zellfreies *In vitro*-DNA-Verpackungssystem für HPV16. Die *in vitro* generierten Pseudovirionen waren aus den Kapsidproteinen L1 und

L2 aufgebaut und konnten Zellkulturzellen infizieren. Der Versuchsablauf ist folgender: Virusähnliche Partikel werden durch Zugabe eines reduzierenden Agens (hier: β -Mercaptoethanol) in Kapsomere dissoziiert. Während der nachfolgenden Dialyse, die in Anwesenheit von Markerplasmid-DNA erfolgt, reassoziieren die Kapsomere zu Kapsiden. Dieser Vorgang resultiert in der unspezifischen Verpackung der DNA in Kapside. Die DNA-haltigen Pseudovirionen lassen sich durch eine CsCl-Geichgewichtszentrifugation von den leeren VLPs abtrennen.

Die *In vitro*-DNA-Verpackung, wie sie für den HPV Typ 16 beschrieben wurde, wurde nun zunächst mit HPV33 L1 und L2 wt-Proteinen ausgeführt. Es musste sichergestellt werden, dass das publizierte System sich auf den von mir verwendeten HPV-Typ 33 übertragen ließ.

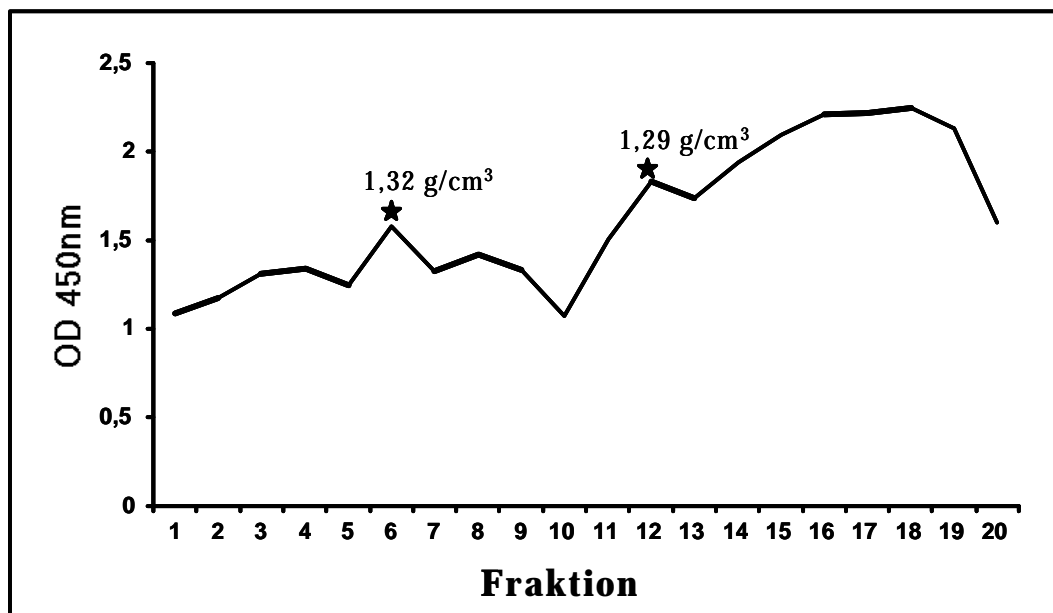


Abb. 6: Analyse des CsCl-Gradienten im ELISA. *In vitro* hergestellte HPV33 L1/L2 Pseudovirionen wurden im CsCl-Gradient von VLPs abgetrennt. Der Gradient wurde fraktioniert und im L1-ELISA analysiert. Von jeder Fraktion wurden 2 μ l in Carbonatpuffer über Nacht an ELISA-Platten gekoppelt. Der L1-Nachweis erfolgte durch den monoklonalen Antikörper L1-7. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm^3 sind gekennzeichnet.

Bei einer erfolgreichen Etablierung des *In vitro*-DNA-Verpackungssystems für die Herstellung von HPV33 wtL1/wtL2 Pseudovirionen sollten anschließend Pseudovirionen ohne wtL2-Beteiligung hergestellt werden. Da die Kernlokalisations- und DNA-Bindungssequenz in L1 überlappen, hat dies zur Folge, dass die zytoplasmatisch lokalisierten L1-Mutanten beim Kapsidaufbau in der Zelle das im Zellkern lokalisierte L2 nicht einbauen. Sollte die Genese L2-freier Pseudovirionen gelingen, so sollten im Anschluss die DNA-bindungsnegativen HPV33 L1-Mutanten im *In vitro*-Verpackungssystem getestet werden.

Erste *In vitro*-Verpackungsstudien wurden mit HPV33 wtL1/wtL2 VLPs und einer für das GFP kodierenden Plasmid-DNA durchgeführt. Der sich anschließende CsCl-Gradient, der Pseudovirionen von leeren VLPs trennt, wurde fraktioniert und die L1-Protein-Verteilung über den Gradienten geprüft (Abbildung 6). Es fällt auf, dass das wtL1-Protein in zwei Dichtebereichen des Gradienten stärker vertreten ist. Diese Bereiche liegen zum einen um die Dichte $1,33 \text{ g/cm}^3$ und zum anderen um $1,29 \text{ g/cm}^3$. Beim ersten Bereich handelt es sich um die Dichte, in der erfahrungsgemäß Pseudovirionen, das heißt DNA-haltige VLPs, akkumulieren (Unckell *et al.*, 1997). Indes ist $1,29 \text{ g/cm}^3$ die Dichte im Gradienten, bei der leere VLPs akkumulieren (Volpers *et al.*, 1994, Unckell *et al.*, 1997). Die Verteilung des L1-Proteins im CsCl-Gradient ist somit ein guter Marker für die Auftrennung von leeren VLPs und DNA-haltigen Pseudovirionen und somit für die Effizienz der DNA-Verpackung.

3.1 Charakterisierung *in vitro* hergestellter Pseudovirionen

3.1.1 Elektronenmikroskopie

Die Verteilung des L1-Proteins über den Gradienten gab einen ersten Hinweis auf eine erfolgreiche DNA-Verpackung durch das *In vitro*-System. Ungewiss war, in welcher Struktur das L1-Protein in den Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ bzw. $1,29 \text{ g/cm}^3$ vorlag. Ein Teil der Fraktionen wurde deshalb für elektronenmikroskopische Analysen verwendet.

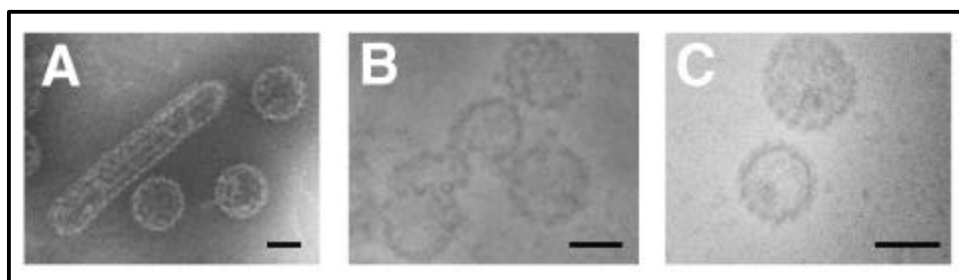


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme *in vitro* hergestellter HPV33 L1/L2-Pseudovirionen. Aus Insektenzellen gewonnene HPV33 L1/L2-VLPs (A) wurden dissoziiert und in Anwesenheit von Markerplasmid-DNA reassoziert. Die erhaltenen VLPs (B) und Pseudovirionen (C) wurden im CsCl-Gradient abgetrennt und im Elektronenmikroskop untersucht. Der schwarze Balken entspricht 50 nm.

Die Untersuchung der Fraktionen im Elektronenmikroskop zeigte, dass sich in beiden Bereichen ($1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$) Kapside befanden (Abbildung 7). Die Kapside sind

elektronenmikroskopisch nicht von Kapsiden zu unterscheiden, die in Zellkultur synthetisiert und nachfolgend nicht manipuliert wurden.

3.1.2 Grad der Kreuzvernetzung

Nachdem sichergestellt war, dass die Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ Kapside enthalten, sollten diese auf den Grad der Kreuzvernetzung untersucht werden. Es war bekannt, dass authentische Virionen sowie *in vivo* generierte Pseudovirionen gegenüber leeren VLPs einen deutlich höheren Grad (annähernd 100%) an Kreuzvernetzung aufweisen (Sapp *et al.*, 1998, Fligge *et al.*, 2001). Die Analyse der *in vitro* hergestellten Pseudovirionen bzw. VLPs sollte zeigen, ob sie dieses Charakteristikum auch aufweisen. Die Kapside aus dem Dichte-Bereich $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ wurden dazu auf nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und das L1-Protein im darauf folgenden Western-Blot nachgewiesen. In beiden Proben sind zwei Signale in Höhe von 55 kDa bzw. ca. 150 kDa zu sehen (Abbildung 8).

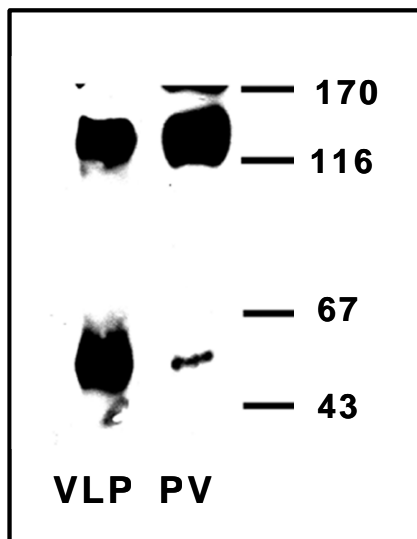


Abb. 8: *In vitro* gewonnene Pseudovirionen sind stärker kreuzvernetzt als VLPs. Aus Insektenzellen gewonnene HPV33 L1/L2-VLPs wurden dissoziiert und in Anwesenheit von Markerplasmid-DNA reassoziert. Die erhaltenen VLPs und Pseudovirionen (PV) wurden im CsCl-Gradient abgetrennt und der Anteil der durch Disulfidbrücken verbundenen L1-Proteine untersucht. Dazu wurden VLPs und Pseudovirionen unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und das L1-Protein mit dem mAk L1-7 im Western-Blot nachgewiesen (Fligge *et al.*, 2001). Die Zahlen geben das Molekulargewicht von Markerproteinen in Kilodalton wieder.

Die L1-Proteine, die mit einem Molekulargewicht von 55 kDa laufen, spiegeln die monomere Form dieses Proteins wider, während kreuzvernetzte L1-Proteine im hochmolekularen Bereich von ca. 150 kDa banden. Die Intensität dieser beiden Signale ist identisch, wenn Kapside verwendet werden, die bei einer Dichte von $1,29 \text{ g/cm}^3$ akkumulieren. Das L1-Protein verteilt sich demzufolge zu 50% auf die obere und untere Bande. Die untere Bande ist aber nur schwach ausgeprägt, wenn Kapside aus dem Bereich

1,32 g/cm³ eingesetzt wurden. Die obere Bande enthält bei diesen *in vitro* generierten Pseudovirionen etwa 90% des aufgetrennten L1-Proteins. Dieser Versuch belegt, dass *in vitro* hergestellte Pseudovirionen, nicht aber *in vitro* reassozierte VLPs fast vollständig kreuzvernetzt sind. Diese erstmals durchgeführte Untersuchung verdeutlicht die Vergleichbarkeit *in vitro* hergestellter Pseudovirionen mit *in vivo* generierten.

3.1.3 DNA-Gehalt

Eine weitere Frage war, ob die *in vitro* generierten Pseudovirionen DNA enthalten, die sie DNase I-resistent während einer Pseudoinfektion auf Zielzellen übertragen können. Dazu wurden die Fraktionen des Dichte-Bereichs 1,32 g/cm³ bzw. 1,29 g/cm³ dialysiert und mit hohen Konzentrationen an DNase I inkubiert. Durch diese Behandlung wurde

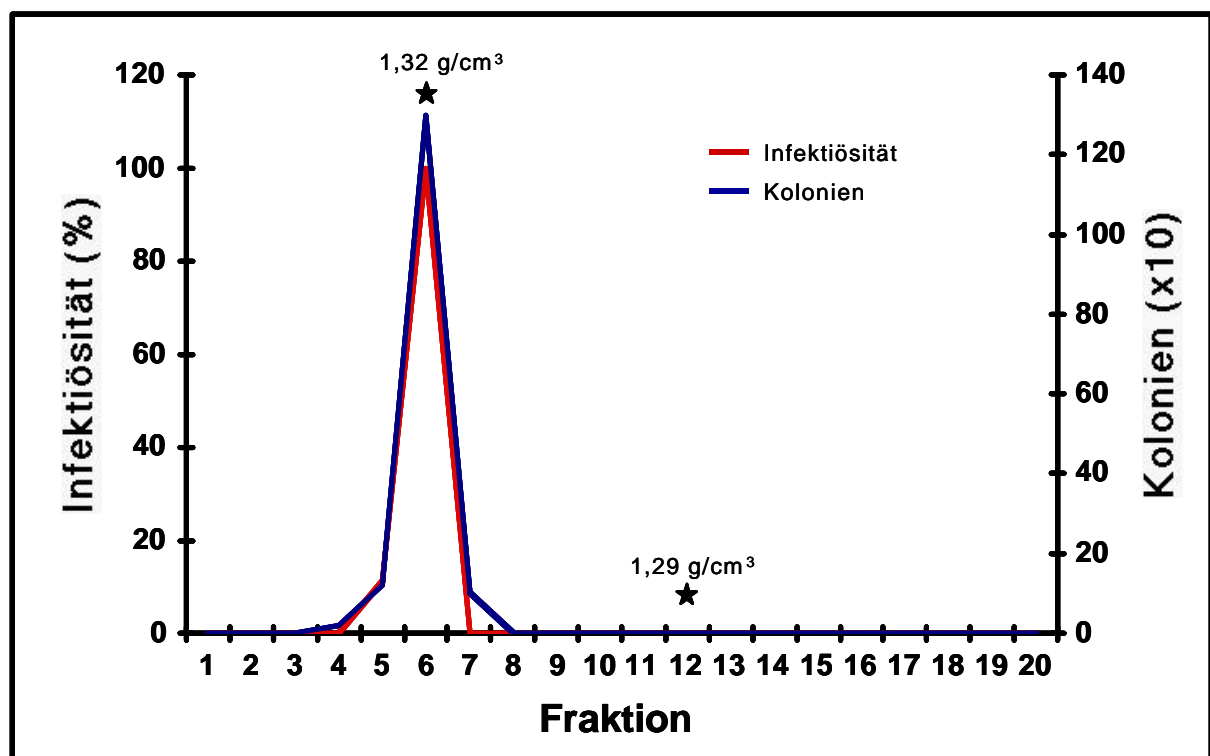


Abb. 9: *In vitro* hergestellte HPV33 L1/L2-Pseudovirionen enthalten DNA und sind infektiös. *In vitro* gewonnene Pseudovirionen wurden im CsCl-Gradienten von VLPs abgetrennt und die Fraktionen des Gradienten auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft. Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet.

möglicherweise an der Außenseite der Kapside unspezifisch haftende DNA degradiert. Die verpackte und somit geschützte DNA wurde aus den Kapsiden isoliert und durch Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht. Die daraus resultierenden Kolonien dienten als quantitativer Nachweis für die verpackte DNA. In der Abbildung 9 ist der DNA-Gehalt der getesteten Fraktionen dargestellt. Die Kapside in den Fraktionen um die Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ enthielten signifikante DNA-Mengen. Es handelte sich dementsprechend um DNA-haltige Kapside, d.h. Pseudovirionen. Die Fraktionen um die Dichte von $1,29 \text{ g/cm}^3$ enthielten nur sehr geringe Mengen an geschützter DNA. In diesen Fraktionen waren hauptsächlich VLPs vorhanden.

3.1.4 Infektionsstudie

Die *in vitro* gewonnenen Pseudovirionen zeigten in den vorangegangenen Analysen alle Charakteristika, die auch *in vivo* hergestellte Pseudovirionen aufweisen (Unckell *et al.*, 1997; Fligge *et al.*, 2001). Darüber hinaus musste noch überprüft werden, ob diese Pseudovirionen ihre verpackte DNA auch auf Zielzellen übertragen können. Hierzu wurde ein Teil der Fraktionen um die Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ über Nacht dialysiert, mit DNase I behandelt und mit adhärennten COS7-Zellen für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Bei einer erfolgreichen Infektion wird das Markerplasmid der Pseudovirionen auf die Zielzellen übertragen. Durch Expression des gfp-Gens sammelt sich das Markerprotein GFP-GFP-NLS im Kern, was diesen stark grün fluoreszieren lässt. Die Auswertung der Infektionsstudien mit dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass lediglich Kapside, die sich im Bereich $1,32 \text{ g/cm}^3$ aufhielten, infektiös waren (Abbildung 9), während die Fraktionen anderer Dichten keine Infektionen hervorrufen konnten.

3.1.5 Trypsinsensitivität

In vivo generierte Pseudovirionen sind gegenüber einer Inkubation mit Trypsin signifikant resistenter als VLPs. Vergleicht man die Zahl der Infektionsereignisse vor und nach der Trypsin-Inkubation, so ist die Zahl nach der Proteasebehandlung höher. Die erhöhte Resistenz beruht auf dem unterschiedlichen Grad der Kreuzvernetzung von Pseudovirionen

und VLPs (Fligge *et al.*, 2001). Die Kreuzvernetzung *in vitro* hergestellter Pseudovirionen zeigt keinen Unterschied zu der *in vivo* generierter Pseudovirionen (siehe oben). Es sollte nun getestet werden, ob die *in vitro* hergestellten Pseudovirionen im Vergleich zu VLPs eine erhöhte Trypsinresistenz aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden *in vitro* generierte Pseudovirionen für 2 und 4 Stunden mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Trypsin durch die Zugabe eines Trypsin-Inhibitors inhibiert und nachfolgend die Infektiösität der Pseudovirionen im Infektionstest untersucht. Die Auswertung der Infektionsansätze (Abbildung 10) belegt, dass die Inkubation der Pseudovirionen für 2 Stunden mit Trypsin die Infektiösität auf 230% erhöht. Eine Inkubation von 4 Stunden setzt hingegen die Infektiösität auf 40% herab. Dieses Ergebnis zeigt, dass *in vitro* generierte Pseudovirionen eine zeitlich bedingte Trypsinresistenz besitzen und sich ihre Infektiösität, wie bei *in vivo* hergestellten Pseudovirionen durch Protease-Inkubation sogar verstärkt.

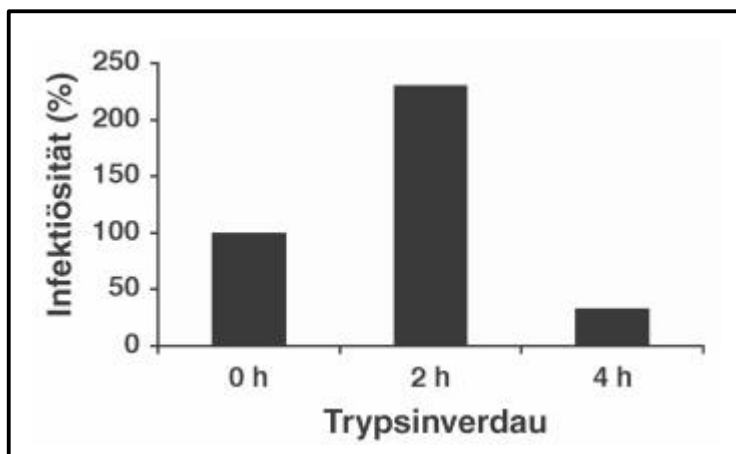


Abb. 10: *In vitro* hergestellte HPV33 L1/L2-Pseudovirionen weisen partiellen Proteaseschutz auf. *In vitro* generierte HPV33 L1/L2-Pseudovirionen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Trypsin, wie von Fligge und Mitarbeitern (2001) beschrieben, inkubiert und nach der Zugabe von Trypsininhibitor mit COS7-Zellen im Infektionsversuch eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden gezählt. Die Infektionsrate der unbehandelten Pseudovirionen wurde gleich 100% gesetzt.

