

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben und anderes Untersuchungsmaterial

Die Mitarbeiter der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Charité in Berlin-Mitte, insbesondere die Ärztinnen und Ärzte der Arbeitsgruppe von Prof. Eggert Stockfleth (Hauttumorzentrum Charité), sammelten die Proben und stellten sie zur Verfügung. Dabei handelte es sich um Biopsien von gutartigen und bösartigen Tumoren sowie gezupften Körperhaare. Die Proben wurden von organtransplantierten, immunsupprimierten Patienten (OTR) und nicht-organtransplantierten, immunkompetenten Patienten (IK) der Klinik im Rahmen verschiedener klinischer Studien. Zusätzlich wurden in Paraffin eingebettete Proben von Hauterkrankungen verschiedener Diagnosen aus der pathologischen Abteilung der Klinik zur Analyse verwendet.

Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Verarbeitung bei -70°C gelagert oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Körperhaare wurden einschließlich ihrer Haarfollikelzellen gezupft, in Stickstoff gesammelt und bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Frank Rösl des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg) wurden in Paraffin eingebettete Biopsien, DNA aus Frischbiopsien, gezupften Haare von *M. coucha* (von Dr. rer. nat. Julia Nafz) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Aufbau der Studien

2.1.2.1 HPV-Infektionen in wiederkehrenden, nicht-melanozytären Hauttumoren²

In dieser retrospektiven Studie mit prospektivem Wert wurden von 3 Patienten mit wiederkehrenden Hauttumoren (Rezidive) 21 klinische Proben (Kryo- und Paraffinpräparaten

² veröffentlicht von Nindl, I., A. Koehler, T. Meyer, T. Forschner, C. J. L. M. Meijer, P. J. F. Snijders, W. Sterry & E. Stockfleth. 2006. Detection of human papillomavirus DNA in primary squamous cell carcinoma and metastases. *British Journal of Dermatology* 154: 797-799.

[FFPE]) zwischen 8–54 Monaten untersucht (Tabelle 2.1). Unter den Proben befanden sich Primärtumor, Rezidive, sowie Metastasen von Haut und Lymphknoten.

Tabelle 2.1: Kryo- und Paraffinpräparate (FFPE) der entnommenen Patientenproben (Primärtumor, Rezidive, Metastasen von Haut und Lymphknoten, Haarfollikel) von 3 NMSC-Patienten

Pat.-Nr.	Biopsie-Nr.	G./Alter	IS	Histologie	Lokalisation	Zeit der Entnahme (Monate)	Gewebe-Beschaffenheit
1	1	w / 75 J.	nein	primäres SCC	Oberschenkel	0	FFPE
	2			kutane SCC-Metastase im Lymphknoten	Leiste	8	FFPE
2	3	m/ 49 J.	ja	primäres SCC	Wange	0	FFPE
	4			AK	Stirn	0	FFPE
	5			SCC	Hand	4	FFPE
	6			kutane SCC-Metastase im Lymphknoten	Kopf	8	FFPE
	7			SCC	Wange	9	FFPE
	8			kutane SCC-Metastase	Stirn	11	FFPE
	9			kutane SCC-Metastase im Lymphknoten	Kopf	37	FFPE
	10			AK	Wange	53	Kryo
	11			SCC	Hals	53	Kryo
	12			AK	Hals	54	Kryo
	H1			Haarfollikel	Augenbraue	53	Kryo
	H2			Haarfollikel	Kopf	53	Kryo
	H3			Haarfollikel	Rumpf	53	Kryo
3	13	m/ 53 J.	nein	Primäres SCC	Gesäß	0	FFPE
	14			SCC	Gesäß	1	FFPE
	15			SCC	Gesäß	10	FFPE
	16			kutane SCC-Metastase im Lymphknoten	Leiste	16	FFPE
	17			Lymphknotenmetastase	Leiste	16	FFPE
	18			SCC	Gesäß	19	FFPE
	19			SCC	Leiste	20	FFPE
	20			SCC	Gesäß	20	FFPE
	21			SCC	Gesäß	24	FFPE

AK, Aktinische Keratose; FFPE, Paraffinpräparat; G., Geschlecht; IS, Immunsuppression; J., Jahre; m, männlich; NMSC, epithelialer Hautkrebs; Nr., Nummer; Pat., Patient; SCC, Plattenepithelkarzinom; w, weiblich

Patienten #1 und #3 waren immunkompetent. Patient #2 war bei der Entnahme des Primärtumors bereits 18 Jahre organtransplantiert (Niere) und immunsupprimiert. Durch eine HPV-Typisierung sollte untersucht werden, ob über einen längeren Zeitraum eine Infektion mit dem gleichen HPV-Typ(en) nachgewiesen werden kann. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob es sich bei nachgewiesenen HPV-Typen um verschiedene Varianten handelt (Neuinfektion) oder ob eine persistierende HPV-Infektion der gleichen Varianten vorliegt.

2.1.2.2 HPV-Prävalenz in Haarfollikeln verschiedener Areale des Körpers³

Es wurden 51 Haarproben von 9 (7 Männer, 2 Frauen) immunsupprimierten Transplantationspatienten (44–69 Jahre, Median: 59 Jahre) und 54 Haarproben von 9 (6 Männer, 3 Frauen) gesunden Probanden als Kontrollgruppe (41–75 Jahre, Median: 53 Jahre) gesammelt. Jede Probe enthielt 3–5 Haare, welche unter sterilen Bedingungen von je 6 verschiedenen Körperarealen entnommen wurde. Darunter waren Sonnenlicht-exponierte (Kopf, Augenbraue und Arm) und nicht Sonnenlicht-exponierte Areale (Rumpf, Bein und Schambereich). Die Proben wurden auf die Anwesenheit 24 kutaner und 37 mukosaler HPV-Typen untersucht, um herauszufinden, welche HPV-Typen an unterschiedlichen Arealen des Körpers nachweisbar sind.

2.1.2.3 Verteilung kutaner/EV HPV-Typen in Haarfollikeln immunsupprimierter, organtransplantiertes Patienten

Die OTR wurden unter 2 unterschiedlichen Aspekten in eine prospektive und eine Fall-Kontroll-Studie aufgenommen:

1. prospektive Studie: Kürzlich transplantierte Patienten, deren Nierentransplantation vor weniger als einem Monat stattfand (Zeitpunkt 0), einschließlich der Nachbeobachtungszeiten von 3, 6, 9, 12 und 18 Monaten (Zeitpunkt 1–5).
2. Fall-Kontroll-Studie: Patienten mit und ohne epithelialen Hauttumoren, deren Nierentransplantation mindestens 2 Jahren zurücklag.

Es wurden 63 Patienten (44 Männer, 19 Frauen) in einem Alter von 22–73 Jahren (Median: 49 Jahre) innerhalb des ersten Monats nach Transplantation aufgenommen. Die Gruppe der Patienten, die mindestens 2 Jahre transplantiert waren, umfasste 154 OTR (102 Männer, 52 Frauen) in einem Alter von 16–74 Jahren (Median: 52 Jahren). Die Organtransplantation lag 2–29 Jahre (Median: 11 Jahre) zurück. Sie wurden in 3 Gruppen eingeteilt: Kontroll-Patienten ohne Warzen und/ oder NMSC, Patienten mit Warzen und Patienten mit NMSC (AK, BCC, SCC).

³ veröffentlicht von Köhler, A., T. Forschner, T. Meyer, C. Ulrich, M. Gottschling, E. Stockfleth & I. Nindl. 2007. Multifocal distribution of cutaneous human papillomavirus types in hairs from different skin areas. *British Journal of Dermatology* 156: 1078-1080.

Von allen Probanden wurden Haare der Augenbrauen entnommen und die Anwesenheit 24 kutaner/EV HPV-Typen bestimmt. In der prospektiven Studie sollte die Persistenz kutaner/EV HPV-Typen analysiert werden. Bei den Probanden der Fall-Kontroll-Studie wurde das Risiko für die Entwicklung von NMSC untersucht.

2.1.2.4 HPV-Infektionen in Warzen von immunsupprimierten und immunkompetenten Patienten⁴

Es wurden 53 kutane Warzen von 33 immunsupprimierten OTR (23 Männer, 10 Frauen; 19–70 Jahre, Median: 53 Jahre) und 41 Hautwarzen von 29 immunkompetenten, nicht-transplantierten Patienten (IK; 21 Männer, 8 Frauen; 10–73 Jahre, Median: 42 Jahre) gesammelt. Von 33 OTR waren 29 Patienten nierentransplantiert, 2 Patienten herztransplantiert, 1 Patient lungentransplantiert und 1 Patient lungen- und herztransplantiert. Die Zeit nach Transplantation betrug 0,5 bis 28 Jahre (Median: 13 Jahre). Alle entnommenen Hautwarzen wurden auf die Anwesenheit der bekannten kutanen/EV HPV-Typen (β & γ), mukosalen α -HPV-Typen, Warzen-assoziierten α -HPV-Typen (A2, A4), μ - und ν -Typen untersucht. Die Viruslast kutaner/EV HPV-Typen und Warzen-assoziiierter α -HPV-Typen wurde in einer repräsentativen Anzahl der Proben bestimmt. Die Studie beschäftigte sich mit der Frage, welche HPV-Typen in Warzen nachweisbar sind und aufgrund der Virusmenge möglicherweise für das Entstehen der Warzen verantwortlich sein können.