Die oben aufgeführten Ergebnisse belegen eindeutig, dass es mir nicht nur gelungen ist, *in vitro* DNA in HPV33 wtL1/wtL2-VLPs zu verpacken, sondern vielmehr, Pseudovirionen herzustellen, die alle Merkmale *in vivo* generierter Pseudovirionen aufweisen. Somit konnte ich ein zellfreies DNA-Verpackungssystem für HPV33 etablieren, das infektiöse Pseudovirionen liefert.

3.2 *In vitro*-DNA-Verpackung in HPV33 wtL1-VLPs

Für die *In vitro*-DNA-Verpackungsstudien sollten in Insektenzellen synthetisierte VLPs verwendet werden. Aufgrund der Überlappung der DNA-Bindungsdomäne und des NLS

werden die HPV33 L1-Mutanten L1-1/492 und L1-1/477 nicht in den Kern transportiert. Die Folge ist, dass sich die mutierten L1-Proteine im Zytoplasma zu VLPs zusammenlagern. Koexprimiertes wtL2-Protein wird nicht in die Kapside eingebaut, da es in den Kern transportiert wird, wo der Kapsidaufbau natürlicher Weise stattfindet. Bevor die L1-Mutanten getestet werden konnten, musste deshalb untersucht werden, ob das majore Kapsidprotein L1 allein DNA verpacken kann, und ob die L2-freien Pseudovirionen infektiös sind.

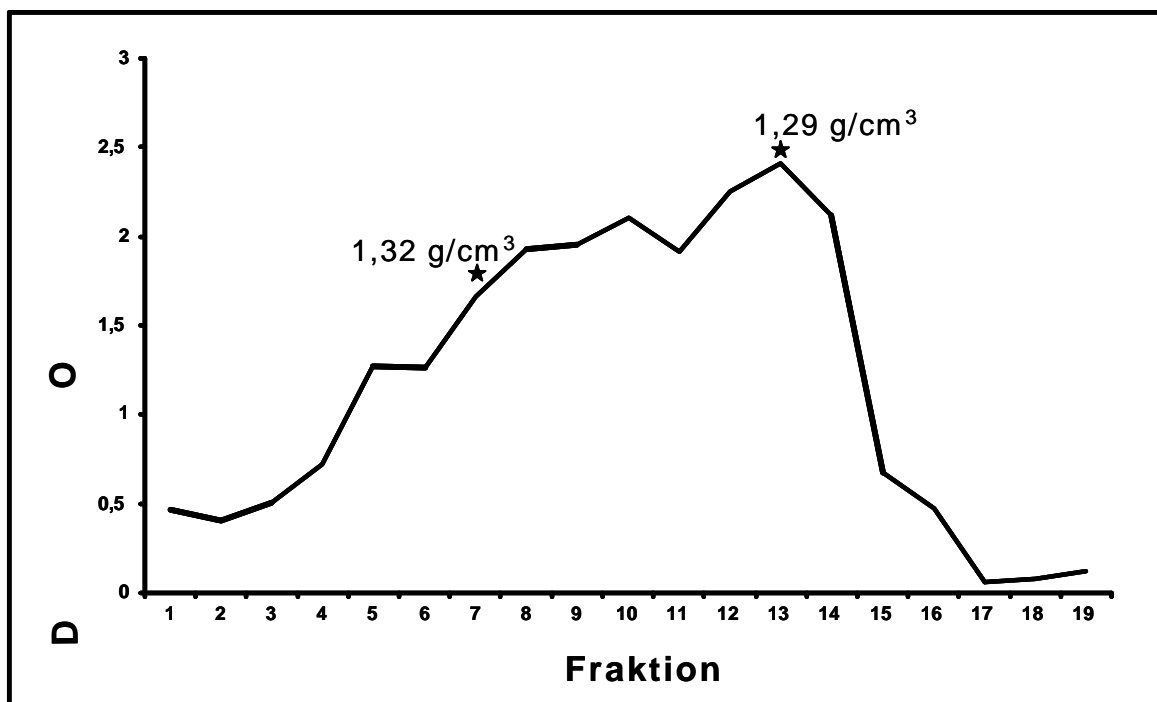


Abb. 11: Analyse des CsCl-Gradienten. *In vitro* hergestellte HPV33 L1-Pseudovirionen wurden im CsCl-Gradient von VLPs abgetrennt. Der Gradient wurde fraktioniert und im L1-ELISA analysiert. Von jeder Fraktion wurden 2 µl in Carbonatpuffer über Nacht an ELISA-Platten gekoppelt. Der L1-Nachweis erfolgte durch den monoklonalen Antikörper L1-7. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet.

Dieser Frage nachgehend wurden HPV33 wtL1-VLPs aus Insektenzellen isoliert und zu Kapsomeren dissoziiert. Nach Reassoziierung in Anwesenheit von Markerplasmid-DNA wurden die Produkte im CsCl-Gradienten aufgetrennt. In der Abbildung 11 ist die L1-Protein-Verteilung über die Fraktionen dargestellt. Der Gradient weist zwei Bereiche auf, in denen das L1-Protein besonders stark akkumuliert. Im vorderen Bereich mit der Dichte 1,32 g/cm³ akkumulieren Pseudovirionen, während im hinteren Abschnitt mit einer Dichte von 1,29 g/cm³ VLPs akkumulieren. Die Auftrennung ist im dichteren Bereich des Gradienten nicht so deutlich wie es der Fall bei L1/L2 Pseudovirionen war.

3.2.1 DNA-Nachweis

Die Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ sollten auf ihren DNA-Gehalt getestet werden. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen dialysiert und mit DNase I inkubiert. Anschließend wurde die DNA isoliert und in *E. coli*-Zellen eingebracht. Die resultierenden Kolonien wurden ausgezählt (Abbildung 12). Es stellte sich heraus, dass die Fraktionen mit

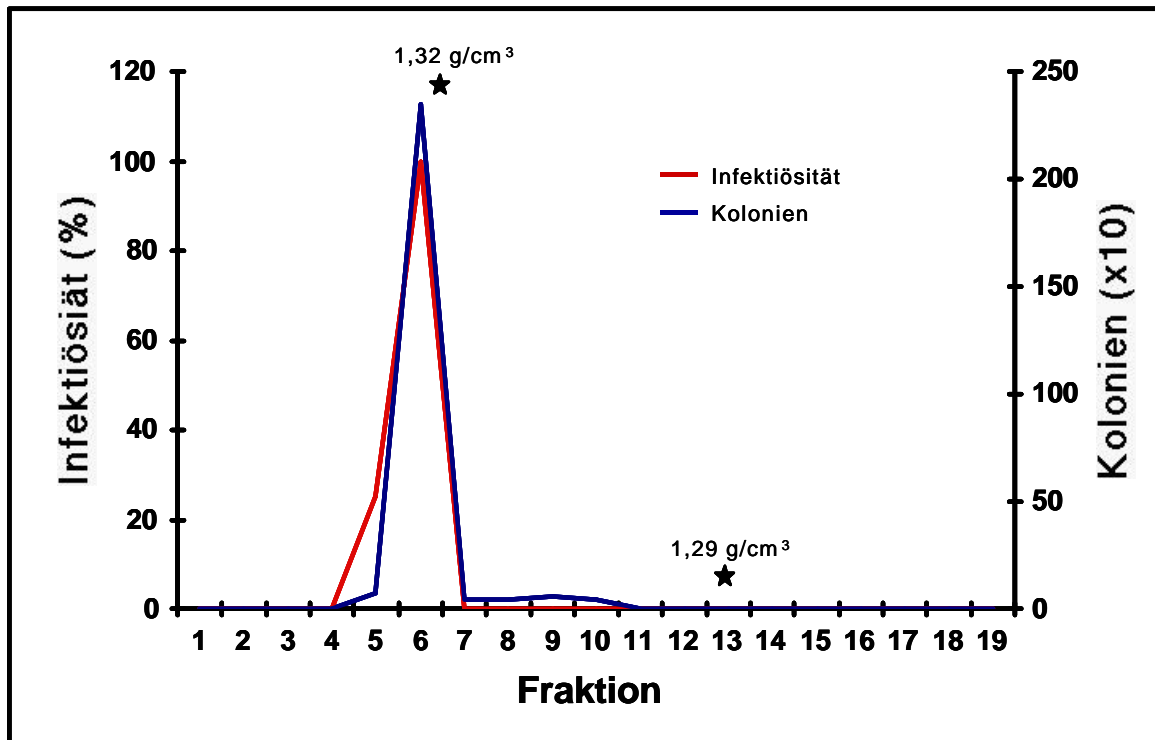


Abb. 12: *In vitro* hergestellte HPV33 L1-Pseudovirionen enthalten DNA und sind infektiös. *In vitro* gewonnene Pseudovirionen wurden im CsCl-Gradienten von VLPs abgetrennt und die Fraktionen des Gradienten auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft. Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ sind gekennzeichnet.

einer Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ DNase I geschützte DNA enthielten, während die Fraktionen geringerer Dichte ($1,29 \text{ g/cm}^3$) nur wenige Kolonien hervorbrachten. Bei der extrahierten DNA aus Kapsiden der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ handelte es sich um das eingesetzte Markerplasmid. Dies beweist die Möglichkeit der DNA-Verpackung in wtL1-VLPs.

3.2.2 Infektionsversuch

Es musste überprüft werden, ob wtL1-Pseudovirionen ihre DNA während einer Pseudoinfektion L2-unabhängig auf Zielzellen übertragen können. Dazu wurden wiederum DNA-haltige Fraktionen mit COS7-Zellen inkubiert und die Anzahl GFP-exprimierender Zellen mit dem Mikroskop bestimmt (Abbildung 12). Tatsächlich konnte ich grünfluoreszierende Zellen nachweisen. Dies zeigt, dass die DNA-haltigen Pseudovirionen ihre DNA ohne L2-Beteiligung auf COS7-Zellen übertragen können.

Dieser Versuchsansatz belegt, dass es möglich ist, Pseudovirionen *in vitro* zu generieren, die ausschließlich L1 als Strukturprotein enthalten. L2 ist demzufolge in diesem System nicht notwendig, um infektiöse Pseudovirionen zu erhalten. Dies unterstützt die Ergebnisse der South-Western-Blot-Analyse. In dieser konnte ich nachweisen, dass lediglich das L1-Protein von HPV33 DNA binden kann, nicht aber das L2-Protein. Diese Versuche zeigen weiter, dass das L2-Protein für die DNA-Verpackung entbehrlich ist.

Dieses System der *In vitro*-DNA-Verpackung bietet daher die ideale Voraussetzung, um L1-Mutanten zu untersuchen, die aufgrund einer carboxyterminalen Deletion nicht in den Kern transportiert werden und in South-Western-Blot-Analysen keine DNA binden können.

3.3 *In vitro*-DNA-Verpackung in mutierte HPV33 L1-Kapside

3.3.1 Charakterisierung der aus L1-Mutanten aufgebauten VLPs

3.3.1.1 Zellbindungsversuch

Für die folgenden Versuche musste im Vorfeld geklärt werden, ob VLPs, die aus L1-Mutanten mit carboxyterminalen Deletionen aufgebaut sind, an COS7-Zellen binden können. Sollte es nicht zu einer Bindung kommen, wäre der Nachweis von Pseudovirionen über die Infektion von COS7-Zellen nicht möglich.

Zu diesem Zweck wurden VLPs, die aus wtL1, L1-1/492 oder L1-1/477 bestanden, mit COS7-Zellen inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene VLPs durch mehrmaliges Waschen der Zellen entfernt und gebundenes L1-Protein im Western-Blot nachgewiesen. Neben wtL1-VLPs waren auch VLPs, bestehend aus L1-1/477 und L1-1/492, in der Lage, COS7-Zellen zu binden (Abbildung 13). Demnach ist der Carboxyterminus von L1 nicht

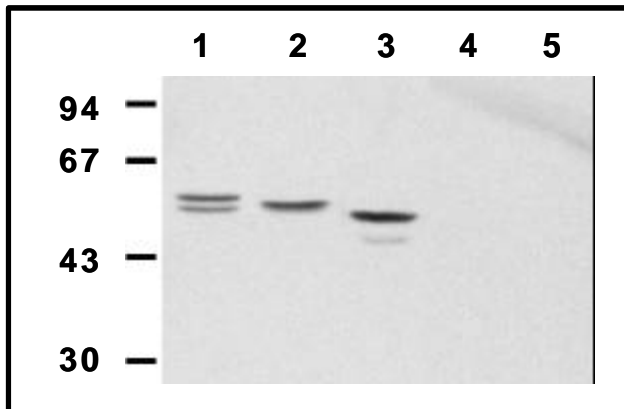


Abb. 13: Der C-Terminus des L1-Proteins ist für die Bindung von HPV33 L1-VLPs an COS7-Zellen nicht essentiell. HPV33 wtL1- sowie ein um 7 (L1-1/492) bzw. 22 AS (L1-1/477) C-terminalverkürztes L1-Protein wurden in Insektenzellen exprimiert und die entstandenen Kapside über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt. 30 ng der Kapside wurden mit adhärennten COS7-Zellen inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen und auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Gebundenes L1-Protein wurde im Western-Blot durch den mAk L1-7 nachgewiesen (Spur 1: wtL1-VLPs; Spur 2: L1-1/492-VLPs; Spur 3: L1-1/477-VLPs; Spur 4: COS7-Zellen; Spur 5: wtL1-VLPs ohne COS7-Zellen). Die Zahlen geben das Molekulargewicht der Markerproteine in Kilodalton wieder.

notwendig, um eine Bindung der VLPs an COS7-Zellen zu erhalten. Sollte es möglich sein, Pseudovirionen zu generieren, deren L1-Proteine Deletionen am Carboxyterminus tragen, so sollten diese Pseudovirionen an Zielzellen binden und ihre DNA übertragen können.

3.3.1.2 Immunisierungsstudie

Die Oberfläche von mutierten L1-VLPs sollte zusätzlich immunologisch untersucht werden. Dazu wurden Mäuse mit L1-1/477 VLPs und zur Kontrolle mit L1-21/499 VLPs immunisiert. Die Analyse der Seren sollte zeigen, ob die verwendeten VLPs die für die Induktion neutralisierender Antikörper notwendigen Epitope tragen, und somit die Infektiösität *in vivo* generierter wtL1/wtL2-Pseudovirionen im Infektionstest reduzieren können. Hierfür wurden die Pseudovirionen vor Infektion der COS7-Zellen für eine Stunde mit dem entsprechenden Antiserum inkubiert. In Abbildung 14 ist die auf der Zugabe von Antiseren beruhende Reduktion der Infektiösität dargestellt. Das Kontrollserum K53, das in Kaninchen durch Immunisierung mit HPV33 wtL1/wtL2-VLPs gewonnen wurde (Unckell *et al.*, 1997), neutralisiert die Pseudovirionen bei einer Verdünnung von 1:100 zu 98%. Bei einer Verdünnung von 1:1000 werden noch 89% der Pseudovirionen neutralisiert. Das Serum C22, das durch die Immunisierung mit L1-1/477 VLPs gewonnen wurde, senkt die Infektiösität sowohl bei einer Verdünnung von 1:100 als auch 1:1000 um 98%. Wurden für die Immunisierung VLPs verwendet, die aus dem L1-21/499 Protein aufgebaut waren, so wirkte das abgeleitete Serum N20 bei einer Verdünnung von 1:100 stark neutralisierend (Reduktion um 98%). Bei einer geringeren Antikörperkonzentration (Verdünnung von

1:1000) wirkte das Serum nicht mehr neutralisierend. Die Infektiösität lag wie bei der Kontrolle, ohne Zugabe von Antikörpern, bei 100%. Eine geringe Neutralisation durch das N20 Serum bei niedriger Konzentration, beruht wahrscheinlich auf dem im ELISA gemessenen niedrigen Endpunkttiter dieses Serums. Der Titer lag für das C22 Serum bei 1:1.280.000, während das N20 Serum nur einen Endpunkt von 1:320.000 erreichte.

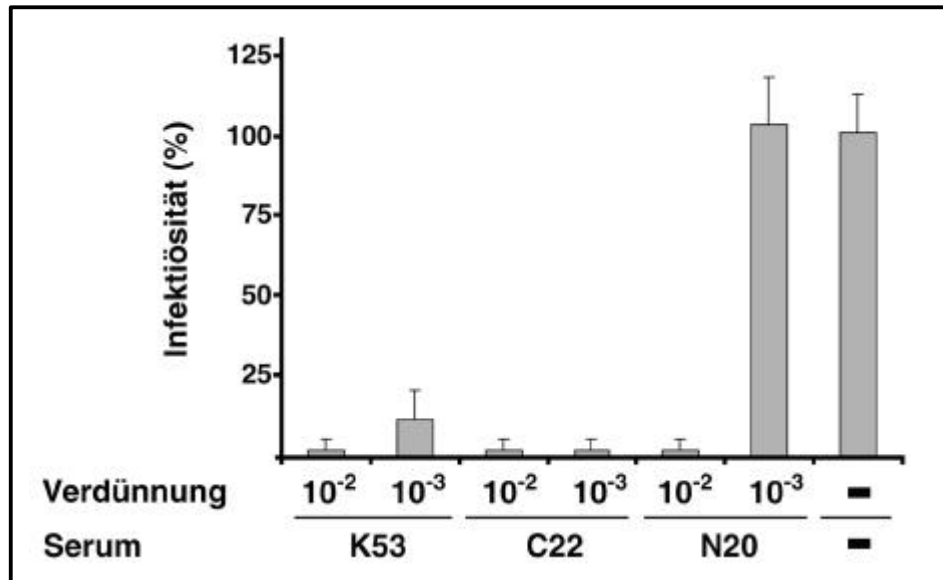


Abb. 14: HPV33 L1-Deletionsproteine induzieren neutralisierende Antikörper. Mäuse wurden mit L1-1/477- und L1-21/499-VLPs immunisiert. Die resultierenden Seren (C22 = L1-1/477 und N20 = L1-21/499) und ein neutralisierendes, polyklonales Kaninchenserum gegen HPV33 L1/L2-VLPs als Kontrollserum wurden in Verschiedenen Verdünnungen mit *in vivo* hergestellten HPV33 L1/L2-Pseudovirionen nach Unckell *et al.*, 1997 inkubiert und die Ansätze anschließend im Infektionsversuch analysiert. Die Infektionsrate unbehandelter Pseudovirionen wurde gleich 100% gesetzt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die aus L1-Mutanten aufgebauten VLPs das gleiche Potential wie wt-VLPs haben, neutralisierende Antikörper zu induzieren. Daraus lässt sich ableiten, dass die Deletionen am Carboxy- und Aminoterminus von L1 die Epitope, die für eine Induktion neutralisierender Antikörper notwendig sind, nicht zerstören. Die VLPs scheinen somit eine wt-ähnliche Oberfläche aufzuweisen. Dies unterstützt den Befund, dass die VLPs auch in Zellbindungsstudien keinen Unterschied zu wt-VLPs zeigen.

3.3.2 *In vitro*-DNA-Verpackung in L1-1/492- und L1-1/477-VLPs

Nachdem die vorangegangenen Analysen gezeigt haben, dass das wtL1-Protein für die DNA-Verpackung ausreicht und VLPs aus L1-Mutanten an COS7-Zellen binden, sollten nun L1-Mutanten in *In vitro*-DNA-Verpackungsstudien untersucht werden. Dafür wurden die L1-Mutanten verwendet, die in South-Western-Blot-Analysen keine DNA-Bindung aufwiesen. Nach Expression in Insektenzellen wurden die gewonnenen Kapside, dem Standardprotokoll für die *In vitro*-DNA-Verpackung folgend, dissoziiert und in Gegenwart von Markerplasmid-DNA reassoziert.

3.3.2.1 Mutante L1-1/492

Die Mutante L1-1/492 wurde nach Reassoziierung der Kapsomere zu Kapsiden und anschließender Dichtezentrifugation im ELISA auf ihre Verteilung im CsCl-Gradient untersucht. Die in Abbildung 15A gezeigte Verteilung des L1-Proteins, wies für die Mutante nur einen Bereich auf, in dem das L1-Protein stark vertreten war. Dieser Abschnitt lag bei einer Dichte von etwa $1,29 \text{ g/cm}^3$, dem Bereich, in dem VLPs akkumulieren. Diesem Gradienten zufolge kam es nicht oder nur zu einer sehr geringfügigen DNA-Verpackung. Die Fraktionen des Bereichs $1,32 \text{ g/cm}^3$ (Dichtebereich der Pseudovirionen) wurden für einen Infektionsversuch eingesetzt. Die Auswertung zeigt, dass kein Ansatz Zellen infizieren konnte (Abbildung 15B). Die verwendeten Fraktionen enthielten keine Pseudovirionen. Bestätigt wurde dieses Ergebnis auch durch den Versuch, in den verwendeten Fraktionen DNA nachzuweisen. Es war nicht möglich eine signifikante Menge an DNase I-resistenter Plasmid-DNA zu isolieren und mittels Transformation in *E. coli*-Zellen nachzuweisen (Abbildung 15B). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es *in vitro* nicht möglich ist, DNA mit Hilfe der Mutante L1-1/492 in Kapside zu verpacken.

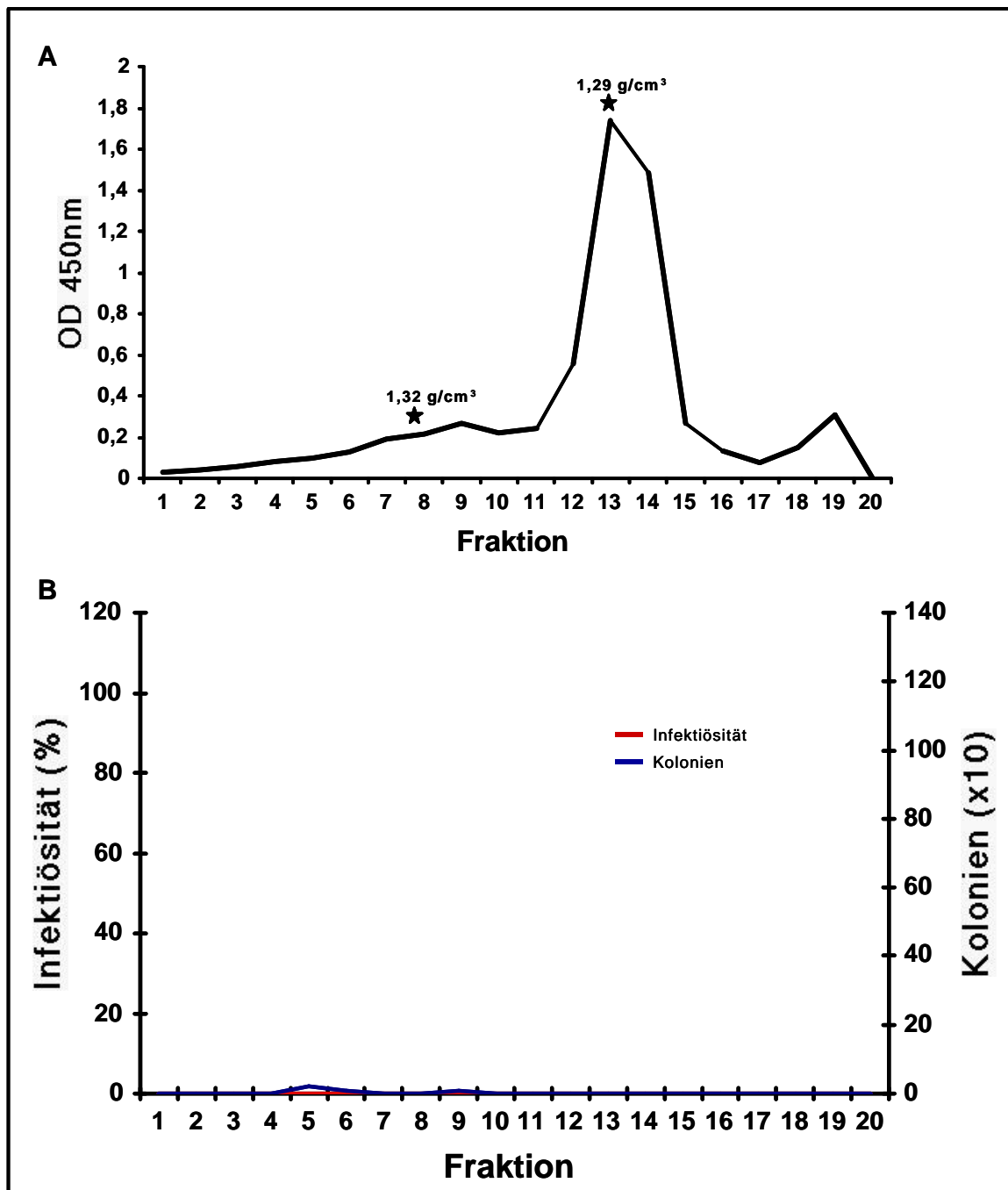


Abb. 15: *In vitro*-DNA-Verpackung in HPV33 L1-1/492-VLPs liefert keine Pseudovirionen. L1-1/492-VLPs wurden für die *In vitro*-DNA-Verpackung verwendet und die reassozierten Kapside im CsCl-Gradienten aufgetrennt. Der Gradient wurde fraktioniert und im L1-ELISA analysiert (A). Von jeder Fraktion wurden 2 μ l in Carbonatpuffer über Nacht an ELISA-Platten gekoppelt. Der L1-Nachweis erfolgte durch den monoklonalen Antikörper L1-7. Die Fraktionen des Gradienten wurden zusätzlich auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft (B). Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm^3 sind gekennzeichnet.

3.3.2.2 Mutante L1-1/477

Der Mutante L1-1/477 fehlen im Vergleich zur Mutante L1-1/492 noch weitere 15 AS am Carboxyterminus. Die ELISA-Analyse des sich an den *In vitro*-DNA-Verpackungsversuch anschließenden CsCl-Gradienten zeigt das in Abbildung 16A dargestellte Verteilungsmuster des L1-Proteins. Die Mutante L1-1/477 sedimentiert bevorzugt bei einer Dichte von 1,29 g/cm³, doch zeigt der Graph bei der Dichte 1,32 g/cm³, bei der Pseudovirionen akkumulieren, eine Schulter. Die Fraktionen dieser Dichte (1,32 g/cm³) wurden im Infektionsversuch analysiert. Überraschenderweise konnten mit diesen Fraktionen Infektionen erzielt werden (Abbildung 16B). Unerwartet ist dieser Befund deshalb, weil die Mutante L1-1/492 DNA nicht verpacken kann, und L1-1/477 eine größere C-terminale Deletion trägt.

Um eine Assoziation der DNA mit der VLP-Oberfläche auszuschließen, wurden wiederum die DNase-resistenten Plasmidmoleküle in den entsprechenden Fraktionen nachgewiesen. Die Elektroporation von *E. coli*-Zellen mit der isolierten DNA ergab eine Vielzahl an kanamycinresistenten Kolonien (Abbildung 16B). Dies beweist, dass die Infektionen auf Pseudovirionen zurückzuführen sind und nicht auf DNA, welche unspezifisch am Kapsid gebunden war.

Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu dem mit der Mutante L1-1/492 erhaltenen Befund zu stehen. Obwohl beiden Proteinen die DNA-Bindungsdomäne fehlt, konnte das L1-Protein L1-1/492 keine DNA verpacken, während das noch weiter verkürzte Protein L1-1/477 dazu in der Lage ist. Der Grund für diese Diskrepanz könnte die Instabilität von L1-1/492 sein. Während sich L1-1/477 gut präparieren ließ, waren Ausbeute und Stabilität der Mutante L1-1/492 wesentlich herabgesetzt (Daten nicht gezeigt).

Es konnte hiermit erstmals gezeigt werden, dass der Carboxyterminus des HPV33 L1-Proteins für eine unspezifische DNA-Verpackung *in vitro* nicht notwendig ist.

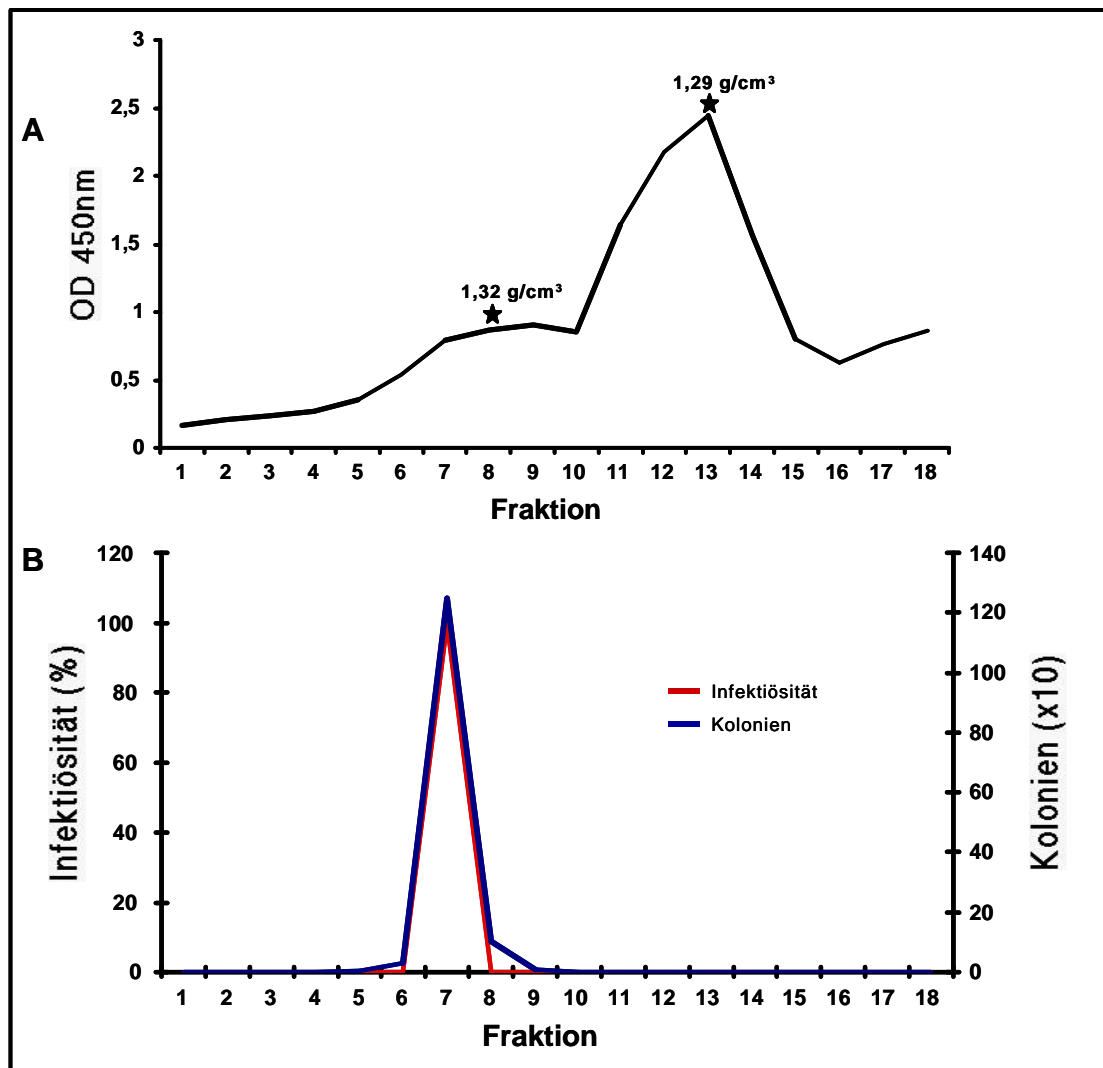


Abb. 16: *In vitro*-DNA-Verpackung in HPV33 L1-1/477-VLPs liefert infektiöse Pseudovirionen. L1-1/477-VLPs wurden für die *In vitro*-DNA-Verpackung verwendet und die reassozierten Kapside im CsCl-Gradienten aufgetrennt. Der Gradient wurde fraktioniert und im L1-ELISA analysiert (A). Von jeder Fraktion wurden 2 μ l in Carbonatpuffer über Nacht an ELISA-Platten gekoppelt. Der L1-Nachweis erfolgte durch den monoklonalen Antikörper L1-7. Die Fraktionen des Gradienten wurden zusätzlich auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft (B). Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet.

4. *In vivo* Pseudovirionen

In vitro war es gelungen, Pseudovirionen aus der Mutante L1-1/477 zu generieren, die aufgrund einer C-terminalen Deletion nicht fähig ist, DNA zu binden. Für die *In vitro*-Situation schien es deshalb irrelevant, ob Pseudovirionen aus wtL1 oder einer Mutante

aufgebaut sind, der carboxyterminal 22 AS fehlen. Beide Ansätze lieferten infektiöse Pseudovirionen.

Es war deshalb von besonderem Interesse zu prüfen, ob es *in vivo* möglich ist, Pseudovirionen zu erhalten, denen der Carboxyterminus des L1-Proteins fehlt. Da sich das Kernlokalisationsignal am Carboxyterminus des L1-Proteins befindet, führt eine Deletion dieses Bereiches zwangsläufig zu einer Retention des L1-Proteins im Zytoplasma. In diesem Kompartiment der Zelle kommt es durchaus zu einem geordneten Kapsidzusammenbau, doch kann hier aufgrund der räumlichen Trennung keine DNA-Verpackung erfolgen. Es musste deshalb eine Möglichkeit geschaffen werden, das L1-Protein mittels einer Signalsequenz in den Kern zu dirigieren. Diese Signalsequenz sollte der eigenen fremd sein und keine DNA-Bindungseigenschaften aufweisen. Da es sich bei den klassischen Kernlokalisationsignalen immer um kurze, stark positiv geladene AS-Sequenzen handelt, war es z.B. nicht möglich die Kernlokalisationssequenz des SV40-Virus zu benutzen. Die Strategie war deshalb, ein möglichst neutral geladenes Kernlokalisationsignal an das carboxyterminal-verkürzte L1-Protein anzufügen. Die Wahl fiel auf das Kernlokalisationsignal des humanen heteronukleären Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1), dessen Sequenz vor wenigen Jahren aufgeklärt wurde. Dieses NLS umfasst 38, vorwiegend ungeladene AS, deren Funktionsfähigkeit in einem heterologen Kontext in der Literatur dokumentiert ist (Subramanian *et al.*, 1999).

4.1 Die Mutante L1-1/477M9

Zuerst wurde das Kernlokalisationsignal des hnRNP A1-Proteins (auch M9 genannt) mittels RT-PCR und Gesamt-Zell-RNA der humanen Zelllinie 293 amplifiziert. Anschließend wurde die Sequenz in einen Baculotransfervektor kloniert. Dieser Vektor war so vorbereitet, dass die M9-Sequenz 3' an das verkürzte L1-Gen angefügt wurde und ein durchgängiger Leserahmen entstand (Vektor pVL1392-L1-1/477M9). Die Herstellung und Amplifikation rekombinanter Baculoviren (Baculovirus bac33L1-1/477M9) erfolgte nach dem Standardprotokoll.

4.1.1 Charakterisierung der Mutante L1-1/477M9

Die Expression der Mutante L1-1/477M9 in Sf9-Zellen wurde mittels eines L1-spezifischen Western-Blots überprüft. Wie in Abbildung 17A zu sehen, wurde die Mutante gut exprimiert und weist ein Laufverhalten entsprechend seiner errechneten Größe von ca. 56,7 kDa auf. Nach der erfolgreichen Klonierung und Expression musste noch überprüft werden, ob die heterologe Kernlokalisationssequenz die Mutante in den Kern leiten kann. Dazu wurden High Five-Zellen mit dem rekombinanten Baculovirus bac33-L1-1/477M9 infiziert und das L1-Protein nach zwei Tagen spezifisch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. In

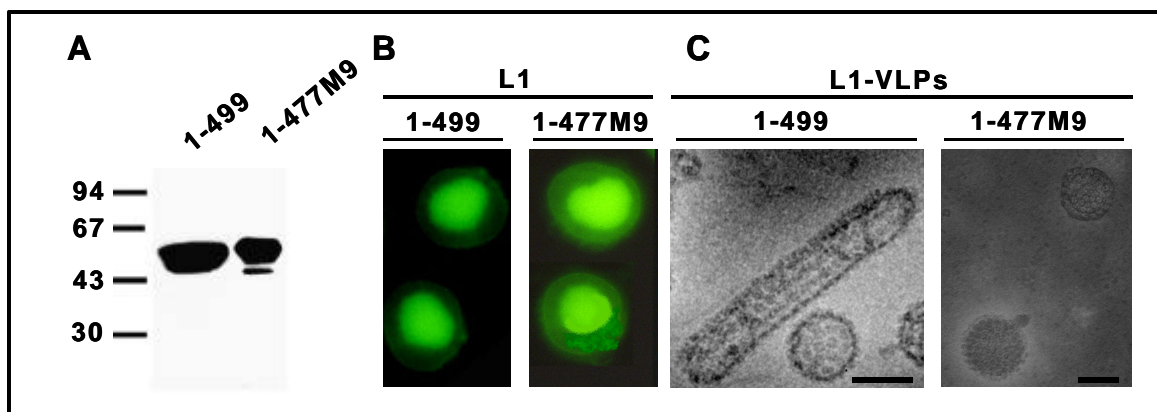


Abb. 17: Analyse der Mutante HPV33 L1-1/477M9. Die Mutante und wtL1-Protein (1-499) wurden in Insektenzellen exprimiert und mit dem mAk L1-7 im Western-Blot (A) und der Immunfluoreszenz (B) nachgewiesen. Wt- und 1/477M9-VLPs wurden zusätzlich im Elektronenmikroskop untersucht (C). Der schwarze Balken entspricht 50 nm. Die Zahlen geben das Molekulargewicht von Markerproteinen in Kilodalton wieder.

Abbildung 17B ist gezeigt, dass sich das L1-1/477M9-Protein überwiegend im Kern befindet. Das Zytoplasma weist eine leichte Fluoreszenz auf. Somit wird die Mutante in den Kern transportiert. Der Kerntransport ist nicht so effizient wie der des wtL1-Proteins, welches ausschließlich im Kern nachzuweisen ist (Abbildung 17B). Dies stellte aber kein Problem dar, weil der geplante *In vivo*-DNA-Verpackungsansatz keine 100%ige Kernlokalisierung des L1-Proteins erforderte. Die Mutante war aber in der Lage VLPs aufzubauen (Abbildung 17C). Bevor die Mutante im *In vivo*-Experiment eingesetzt werden konnte, musste noch geklärt werden, 1.) ob die Mutante zusammen mit wtL2-Protein Kapside bilden kann, und 2.) ob die Mutante L1-1/477M9 trotz der carboxyterminalen Substitution keine DNA binden kann. Für diese Fragestellungen wurden nach der Koexpression von wtL2 und der Mutante L1-1/477M9 in Sf9-Zellen die partiell aufgereinigten Kapside (Abbildung 18A, Fraktion 11) in einem linearen Sucrosegradienten aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient fraktioniert, und die Fraktionen wurden einer

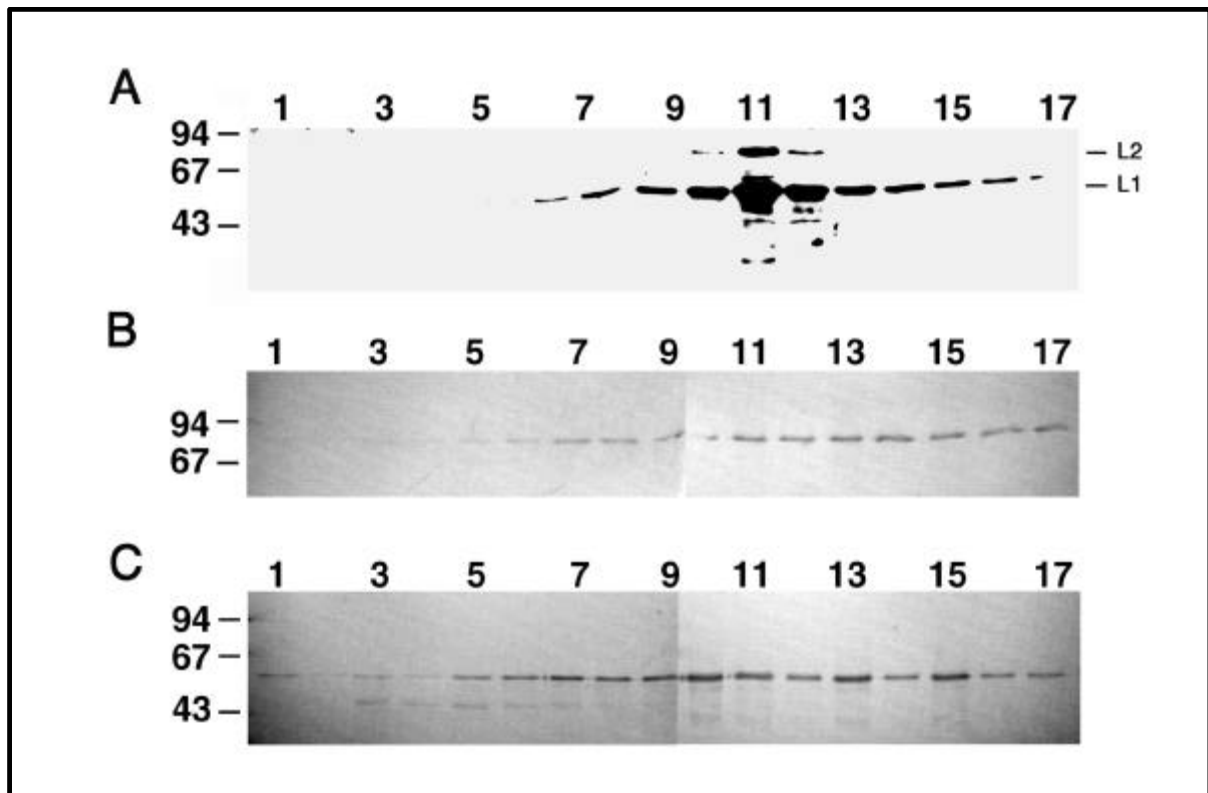


Abb. 18: Die Mutante HPV33 L1-1/477M9 bildet L2-haltige VLPs. Die Koexpression von L2 und L1-1/477M9 in Sf9-Zellen resultiert in VLPs. Diese wurden isoliert und in einem CsCl-Gradienten aufgereinigt. Der Gradient wurde vom Boden beginnend fraktioniert. 4 μ l jeder Fraktion wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und das L1- und L2-Protein mit den mAk L1-7, L2-1 und L2-2 im Western-Blot nachgewiesen (A). Die Fraktion 11 entsprach einer Dichte von 1,29 g/cm³. 120 μ l der Fraktion 11 (A) wurden auf einen linearen Saccharose-Gradienten (40-20%) geladen (Volpers *et al.*, 1994). Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient von oben fraktioniert. Die Proben wurden einer TCA-Fällung unterzogen, und das präzipitierte Protein in Laemmli-Puffer aufgenommen. 1/4 jeder Probe wurde für den L1-Nachweis (C) und 3/4 jeder Probe für den L2-Nachweis (B) auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit den mAk L1-7 (C) oder L2-1 (B) im Western-Blot nachgewiesen. Die Zahlen 1-17 geben die Fraktionsnummern an. Die Zahlen an der linken Seite geben das Molekulargewicht der Markerproteine in Kilodalton wieder.