2.1.2.5 Lokalisation und Virusmenge in Haut und Haarfollikeln von *Mastomys coucha*⁵

Viruspräsenz und Viruslast wurde in Normalhaut und Tumorproben von 6 Tieren mit Hauttumoren im Alter von 10 bis 16 Monaten analysiert. Ferner erfolgten diese Untersuchungen bei 5 gesunden Tieren im Alter von 1,5–14 Monaten. Im Fokus dieser Studie stand die Frage, ob die Viruslast mit der Hauttumorgenese korreliert.

⁴ Veröffentlichung in Vorbereitung

⁵ Veröffentlichung von Nafz, J., & A. Köhler, M. Ohnesorge, I. Nindl, E. Stockfleth & F. Rösl. 2007. Persistence of *Mastomys natalensis* Papillomavirus in the brain and multiple Organs Identifies new targets for infection. *Journal of General Virology*.

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der Immunsuppression auf die Viruslast untersucht. Dafür erhielten jeweils 5 Tiere (Alter: 5 Monate) einmal Immunsuppressiva Rapamycin bzw. Cyclosporin A im Futter, weitere 5 Tiere erhielten nur normales Futter. Für eine Bestimmung der Viruslasten über eine Zeit von 20 Wochen wurden Haare gezupft und analysiert.

2.1.3 Verwendete Geräte

Neben Laborgeräten wie Tischzentrifuge, Thermomixer, Vortexer, pH-Meter, Heiz- und Magnetrührer wurden nachfolgende Geräte verwendet:

Subcell GT System, Mini Protean II System, Power Pac 300	Bio-Rad, München, D
Geldokumentationssystem	Syngene Cambridge, UK
Spektrofluorometer Lambda FLUORO 320	BIO-TEK Instruments, Winooski, USA
Mikroskop	Zeiss, Jena, D
Mikroskop-Kamera PowerG3	Canon, Krefeld, D
Miniblotter MN45	Immunitics, Boston, MA, USA
Hybridisierungsöfen: HERAhybrid 6	Kendro Lab, Hanau, D
GFL 7601	GFL, Burgwedel, D
PCR-Thermozykler: Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
PE9600	Perkin Elmer, Jügesheim, D
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
LightCycler® Instrument 1.0 und 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim, D

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2 ml), Kryoröhrchen, Schraubdeckel-Röhrchen (1,5; 15 und 50 ml) wurden von Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg, D), Sarstedt (Nümbrecht, D) und Eppendorf (Hamburg, D) bezogen. Spezielle Verbrauchsmaterialien sind nachfolgend aufgeführt:

Multi-Ultra PCR Tubes 0,2 ml	Roth, Karlsruhe, D
Biodyne C Membrane 0,45 µ (#60320)	Pall Corporation, Pensacola, USA
Foam cushions PC200	Immunitics, Boston, MA, USA

Hyperfilm ECL (RPN2103k)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
LightCycler® Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim, D

2.1.5 Reagenzien

Alle handelsüblichen Substanzen wurden von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), SIGMA-ALDRICH (Steinheim, D), SERVA (Heidelberg, D), Biorad (München, D) und Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg, D) bezogen. Spezielle Reagenzien sind nachfolgend aufgeführt.

Streptavidin-POD (#1089154)	Boehringer, Mannheim, D
SDS (# 444464T)	BDH Chemicals Ltd, Poole, UK
<i>Aqua ad iniectabilia (Aqua ini.)</i>	Braun, Melsungen, D
<i>Desoxyribonucleic Acid from human placenta</i>	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
Glycogen (20mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Proteinase K für ISH und IHC (# S3004)	DAKO, Hamburg, D
Proteinase K für DNA-Isolation	Roth, Karlsruhe, D
SSSDNA (#201190)	Stratagene, Amsterdam, NL
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Hämatoxylin (Hamalaun nach Meyer)	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
Eosin-Phloxin-Lösung (gebrauchsfertig)	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
AEC-Gebrauchslösung (#K3464)	DAKO, Hamburg, D
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Gibco, Invitrogen Co., Paisley, UK
<u>DNA-Größenstandards:</u>	
DNA-Marker 100 bp-Leiter , pUC19/Msp I, 250 bp-Leiter	Roth, Karlsruhe, D
NEB 1 kb DNA-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt/M, D

2.1.6 Reagenzsysteme (*Kits*)

ABI PRISM BigDye <i>terminator reaction kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ampli <i>Taq</i> Gold Polymerase	Applied Biosystems, Roche, Foster City, USA
<i>Biotin nick translation mix</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, D
DEXPAT™ <i>kit</i>	TaKaRa BIO Inc, Shiga, Japan

LightCycler® *control kit*; LightCycler® FastStart DNA *Master* SYBR Green I; LightCycler® *color compensation kit*; LightCycler® FastStart DNA *Master* HybProbe

Roche Diagnostics, Mannheim, D

QIAamp DNA *mini kit*; QIAquick PCR *extraction kit* (dsDNA 100bp–10kb); MinElute PCR *purification kit* (dsDNA 70bp–4kb); QIAquick *gel extraction kit*; QIAGEN *plasmid maxi kit*;

DNA *Taq* Polymerase QIAGEN, Hilden, D

ECL Direct™ *nucleic acid detection system* GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

PicoGreen dsDNA *quantification kit* Molecular Probes Inc., Eugene, USA

TSA-Biotin-System NEL 700 Perkin Elmer, Jügesheim, D

TOPO TA cloning kit; *one shot* DHα Invitrogen, Breda, NL

Restriktionsenzyme New England Biolabs, Beverly, USA

2.1.7 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, mit autoklaviertem, demineralisiertem Wasser (millipore) hergestellt.

20x SSC (pH 7,0): 3,0 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat

20x SSPE (pH 7,4) : 3,6 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTA

1xTE (pH 8,0): 10 mM Tris/1 mM EDTA

DNA-Gelladepuffer (pH 8,0): 1x TE, 40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau

LB-Medium (1l; pH 7,0): 10 g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl

0,5 M Phosphat-Puffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,8)

0,5 M NaHCO₃ (pH 8,4)

50x Na-Citrat-Puffer (pH 6,0) ProTaqstura, Quartett GmbH, Berlin, D

50x TBS (pH 7,6) ProTaqstura, Quartett GmbH, Berlin, D

10x PBS (pH 7,0) BioWhittaker Europe, Cambrex, Verviers, B

50x TAE (pH 8,3) Gibco, Invitrogen Co., Paisley, UK

Foto-Entwickler G153 AGFA, Köln, D

Foto-Fixierlösung G354 AGFA, Köln, D

2.2 Methoden

Die Reaktionsschritte und Inkubationszeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Paraffin eingebettetem Gewebe

Abhängig von Größe und Beschaffenheit der eingebetteten Gewebeprobe wurden 5–15 Mikrotomschnitte einer Dicke von 5 μm in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit einer Deparaffinierungslösung (Dexpath, TaKaRa) und orientierte sich an den Angaben des Herstellers. Dabei wurden 0,5 ml Dexpath zu den Paraffinschnitten gegeben und gut gemischt. Bei der anschließenden Inkubation im Thermoschüttler (95°C, 10 min, 800 rpm) schmolz das Paraffin und konnte nach Zentrifugation (4°C, 10 min, 12.000 rpm) von der wässrigen, DNA-haltigen Suspension als sichtbarer Paraffindeckel abgetrennt werden. Anschließend wurden 200–400 μl wässriger Überstand abpipettiert und mit einem zusätzlichen Phenol/Isopropanol-Reinigungsschritt von letzten Geweberesten befreit. Die aufgereinigte DNA wurde mittels absolutem Ethanol unter Zugabe von 50 μl 3 M NaCl und 1 μl 20 mg/ml Glykogen (Roche) bei –20°C für mindestens 2 h gefällt. Die durch einen Zentrifugationsschritt pelletierte DNA wurde mit 75% Ethanol gewaschen, bei 60°C getrocknet und in 50–100 μl *Aqua ini.* aufgenommen.

2.2.1.2 DNA Isolierung aus Haarfollikelzellen

Drei bis 8 Haare der Augenbrauen, Körperhaare oder im Fall von *M. coucha* mindestens 20 Körperhaare wurden jeweils mit Haarwurzel steril in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bis zur Aufarbeitung bei –20°C gelagert. Die Isolierung der DNA wurde mit dem *tissue* Protokoll des QIAamp DNA *mini kit* (QIAGEN) nach Herstellerangabe durchgeführt.

Zuerst wurden die Haare zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min). Die Zellen wurden mit 20 μl Proteinase K und 180 μl Zell-Lysispuffer bei 56°C für mindestens 3 h im Thermoschüttler lysiert. Die DNA wurde durch die Bindung an eine Anionenaustauschersäule abgetrennt, gewaschen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfröhrchen durch 2 Elutionsschritte mit je 25–100

µl EB-Puffer gewonnen. Von der resultierenden 50–200 µl DNA-Lösung wurden für nachfolgende Experimente 1–10 µl eingesetzt.

2.2.1.3 DNA Isolierung aus humanem Gewebe (Biopsien)

Die Gewebestücke hatten einen Durchmesser von 2–3 mm, das entspricht etwa 25 µg DNA. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte unter Zugabe von 500 µl TE + 50,4 µl 10% SDS + 12,6 µl Proteinase K (Roth, 10mg/ml in *Aqua ini.*) bei 60°C im Thermoschüttler für mindestens 2 h. Nach der Zersetzung des Gewebes folgte eine Phenolreinigung mit anschließender Ethanol-Fällung. Dabei wurden ein Volumen (500 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) hinzugeben, die beiden Phasen gut gemischt, bis eine milchig-trübe Emulsion entstand. Nach der Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phenolreinigung wurde wiederholt, bis die wässrige Phase klar war. Unter Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaCl und 1–2,5 Volumen absoluten Ethanol wurde die DNA bei –20°C für mindestens 2 h gekühlt. Bei geringen DNA-Mengen (weniger als 1 µg) wurde die gefällte Menge an Nukleinsäure durch Zugabe von 1 µl Glykogen (20 mg/ml) erhöht. Die ausgefallene DNA wurde mittels Zentrifugation (4°C, 10 min, 14.000 rpm) pelletiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation (RT, 3 min, 14.000 rpm) bei 60°C für 10 min getrocknet und in 50–200 µl *Aqua ini.* aufgenommen. Das Pellet wurde im Thermoschüttler bei 60°C für 10 min gelöst. Die isolierten DNA-Proben wurden bei –20°C gelagert.

2.2.2 Virale Positivkontrollen

2.2.2.1 PV-Genome

Als Positivkontrollen dienten PV-Genome und Teilsequenzen von PV-Genomen in Bakterienvektoren. Das ermöglichte die einfache Vermehrung mittels *Escherichia coli*-Kulturen sowie die genaue Quantifizierung der extrahierten DNA. Für die Herstellung der Vektoren wurden die zirkulären PV-Genome mit einer spezifischen Endonuklease (Restriktionsenzym) geschnitten und in einen äquivalent geschnittenen, ebenfalls linearisierten Bakterienvektor durch Ligation eingefügt. Die erhaltene Vektor-PV-Hybrid-DNA entspricht in ihrem Aufbau einem bakteriellen Episom und wird nach der Aufnahme in

die Bakterienzelle (Transformation) durch die Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben und somit vermehrt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PV-Plasmide wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Alle Angaben zu den verwendeten PV-Plasmiden sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Papillomavirus-Plasmide

PV-Typ	Plasmid-Vektor	Schnittstelle	zur Verfügung gestellt von	Referenz(en)	Datenbank-Nummer (accession number)*
HPV-3	pBR322	<i>Bam</i> H I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Delius & Hofmann, 1994)	X74462
HPV-5	pBR322	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Zachow et al., 1987)	NC_001531
HPV-6b	pBR322	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Schwarz et al., 1983)	NC_001355
HPV-8	pUC19	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Fuchs et al., 1986)	M12737
HPV-11	pBR322	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Dartmann et al., 1986)	M14119
HPV-14d	pBR322	<i>Hind</i> III	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984) (Delius & Hofmann, 1994)	X74467
HPV-15	pBR322	<i>Bam</i> H I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984) (Delius & Hofmann, 1994)	X74468
HPV-17	pBR322	<i>Bam</i> H I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984) (Delius & Hofmann, 1994)	X74469
HPV-19	pBR322	<i>Bam</i> H I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984) (Delius & Hofmann, 1994)	X74470
HPV-20	pBR322	<i>Ava</i> I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984) (Gassenmaier et al., 1984)	U31778
HPV-21	pBR322	<i>Bam</i> H I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kremsdorf et al., 1984)	U31779
HPV-27	pUC19	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Delius & Hofmann, 1994) (Yamaguchi et al., 2005)	X74473 AB211993
HPV-36	pSP65	<i>Eco</i> R I	G. Orth, Institut Pasteur, Paris	(Kawashima et al., 1986)	U31785
HPV-57	pUC19	<i>Bam</i> H I	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Hirsch-Behnam et al., 1990) (Trujillo et al., 1996)	X55965 U37537
MnPV-1	pB322	<i>Hind</i> III	F. Rösl, DKFZ, Heidelberg	(Tan et al., 1994)	U01834

*Datenbank (NCBI nucleotide): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>

2.2.2.2 Transformation und Selektion mit Antibiotika

Die detaillierten Protokolle und verwendete Lösungen für Transformation, MiniPrep, MaxiPrep, Restriktionsverdau sind aus *Molecular Cloning* (Sambrook & Russell) entnommen. Zur Vermehrung der HPV-Plasmide wurde chemisch kompetente *E. coli* Bakterien (DH α) transformiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurde dem verwendeten Nährmedium das Antibiotikum zugesetzt, für welches das einzubringende Plasmid ein Resistenzgen besaß. Für die Erhaltung des Plasmids in der Zelle enthielten alle

nachfolgenden Schritte das erforderliche Antibiotikum. Als Antibiotika dienten Ampicillin (100 mg/ml in *Aqua ini.*) und Kanamycin (10 mg/ml in *Aqua ini.*) in einer Arbeitskonzentration von jeweils 50 µg/ml.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmiden aus 5 ml über Nacht-Kultur (DNA-MiniPrep)

Für die Überprüfung transformierter Bakterien wurden einzelne Kolonien (etwa 10) der beimpften Agarplatten steril entnommen und in jeweils 5 ml Luria Bertani-(LB-)Medium (mit Antibiotikum) überführt. Die Inkubation erfolgte im Bakterieneschüttler bei 37°C für 12–16 h, vorzugsweise über Nacht (ÜN-Kultur). Durch einen alkalischen Zellaufschluss, anschließender Neutralisation und einer Ethanol-Fällung wurden die Plasmid-DNA isoliert. Je nach Größe des DNA-Pellets wurde die DNA in 20–50 µl 1x TE gelöst und bei –70°C aufbewahrt.

2.2.2.4 DNA Isolierung aus 250 ml über Nacht-Kultur (DNA-MaxiPrep)

Ein Volumen von 250 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurde mit 1 ml der Mini-ÜN-Kultur beimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Plasmid DNA aus 250 ml ÜN-Bakterienkultur wurde nach Herstellerangabe mit dem *plasmid maxi kit* (QIAGEN) gewonnen. Je nach Größe des DNA-Pellets wurde es in 50–200 µl 1x TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der MaxiPrep Plasmide erfolgte bei –70°C.

2.2.2.5 Restriktionsverdau

Für die Verifizierung der nach DNA-Mini- und MaxiPrep isolierten DNA wurde diese mit spezifischen Restriktionsenzymen (New England Biolabs) verdaut. Zwischen 0,1–1 µg DNA wurde in einem Volumen von 20 µl mit 2 µl 10x Enzym-Puffer und 0,5 µl Enzym für mindestens eine Stunde bis über Nacht je nach verwendetem Enzym bei 25–65°C, meistens bei 37°C inkubiert. Für einige Enzyme wurde zum Ansatz nach Herstellerangabe 2 µl 1 mg/ml BSA-Lösung (engl. *bovine serum albumine*, New England Biolabs) hinzugeben. Die Auftrennung der gewonnenen Fragmente mittels einer Agarose-Gelelektrophorese zeigte ein Sequenzlängen-abhängiges Muster, das dokumentiert und ausgewertet wurde.

2.2.2.6 DNA-Quantifizierung

Für die Bestimmung der Viruslast wurden HPV-Plasmide in Konzentrationen von 10–10.000 Kopien/ μ l eingesetzt. Für die Herstellung der Verdünnungsreihen wurden die Plasmidlösungen exakt quantifiziert. Zur DNA-Quantifizierung wurde ein Verfahren angewendet, welches auf der Einlagerung eines Farbstoffes ausschließlich in doppelsträngige DNA beruht (PicoGreen dsDNA *quantification kit*, Molecular Probes). Mit einer Standardkurve wurden Konzentrationen von 5–250 ng/ml (5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/ml) erfasst. Die zu bestimmenden Proben wurden verdünnt und nach Herstellerangabe mit der Farbstofflösung inkubiert. Die anschließende Messung mit einer Anregungswellenlänge von 485/20 nm erfolgte im Spektrofluorometer bei 530/25 nm. Die Messwerte der Proben wurden von der angeschlossenen Recheneinheit ausgegeben.