TCA-Fällung unterzogen. Die gefällten Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der nachfolgende Transfer und die Detektion von L1-1/477M9 und wtL2 mittels L1- und L2-spezifischer Antikörper im Western-Blot zeigte (Abbildung 18B L2-Nachweis und 18C L1-Nachweis), dass sich der Hauptanteil des L1-Proteins in der Mitte des Gradienten befand und auch L2 in diesen Fraktionen nachzuweisen war. Es ist somit deutlich, dass wtL2-Protein in das Kapsid eingebaut wird, wenn es mit der Mutante L1-1/477M9 koexprimiert wird. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, konnte mittels South-Western-Blot-Analyse für die Mutante L1-1/477M9 keine DNA-Bindung nachgewiesen werden.

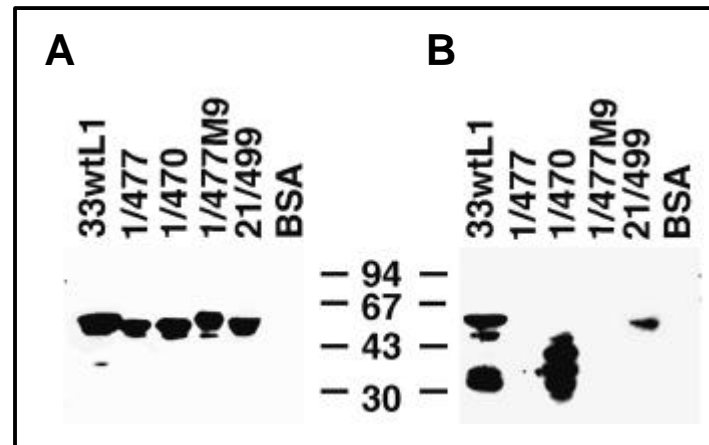


Abb. 19: South-Western-Blot-Analyse zum Nachweis DNA-bindender Domänen von HPV33 Kapsidproteinen. Western-Blot Analyse der eingesetzten Proteine (A). South-Western-Blot Analyse (B). HPV33 wtL1-Kapsidprotein sowie die carboxyterminal verkürzten bzw. substituierten L1-Proteine 1/470 und 1/477M9 wurden mit dem Vaccinia-Virus-Expressionssystem in COS7-Zellen synthetisiert. Die Deletionsmutanten 1/477 und 21/499 wurden in Insektenzellen exprimiert. Die Proteine wurden über CsCl-Dichtezentrifugation aufgereinigt, auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden blockiert, renaturiert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Gebundene DNA wurde über PhosphorImaging nachgewiesen (B). Die Membranen wurden anschließend mit dem mAk L1-7 inkubiert und die Proteine im Western-Blot nachgewiesen (A). BSA diente als Negativkontrolle. Die Zahlen in der Mitte geben das Molekulargewicht von Markerproteinen in Kilodalton wieder.

4.1.2 Expression von L1-1/477M9 im Vacciniasystem

Die Expression der Mutante L1-1/477M9 in COS7-Zellen erforderte die Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren. Dazu wurde der Leserahmen der Mutante L1-1/477M9 in einen Vacciniatransfervektor kloniert (pTM1-L1-1/477M9) und das entsprechende rekombinante Vaccinia-Virus (vac33L1-1/477M9) isoliert. Die rekombinanten Vaccinia-Viren für wtL1 und wtL2 waren bereits im Labor vorhanden (Unckell *et al.*, 1997). Das Helfervirus VTF7-3 wurde von B. Moss (Moss *et al.*, 1990) zur Verfügung gestellt. Die Expression der Mutante L1-1/477M9 in einer Osteosarcomzelllinie (HuTk⁻) zeigte, dass sich das L1-Protein vornehmlich im Zellkern befand (Abbildung 20). Bei einer Koexpression mit wtL2 war die Verteilung der Mutante L1-1/477M9 nicht von der des wtL1-Proteins zu unterscheiden (Abbildung 20). Diese Ergebnisse spiegeln die wt-Situation wider und waren eine gute Voraussetzung für die *In vivo*-Analyse der Mutante.

4.2 Die Mutante L1-1/470

Die Mutante L1-1/470 zeichnet sich durch eine carboxyterminale Deletion von 29 AS aus und kann deshalb nicht eigenständig in den Kern transportiert werden. Wird diese Mutante hingegen zusammen mit wtL2 exprimiert, findet der Kerntransport des mutierten L1-Proteins statt. Offensichtlich kann das L2-Protein L1-1/470 in den Zellkern befördern. Die Verteilung der Mutante im Zellkern zeigt, dass sie sich bei Koexpression mit wtL2 wie das wtL1-Protein in spezifischen Kernstrukturen befindet (Abbildung 20). Im Zellkern kommt es dann zu einer Kapsidzusammenlagerung der Mutante, bei der das wtL2-Protein in das Kapsid miteingebaut wird (L. Florin).

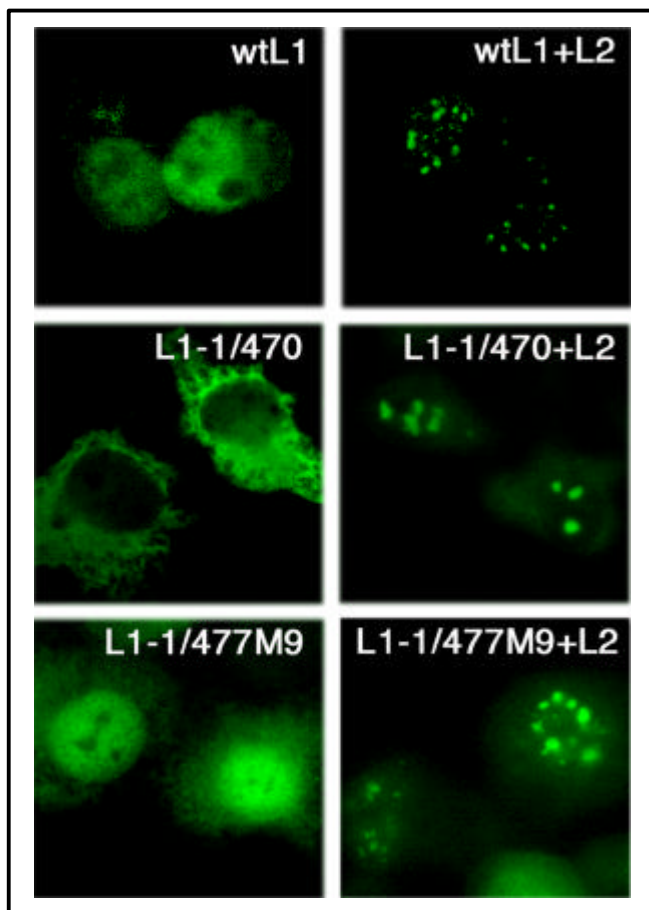


Abb. 20: Zelluläre Lokalisation verschiedener HPV33 L1-Proteine. HPV33 L1 wt-Protein, sowie eine C-terminale Deletions- (L1-1/470) und Substitutionsmutante (L1-1/477M9) wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren allein oder zusammen mit L2 in HuTk-Zellen exprimiert. In der Immunfluoreszenzanalyse wurde das L1-Protein mit dem mAk L1-7 nachgewiesen.

Für die *In vivo*-Herstellung von wtL1/wtL2-, L1-1/477M9/wtL2- und L1-1/470/wtL2-Pseudovirionen wurden COS7-Zellen mit einem Markerplasmid, welches das *gfp*-Gen trägt, transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit den entsprechenden L1- und L2-rekombinanten Vaccinia-Viren und dem Helfervirus infiziert. Etwa 72 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen aufgeschossen und die Kapside aus den Kernen isoliert. Die Aufreinigung der Kapside erfolgte im CsCl-Dichtegradienten, der anschließend fraktioniert wurde. Die Analyse der Fraktionen umfasste einen L1-spezifischen ELISA, Infektionsstudien sowie die Extraktion der DNA aus den verschiedenen Fraktionen.

4.3 *In vivo*-DNA-Verpackung

4.3.1 Die wt-Situation

Das System der *In vivo*-DNA-Verpackung wurde von mir zuerst mit wtL1- und wtL2-Protein durchgeführt, um es auf meine Fragestellung reproduzierbar abzustimmen. Erst danach sollten die Mutanten L1-1/477M9 und L1-1/470 ausgetestet werden. Es wurden *gfp*-prätransfizierte COS7-Zellen mit wtL1- und wtL2-Vaccinia-Viren infiziert. Die aus den Kernen isolierten wtL1/L2-Kapside wurden durch eine CsCl-Zentrifugation in VLPs und Pseudovirionen aufgetrennt. Die charakteristische Verteilung des L1-Proteins über den Gradienten ist in Abbildung 21A dargestellt. Es ist deutlich eine Anreicherung des L1-Proteins in zwei Bereichen zu erkennen. Diese Bereiche umfassen die Dichten $1,29 \text{ g/cm}^3$ bzw. $1,32 \text{ g/cm}^3$, in denen sich VLPs bzw. Pseudovirionen aufhalten. Diese zwei Dichtebereiche des Gradienten wurden in Infektionsstudien untersucht. Es erwiesen sich nur die Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ als infektiös (Abbildung 21B).

Anschließend sollte der DNA-Gehalt der Fraktionen bestimmt werden. 1997 zeigten Unckell und Mitarbeiter erstmals, dass *in vivo* generierte HPV33 wtL1/wtL2-Pseudovirionen DNA enthalten und infektiös sind. Damals wurde der DNA-Nachweis mittels semiquantitativer PCR geführt. Mein Ziel war es, diesen Nachweis zu verbessern, um die Zahl der Infektionen pro Fraktion mit dem DNA-Gehalt der Fraktionen korrelieren zu können. Dazu musste die DNA-Menge quantitativ bestimmt werden. Die DNA wurde aus den entsprechenden Fraktionen des Gradienten isoliert und im Anschluss durch Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht. Die transformierten Zellen wurden auf selektionierenden Platten ausgestrichen und die Koloniezahl bestimmt. Wie in Abbildung 21B zu erkennen, korreliert der DNA-Gehalt der Fraktionen mit ihrer Infektiosität: Fraktionen in denen Pseudovirionen detektiert werden konnten, brachten zahlreiche Kolonien nach Transformation der *E. coli* Zellen hervor. Sie enthielten somit viele verpackte DNA-Moleküle. Waren Fraktionen nicht oder nur geringfügig infektiös, wurde eine dramatisch geringere Zahl an Kolonien gezählt, die als Hintergrundsignal bewertet werden kann. Die verpackte DNA wurde analysiert und erwies sich weitgehend als das eingesetzte, intakte Markerplasmid (Abbildung 21C).

Die wtL1/wtL2-Pseudovirionen weisen alle Charakteristika auf, wie sie von Unckell und Mitarbeitern beschrieben wurden. Zusätzlich ist es mir gelungen, den DNA-Nachweis, hinsichtlich meiner Fragestellung zu optimieren.

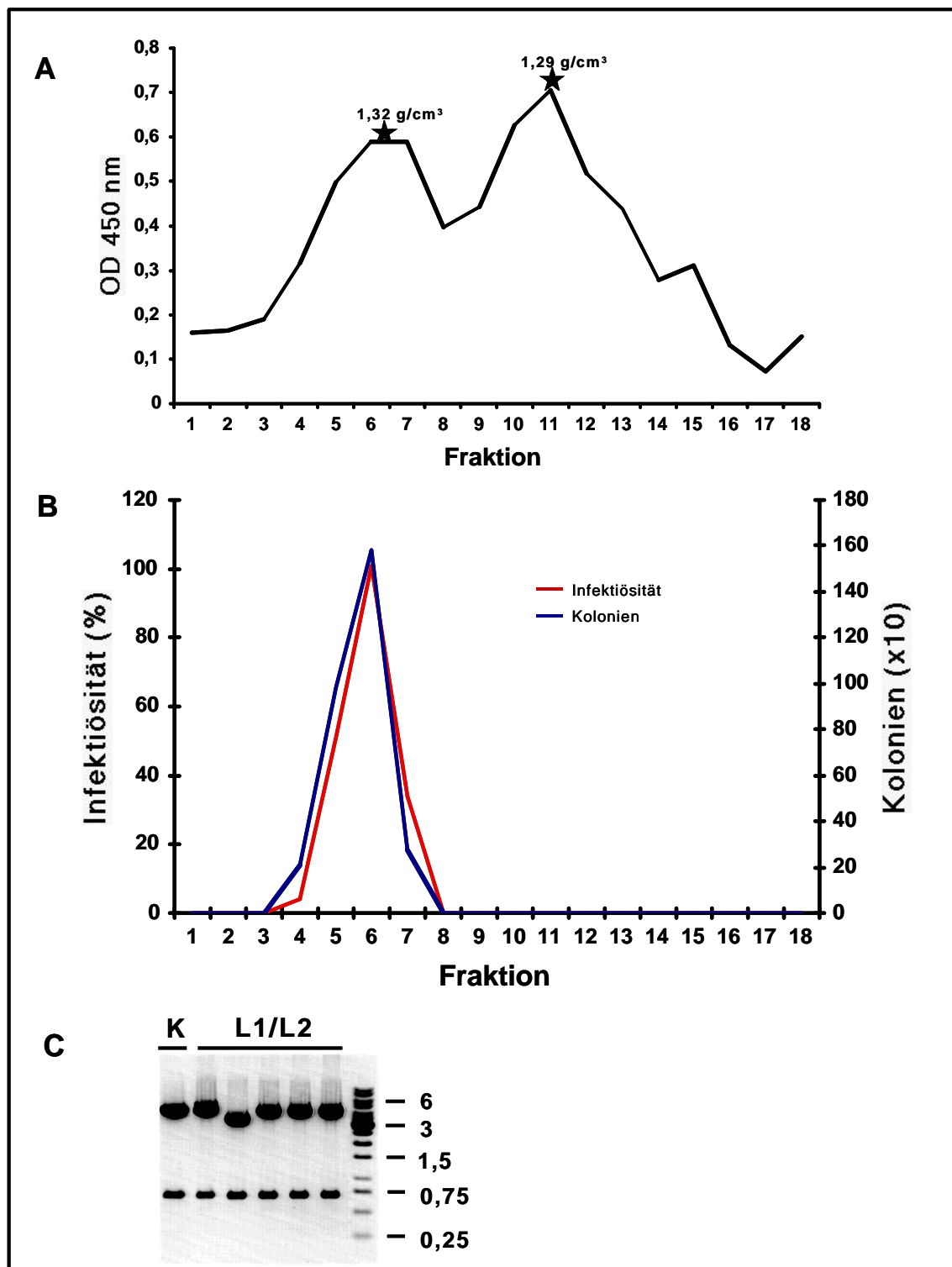


Abb. 21: HPV33 L1/L2-Pseudovirionen. In prätransfizierten COS7-Zellen wurden die wt Kapsidproteine L1 und L2 mittels rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Die Kapside wurden aus den infizierten Zellen isoliert und über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt. Der Gradient wurde fraktioniert und das L1-Protein mit dem mAk L1-7 im ELISA nachgewiesen (A). Die Fraktionen des Gradienten wurden zusätzlich auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft (B). Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet. Von den erhaltenen Kolonien wurden nach dem Zufallsprinzip einige Kolonien ausgewählt und amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde aus den individuellen Kolonien isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (C). Als Kontrolle (K) diente das Ausgangsplasmid, das ebenfalls mit den Restriktionsenzymen behandelt wurde. Die Größe der Marker-DNA-Fragmente ist in kb angegeben.

4.3.2 Die Mutante L1-1/470

Dem Standardprotokoll für die *In vivo*-Herstellung von Pseudovirionen folgend sollte nun die Mutante L1-1/470 zusammen mit wtL2 getestet werden. Nach Expression der Proteine in *gfp*-prätransfizierten COS7-Zellen wurden die entstandenen VLPs und Pseudovirionen durch eine CsCl-Dichtezentrifugation voneinander abgetrennt. Die L1-Verteilung über den CsCl-Dichtegradienten stellte sich wie in Abbildung 22A gezeigt dar. Das L1-1/470-Protein sedimentierte nicht in zwei klar definierten Bereichen wie es beim wtL1-Protein zu beobachten ist, sondern verteilte sich im Bereich höherer Dichte eher diffus und zeigt bei der Dichte $1,29 \text{ g/cm}^3$ eine verstärkte Akkumulation. Die Expression der Kapsidproteine hat folglich zu einem Aufbau von VLPs geführt. Es war jedoch nicht deutlich, ob sich auch Pseudovirionen in den Fraktionen um die Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ befinden. Dieser Frage wurde nachgegangen, indem die entsprechenden Fraktionen in einem Infektionsversuch untersucht wurden. Das Ergebnis zeigt, dass die Fraktionen nicht infektiös waren und somit keine Pseudovirionen enthielten (Abbildung 22B). Es war indessen nicht auszuschließen, dass sich Pseudovirionen in den entsprechenden Fraktionen befanden, sie aber aufgrund der L1-Mutante nicht mehr an die Zielzellen binden können und somit eine nachweisbare Infektion ausbleibt. Um dies zu klären, wurden VLPs in einem Zellbindungsversuch untersucht. Dazu wurden einerseits COS7-Zellen verwendet, die die Zielzellen im Infektionsversuch darstellen und andererseits humane Keratinozyten, die natürlichen Zielzellen von HPV. Nach 90-minütiger Inkubation der Zellen mit den VLPs wurden diese gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen und die L1-Protein-Bindung mittels Western-Blot untersucht. Wie Abbildung 23 zeigt, konnte deutlich gemacht werden, dass VLPs der entsprechenden Dichte konzentrationsabhängig an COS7-Zellen und humane Keratinozyten binden können. Dies unterstreicht zugleich den Befund, dass die Mutante L1-1/470 zusammen mit wtL2 *in vivo* keine DNA verpacken kann und in den Fraktionen der Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ keine infektiösen Pseudovirionen enthalten sind. Eine letzte Analyse sollte diese Erkenntnis zusätzlich bestätigen. In dieser Studie wurden die Fraktionen der Dichte um $1,32 \text{ g/cm}^3$ mit DNase I inkubiert und die geschützte DNA isoliert. Die anschließende Transformation von *E. coli*-Zellen mit der extrahierten DNA resultierte in nur geringen Koloniezahlen (Abbildung 22B). Die Anzahl war so gering, dass sie aus der Erfahrung mit wtL1/wtL2-Gradienten als Hintergrundsignal anzusehen ist. Die isolierte DNA wies Deletionen auf, was darauf schließen lässt, dass es sich um nicht vollständig in Pseudovirionen verpackte DNA handelt (Abbildung 22C). Hiermit ist eindeutig gezeigt, dass

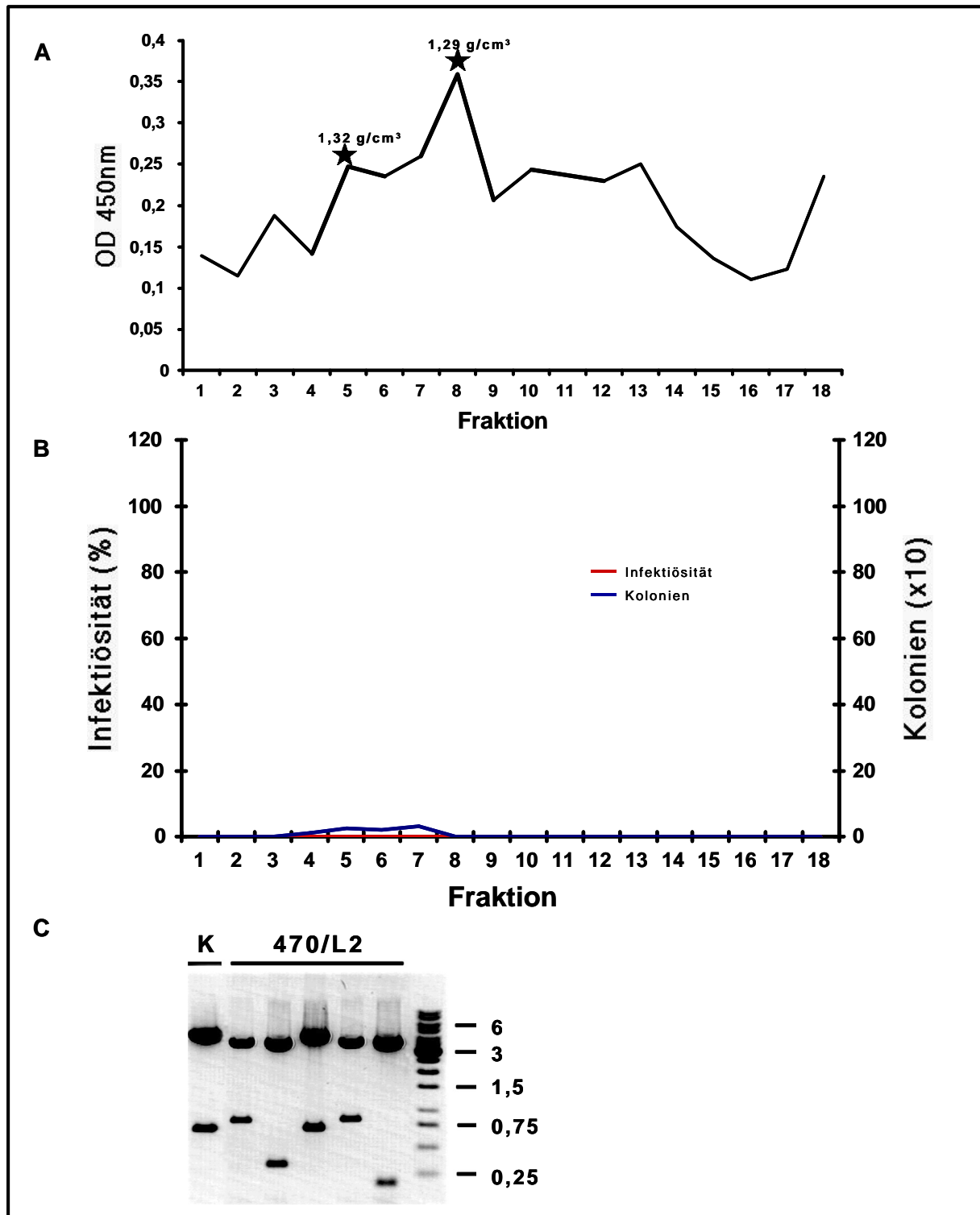


Abb. 22: In vivo-DNA-Verpackung in HPV33 L1-1/470/L2-VLPs. In prätransfizierten COS7-Zellen wurden die Kapsidproteine L1-1/470 und L2 mittels rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Die Kapside wurden aus den infizierten Zellen isoliert und über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt. Der Gradient wurde fraktioniert und das L1-Protein mit dem mAk L1-7 im ELISA nachgewiesen (A). Die Fraktionen des Gradienten wurden zusätzlich auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft (B). Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet. Von den erhaltenen Kolonien wurden nach dem Zufallsprinzip einige Kolonien ausgewählt und amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde aus den individuellen Kolonien isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (C). Als Kontrolle (K) diente das Ausgangsplasmid, das ebenfalls mit den Restriktionsenzymen behandelt wurde. Die Größe der Marker-DNA-Fragmente ist in kb angegeben.

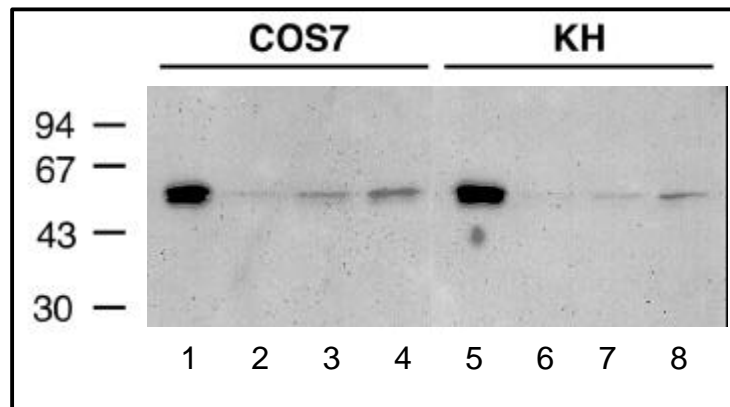


Abb. 23: C-terminale Deletion des L1-Proteins beeinflusst nicht die Zellbindung von VLPs. L1-1/470+L2-VLPs wurden in verschiedenen Konzentrationen (30 ng: Spuren 2 und 6; 60 ng: Spuren 3 und 7; 120 ng: Spuren 4 und 8) mit adhärennten COS7-Zellen und humanen Keratinozyten (KH) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen und auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Gebundene VLPs wurden mit dem mAk L1-7 im Western-Blot nachgewiesen. 120 ng der VLPs wurden zur Kontrolle direkt auf das SDS-PAA-Gel aufgetragen (Spuren 1 und 5). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in Kilodalton angegeben.

die Mutante L1-1/470 trotz Kotransport durch wtL2 und entsprechender Lokalisation im Zellkern, dem natürlichen Ort des DNA-Einschlusses in das virale Kapsid, keine DNA verpacken kann.

4.3.3 Die Mutante L1-1/477M9

Aufgrund der Ergebnisse, die mit der Mutante L1-1/470 erhalten wurden, musste davon ausgegangen werden, dass für die DNA-Verpackung *in vivo* ein intakter Carboxyterminus des L1-Proteins essentiell ist. Es war aber nicht auszuschließen, dass der Kotransport von L1-1/470 durch L2 die Ursache für die fehlende DNA-Verpackung ist.

Dieser L1-Transport ist in einem natürlichen System so nicht zu beobachten. Aus diesem Grund wurde die Mutante L1-1/477M9 im *In vivo*-Verpackungsversuch getestet. Dazu wurden wie bei den vorangegangenen Versuchen die L1-Mutante und wtL2 mit Hilfe des Vaccinia-Expressionssystems in *gfp*-prätransfizierten Zellen exprimiert und die VLPs bzw. Pseudovirionen aus den Zellkernen isoliert. Nach der Auftrennung im CsCl-Dichtegradienten wurde die Verteilung des L1-Proteins über den Gradienten im L1-spezifischen ELISA untersucht. Wie in Abbildung 24A dargestellt, gibt es einen Bereich im Gradienten, in dem das L1-Protein akkumuliert. Die Fraktionen mit einem hohen L1-Gehalt liegen ausschließlich in dem Bereich, in dem VLPs akkumulieren. Um die Dichte von 1,32

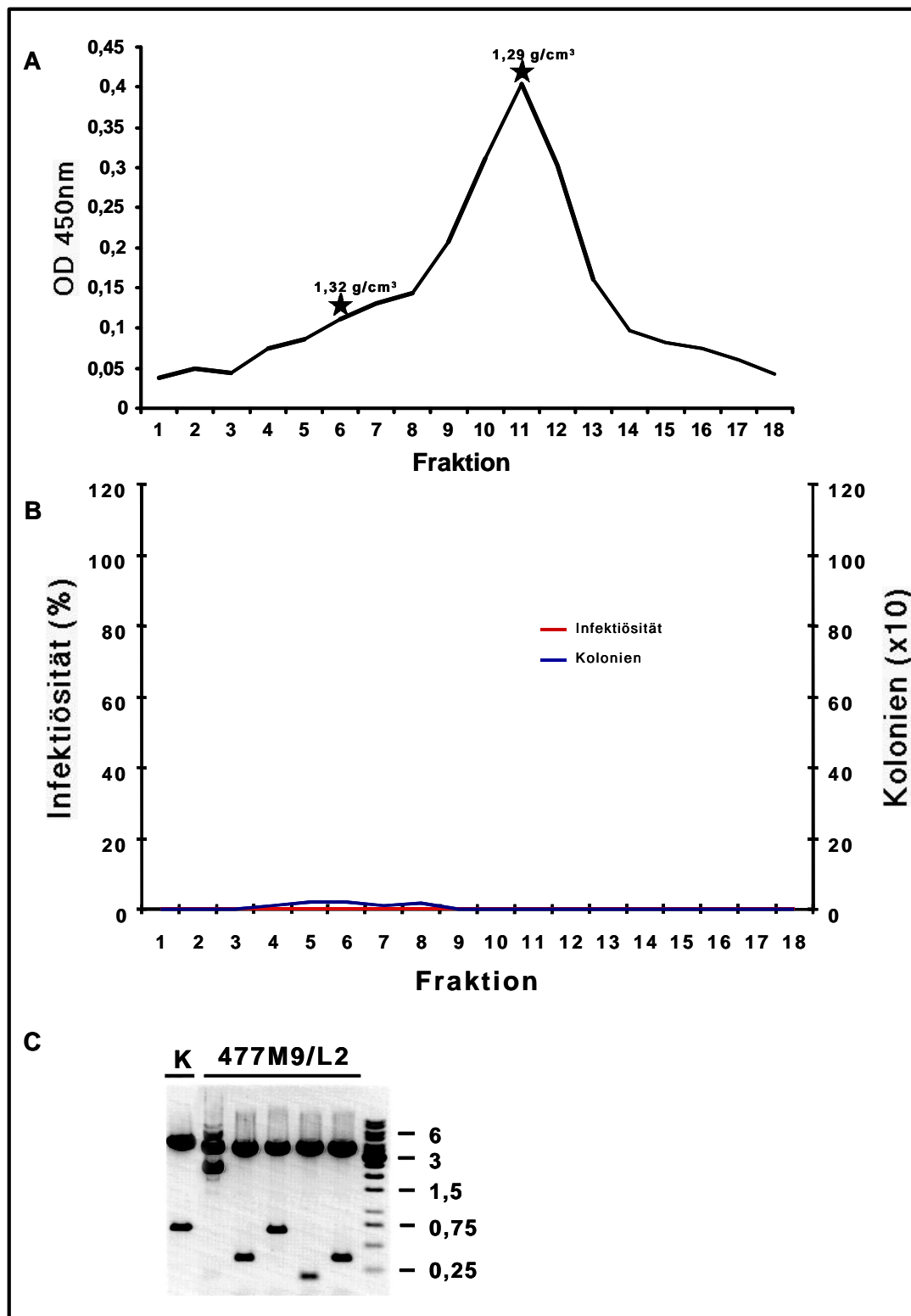


Abb. 24: *In vivo*-DNA-Verpackung in HPV33 L1-1/477M9/L2-VLPs. In prätransfizierten COS7-Zellen wurden die Kapsidproteine L1-1/477M9 und L2 mittels rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Die Kapside wurden aus den infizierten Zellen isoliert und über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt. Der Gradient wurde fraktioniert und das L1-Protein mit dem mAk L1-7 im ELISA nachgewiesen (A). Die Fraktionen des Gradienten wurden zusätzlich auf DNA-Gehalt und Infektiösität geprüft (B). Dazu wurden Aliquots der Fraktionen DNase I behandelt, geteilt und anschließend entweder mit COS7-Zellen inkubiert oder aus ihnen die DNase I-resistente DNA isoliert. Die isolierte DNA wurde durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht, die Zellen auf selektionierenden Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ausgezählt (blaue Linie). Infizierte COS7-Zellen wurden ebenfalls ausgezählt (rote Linie). Die maximale Infektionsrate wurde gleich 100% gesetzt. Die Fraktionen der Dichte 1,32 und 1,29 g/cm³ sind gekennzeichnet. Von den erhaltenen Kolonien wurden nach dem Zufallsprinzip einige Kolonien ausgewählt und amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde aus den individuellen Kolonien isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt (C). Als Kontrolle (K) diente das Ausgangsplasmid, das ebenfalls mit den Restriktionsenzymen behandelt wurde. Die Größe der Marker-DNA-Fragmente ist in kb angegeben.

g/cm^3 ist keine Anreicherung des L1-Proteins zu erkennen. Dieser erste Befund ließ wie bei der Mutante L1-1/470 die Vermutung aufkommen, dass keine Pseudovirionen gebildet wurden. Dieser Vermutung wurde in dem sich anschließenden Infektionsversuch nachgegangen. Dabei wurden COS7-Zellen mit den Fraktionen der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ inkubiert und die infizierten Zellen gezählt. Das Ergebnis bestätigte die Vermutung. Es konnten keine infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 24B). Fraglich war noch der DNA-Gehalt der verwendeten Fraktionen, und ob die Kapside, die aus dem L1-1/477M9- und wtL2-Protein aufgebaut sind, an die Zielzellen binden können. Die Bestimmung DNase-resistenter DNA-Moleküle ergab ebenfalls eine sehr geringe Menge, die im Bereich des Versuchshintergrundes lag (Abbildung 24B). Es gab keine Fraktion, in der der DNA-Gehalt als signifikant hätte beschrieben werden können. Wie schon für die Mutante L1-1/470 berichtet, unterschied sich die isolierte DNA von der eingesetzten Plasmid-DNA durch zahlreiche Deletionen (Abbildung 24C). Es ist festzuhalten, dass die Fraktionen um die Dichte von $1,32 \text{ g/cm}^3$ keine DNA-haltigen VLPs, d.h. Pseudovirionen, enthielten. Der Zellbindungsversuch (Abbildung 25) beweist, dass VLPs dieser Mutante sehr

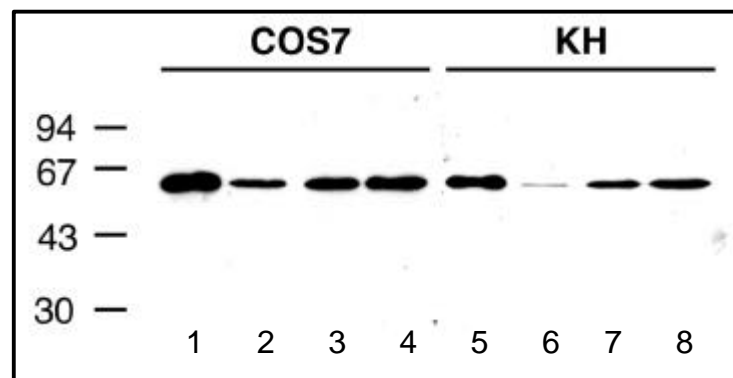


Abb. 25: C-terminale Substitution des L1-Proteins verhindert nicht die Zellbindung von VLPs. L1-1/477M9+L2-VLPs wurden in verschiedenen Konzentrationen (30 ng: Spuren 2 und 6; 60 ng: Spuren 3 und 7; 120 ng: Spuren 4 und 8) mit adhärennten COS7-Zellen und humanen Keratinozyten (KH) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen und auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt. Gebundene VLPs wurden mit dem mAk L1-7 im Western-Blot nachgewiesen. 120 ng der VLPs wurden zur Kontrolle direkt auf das SDS-PAA-Gel aufgetragen (Spuren 1 und 5). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist in Kilodalton angegeben.

wohl an COS7-Zellen binden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L1-1/477M9/wtL2-VLPs konzentrationsabhängig an humane Keratinozyten, die Zielzellen natürlicher HPV-Virionen, binden können. Dies verdeutlicht abermals, dass es *in vivo* nicht möglich ist, mit der Mutante L1-1/477M9 und wtL2-Protein infektiöse Pseudovirionen zu synthetisieren. Dem wtL1-Protein ist durch die Substitution am Carboxyterminus, wodurch

das eigene Kernlokalisierungssignal gegen das des hnRNP A1-Proteins ausgetauscht wurde, die DNA-Bindungseigenschaft verloren gegangen und somit auch die Fähigkeit, *in vivo* DNA zu verpacken.

5. *In vitro* und *in vivo* hergestellte Pseudovirionen: ein Vergleich der Infektiösität

In den Kapiteln *In vitro*- und *In vivo*-DNA-Verpackung habe ich den DNA-Gehalt und die Infektiösität *in vitro* und *in vivo* hergestellter wtL1/wtL2-Pseudovirionen dargestellt. Die Tabelle 2 zeigt die Korrelation der Koloniezahl und der Infektionsereignisse der untersuchten Pseudovirionen. Es ist klar zu erkennen, dass die Quotienten aus Koloniezahl und Anzahl infizierter Zellen bei *in vitro* hergestellten Pseudovirionen um ein Vielfaches höher sind. Damit wird deutlich, dass *in vivo* generierte Pseudovirionen ihre DNA effizienter im Infektionsversuch auf Zielzellen übertragen können. Dieser Vergleich der Infektiösität *in vivo* und *in vitro* gewonnener Pseudovirionen zeigt erstmalig, dass *in vivo* gewonnene Pseudovirionen bis zu fünffach infektiöser sind als *in vitro* generierte. Da beide Typen von

Tabelle 2: Infektiösität von Pseudovirionen

Experiment Nr.	Zahl der Kolonien ^a	Zahl infizierter Zellen ^b	Quotient ^c
<i>in vivo</i> 1	14873	190	78
2	18529	211	87
<i>in vitro</i> 1	6810	20	340
2	8884	23	386

^a Zahl der Kolonien, die durch Elektroporation von *E. coli*-Zellen mit aus Pseudovirionen isolierter DNA erhalten wurde, wurde für die Elektroporationseffizienz korrigiert; ^b Infektiösität wurde wie in Material und Methoden erwähnt unter Verwendung von COS7-Zellen bestimmt; ^c Quotient aus Zahl der Kolonien und Zahl infizierter Zellen

Pseudovirionen biochemisch und strukturell vergleichbar sind (siehe Kapitel *In vitro* Pseudovirionen), liegt der Unterschied wahrscheinlich darin begründet, dass die *in vivo* hergestellten Pseudovirionen DNA in Form von Chromatin enthalten, während die *in vitro* erzeugten Pseudovirionen gereinigte DNA eingeschlossen haben.