2.2.3 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, allgemein mit PCR (engl. *polymerase chain reaction*) abgekürzt, wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt (Mullis & Faloona, 1987). Durch stetige Weiterentwicklung ist sie heute eine vielseitig eingesetzte Methode zur *in vitro*-Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen. Für die Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts wird eine DNA-Matrize mit 2 Startermolekülen (Oligonukleotide, engl. *primer*), die beide Seiten des Abschnitts flankieren, sowie die 4 verschiedenen Desoxynukleosid-Triphosphate mit den Basen Adenin, Cytosin, Guanin, und Thymin benötigt. In einer chemischen Reaktion, der allein durch eine zyklische Temperaturänderung gesteuert wird, baut eine thermostabile DNA-Polymerase daraus komplementäre Stränge zur DNA-Vorlage auf. In etwa 30–50 Wiederholungen werden 3 temperaturabhängige Reaktionsschritte nacheinander durchgeführt, die zur exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnittes führen:

1. **Denaturierung** des Doppelstrangs (bei mehr als 90°C);
2. **Hybridisierung** der spezifischen Oligonukleotide (engl. *annealing*) erfolgt sequenzabhängig bei 35–65°C;
3. Verlängerung der Oligonukleotide komplementär zur gebundenen DNA-Vorlage (**Elongation**), abhängig von der verwendeten Polymerase; bei etwa 70°C).

Es gibt eine Reihe verschiedener Modifikationen dieser allgemeinen PCR. Durch die Verwendung mehrerer vorwärts und rückwärts bindender Oligonukleotide können

beispielsweise mehrere Sequenzen gleichzeitig amplifiziert werden (Multiplex-PCR), die durch erweiterte Nachweismethoden differenziert werden können. Ein Beispiel hierfür ist die für diese Arbeit wichtige BGC-PCR zur Identifizierung kutaner HPV-Infektionen.

2.2.4 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Mittels PCR wurden spezifische Bereiche bestimmter HPV-Typen amplifiziert. Zum einen wurde die durch BGC-PCR und RLB erhaltenen HPV-Ergebnisse verifiziert, zum anderen konnten die amplifizierten Fragmente anschließend sequenziert oder kloniert werden. Die in der quantitativen PCR (siehe Abschnitt 2.2.6) verwendeten Oligonukleotide wurden zuvor in einer konventionellen PCR eingesetzt, um ihre Spezifität zu kontrollieren und die erforderliche Hybridisierungstemperatur zu bestimmen.

Ein PCR-Ansatz enthielt grundsätzlich die DNA-Matrize, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribose-Triphosphate (dNTP), 2 Oligonukleotide (F und R) in einer geeigneten Pufferlösung mit Magnesiumionen. Letztere sind essentiell für die Funktion der Polymerase, da sie einen löslichen Komplex mit den dNTP bilden und die Polymerase-Aktivität stimulieren. In der durchgeführten PCR wurde vor allem *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* QIAGEN) oder industriell veränderte Formen verwendet (Ampli*Taq*Gold). Die Pufferlösung war in ihrer Zusammensetzung sowie dem pH-Wert an die eingesetzte Polymerase angepasst und wurde vom Hersteller mitgeliefert.

Pipettierschema 1: Konventionelle PCR

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
F-Oligonukleotid (100 µM)	0,5 µM	0,5 µl
R-Oligonukleotid (100 µM)	0,5 µM	0,5 µl
dNTP (2 mM)	0,2 mM	5,0 µl
10x Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	1x	5,0 µl
MgCl ₂	1,5 mM	
DNA		1–5 µl *
<i>Taq</i> QIAGEN (5 U/µl)	1,5 U	0,3 µl
PCR-Wasser		38,2–34,2 µl *
Gesamtvolumen pro Ansatz		50 µl

*Abhängig von der DNA-Konzentration und Qualität

Die Oligonukleotide wurden so generiert, dass sie bei einer Länge von etwa 20 Basen hochspezifisch waren und einen theoretischen Schmelzpunkt von 60°C besaßen. Für eine schnelle und effiziente Suche von Oligonukleotiden wurde die Internet-Suchmaschine primer3 in Anspruch genommen (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Der Schmelzpunkt ist abhängig von Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotide (Verhältnis von A–T zu G–C). Die Hybridisierungstemperatur wurde für jede neue PCR mittels einer Gradienten-PCR ausgetestet. Hierbei wurde der Mastermix aliquotiert und mit der gleichen DNA-Menge als Positivkontrolle eine PCR durchgeführt, die sich jeweils in der Anlagerungstemperatur unterschied (55°C, 58°C, 60°C, 63°C und 65°C).

Temperaturprotokoll 1: Eppendorf Mastercycler Gradient

Schritt	T [°C]	t [s]	n [Zyklen]
Initiale Denaturierung	96	240	1
Denaturierung	96	45	} x40
Hybridisierung	55–65 ^a	45	
Elongation	72	45–90 ^b	
Finale Elongation	72	240	1
Abkühlung	4	∞	1

^a die spezifischen Hybridisierungstemperaturen jeder PCR sind in Tabelle 2.3 zu finden

^b Elongationszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes
1 kb/min (*Taq* Polymerase)

Tabelle 2.3: Spezifische Oligonukleotide für konventionelle PCR und Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz 5'–3'	Position ORF	Produktgröße	MgCl ₂	T _{hyb}	Verwendung
BG_PC03 F	ACA CAA CTg TgT TCA CTA gC	70558–577	210 bp	1,5 mM	55°C	β-Globin (NG_000007) DNA-Kontrolle
BG_PC05 R	gAA ACC CAA gAg TCT TCT CT	70748–767				
HPV-8 E6 F	CAA TgC TgT gAC TTg TgC AAT	163–183	516 bp	1,5 mM	60°C	HPV-8 spezifisch Sequenzierung
HPV-8 E6 R	TgC ACA gTg ACC TCT TTA CCA A	657–678				
HPV-14D E6 F	ggC gAC AAC TgA CTC TTC AAC	198–218	150 bp	1,5 mM	55°C	HPV-14D spezifisch Sequenzierung
HPV-14D E6 R	AgT ggT ATT TCC AAT Agg TTT gC	325–347				
HPV-21 E6 F	gCC CTA gTA CTC ATg gCT gAC	188–208	268 bp	1,5 mM	60°C	HPV-21 spezifisch Sequenzierung
HPV-21 E6 R	CAA ACA CAC AAT gAT CTT TCC AA	433–455				
HPV-36 E6 F	ATA ATT AAg gCA AAT ggC AgA gC	187–209	153 bp	1,5 mM	60°C	HPV-36 spezifisch Sequenzierung
HPV-36 E6 R	AAT TTg CCA CAA AAg TTA CAA gg	317–339				

bp, Basenpaare; F, vorwärts; ORF, offener Leserahmen; R, rückwärts; T_{hyb}, Hybridisierungstemperatur

2.2.5 Genotypisierung kutaner und mukosaler Papillomaviren mittels *Reverse Line Blot*

2.2.5.1 Nachweis kutaner/EV HPV-Typen der β - und γ -Papillomaviren mittels BGC-PCR⁶

Die *Beta-Gamma-Cutaneous-PCR* (BGC-PCR) ermöglicht den Nachweis einer großen Anzahl kutaner HPV-Typen der β - und γ -Gruppe durch die Amplifikation eines konservierten Bereiches innerhalb des HPV-L1-Gens. Unter Verwendung von 6 in Genrichtung bindenden (F-Mix) und 8 entgegengesetzt bindenden (R-bio-Mix) DNA-Oligonukleotiden entsteht aus dem flankierten Bereich ein 72 bp langes PCR-Produkt (Pipettierschema 2). Die Biotinylierung der rückwärtigen (R) Oligonukleotide resultiert in einer Biotinmarkierung des Amplikons, das im anschließenden *Reverse Line Blot* (RLB) durch die Bindung an typenspezifische Sonden nachgewiesen werden kann.

Pipettierschema 2: BGC-PCR

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
F-Mix	0,25 μ M	1 μ l
R-bio-Mix (je Oligonukleotid 12,5 μ M)	0,25 μ M	1 μ l
dNTP (2 mM)	0,2 mM	5 μ l
10x Puffer	1x	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	0,75 μ l
DNA		1–5 μ l*
Ampli <i>Taq</i> Gold (5 U/ μ l)	1 U	0,2 μ l
PCR-Wasser		38,2–34,2 μ l *
Gesamtvolumen pro Ansatz		50 μl

* abhängig von der DNA-Konzentration und Qualität

⁶ Die Sequenzen der Oligonukleotide und Sonden wurden von C. J. L. M. Meijer und P. J. F. Snijders des Instituts für Pathologie, Vrije Universität Amsterdam zur Verfügung gestellt und sind veröffentlicht bei Brink, A. A., B. Lloveras, I. Nindl, D. A. Heideman, D. Kramer, R. Pol, M. J. Fuente, C. J. Meijer & P. J. Snijders. 2005. Development of a general-primer-PCR-reverse-line-blotting system for detection of beta and gamma cutaneous human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5581-7.