IV. Diskussion

Im Rahmen meiner Dissertation konnte ich zeigen, dass der Carboxyterminus des majoren Kapsidproteins L1 für die Morphogenese des humanen Papillomvirus Typ 33 essentiell ist. Diese Aminosäuresequenz kann mit DNA interagieren und ist *in vivo* für die DNA-Verpackung in das virale Kapsid verantwortlich. Deletions- und Substitutionsmutanten des L1-Proteins verloren nicht nur ihre Fähigkeit, mit DNA zu interagieren, sondern auch, diese zu verpacken. Die Größe der verpackten DNA unterliegt bei HPV33 offensichtlich nur einer Größenbeschränkung im hochmolekularen Bereich von ca. 8kb, was gleichzeitig die Größe des viralen Genoms widerspiegelt. Wie ich in *In vitro*-Verpackungsstudien zeigen konnte, benötigt der DNA-Einschluss in das virale Kapsid keine zellulären Faktoren. Die erhaltenen DNA-haltigen VLPs, d.h. Pseudovirionen, sind morphologisch und biochemisch von *in vivo* generierten Pseudovirionen nicht zu unterscheiden. Eine große Diskrepanz zeigte sich aber beim Vergleich der Infektiosität von *in vivo* und *in vitro* hergestellten Pseudovirionen: *In vivo* synthetisierte Pseudovirionen sind bis zu fünfmal infektiöser als *in vitro* hergestellte Pseudovirionen.

1. Die DNA-Bindungseigenschaft des HPV L1-Proteins

Das L1-Protein der humanen Papillomviren ist strukturell gut charakterisiert. Es umfasst ca. 500 AS und trägt am Carboxyterminus ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Diese AS-Sequenz stellt eine Abfolge positiv geladener Aminosäuren dar (Zhou *et al.*, 1991). Das NLS des HPV L1-Proteins wird wie das des T-Antigens von SV40 zu den klassischen NLS gezählt (Dingwall and Laskey, 1991). Aufgrund der Ladungsverhältnisse in diesem Bereich (AS-Abfolge bei HPV33 L1 –KRKKVKK) erscheint eine DNA-Bindung an das NLS der HPV L1-Proteine nicht unwahrscheinlich. Ich konnte zeigen, dass die L1-Proteine der HPV-Typen 16, 18 und 33 mit DNA interagieren können. Meine Beobachtung wird von anderen Arbeitsgruppen geteilt. Li und Mitarbeiter beschrieben 1997 die DNA-Bindung des L1-Proteins von HPV11. Weiterhin gibt es eine Publikation, in der eine DNA-Bindung für das HPV16 L1-Protein erwähnt wird (Touzé *et al.*, 2000). Beiden Veröffentlichungen ist gemeinsam, dass sie, wie ich für HPV33, den Carboxyterminus und somit die Kernlokalisationssequenz des L1-Proteins als eine DNA-bindende Sequenz identifiziert

haben. In South-Western-Blot-Analysen habe ich die DNA-Bindung für das HPV33 L1-Protein auf die letzten sieben AS kartiert. Weiterführend habe ich geprüft, ob diese AS-Abfolge einem anderen Protein DNA-bindende Eigenschaften verleihen kann. Dazu habe ich ein GFP-Dimer verwendet, dem diese Sequenz carboxyterminal angefügt wurde. Für das GFP-Dimer konnte ich keine DNA-Bindung nachweisen. Im Fall von HPV16 ist es allerdings Combita und Kollegen (2000) gelungen, einem nicht DNA-bindenden Protein durch die Fusion mit dem DNA-bindenden Motiv des HPV16 L1-Proteins eine DNA-Bindungseigenschaft zu verleihen. Es wurden dazu die neun carboxyterminalen AS an das Kapsidprotein VP60 fusioniert. Das Kapsidprotein, welches ursprünglich nicht in der Lage war, DNA zu verpacken, erhielt durch die angefügten AS nicht nur die Fähigkeit DNA zu binden, sondern auch zu verpacken. Der Grund für die fehlende DNA-Bindung meines GFP-Dimers kann darin liegen, dass die Deletion von sieben AS zwar ausreicht, um das DNA-bindende Motiv von HPV33 L1 zu zerstören, aber weitere AS benötigt werden, um einem fremden Protein DNA-bindende Eigenschaften zu verleihen. So könnten z.B. wie bei HPV16 L1 9 C-terminale AS benötigt werden, oder im HPV33 L1-Protein aufgrund der dreidimensionalen Proteinfaltung auch entferntere AS an der DNA-Bindung beteiligt sein. Dem widersprechen jedoch die Daten, die ich mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchenserums erhalten habe. Das verwendete Serum wurde durch Immunisierung mit einem synthetischen Peptid gewonnen, das die letzten 15 AS des HPV33 L1-Proteins umfasst. Durch die Verwendung dieses Serums konnte ich die DNA-Bindung des L1-Proteins vollständig unterdrücken. Dieses Ergebnis spricht eindeutig gegen eine Beteiligung von AS, die in der Primärstruktur weiter entfernt sind. Vielmehr spricht es dafür, dass die DNA-bindenden AS am Carboxyterminus geschlossen angeordnet sind. Die fehlende DNA-Bindung kann aber auch in der Struktur des GFP-Proteins begründet sein. So bildet das Protein eine geschlossene β -Faltblatt-Tonnenstruktur. Der Carboxyterminus faltet sich zurück und ca. die letzten 7 AS sind außerhalb der geschlossenen Struktur (Ormö *et al.*, 1996). Die angefügten und stark geladenen AS könnten zum einen den Carboxyterminus im Inneren der Struktur zurückhalten oder zum anderen außerhalb der Struktur mit einem Bereich derart interagieren, dass eine DNA-Bindung unterbunden wird. Weiterhin ist bekannt, dass das GFP-Protein am Carboxyterminus Proteaseschnittstellen enthält, welche von Carboxypeptidasen und unspezifischen Proteasen wie Proteinase K erkannt werden (Prasher *et al.*, 1992). Dieser Abbau führt beim wt-Protein zu diversen Spaltprodukten. Auf diesem Hintergrund kann die Überlegung angestellt werden, ob der Carboxyterminus und

somit die Kernlokalisationssequenz des HPV33 L1-Proteins während der Versuchsdurchführung abgespalten wurde und deshalb die DNA-Bindung ausblieb.

Die von mir beobachtete DNA-Bindung an das majore Kapsidprotein ist auf DNA-Ebene sequenzunabhängig. Sowohl ein DNA-Fragment, das den Replikationsursprung von HPV33 trägt, als auch ein Plasmid-DNA-Fragment, das keine HPV-Sequenzen trägt, führten zu einer gleich starken DNA-Bindung an das L1-Protein. Literaturberichte, in denen die sequenzspezifische DNA-Bindung an die L1-Proteine der HPV-Typen 11 und 16 beschrieben wurden, bestätigen diese Beobachtungen (Li *et al.*, 1997; El Mehdaoui *et al.*, 2000).

2. Die DNA-Bindungseigenschaft des HPV L2-Proteins

Das L2-Protein hat am Amino- und Carboxyterminus einen Bereich positiv geladener Aminosäuren und ist annähernd so groß wie das L1-Protein. Das NLS ist nicht eindeutig identifiziert. Es wurde von Sun und Mitarbeitern (Sun *et al.*, 1995) für den HPV Typ 6b auf einen C- und N-terminalen Bereich des Proteins festgelegt. Es gibt aber Hinweise, dass diese Aussage für das L2-Protein von HPV33 nicht haltbar ist (L. Florin). Eine mögliche DNA-Bindung an das HPV L2-Protein wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Das HPV16 L2-Protein wurde 1994 als DNA-bindendes Protein beschrieben und der interagierende Bereich auf den Aminoterminus kartiert (Zhou *et al.*, 1994). Diese Daten werden von El Mehdaoui und Kollegen gestützt, die im Jahr 2000 die entsprechende Sequenz untersuchten. Sie fanden, dass der Aminoterminus einem nicht DNA-bindenden Protein DNA-Bindungseigenschaft verleiht. Andererseits wurde bereits 1997 berichtet, dass das L2-Protein von HPV11 keine DNA-Bindungseigenschaft aufweist. Diese Gruppe konnte auch keine DNA-Bindung an das HPV16 L2-Protein feststellen (Li *et al.*, 1997). Meine Daten bekräftigen diese Ergebnisse, da ich für das HPV33 L2-Protein ebenfalls keine DNA-Bindung beobachten konnte. Festzuhalten ist, dass die DNA-Bindungsdomäne des HPV16 L2-Proteins in einem heterologen Kontext wie dem erwähnten Fusionsprotein nur als schwacher Bindungspartner agiert. Die Tatsache, dass die einzelnen Bindungsstudien mit unterschiedlich stringenten Puffern durchgeführt wurden, könnte die Ursache für die abweichenden Ergebnisse sein. Bei einer hypothetischen DNA-Bindung an das HPV33 L2-Protein stellt sich die Frage, ob eine solche Interaktion Relevanz hat, da L2 für die DNA-Verpackung in dem von mir verwendeten System nicht benötigt wird. Abweichende

Ergebnisse in den erwähnten Studien können auch in den verwendeten Expressionssystemen begründet sein. So verwendeten Li und Kollegen (1997) in *E. coli*-Zellen exprimiertes L2-Protein, Zhou und Mitarbeiter exprimierten das L2-Protein mittels rekombinanter Vacciniaviren, und meine Untersuchungen stützten sich auf ein durch rekombinante Baculoviren exprimiertes L2-Protein. Die unterschiedlich synthetisierten L2-Proteine gehören zudem verschiedenen HPV-Typen (11, 16 und 33) an und wurden in unterschiedlich durchgeführten Bindungsstudien untersucht.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der amino- und carboxyterminal verkürzte L2-Mutanten des HPV-Typs 16 untersucht wurden, beschäftigte sich mit der Frage, ob es mit diesen L2-Mutanten möglich ist, pseudotypische Virionen herzustellen. Es zeigte sich, dass diese L2-Mutanten weder den geordneten Kapsidaufbau störten noch verhindern konnten, dass DNA vom Kapsid eingeschlossen wurde (Roden *et al.*, 2001). Dieser Literaturbericht weist ebenfalls deutlich daraufhin, dass das L2-Protein als DNA-Bindungspartner bei der Virusmorphogenese wahrscheinlich keine Rolle spielt.

3. Einschluss zellulärer DNA in VLPs

Die rekombinante Expression der Kapsidproteine L1 und L2 durch Baculoviren führt in Insektenzellen zu einer enormen Anhäufung von leeren VLPs in den Zellkernen. Werden die Standardbedingungen variiert, können auch Kapside höherer Dichte als VLPs sie aufweisen, beobachtet werden. Diese „schweren“ Kapside akkumulieren im CsCl-Gradient bei der gleichen Dichte wie Virionen und enthalten zelluläre DNA. Bei der Analyse dieser verpackten DNA konnte ich zeigen, dass ein oberes Größenlimit bei ca. 8 kb liegt. Diese Größe entspricht der des viralen Genoms. Eine untere Größenbeschränkung war nicht festzustellen. Bei der verpackten DNA war zusätzlich nicht erkennbar, ob eine bevorzugte DNA-Größe oder ein Größenbereich existiert. Diese erstmals durchgeführte Analyse zeigt, dass das Kapsid der humanen Papillomviren während des DNA-Einschlusses offensichtlich alle DNA-Moleküle toleriert, die nicht größer als ca. 8 kb sind und sein Fassungsvermögen überschreiten.

Meine Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die mit Hilfen von Pseudovirionen erhalten wurden. Die Herstellung von Markerplasmid tragenden VLPs wurde von Unckell und Mitarbeitern erstmals publiziert (Unckell *et al.*, 1997). Dieser Studie folgten weitere Publikationen, die aufzeigen, dass Markerplasmid-DNA im Bereich von 5,4 bis 8 kb vom

Kapsid umschlossen werden kann (Kawana *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 2001; Stauffer *et al.*, 1998; Touzé and Coursaget, 1998; Zhao *et al.*, 1998). Bei den verpackten DNA-Molekülen handelte es sich zum Teil um Plasmide, die zusätzlich Papillomvirus-Sequenzen tragen. Papillomvirus-Sequenzen sind aber nicht notwendig, um eine Verpackung zu erhalten. Der *In vitro*-Versuch, ein größeres Plasmid in HPV16 VLPs zu verpacken (ca. 10 kb), schlug fehl und zeigt eindeutig, dass Plasmide, deren Größe die des viralen Genoms überschreiten, bei der Verpackung diskriminiert werden (Touzé and Coursaget, 1998). Eine *In vivo*-Analyse der Größenbeschränkung wurde von Zhao und Kollegen mit BPV1 durchgeführt. Diese Gruppe publizierte eine DNA-Verpackung bis zu einer Plasmid-Größe von 10,2 kb (Zhao *et al.*, 1998). Das zelluläre Umfeld während der Verpackung könnte die Möglichkeit bieten, auch Plasmide zu verpacken, die die Größe des viralen Genoms um ca. 25% überschreiten, doch bleibt dieses Ergebnis fragwürdig. Die Tatsache, dass Papillomviren nur ein sehr kleines Genom besitzen, welches sie nicht zuletzt durch die Verwendung aller Leseraster sehr effizient nutzen, macht es unwahrscheinlich, dass sie die Möglichkeit haben, solch große Plasmide zu verpacken, ihr eigenes Genom aber deutlich kleiner ist und sie nicht ihre volle Kapazität, DNA zu verpacken, ausnutzen.

Meine Untersuchung zeigt weiterhin, dass fragmentierte zelluläre DNA, wie sie nach Eintritt der baculoinfizierten Zellen in die Apoptose auftritt, verpackt wird. Die Verpackung zellulärer DNA, ist ein klarer Hinweis darauf, dass ein spezifisches Verpackungssignal bei HPV nicht erforderlich ist. Während einer natürlichen Infektion enthält die virusbildende Zelle neben der viralen DNA nur chromosomale DNA, deren Größe eine Verpackung ausschließt. Die Entwicklung einer für die Verpackung spezifischen Sequenz, wie sie z.B. für RNA-Viren beschrieben ist, war daher wahrscheinlich nicht notwendig. Ähnliches wurde für die Polyomaviren beschrieben. Auch hier wird bei einer Expression in Insektenzellen fragmentierte, zelluläre DNA in Polyomavirus-Kapside verpackt (Pawlita *et al.*, 1996; Gillock *et al.*, 1997). Diese DNA kann in ihrer Größe ebenfalls variieren. Bei Präparationen von natürlichen Polyoma-Virionen zeigte sich, dass die isolierten Partikel eine Mischung aus Kapsiden mit Polyomavirusgenom und zellulärer DNA darstellten.

Bei natürlichen Papillomviren könnte die Toleranz gegenüber DNA-Molekülen mit heterogener Größe und das Fehlen einer HPV-spezifischen DNA-Bindungssequenz das Auftreten von Kapsiden mit umschlossenem viralen Genom und Kapsiden mit verpackter zellulärer DNA zur Folge haben.

4. Determinanten der Virusmorphogenese und Infektion

Die Morphogenese der Papillomviren ist trotz intensiver Forschung über die letzten Jahrzehnte noch nicht vollständig aufgeklärt. Von mir durchgeführte *In vivo*-DNA-Verpackungsstudien zeigen, dass der Carboxyterminus des L1-Proteins für den *In vivo*-DNA-Einschluss in das Kapsid entscheidend ist. Bei den verwendeten L1-Mutanten handelte es sich einerseits um eine carboxyterminale Deletion von 29 AS und andererseits um eine carboxyterminale Substitution, die die letzten 22 AS umfasst. Beide Mutanten wurden negativ getestet, obwohl das minore Kapsidprotein L2 anwesend war. Die Deletionsmutante L1-1/470 wird in dem von mir verwendeten System durch das L2-Protein in den Zellkern transportiert. Dieser Transport spiegelt eine unnatürliche Situation wider, resultiert aber in einer wildtypentsprechenden L1-Lokalisation. Das L1-Protein akkumuliert zusammen mit L2 in PODs. Die zweite Mutante L1-1/477M9, die ein heterologes Kernlokalisierungssignal trägt, wird wie das wtL1-Protein durch Karyopherin bzw. Importin (Merle *et al.*, 1999; Siomi and Dreyfuss, 1995; Pollard *et al.*, 1996) in den Zellkern eingebracht. Auch dieser Transport zeigt eine Kolo-kalisation des L1- und L2-Proteins im Zellkern. Die fehlende DNA-Verpackung kann deswegen nicht auf einer veränderten zellulären Lokalisation der Kapsidproteine beruhen, die durch den artifiziellen Transport hätte ausgelöst werden können. Wie oben diskutiert, habe ich für das L2-Protein keine DNA-Bindungseigenschaft nachweisen können. Weiter vermochte die Anwesenheit von L2 es nicht, die DNA-Verpackung aufrechtzuerhalten; ein Zeichen dafür, dass das L2-Protein die DNA-Verpackung nicht bedingt und ausführen kann.

In der Literatur herrscht über die Notwendigkeit von L2 bei der DNA-Verpackung eine zweigeteilte Meinung. Einige Autoren publizierten, die Anwesenheit von L2 sei für eine DNA-Verpackung essentiell oder steigere diese um den Faktor 50 (Zhou *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1998; Roden *et al.*, 1996; Stauffer *et al.*, 1998). Verschiedene Publikationen beschreiben aber, dass in Abwesenheit von L2 durchaus L1-Pseudovirionen hergestellt werden können (Unckell *et al.*, 1997; Touzé *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 2001). Meine Ergebnisse favorisieren deutlich das L1-Protein als das Kapsidprotein, das die DNA-Verpackung ausführt. Die Anwesenheit von L2 in dem von mir gewählten Versuchsansatz mit den verpackungsdefizienten L1-Mutanten zeigt, dass das L2-Protein nicht maßgeblich an der DNA-Verpackung beteiligt sein kann. Die früher postulierte DNA-bindende Sequenz und die daraus abgeleitete Funktion des L2-Proteins bei der Verpackung (Zhou *et al.*, 1994) lässt sich nicht länger halten. Roden und Kollegen zeigten zudem für

BPV1 eindeutig, dass die aminoterminalen AS nicht für den DNA-Einschluss in das Kapsid verantwortlich sind (Roden *et al.*, 2001). Ein weiterer Hinweis dafür, dass die publizierte DNA-Interaktion des L2-Proteins für die Verpackung unbedeutend ist. Dagegen berichteten Okun und Kollegen über eine herabgesetzte DNA-Verpackung für BPV1, wenn L2-Mutanten benutzt wurden, denen die L1-Interaktionsdomänen fehlten (Okun *et al.*, 2001). Da ich in meinen Studien wtL2-Protein verwendet habe, wurde die Interaktion zwischen L1 und L2 nicht beeinträchtigt. Sacharose-Gradienten zeigten zudem eine deutliche L1/L2-Kosedimentation, wenn Kapside analysiert wurden, die nach Expression von wtL2 und den beschriebenen L1-Mutanten gewonnen wurden. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die Interaktion des L2-Proteins mit dem Carboxyterminus des L1-Proteins erfolgt, der bei den von mir verwendeten Mutanten deletiert oder substituiert war.

So essentiell der Carboxyterminus von L1 bei der DNA-Verpackung auch ist, so bedeutungslos ist er offenbar bei der Infektion. In Immunisierungsstudien mit HPV33 L1-VLPs, dessen L1-Protein carboxyterminal um 22 AS verkürzt ist, konnte ich neutralisierende Antikörper induzieren. Dies Ergebnis zeigt, dass der Carboxyterminus nicht das entscheidende Epitop birgt, über das die Neutralisierung durch Antikörper erfolgen kann. Dies steht im Einklang mit der Kartierung neutralisierender Epitope im zentralen Bereich von L1 (AS 131-132; AS 268-297). Auch in Zellbindungsstudien mit COS7-Zellen und humanen Keratinozyten konnte ich eine Zellbindung mit VLPs nachweisen, selbst wenn der Carboxyterminus des L1-Proteins deletiert oder substituiert war. Joyce und Mitarbeiter (1999), die zuerst eine Interaktion des viralen Kapsids mit Proteoglykanen für HPV11 zeigten, beschrieben aber, dass der Carboxyterminus des L1-Proteins diesen Kontakt eingeht. Mit dieser Publikation konnte zwar gezeigt werden, dass der bis dahin postulierte Rezeptor ($\alpha 6$ Integrin, Evander *et al.*, 1998) nicht mehr haltbar ist, doch steht sie zu meinen Ergebnissen und anderen Literaturdaten im Widerspruch: ELISA-Studien von Giroglou und Mitarbeitern zeigen, dass für die Bindung von HPV33 L1-VLPs an Heparin der Carboxyterminus nicht notwendig ist. L1-Mutanten, denen 22 AS am Carboxyterminus fehlen, können als VLPs an Heparin-BSA binden (Giroglou *et al.*, 2001). Der endgültige Nachweis, dass der Carboxyterminus von HPV33 L1 nicht die Bindung mit Glycosaminoglykanen eingeht, wurde von Fligge und Kollegen indirekt erbracht (Fligge *et al.*, 2001). Ihre Daten weisen auf einen Proteaseschutz des Carboxyterminus in Pseudovirionen und natürlichen Virionen, nicht aber VLPs, hin. Dies bedeutet, dass der Carboxyterminus sich im Virion und Pseudovirion im Inneren befindet und nicht an der Interaktion beteiligt sein kann. Auf eine Retention des Carboxyterminus im Inneren von

Virionen und gar VLPs weist die Analyse von HPV16-Kapsiden hin. Die verwendeten T=1 Kapside zeigten in Strukturanalysen einen Aufbau, bei dem sich der Carboxyterminus im Inneren des Kapsids befand (Chen *et al.*, 2000). Somit weist alles darauf hin, dass der Carboxyterminus des L1-Proteins nicht den ersten Kontakt mit dem primären Rezeptor vermittelt und keinen entscheidenden Einfluss auf die Infektion hat, sondern für die Interaktion mit der DNA verantwortlich ist und als Kernlokalisierungssignal dient.

5. *In vivo*- und *In vitro*-Herstellung von Pseudovirionen

Wenn die DNA-Verpackung bei Papillomviren nach dem von Day und Mitarbeitern (1998) postulierten Szenario abläuft, dann hätte es mir nicht gelingen dürfen, *in vivo* Pseudovirionen herzustellen, da in meinem System weder das E2-Protein noch Bereiche des viralen Genoms anwesend waren. Nach dem Modell würden sich die Kapsidproteine L2 und L1 in PODs ansammeln und nicht mit dem zu verpackenden Plasmid in Kontakt kommen, da es aufgrund der fehlenden HPV-DNA-Sequenzen und des daran bindenden E2-Proteins nicht zu diesen Strukturen geleitet wird. Bestenfalls wäre eine sehr geringe DNA-Verpackung zu beobachten, die auf das zufällige Zusammentreffen von Protein und Plasmid beruht. Die Beobachtung ist aber, dass in COS7-Zellen mit HPV33 L1 alleine (Unckell *et al.*, 1997) oder, wie in meinem Versuchsaufbau, in Kombination mit L2 und Plasmid-DNA, Pseudovirionen effizient hergestellt werden können. Der scheinbare Widerspruch könnte sich durch die von mir verwendete Zelllinie klären: Die *In vivo*-DNA-Verpackung habe ich mit COS7-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie ist mit SV40 transformiert und exprimiert deshalb das T-Antigen. Bei der Transfektion mit dem Markerplasmid, welches den Replikationsursprung des SV40 Virus und damit die Bindungsstellen für das T-Antigen des SV40-Virus trägt, wird dieses durch das T-Antigen gebunden, zu den PODs geleitet und dort repliziert (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2000). Bei der nachfolgenden Infektion der COS7-Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren werden das L1- und L2-Protein überexprimiert. Die Kapsidproteine werden in den Zellkern transportiert und sammeln sich in PODs an. Der DNA-Einschluss in das entstehende Kapsid kann erfolgen. Die Verwendung eines Plasmids mit SV40-Replikationsursprung und einer T-Antigen exprimierenden Zelllinie ersetzt in diesem System das virale Protein E2 sowie das virale Genom. Das begründet auch, warum für HPV33 kein Effekt beobachtet wurde, wenn in diesem System zusätzlich E2 verwendet wurde (Unckell *et al.*, 1997).

Die Aufreinigung von HPV33 L1/L2-Pseudovirionen im CsCl-Gradient und die von mir anschließend durchgeführte Analyse der verpackten Plasmid-DNA zeigte, dass nur Kapside der Dichte $1,32 \text{ g/cm}^3$ signifikante Mengen DNase-geschützter DNA enthielten. Die eingebaute DNA war sehr homogen und zeigte nur selten Veränderungen gegenüber dem Ausgangsplasmid. Eine DNA-Verpackung in VLPs der Dichte $1,29 \text{ g/cm}^3$, wie sie von Zhao und Kollegen mehrfach beschrieben wurde (Zhao *et al.*, 1998; 2000; Liu *et al.*, 2001), konnte ich nicht beobachten. Auch die in diesem Zusammenhang angeführten Belege einer vermehrten Verpackung von verkürzten Plasmiden in VLPs der Dichte $1,30 \text{ g/cm}^3$ gegenüber dem erhöhten Vorkommen von nicht veränderten Plasmiden in VLPs der Dichte $1,34 \text{ g/cm}^3$ kann ich nicht bestätigen. Die von Zhao und Mitarbeitern publizierten Ergebnisse sind widersprüchlich: Einerseits publiziert diese Gruppe, dass die von ihnen hergestellten Pseudovirionen bei $1,34 \text{ g/cm}^3$ und VLPs bei $1,30 \text{ g/cm}^3$ akkumulieren (Zhao *et al.*, 2000), während die gleichen Partikel in einer anderen Publikation bei $1,35 \text{ g/cm}^3$ und $1,29 \text{ g/cm}^3$ akkumulieren (Liu *et al.*, 2001). Sie geben zudem an, dass die VLPs ($1,29 \text{ g/cm}^3$ oder $1,30 \text{ g/cm}^3$) Plasmid-DNA enthalten (Zhou *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Diese akkumulieren in ihren Versuchen aber bei der gleichen Dichte wie leere, DNA-freie VLPs. Alle Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet beobachten gleichermaßen, dass DNA-tragende VLPs bei einer höheren Dichte akkumulieren als leere VLPs. Die Beobachtung, dass VLPs der Dichte $1,29 \text{ g/cm}^3$ signifikante DNA-Mengen enthalten sollen, ist deshalb eher unglaubwürdig. Es ist äußerst unwahrscheinlich, dass VLPs, ob DNA-haltig oder DNA-frei, bei der selben Dichte von $1,29 \text{ g/cm}^3$ akkumulieren, aber Pseudovirionen, die in ihren Untersuchungen etwas größere Plasmide enthalten, deutlich getrennt bei $1,35 \text{ g/cm}^3$ akkumulieren. Diese Beobachtung würde in letzter Konsequenz bedeuten, dass die CsCl-Dichtezentrifugation für die Abtrennung von DNA-haltigen und DNA-freien VLPs als Methode nicht geeignet ist. Möglicherweise liegt die Erklärung dieser Widersprüchlichkeiten darin begründet, dass Zhao und Kollegen in die Verpackungsstudien das E2-Protein miteinbeziehen. Dadurch wird das zur Pseudovirionenherstellung verwendete Plasmid, welches eine E2-Bindungsstelle besitzt, zwar vom E2-Protein zu den PODs geleitet und verpackt, gleichzeitig assoziiert das Plasmid aber über das E2-Protein mit der Kernmatrix (Zou *et al.*, 2000). Bei der Aufarbeitung werden diese Strukturen nicht völlig zerstört und assoziieren zum Teil auch mit VLPs und Pseudovirionen. Bei einer nur unzureichenden DNase-Behandlung werden freie Plasmide, die eventuell noch mit der Kernmatrix oder chromosomaler DNA assoziiert sind, nicht vollständig abgebaut. Die Folge ist die Beobachtung, dass viele Plasmide aus Kapsiden der Dichte $1,29 \text{ g/cm}^3$ isoliert werden, die Deletionen tragen. Bei den

Pseudovirionen sieht man den selben Anteil, der aber von den tatsächlich verpackten und geschützten DNA-Molekülen überlagert wird. Dies könnte die Autoren veranlasst haben zu publizieren, dass Pseudovirionen gegenüber verkürzten Plasmiden diskriminieren und bevorzugt intakte Plasmide verpacken, während VLPs bevorzugt verkürzte Plasmide verpacken.

Ich konnte ebenfalls DNA aus VLP-haltigen CsCl-Fraktionen isolieren. Die Menge war aber im Vergleich zu Pseudovirionen signifikant geringer (Faktor 100). Kontaminierende nicht verpackte Plasmide konnte ich folglich durch eine längere Dialysezeit und ausgiebige DNase-Behandlung nahezu vollständig zerstören. Wie stark die isolierten DNA-Moleküle vom Ausgangsplasmid abweichen, zeigen Analysen von L1/wtL2-VLPs, die die verpackungsnegativen L1-Proteine L1-1/470 oder L1-1/477M9 enthielten. Die Deletionen, die in den isolierten Plasmiden zu sehen sind, beruhen meiner Meinung nach darauf, dass die Plasmide nicht DNase-resistent verpackt sind. Die isolierten Plasmide werden anschließend in *E. coli*-Zellen eingebracht, wo sie repariert, d.h. zirkularisiert und amplifiziert werden. Eine Abtrennung von plasmid-haltigen und DNA-freien VLPs durch eine CsCl-Dichtezentrifugation ist demnach gut möglich. Die Behauptung von Zhao und Kollegen, das E2-Protein würde die Verpackung von intakten Plasmiden vermitteln und die verkürzten Plasmide würden schon in der Zelle in VLPs verpackt, kann ich damit entkräften, dass ich in meinen Versuchen kein E2-Protein verwendet habe, aber Pseudovirionen mit intakter DNA isolieren konnte. Veränderte Versuchsbedingungen wie eine längere Dialysezeit und gestaffelte DNase-Behandlungen könnten darüber Aufschluss geben, inwiefern BPV1-VLPs Plasmid-DNA enthalten.

Die *In vitro*-DNA-Verpackung benötigt gegenüber der *In vivo*-Situation keinerlei zelluläre Faktoren. Es reicht aus, wenn VLPs zu Kapsomeren dissoziieren und anschließend in Gegenwart von Plasmid-DNA zu Kapsiden reassoziieren. Das zufällige Zusammentreffen von Kapsomeren und DNA während des Kapsidaufbaus ist kein geordneter Prozess, sondern wird durch die hohe Konzentration an Kapsomeren und DNA-Molekülen regelrecht erzwungen. Die Möglichkeit, DNA *in vitro* in VLPs einzubringen, beruht letztendlich auf der Fähigkeit des L1-Proteins, sich autonom zu Kapsiden zusammenzulagern. In Versuchen mit HPV33 wtL1/wtL2 VLPs konnte ich L2-haltige, infektiöse Pseudovirionen gewinnen. Das L2-Protein verbleibt während des Zerfalls des Kapsids zu Kapsomeren mit den Kapsomeren verbunden (Sapp *et al.*, 1995). Auch ohne das minore Kapsidprotein L2 war es mir möglich, *in vitro* Pseudovirionen zu generieren. Mit meinen Infektionsstudien habe ich

eine herabgesetzte Infektösität von L2-freien Pseudovirionen beobachten können, die mit Daten anderer Publikationen übereinstimmen (Unckell *et al.*, 1997; Kawana *et al.*, 1998; Kawana *et al.*, 2001). Die Effizienz des Gentransfers war in meinen Versuchen geringer als sie von Touzé und Mitarbeitern für HPV16 publiziert wurde (Touzé and Coursaget, 1998). Dies könnte auf den unterschiedlichen Methoden beruhen, die für die Pseudovirionenherstellung verwendet wurden. Wenn ich die von Touzé und Coursaget für HPV16 publizierte Verpackungsmethode mit HPV33 L1 durchführte, erfolgte kein Gentransfer. Eine kürzlich erschienene Publikation der selben Gruppe hat 9 HPV-Typen bezüglich ihrer Einsetzbarkeit für den DNA-Transfer beschrieben (Combata *et al.*, 2001). Bei den verwendeten VLPs (Typ 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 und 68) beobachteten sie für den HPV-Typ 33 die geringste Gentransfer-Rate. In meinen Studien habe ich mich vornehmlich auf den HPV-Typ 33 beschränkt, aber auch Versuche mit HPV16 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Ich konnte mit dem von mir verwendeten System sowohl für HPV33 als auch HPV16 Pseudovirionen herstellen. Die Effizienz variierte nur gering, lag aber einheitlich unter der von Touzé und Coursaget für HPV16. Meine Ergebnisse werden von Kawana und Mitarbeitern (1998; 2001) bestätigt, die ebenfalls wie Touzé und Kollegen (1998) *In vitro*-Versuche mit HPV16 durchgeführt haben und geringere Effizienzen sahen. Die geringe DNA-Verpackung durch HPV33 VLPs könnte in der großen Heterogenität der HPV33 VLPs untereinander begründet liegen. Combata und Kollegen berichten z.B. über eine gute Expression des HPV33 L1-Proteins in Insektenzellen, können jedoch nur geringe Mengen an VLPs nachweisen, die sich im Elektronenmikroskop zudem in ihrer Größe und Form sehr unterschiedlich darstellen. Diese Heterogenität der HPV33 VLPs, wie sie für andere HPV-Typen nicht beschrieben ist, habe ich in EM-Präparaten insofern beobachtet, dass neben sphärischen Partikeln auch tubuläre Strukturen existierten. Die sphärischen VLPs sind aber untereinander weitgehend homogen und stellen den Hauptanteil der VLPs. Die Ausbeute an VLPs ist auch bei mir im Vergleich zu HPV16 herabgesetzt, reicht aber aus, um VLPs in großen Mengen zu synthetisieren.

In weiterführenden *In vitro*-Studien habe ich L1-Mutanten verwendet, denen am Carboxyterminus 7 oder 22 AS fehlen. Mit diesen Mutanten habe ich ein überraschendes Ergebnis erhalten. So konnte ich Pseudovirionen herstellen, wenn das L1-Protein um 22 AS verkürzt war, aber nicht, wenn nur 7 AS am Carboxyterminus fehlten. Ein Erklärung für dieses Ergebnis könnte die reduzierte Stabilität der L1-1/492-VLPs sein. Durch den gesteigerten Abbau der VLPs und Pseudovirionen ist die DNA kaum oder schlecht geschützt, wodurch eine nachweisbare Infektion ausbleibt. Für HPV16 L1 wird berichtet,

dass *in vitro* keine DNA-Verpackung erfolgt und somit keine Pseudovirionen erhalten werden können, wenn der Carboxyterminus um 9 oder mehr AS verkürzt wird (Touzé *et al.*, 2000). Dieser C-terminale Aminosäureabschnitt des L1-Proteins wurde von mir und anderen als DNA-bindende Sequenz identifiziert (Li *et al.*, 1997; Touzé and Coursaget, 1998). Meine Aussage hingegen, dass eine DNA-Verpackung auch mit einem C-terminal verkürzten L1-Protein (HPV33 L1-1/477) beobachtet werden kann, wird von einer aktuell erschienenen Publikation bestätigt (Shi *et al.*, 2001). Darin wird eine *In vitro*-DNA-Verpackung in HPV16 und BPV1 L1-VLPs beschrieben, auch wenn der Carboxyterminus der entsprechenden L1-Proteine deletiert ist. Mit den erhaltenen Pseudovirionen war es den Autoren außerdem möglich, cytotoxische T-Lymphozyten zu induzieren. Dies zeigt, dass die Pseudovirionen nicht nur DNA enthalten, sondern auch funktionsfähig sind. Die DNA-Verpackung in VLPs stellt *in vitro* ein zufälliges Ereignis dar. Hieraus begründet sich meiner Meinung nach die Möglichkeit, DNA *in vitro* zu verpacken, selbst wenn keine Interaktion zwischen dem L1-Protein und der DNA stattfindet. Die Menge der verpackten DNA-Moleküle ist eventuell im Vergleich zum wt-Protein geringer, aber eine Infektion konnte ich dennoch nachweisen. Der von mir durchgeführte Infektionsversuch ist sehr sensitiv und kann auf Einzelzellniveau ausgewertet werden. Touzé und Kollegen weisen ihre Infektionen hingegen durch photometrische Bestimmungen eines in infizierten Zellen umgesetzten Farbstoffs nach. Eine geringe Anzahl infizierter Zellen ist bei diesem Ansatz nicht nachweisbar.

6. Infektiösität *in vitro* und *in vivo* gewonnener Pseudovirionen

DNA-haltige Pseudovirionen können sowohl in einem zellfreien *In vitro*- als auch in einem *In vivo*-Verpackungssystem hergestellt werden. Beide Arten an Pseudovirionen können Zielzellen binden und ihre Markerplasmide DNase I-resistent übertragen. Des Weiteren teilen beide Pseudovirionentypen die Eigenschaft der höheren Kreuzvernetzung und Proteaseresistenz im Vergleich zu VLPs. Elektronenmikroskopisch sind *in vivo* hergestellte Pseudovirionen nicht von *in vitro* generierten zu unterscheiden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, beide Arten an Pseudovirionen mit spezifischen Antikörpern zu inhibieren. Neben all den Gemeinsamkeiten unterscheiden sich *in vitro* generierte Pseudovirionen in der Infektiösität von *in vivo* hergestellten Pseudovirionen sehr. Dieser von mir beobachtete Unterschied muss auf der Art der Pseudovirionenherstellung beruhen. Im *In vivo*-System

verpacken Pseudovirionen Plasmide, die episomal in hoher Kopienzahl vorliegen. Diese Plasmid-DNA ist mit zellulären Histonen assoziiert (Sogo *et al.*, 1986; Collingwood *et al.*, 2001). *In vivo* hergestellte Pseudovirionen enthalten somit in ihrem Kapsid mit hoher Wahrscheinlichkeit DNA in Form von Chromatin. *In vitro* stellt sich die Situation wie folgt dar: Bei der zellfreien DNA-Verpackung werden gereinigte VLPs in Kapsomere dissoziiert und anschließend reassoziert. Bei diesem Vorgang gelangt gereinigte, histonfreie DNA in das entstehende Kapsid. Vergleicht man nun die Quotienten aus Anzahl der Kolonien, die repräsentativ für die DNA-Menge der Präparation steht, und der Anzahl infizierter Zellen, ergibt sich bei meinen Versuchen, dass *in vivo* hergestellte Pseudovirionen bis zu fünfmal infektiöser sind als *in vitro* generierte (Tabelle 2). Chromatin scheint demnach bei der Infektion mit Pseudovirionen eine beachtliche Rolle zu spielen. Der Vorteil histonassoziierter DNA könnte z.B. darin bestehen, dass sie nach erfolgter Infektion und Freisetzung aus dem Kapsid vor einer Degradation geschützt ist. Zusätzlich könnte die DNA durch die Histone effizienter zum Kern transportiert und in diesen durch den histonimportierenden Proteinkomplex Importin β /Importin7 (Jakel *et al.*, 1999) eingebracht werden. Diese Theorie ist bereits auf dem Gebiet der Gentherapie angewandte Praxis. Es kommen hier nicht-virale Vektoren zum Einsatz, die mit Histonfragmenten assoziiert werden. Die Folge ist ein effizienterer DNA-Transport zum Zellkern (Boettger *et al.*, 2001; Hasselmayer *et al.*, 2001).

In natürlichen Papillomvirionen liegt die virale DNA als Minichromosom vor. Die Assoziation mit Histonen gilt als gesichert. Auffällig ist der Befund, dass die Histone H2A, H2B, H3 und H4 gefunden wurden, nicht aber das Histon H1 (Pfister *et al.*, 1977). In *Saccharomyces cerevisiae*, einem Organismus, der das Histon H1 nicht exprimiert (Certa *et al.*, 1984; Albig *et al.*, 1998), können Pseudovirionen hergestellt werden (Rossi *et al.*, 2000). Diese HPV16-Pseudovirionen werden als sehr infektiös beschrieben. Aus den Angaben der Autoren abgeleitet, werden nur etwa 30 Pseudovirionen für die Infektion einer Zelle benötigt. Für HPV33-Pseudovirionen aus COS7-Zellen wurde berichtet, dass 2000 Pseudovirionen pro Zelle benötigt werden, um eine Infektion zu etablieren (Unckell *et al.*, 1997). Der Unterschied, dass in Hefe hergestellte Pseudovirionen um ein vielfaches infektiöser sind, könnte wiederum auf einem durch Chromatin hervorgerufenen Effekt beruhen. Beide Systeme verwenden ein episomal vorliegendes Plasmid. Dieses Plasmid ist sowohl in COS7-Zellen als auch in den verwendeten Hefezellen mit Histonen assoziiert. Im Gegensatz zu COS7-Zellen wird in *Saccharomyces cerevisiae* kein Histon H1 exprimiert. Demzufolge enthalten in Hefe hergestellte Pseudovirionen ein Plasmid, das die Core-

Histone trägt, aber frei von Histon H1 ist. Diese Situation spiegelt die natürliche Situation wider und könnte der Grund für eine gesteigerte Infektiosität sein. Sowohl der Vergleich *in vitro* und *in vivo* hergestellter Pseudovirionen als auch in Hefe generierter Pseudovirionen legen den Schluss nahe, dass die HPV-Pseudovirioneninfektion von Histonen positiv beeinflusst wird. Dabei scheint auch der Abwesenheit von Histon H1 eine besondere Rolle zuzukommen. Es wäre interessant, dieses Phänomen durch die Verwendung von Pseudovirionen mit definierter Chromatinstrukturen zu entschlüsseln. Dabei wäre es denkbar, Plasmide *in vitro* mit gereinigten Histonen konzentrationsabhängig zu inkubieren, sowie den Effekt einzelner Histone mit besonderem Augenmerk auf das Histon H1 zu untersuchen.