Jedes PCR-Experiment (BGC/GP-PCR) enthielt 3 Negativkontrollen mit 100 ng DNA aus humaner Plazenta sowie 3 Positivkontrollen mit 10, 100 oder 1000 Kopien eines HPV-Plasmids ebenfalls mit 100 ng Plazenta-DNA als Hintergrund. Alle Proben wurden mindestens zweimal an verschiedenen Tagen analysiert. Die HPV-Ergebnisse positiver Proben wurden nur gewertet, wenn sie in 2 PCR-Analysen nachgewiesen wurden.

Temperaturprotokoll 2: Perkin Elmer 9600

Schritt	T [°C]	t [s]	Δt für ΔT [s]*	n [Zyklen]
Initiale Denaturierung	94	240		1
Denaturierung	94	20	114	} x40
Hybridisierung	38	60	120	
Elongation	72	80	78	
Finale Elongation	72	240		1
Abkühlung	4	∞		1

* Temperaturänderung von der vorherigen Temperatur wird in der angegebenen Zeit erreicht

2.2.5.2 Nachweis mukosaler HPV-Typen mittels GP-PCR⁷

Für die Identifizierung mukosaler HPV-Typen wurden die Oligonukleotide GP5+ (F) und GP6+ (R) mit einer Endkonzentration von 1 μ M und einer erhöhten Magnesiumkonzentration von 3,5 mM verwendet. Alle weiteren Komponenten des 50 μ l Ansatz entsprachen dem Pipettierschema 2. Das Temperaturprotokoll war identisch mit dem der BGC-PCR.

2.2.5.3 Prinzip des Reverse Line Blot

Das Prinzip des RLB ist dem des *Southern Blot* abgeleitet, wobei DNA-Fragmente durch spezifische DNA-Sonden identifiziert werden. Im Gegensatz zum *Southern Blot* sind beim RLB aber nicht die nachzuweisenden DNA-Fragmente, sondern die spezifischen

⁷ Die Sequenzen der Oligonukleotide und Sonden sind veröffentlicht bei van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM & Snijders PJF.2002. GP5+/6+ PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes, *Journal of Clinical Microbiology* 40: 779–787

Sonden kovalent an eine Membran gekoppelt (Abbildung 2.1). Für die Kopplung tragen die DNA-Sonden am 5'-Ende eine reaktive Aminogruppe (5'-C6-NH₂). Nach einer Aktivierung der negativ geladenen Carboxylgruppen (-COO⁻) auf der Membranoberfläche (1) durch ein Carbodiimid-Derivat (EDAC) kann die 5'-Aminogruppe der Sonde dieses wieder verdrängen (2), und es entsteht eine thermostabile Amidbindung (3). Nach der Denaturierung des biotinylierten PCR-Produktes kann die Sonde spezifisch mit dem markierten Einzelstrang hybridisieren (4). Für den Nachweis des gebundenen Amplikons wird dieses indirekt durch die Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidin erkannt (5). Anschließend setzt die Peroxidase ein lumineszierendes Substrat um, das durch die Belichtung eines Filmes dokumentiert werden kann.

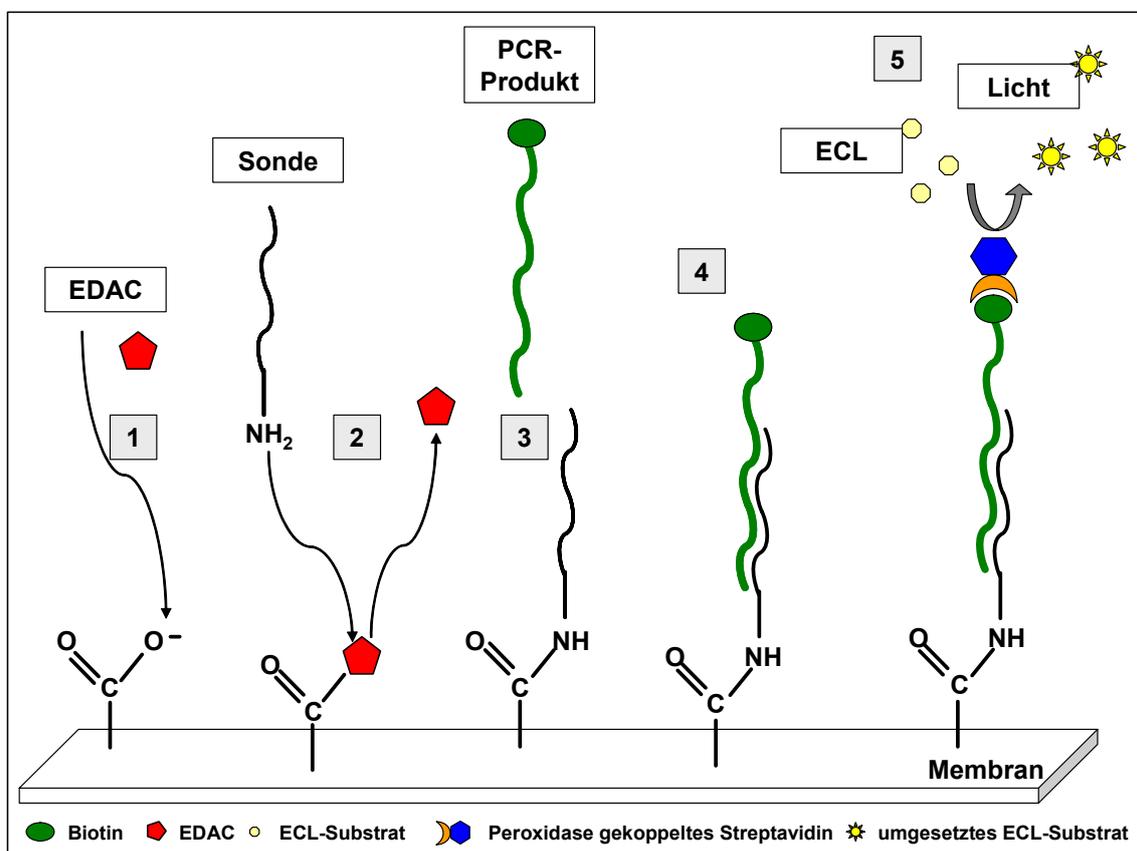


Abbildung 2.1: Prinzip des *Reverse Line Blot*: (1) Aktivierung der negativ geladenen Membranoberfläche durch EDAC; (2) Bindung der spezifischen Oligonukleotid-Sonde (3); Generierung der biotinylierten PCR-Produkte in der BGC-PCR; (4) Hybridisierung der denaturierten PCR-Produkte mit den spezifischen Sonden; (5) Nachweis der gebundenen PCR-Produkte durch Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidin an Biotin und Umsetzung eines Substrates (ECL).

2.2.5.3.1 Kovalente Kopplung der Oligonukleotid-Sonden an die Membran

Die Sonden wurden in 150 μ l 500 mM NaHCO₃, (pH 8,4) auf 200 pmol verdünnt. Für die Aktivierung der negativ geladenen Membranoberfläche (Biodyne C) erfolgte eine Inkubation mit 10 ml frisch angesetzter EDAC-Lösung in einer Plastikschiene bei Raumtemperatur für 10 min. Nach der Inkubation wurde die aktivierte Nylonmembran 10 sec in 100 ml Wasser (millipore) gespült und für die spätere Orientierung eine Ecke der Membran abgeschnitten. Anschließend wurde die Membran auf ein Auflagepolster im Miniblotter (MN45) platziert (A, Abbildung 2.2). Der Miniblotter wurde fest verschlossen und die Kanäle mit einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt.

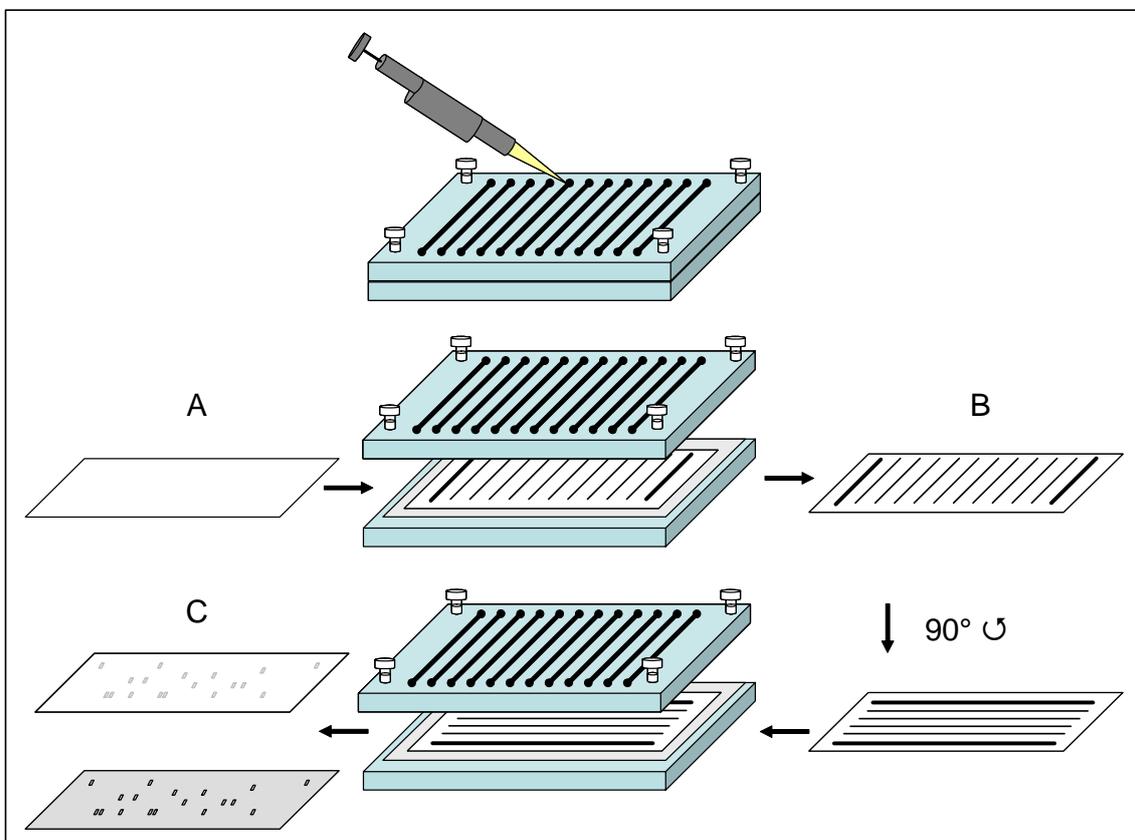


Abbildung 2.2: Durchführung des *Reverse Line Blot*, Miniblotter MN45. (A) Die aktivierte Nylonmembran wurde in den Miniblotter eingespannt und durch die Rillen die gelösten Oligonukleotid-Sonden aufgetragen. (B) Die inaktivierte, fertige Membran wurde um 90° verdreht erneut in den Miniblotter eingespannt und die denaturierten, biotinylierten PCR-Produkte durch die ebenfalls in Rillen auf die Membran zur Hybridisierung gebracht. (C) Spezifisch gebundene PCR-Produkte konnten anschließend durch die Belichtung eines Filmes dokumentiert werden.

In die ersten und letzten 2 der 45 Kanäle wurde als Markierung verdünnte Schreibtinte (1:50 in *Aqua ini.*) gefüllt, danach wurden die vorbereiteten 150 µl Sondenlösung aufgetragen bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit mittels Wasserstrahlpumpe wurde die Membranoberfläche für maximal 10 Minuten in frisch hergestellter 100 mM NaOH-Lösung inaktiviert und anschließend für 1 min in Wasser geschwenkt. Eine längere Inaktivierungszeit resultierte in einer Abnahme der Sensitivität. Ein Waschschrift bei 60°C für 5 min in 100 ml 2x SSPE, 0,1% SDS schloss die Herstellung der Membran ab. Für eine spätere Verwendung wurde die Membran erst in 100 ml 20 mM EDTA (pH 8) bei RT für 15 min gewaschen und in einer Plastikfolie mit ungefähr 5 ml 20 mM EDTA (pH 8) eingeschweißt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5.3.2 Hybridisierung der PCR-Produkte

Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt in 150 µl 2x SSPE, 0,1% SDS verdünnt und bei mindestens 95°C für 10 min denaturiert. Bis zum Probenauftrag verhinderte eine sofortige Kühlung auf Eis für mindestens 10 min die Renaturierung der DNA-Einzelstränge. In der Zwischenzeit wurde die Membran für 5 min in 100 ml 2x SSPE, 0,1% SDS geschwenkt und anschließend auf einem Auflagepolster platziert. Das Einspannen in den Miniblotter erfolgte zur Lage der Kopplung (B, Abbildung 2.2) um 90° gedreht, die sichtbaren Tintenlinien der Kopplung dienten hierbei als Orientierung. Vor dem Auftrag der Proben wurden die Kanäle mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt und anschließend die verdünnten PCR-Produkte luftblasenfrei in die Kanäle pipettiert. Auch hier wurden die ersten und die letzten 2 Kanäle mit verdünnter Tinte beziehungsweise Puffer gefüllt. Die Hybridisierung erfolgte auf einer horizontalen Oberfläche bei 42°C für 1 h im Hybridisierungsofen GFL7601.

Nach dem Absaugen der Proben wurde die Membran aus dem Miniblotter entnommen und zweimal in je 100 ml 2x SSPE, 0,5% SDS bei 51°C für 10 min unter leichtem Schütteln im Wasserbad gewaschen. Für den Nachweis der gebundenen PCR-Produkte wurde die hybridisierte Membran in einer Rollflasche mit 10 ml in 1:4000 verdünnter Streptavidin-POD-Lösung bei 42°C für 45 min im Hybridisierungsofen inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimal in 100 ml 2x SSPE, 0,5% SDS bei 42°C für 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen und zweimal in 2x SSPE auf dem Taumler bei RT für je 5 min gespült.

Die Dokumentation der gebunden Proben erfolgt mittels Chemilumineszenz und anschließender Belichtung eines Röntgenfilms (C, Abbildung 2.2). Dafür wurde die Membran mit 3 ml eines frisch hergestellten ECL-Reaktionsgemisches für max. 1 min inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran mit einem Röntgenfilm in einer Kassette für 2 bis maximal 16 h belichtet. Für die Entwicklung wurde der Film für 3 min in Entwicklerlösung geschwenkt, gefolgt von einem Spülschritt von 1 min in Leitungswasser. Nach einem 1 min Fixierbad, der Reinigung des Films in Leitungswasser und abschließender Trocknung wurden die Ergebnisse dokumentiert und ausgewertet.

2.2.5.3 Entfernen der hybridisierten PCR-Produkte – *Strippen* der Membran

Die sondengekoppelte Membran konnte bis zu zehnmal verwendet werden. Dafür wurden die hybridisierten Proben durch das zweimalige Waschen in 1%iger SDS-Lösung im Wasserbad bei 80°C für 30 min entfernt. Nach anschließendem Spülen in 20 mM EDTA (pH 8) bei RT für 15 min wurde die Membran bis zur nächsten Verwendung mit etwa 5 ml 20 mM EDTA (pH 8) in Plastik eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5.4 Nachweis von α - (A2 und A4), μ - und ν -Papillomaviren

Der Nachweis der mukosalen und Warzen-assoziierten α -HPV-Typen der viralen Spezies A4 erfolgte mit einer *nested*-PCR (MY09/MY11, MYN9/MYN10; (Manos et al., 1989). Die A2-HPV-Typen und die μ - und ν -Spezies wurden in einer Einzel-PCR (CN3F/CN3R beziehungsweise CN1F/CN1R; (Harwood et al., 1999b) amplifiziert. Die Identifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch anschließende Sequenzierung.

Die Analysen der mukosalen α -HPV-Typen und Warzen-assoziierten α -, μ - und ν -HPV-Typen wurden von unseren Kooperationspartnern des Institutes für Pathologie und Molekularer Biologie (IMP) in Hamburg durchgeführt (Dr. Th. Meyer, Labor Prof. Arndt und Partner) (Nindl et al., 2004).

2.2.5.5 Sequenzierung

Die Basenfolge eines DNA-Stranges bestimmt man heute hauptsächlich mit der durch F. Sanger erstmals beschriebenen Didesoxy- oder auch Kettanabbruchmethode (Sanger et al.,

1977). Es handelt sich um eine PCR-basierte Methode bei der eine DNA-Polymerase nur ein statt 2 Oligonukleotide komplementär zur DNA-Vorlage verlängert. Neben den 4 dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) werden auch Didesoxynuklotide (ddNTP) eingebaut, die nicht weiter verlängert werden können und so zu einem zufälligen Abbruch der Strangsynthese führen. Es entstehen unterschiedlich lange Ketten, die durch eine Markierung der Abbruchnukleotide nachweisbar sind. Vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die 4 Abbruchnukleotide markiert sind, ermöglichen die Durchführung der gesamten Reaktion innerhalb eines Ansatzes. Die PCR-Produkte werden mittels einer hoch auflösenden Gelelektrophorese (Kapillargelelektrophorese) getrennt und geben aufgrund ihrer Markierung und Länge die komplementäre Basenabfolge der DNA-Vorlage wieder.