V. Zusammenfassung

Die DNA-Bindungseigenschaft der Kapsidproteine L1 und L2 humaner Papillomviren (HPV) wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine damit verbundene Rolle in der *In vitro*- und *In vivo*-DNA-Verpackung in virusähnliche Partikel (VLPs) ist nicht eindeutig geklärt. Ich konnte eine DNA-Bindung der wtL1-Proteine von HPV16, 18 und 33 nachweisen. Dabei gelang es mir die DNA-Bindungsdomäne für HPV33 L1 auf die letzten sieben AS des Carboxyterminus zu kartieren. Für das HPV33 L2-Protein konnte keine DNA-Bindung nachgewiesen werden. In weiterführenden DNA-Verpackungsstudien wurde getestet, ob DNA-bindungsnegative L1-Mutanten den DNA-Einschluss in VLPs verhindern. Mit Hilfe des *In vitro*-DNA-Verpackungsansatzes wurde gezeigt, dass eine C-terminal um 22 AS verkürzte L1-Mutante DNA wie wtL1 alleine oder wtL1 zusammen mit wtL2 verpacken und infektiöse Pseudovirionen bilden kann. Die *in vitro* generierten Pseudovirionen waren biochemisch und strukturell nicht von *in vivo* hergestellten Pseudovirionen zu unterscheiden. So konnte erstmals gezeigt werden, dass *in vitro* hergestellte Pseudovirionen im Vergleich zu VLPs eine höhere Disulfidverknüpfung und Proteaseresistenz aufweisen.

In einem *In vivo*-DNA-Verpackungsansatz wurden ebenfalls DNA-bindungsnegative L1-Mutanten untersucht. Der Umstand, dass die DNA-Bindungssequenz des L1-Proteins gleichzeitig das Kernlokalisierungssignal (NLS) enthält, machte es notwendig, sowohl ein C-terminal um 29 AS verkürztes L1-Protein als auch eine Substitutionsmutante (L1-1/477M9) zu testen. Bei der L1-1/477M9-Mutante wurde das klassische NLS gegen das neutrale NLS (M9) des humanen heteronukleären Ribonukleoproteins A1 ausgetauscht. Auch diese Mutante war DNA-bindungsnegativ. Während das L1-1/470-Protein sich nach Expression in humanen Zellen im Zytoplasma befand, hielt sich die Mutante L1-1/477M9 vornehmlich im Zellkern auf. Wurden die L1-Mutanten zusammen mit L2 exprimiert, so kolokalisierten sie mit L2 in sogenannten *nuclear domains 10* (ND10), was der Wildtypsituation entspricht. Beide L1-Mutanten waren in der Lage, L2-haltige Kapside aufzubauen. Wurden wtL1 und wtL2 koexprimiert, so konnten in *In vivo*-DNA-Verpackungsstudien Pseudovirionen hergestellt werden. Demgegenüber war es allerdings nicht möglich, Pseudovirionen zu erhalten, wenn die Mutanten L1-1/470 oder L1-1/477M9 zusammen mit wtL2 getestet wurden. Eine DNA-Interaktion des L1-Proteins scheint somit die Grundvoraussetzung für den DNA-Einschluss in das Kapsid zu sein.

Darüber hinaus habe ich die Infektiösität histonfreier, *in vitro* hergestellter Pseudovirionen mit der *in vivo* hergestellter Pseudovirionen verglichen, die höchstwahrscheinlich histon-assoziierte DNA tragen. Obwohl keine offensichtlichen strukturellen und biochemischen Unterschiede zwischen beiden Arten der Pseudovirionen festzustellen waren, wurden *in vivo* gewonnene Pseudovirionen als bis zu fünffach infektiöser getestet. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass Chromatin für die Steigerung der Infektiösität von Pseudovirionen verantwortlich sein könnte.

VI. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BPV	Rinderpapillomvirus (bovine papillomavirus)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
COPV	Hundepapillomvirus
CRPV	Kaninchenpapillomvirus
C-Terminus	Carboxyterminus
Cys	Cystein
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
h	Stunde(n)
HPV	humane Papillomviren
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH	humane Keratinozyten
l	Liter
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute(n)
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PV	Papillomviren
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen (rounds) pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

sek	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheit (unit)
ü.N.	über Nacht
VLPs	virusähnliche Partikel (virus-like particles)
Vol	Volumen
wt	Wildtyp

VII. Literaturverzeichnis

- Albig, W., Runge, D.M., Kratzmeier, M. and Doenecke, D. (1998). Heterologous expression of human H1 histones in yeast. *FEBS Lett.* **435**, 245-250.
- 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.
- Bastien, N. and McBride, A.A. (2000). Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* **270**, 124-134.
- Boettger, M., Zaitsev, S., Dalluege, R., Sukhorukov, G. and Haberland, A. (2002). From polycationic transfection systems to aggregatoin-free polyelectrolyte nanoparticles. 9th Meeting of the European Society of Gene Transfer.
- Bonne-Andrea, C., Santucci, S., Clertant, P. and Tillier, F. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J. Virol.* **69**, 2341-2350.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E. and Band, V. (1996). E7 protein of human papillom virus 16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-protasome pathway. *Cancer Res.* **56**,4620-4624.
- Bream, G.L., Ohmstede, C-A and Phelps, W.C. (1993). Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J. Virol.* **67**, 2655-2663.
- Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubber, 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.
- Burkhardt, A., DiMaio, D. and Schlegel, R. (1987). Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.* **6**, 2381-2385.
- Carvalho, T., Seeler, J.S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M. and Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A-Orf3proteins to nuclear matrix associated PML bodies. *J. Cell. Biol.* **131**, 45-56.
- Certa, U., Colavito-Shepanski, M. and Grundstein, M. (1984). Yeast may not contain histone H1: the only known histone like H1 protein in *S. cerevisiae* is a mitochondrial protein. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7975-7985.
- Chow, L.T. and Broker, T.R. (1994). Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* **37**, 150-158.

- Chow, L.T. and Broker, T.R. (1997). Small DNA tumor viruses. In „Viral Pathogenesis“ (N. Nathanson et al., eds) pp 267-301. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Christensen, N., Kirnbauer, R., Schiller, J.T., Ghim, S.J., Schlegel, R., Jenson, A.B. and Kreider, J.W. (1994). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* **205**, 329-335.
- 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.
- Clertant, P. and Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins. *Nature* **311**, 276-279.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., Chatterjee, V.K. and Wolffe, A.P. (2001). Chromatin remodeling by the thyroid hormone receptor in regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha-subunit promoter. *J. Biol. Chem.* **276**, 34227-34234.
- Combata, A.L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P-Y., Muñoz, N. and Coursaget, P. (2001). Gene transfer using papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiology Letters* **204**, 183-188.
- Crum, C.P., Barber, S., Symbula, M., Snyder, K., Saleh, A.M. and Roche, J.K.. (1990). Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* **178**, 238-246.
- Cueille, N., Nougarede, R., Mechali, P., Philippe, M. and Bonnez-Andrea, C. (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-cdk2. *J. Virol.* **72**, 7255-7262.
- Day, P.M., Roden, R.B.S., 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 Villiers, E.M. (1997). Papillomavirus and HPV-Typing. *Clin. Dermatol.* **15**, 199-206.
- DiMaio, D., Petti, L. and Hwang, E-S. (1994). The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Semin. Virol.* **5**, 369-379.
- Dingwall, C and Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 478-481.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. and Crawford, L. I. (1991). Specific interaction between HPV 16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824-827.

- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Naphine, S., Sterling, J., Winter, G. and Griffin, H.. (1997). Characterization of events during the late stages of HPV 16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* **238**, 40-52.
- Doucas, V., Ishov, A.M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M.D., Evans, R.M. and Maul, G.G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**, 196-207.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K. and Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J. Virol.* **66**, 6893-6902.
- El Mehdaoui, S., Touze, A., Sizarret, L., Rasschaert, D. and Coursaget, P. (2000). Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 and L2 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **74**, 10332-10340.
- Finch, J.T. and Klug, A. (1965). The structure of viruses of the papilloma-polyoma type III. Structure of rabbit papillomavirus. *J. Mol. Biol.* **13**, 1-12.
- Fligge, C., Schäfer, F., Selinka, H.C., Sapp, C. and Sapp, M. (2001). DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J. Virol.* **75**, 7727-7731.
- Fligge, C., Giroglou, T., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2001). Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology* **283**, 353-357.
- Florin, L., Streeck, R.E. and Sapp, M. unpublished observation.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002). A novel role for L2: Reorganizing nuclear domain 10. Accepted for publication in *Virology*.
- Franco, E.L. (1991). Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 1195-1206.
- Fuchs, P.G. and Pfister, H. (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* **37**, 159-167.
- Gillock, E.T., Rottinghaus, S., Chang, D., Cai, S., Smiley, A., An, K. and Consigli, A. (1997). Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J. Virol.* **71**, 2857-2865.
- Giri, I. and Yaniv, M. (1988). Study of the E2 gene product of the cottontail rabbit papillomavirus reveals a common mechanism of transactivation among the papillomaviruses. *J. Virol.* **62**, 1573-1581.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2001a). 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. (2001b). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* **19**, 1783-1793.
- Gissmann, L., Pfister, H. and Zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**, 569-580.
- Gluzman, Y. (1981). SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV 40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- 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.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N. and Galloway, D.A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **67**, 315-322.
- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harlow, E. and Lane, D.P. (1988). Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. USA
- Hasselmayer, O., Demirhan, I., Bayer, M. and Chandra, P. (2001). Inhibition of histone-mediated gene transfer in eucaryotic cells by anti-histone IgG. *Anticancer Res.* **21**, 2377-2386.
- Haugen, T.H., Turek, L.P., Mercurio, F.M., Cripe, T.P., Olson B.J., Anderson, R.D., Seidl, D., Karin, M. and Schiller, J. (1988). Sequence specific and general transactivation by the BPV-1 E2 transactivator requires an N-terminal amphipathic helix-containing E2-domain. *EMBO J.* **7**, 4245-4253.
- Heck, D.V., Yee, C.L., Howley, P.M. and Munger, K. (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4442-4446.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.
- Hirochika, H., Hirochika, R., Broker, T.R. and Chow, L.T. (1988). Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the transacting E2 proteins. *Genes Dev.* **2**, 54-67.
- Howley, P.M. and Lowy, D.R. (2001). Papillomaviruses and their replication. In "Virology" (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., eds), pp 2197-2264. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

- Howley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1989). HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**, 3905-3910.
- Jablonska, S. and Majewski, S. (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. In "Humanpathogenic Papillomaviruses" (zur Hausen, H., ed.). Heidelberg, Springer. 157-175.
- Jakel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Gorlich, D. (1999). The importin beta/importin7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* **18**, 2411-2423.
- Jiang, W.Q., Szekely, L., Klein, G. and Ringertz, N. (1996). Intranuclear redistribution of SV40T, p53, and PML in a conditionally SV40T-immortalized cell line. *Exp. Cell Res.* **229**, 289-300.
- Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehmann, 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.
- 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, Y., Kawana, K., Yoshikawa, N., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda, T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J. Virol.* **75**, 2331-2336.
- Keider, J.W., Howlett, 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.
- Kesis, T.D., Slebos, R.J., Nelson, W.G., Kastan, M.B., Plunkett, B.S., Han, S.M., Lorincz, A.T., Hedrick, L. and Cho, K.R. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 3988-3992.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, N., 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**, 6929-6936.
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T. and Ishibashi, M. (1997). Binding of high risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 11612-11616.
- Klingelutz, A.J., Foster, S.A. and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**, 79-81.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S.S., Weiss, R.S. and Javier, R.T. (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDIg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6670-6675.
- Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. and Javier, R.T. (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **74**, 9680-9693.
- 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, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. and Garcea, R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* **72**, 2160-2167.
- Li, R., Knight, J., Bream, G., Stenlund, A. and Botchan, M. (1989). Specific recognition nucleotides and their context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev.* **3**, 510-526.
- Liu, Y., Frazer, I.H., Liu, W.J., McMillan, N. and Zhao, N.K. (2001). Efficiency of delivery of DNA to cells by bovine papillomavirus type 1 L1/L2 pseudovirions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 150-156.
- Ma, T., Zou, N, Lim, B.Y., Chow, L.T. Harper, J.W. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 382-387.
- McBride, A.A., Byrne, J.C. and Howley, P.M. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus 1 form dimers through the carboxyl-terminal DNA binding domain: Transactivation is mediated through the conserved amino-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 510-514.
- Merle, E., Rose, R.C., LeRoux, L. and Moroianou, J. (1999). Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin $\alpha 2 \hat{1}$ heterodimers. *J. Cell. Biochemistry* **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.
- Mohr, I.J., Clark, R., Sun, S., Androphy, I.J., MacPhearson, P. and Botchan, M.R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**, 1694-1699.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A. and Fürst, T.R. (1990). New mammalian expression vectors. *Nature* **348**, 91-92.

- Münger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M. and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4417-4421.
- 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 risk of cervical cancer linked to 25 HPV types: which are the high risk types? 18th international papillomavirus conference, Barcelona.
- Neary, K., Horwitz, B.H. and DiMaio, D. (1987). Mutational analysis of open reading frame E4 of bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **61**, 1248-1252.
- Nevins, F.R. (1992). A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429.
- Okun, M.M., Day, P.M., Greenstone, H.L., Booy, F.P., Lowy, D.R., Schiller, J.T. and Roden, R.B.S. (2001). L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation. *J. Virol.* **75**, 4332-4342.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M.R. and Mohr, I.J. (1994). The cellular DNA polymerase α -primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 8700-8704.
- Pawlita, M., Müller, M., Oppenländer, M., Zentgraf, H. and Herrmann, M. (1996). DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* **70**, 7517-7526.
- Petti, L. and DiMaio, D. (1992). Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6736-6740.
- Petti, L. and DiMaio, D. (1994). Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the b receptor for platelet derived growth factor in stably transformed and acutely transfected cells. *J. Virol.* **68**, 3582-3592.
- Pfister, H., Gissmann, L. and zur Hausen, H. (1977). Partial characterization of proteins of the human papilloma viruses (HPV) 1-3. *Virology* **83**, 131-137.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-994.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-flourescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

- Rangasamy, D and Wilson, V.G. (2000). Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J. Biol. Chem.* **29**, 30487-30495.
- 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.
- Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G.D., Kreider, J.W. and Gallimore, P.H. (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**, 176-187.
- Roden, R.B.S., Greenstone, H.L., Kirnbauer, R., Booy, F.P., Jessie, J., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1996). In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* **70**, 5875-5883.
- Rogel-Gaillard, C., Pehau-Armaudet, G., Breiburd, F. and Orth, G. (1993). Cytopathic effect in human papillomavirus type 1 induced inclusion warts. In vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 843-851.
- Romanczuk, H., Thierry, F. and Howley, P.M. (1990). Mutational analysis of cis-elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **64**, 2849-2859.
- Rossi, J.L., Gissmann, L., Jansen, K. and Müller, M. (2000). Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Gene Therapy* **11**, 1165-1176.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sang, B.C. and Barbosa, M.S. (1992). Single amino acid substitutions in low risk human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the high risk HPV E7 oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8063-8067.
- Sapp, M., Volper, C., Müller, M. and Streeck, R.E. (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **76**, 2407-2412.
- Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J.R. and Streeck, R.E. (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J. Virol.* **72**, 6186-6189.
- Schlegel, R., Wade-Glass, M., Rabson, M.S. and Yang, Y.C. (1986). The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small hydrophobic polypeptide. *Science* **233**, 464-467.

- Schapiro, F., Sparkowski, J., Adduci, A., Supryniewicz, F., Schlegel, R. and Grinstein, S. (2000). Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J. Cell. Biol.* **148**, 305-315.
- 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.
- 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, Bosch, Shah, Meheus eds) pp. 25-52. IARC, London.
- Seo, Y., Muller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H.Y., Phillips, B. and Hurwitz, J. (1993). Bovine papillomavirus (BPV)- encoded E1 protein contains multiple activities required for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 702-706.
- Shah, K.V. and Howley, P.M. (1996). Papillomaviruses. *Virology* (Fields, Knipe, Howley, eds), pp. 2077-2109. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Shi, W., Liu, J., Huang, Y. and Qiao, L. (2001). Papillomavirus pseudovirions: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses. *J. Virol.* **75**, 10139-10148.
- Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J. Cell Biol.* **129**, 551-559.
- Skiadopoulos, M.H. and McBride, A.A. (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J. Virol.* **72**, 2079-2088.
- Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T. and Knippers, R. (1986). Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J. Mol. Biol.* **189**, 189-204.
- Stauffer, Y., Raj, K., Mastermak, K. and Beard P.J. (1998). Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *Mol. Biol.* **283**, 529-536.
- Stubenrauch, F. and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 379-386.
- Subramanian, A., Ranganathan, P. and Diamond, S.L. (1999). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **17**, 873-877.
- Sun, X.Y., Frazer, I., Müller, M., Gissmann, L. and Zhou, J. (1995). Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6b L2-protein. *Virology* **213**, 321-327.

- Sundberg, J.P. (1987). Papillomavirus infections in animals. In "Papillomaviruses and human disease" (Syrjanen, K., Gissmann, L., Koss, L.G. eds) pp 379-386, Springer-Verlag, Berlin.
- Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A. and Chow, L.T. (1999). Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J. Virol.* **73**, 1001-1009.
- Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P. and Maul, G.G. (2000). Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J. Virol.* **74**, 9694-9700.
- Thierry, F. and Yaniv, M. (1987). The BPV-1 E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV 18 regulatory region. *EMBO J.* **6**, 3391-3397.
- Thorner, L.K., Lim, D.A. and Butchan, M.R. (1993). DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: Structural and functional aspects. *J. Virol.* **67**, 6000-6014.
- Touzé, A. and Coursaget, P. (1998). In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1317-1323.
- Touzé, 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.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Trus, B.L., Roden, R.B.S., 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 9Å resolution. *Nat. 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., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral recognition factor E1. *EMBO J.* **10**, 4321-4329.
- 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.
- Watanabe, S., Kanda, T. and Yosshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* **63**, 965-969.
- 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.

- Zhao, K-N., Frazer, I.H., Liu, W.J., Williams, M. and Zhou, J. (1999). Nucleotides 1506-1625 of bovine papillomavirus type 1 genome can enhance DNA packaging by L1/L2 capsids. *Virology* **259**, 211-218.
- Zhao, K-N., Hengst, K., Liu, W.J., Liu, Y.H., Liu, X.S., McMillan, N.A. and Frazer, I.H. (2000). BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* **272**, 382-393.
- Zhou, J., Doobar, J., Sun, X.Y., Crawford, L., McLean, C.S. and Frazer, I.H. (1991). Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* **185**, 625-632.
- Zhou, J., Stenzel, D.J., Sun, X.Y. and Frazer, I.H. (1993). Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J. Gen. Virol.* **74**, 763-768.
- Zhou, J., Sun, X.Y., Louis, K. and Frazer, I.H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV-DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* **68**, 619-625.
- Zou, N., Lin, B.Y., Duan, F., Lee, K.Y., Jin, G., Guan, R., Yao, G., Lefkowitz, E.J., Broker, T.R. and Chow, L.T. (2000). The hinge of the human papillomavirus type 11 E2-protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J. Virol.* **74**, 3761-3770.
- Zur Hausen, H. and de Villiers, E.M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 427-447.