Pipettierschema 3: Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Volumen pro Probe
F oder R Oligonukleotid (3 μM)	1 μl
dRhodamin/BigDye	6 μl
DNA	1–12 μl *
PCR-Wasser	0–11 μl *
	20 μl

* abhängig von der DNA-Konzentration und Fragmentlänge

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden diese in einer Agarosegelelektrophorese getrennt, ausgeschnitten und aus dem Gel mittels QIAquick *gel extraction kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Mit den eluierten PCR-Produkten wurde eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Je 2 Ansätze wurden zur Entschlüsselung eines PCR-Produktes benötigt. Jeder Ansatz enthielt nur einen der vorher verwendeten Oligonukleotide (F oder R), das heißt, es erfolgt eine lineare, und keine exponentiellen Vermehrung der eingesetzten DNA. Hinzugefügt wurden fluorophormarkierte Abbruchnukleotide, nicht-fluorophormarkierten Nukleotide, *Taq*-Polymerase und Mg^{2+} -Salz in der notwendigen Konzentration in einem gebrauchsfertigen Mix (dRhodamin/BigDye, ABI PRISM BigDye *terminator reaction kit*; Applied Biosystems).

Die eingesetzte DNA-Menge variierte mit der Länge des PCR-Produktes (2 ng für 200 bp, bis zu 100 ng bei über 2.000 bp). Die Sequenzierung wurde mit dem 310 ABI Prism System (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein allgemeines Protokoll findet sich im ABI

PRISM BigDye *Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Protocol* (Version 2.0, 2000, Applied Biosystems).

Temperaturprotokoll 3: Biometra T3 Thermocycler

Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	30	1
Denaturierung	96	30	} x25
Hybridisierung	50	15	
Elongation	60	240	
Abkühlung	10	∞	1

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Sequence Navigator* Software von Applied Biosystems und der Datenbank des ‚National Center for Biotechnology Information‘ (NCBI Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequenzmutationen wurden nur angegeben, wenn sie in 2 unabhängig erzeugten PCR-Produkten im F- als auch R-Strang nachgewiesen werden konnten.

2.2.6 Quantitative Bestimmung der Viruslast

2.2.6.1 Grundlagen der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde ursprünglich für die rein qualitative Analyse von geringen DNA-Mengen entwickelt. Durch die exponentielle Reaktion ist aber auch eine Quantifizierung eingesetzter DNA-Mengen möglich. Diese wurde durch die Entwicklung der quantitativen Echtzeit (engl. *real-time*) -PCR (Q-PCR) realisiert. Zur Beobachtung aller Reaktionsschritte werden Farbstoffe (z. B. SYBR Green) eingesetzt, die eine Steigerung der Fluoreszenz durch die Einlagerung in doppelsträngige DNA (dsDNA) aufweisen (Abbildung 2.3). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von fluoreszierenden Hybridisierungssonden (Abbildung 2.3, C und D), die die Interaktion von 2 Farbstoffen miteinander benötigt um ein Mess-Signal zu erzeugen.

Die beiden unterschiedlich markierten Sonden (mit den Fluorophoren F1 und F2) binden in einem spezifischen Abstand zueinander an das neu entstandene PCR-Produkt. Das Fluorophor F1 (z. B. Fluorescein) wird durch einen Laser mit der Anregungswellenlänge λ_1 angeregt. Das Emissionsspektrum E_1 kann vom Meßsystem nicht erfasst werden. Erst wenn sich Fluorophore in spezifischem Abstand zueinander befinden, erfolgt ein strahlungsloser

Energietransfer vom F1 zu F2 (engl. *fluorescence resonance energy transfer*: FRET). Das Fluorophor F2 gibt dann die übertragene Energie als Licht seines Emissionsspektrums E2 ab.

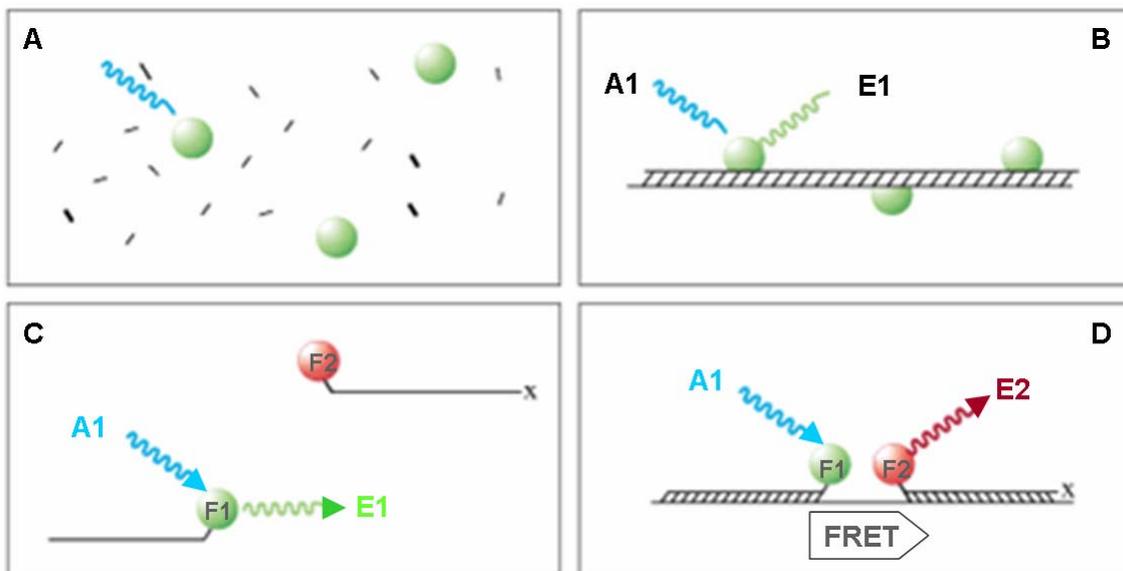


Abbildung 2.3: Quantitative PCR, entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green: (A) und (B), oder mit Hybridisierungssonden: (C) und (D). SYBR Green zeigt ohne die Bindung an dsDNA keine messbare Fluoreszenz (B). Mit Bindung an doppelsträngige DNA wird Licht der Wellenlänge E1 emittiert, deren Intensität relativ zur vorhandenen DNA-Menge ist. (C) und (D) Bei der Verwendung von Hybridisierungssonden wird die zu messende Wellenlänge E2 nur emittiert, wenn beide markierten Oligonukleotide in spezifischem Abstand zueinander an die DNA-Sequenz binden und ein strahlungsloser Energietransfer (FRET) von Fluorophor F1 zu Fluorophor F2 erfolgt.

Die Entwicklung der Fluoreszenz bei ansteigender Produktmenge kann bei beiden Nachweismethoden, der Farbstoffeinlagerung in dsDNA und der Anlagerung spezifischer Hybridisierungssonden, mit jedem neuen Zyklus verfolgt und aufgezeichnet werden. Beide Techniken finden Anwendung in der Q-PCR im LightCycler Instrument (Roche). Aus den gemessenen Werten ermittelt eine Recheneinheit eine Kurvenfunktion und legt aufgrund des Signal-/Hintergrund-Verhältnisses einen Schwellenwert fest, an dem das Fluoreszenzsignal den Hintergrund verlässt. Der Schnittpunkt von Schwellenwert und Fluoreszenzsignal wird als Kreuzpunkt (engl. *crossing point*: CP) bezeichnet und dient bei beiden Varianten als Messwert (Abbildung 2.4 A). Der CP-Wert ist abhängig von der Effizienz der PCR und der Menge an eingesetzter DNA. Für die Ermittlung der DNA-Menge einer unbekannt Probe wird eine Standardkurve aus bekannten DNA-Konzentrationen erzeugt und mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung unbekannte Proben bestimmt (*LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Roche).

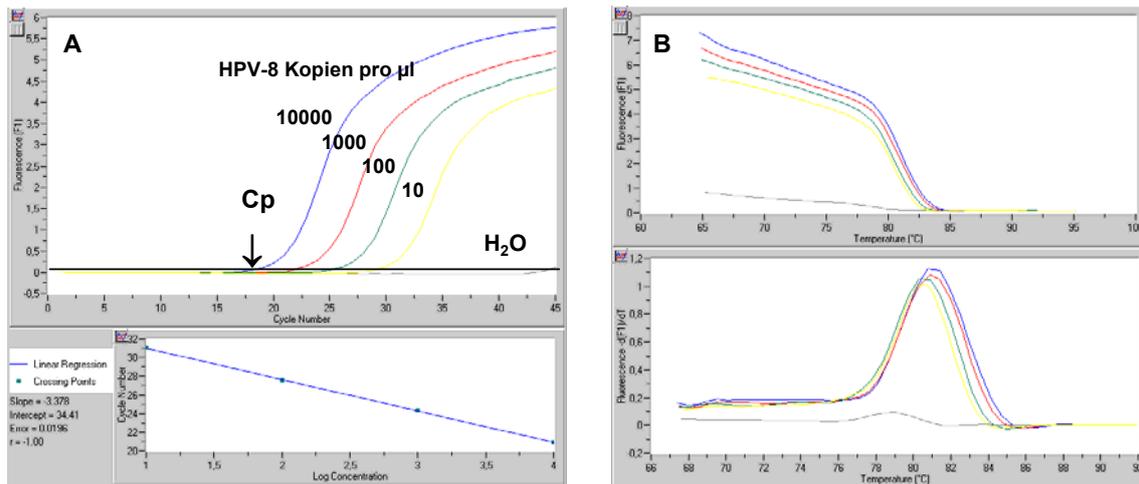


Abbildung 2.4: Quantitative PCR von HPV-8 mit Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. (A) Ermittlung der Standardgeraden (unten) aus den CP-Werten der Standardproben (10000, 1000, 100, 10 Kopien einer HPV-8-Plasmid Verdünnungsreihe): mit einem Anstieg von $-3,378$ und einem Schnittpunkt mit y bei $34,41$. Auf der x-Achse ist der dekadische Logarithmus der Konzentration (von 10 – 10000 Kopien) angegeben. (B) Schmelzkurvenanalyse von HPV-8-Standardproben (10000, 1000, 100, 10 Kopien). Abnehmendes Fluoreszenzsignals (oberer Graph) im Kanal F1 mit steigender Temperatur (von links nach rechts, 60 – 100°C). Bestimmung von T_m (unterer Graph: Fluoreszenzänderung über die Temperaturänderung $-dF1/dT$).

Nach der Beendigung aller Amplifikationschritte der PCR wird zur Kontrolle eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abbildung 2.4 B). Die Schmelztemperatur T_m einer Sequenz bezeichnet die Temperatur, bei der sich die Hälfte der Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt hat. Aufgrund ihrer spezifischen Basenfolge zeichnet sich jede DNA-Sequenz durch eine spezifische Schmelztemperatur aus. Die Trennung der Stränge ist als Abnahme des Fluoreszenzsignals messbar und wird durch die Freisetzung des Doppelstrang-bindenden SYBR Green als auch der Hybridisierungssonden dargestellt. Die Schmelzkurvenanalyse gewährleistet, dass spezifische Amplikons gemessen wurden und nicht Nebenprodukte wie Oligonukleotid-Dimere.

2.2.6.2 Quantitative PCR mit SYBR Green

Der LightCycler-Fast Start *Master* SYBR Green I (Roche) wurde nach Herstellerangabe angesetzt. Dafür wurden $10\ \mu\text{l}$ des FastStart Enzyme in ein neues Röhrchen FastStart *Reaction Mix* SYBER Green I pipettiert und sorgfältig vermischt. Dieses Gemisch ($10\times$) enthielt neben der Polymerase und dem Farbstoff SYBR Green I die erforderlichen Puffersalze für den Reaktionsansatz und eine initiale Menge an Magnesiumionen ($10\ \text{mM}$). Für die Optimierung der Magnesiumkonzentration wurde jede neue PCR mit 5 verschiedenen

Magnesium-Konzentrationen (2, 3, 4, 5 oder 6 mM) mit der bereits optimierten Hybridisierungstemperatur ausgetestet. Aufgrund der sehr schnellen Temperaturwechsel im LightCycler werden höhere Magnesiumkonzentrationen als bei einer konventionellen PCR benötigt, meist zwischen 3–5 mM Mg^{2+} . Es wurden sowohl 20 μ l als auch 5 μ l-Ansätze verwendet. PCR-Ansätze mit 5 μ l wurden verwendet, wenn Probenvolumina mit sehr geringen DNA-Konzentrationen zur Verfügung standen.

Pipettierschema 4: LightCycler PCR-Ansatz mit SYBR Green

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe	Volumen pro Probe
F-Oligonukleotid (100 μ M)	0,5 μ M	0,1 μ l	0,025 μ l
R-Oligonukleotid (100 μ M)	0,5 μ M	0,1 μ l	0,025 μ l
10x LightCycler-FastStart <i>Master</i> SYBR Green I	1x	2 μ l	0,5 μ l
inkl. 10 mM $MgCl_2$	1 mM		
$MgCl_2$ (25 mM)	4 mM	2,4 μ l	0,6 μ l
DNA		*1–5 μ l	1 μ l
LC-PCR-Wasser		*10,4– 14,4 μ l	3,05 μ l
		20 μl	5 μl

Temperaturprotokoll 4: LightCycler™ (Roche) Instrument 1.0/1.5

Schritt	T [°C]	t [s]	ΔT [°C/s]	n [Zyklen]
Initiale Denaturierung	95	600		1
Amplifikation				
Denaturierung	95	10		} x45
Hybridisierung	58-65 ^a	5		
Elongation ^b	72	10		
Schmelzkurvenanalyse				
Denaturierung	95	0		1
Hybridisierung	65	15		1
Schmelzen	95	0	0,1	1
Abkühlung	40	∞		

^a Oligonukleotid-abhängige Temperatur, siehe Tabelle 2.4

^b während diesen Schrittes wird die Fluoreszenz gemessen

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgelistet, ebenso wie die jeweiligen Hybridisierungstemperaturen und Mg^{2+} -Konzentrationen. Im LightCycler Instrument (Roche) wurde die Lösung zuerst bei 95°C für 10 min denaturiert, wobei die enthaltene Hot Start Polymerase aktiviert wurde. Die Messung der Fluoreszenz (Kanal F1) erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Elongation durch die Polymerase. Damit konnte die Menge an neu entstandener DNA nach der Einlagerung von SYBR Green direkt erfasst werden.

Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurde zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte diese in einem 3%igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, um die Amplikongröße zu dokumentieren. Von allen Proben wurden in einem Experiment Dubletten gemessen und jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt. Bei der Messung der Zelläquivalente wurden 3 Standardproben mit 10, 1 und 0,1 ng DNA ebenso wie Wasser als Negativkontrolle gemessen. Für die Ermittlung der Viruskopien wurden 3 Positivkontrollen mit 1.000, 100 und 10 Viruskopien und 2 Negativkontrollen, Wasser und 1 ng Hintergrund-DNA mitgeführt.

2.2.6.3 Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden wurden zur Erfassung von 2 unterschiedlichen PCR-Produkten innerhalb eines Ansatzes eingesetzt. Möglich wurde dies durch die unterschiedliche Fluorophor-Markierung der Sonden. Im LightCycler Instrument (Roche) wurden die Signale in unterschiedlichen Kanälen gemessen, bei 640 nm (Kanal F2) und 705 nm (Kanal F3). Für eine korrekte Messung der Fluoreszenz in den einzelnen Kanälen wurde eine Eichung des Gerätes nach den Angaben des Hersteller durchgeführt (*color compensation kit*, Roche), wobei die spezifischen Gerätekonstanten für die Korrektur gespeichert wurden. Bei der Messung der Proben wurde die gespeicherte Datei zur Korrektur am LightCycler Instrument angegeben und automatisch durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden 60 µl des FastStart *Reaction Mix* HybProbe (Roche) in ein neues Röhrchen FastStart Enzym pipettiert und sorgfältig vermischt. Dieses Gemisch (10x) enthielt die Polymerase, die erforderlichen Puffersalze für den Reaktionsansatz und eine initiale Menge an Magnesiumionen (10 mM). Außerdem wurden jeweils beide Sonden (Tabelle 2.4) für den Nachweis eines HPV-Typen vorher vermischt. Sondenmix 1 enthielt die Ankersonde (FL) und Sendersonde (LC640) für HPV-27, Sondenmix 2 dagegen die

Ankersonde (FL) und Sendersonde (LC705) für HPV-57. Für die Optimierung der Magnesiumkonzentration wurde zuvor eine SYBR Green Q-PCR ohne Sonden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Pipettierschema 5: LightCycler PCR-Ansatz mit Hybridisierungssonden

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
F-Oligonukleotid (100 µM)	0,5 µM	0,1 µl
R-Oligonukleotid (100 µM)	0,5 µM	0,1 µl
LightCycler-FastStart <i>Master</i> HybProbe 10x	1x	
10 mM MgCl ₂	1 mM	2 µl
HybProbeMix 1 (HPV 27FL+LC640)	0,2 µM	2 µl
HybProbeMix 1 (HPV 57FL+LC705)	0,2 µM	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	1,6 µl
DNA		1–5 µl
LC-PCR-Wasser		11,2–7,2 µl
		20 µl

Temperaturprotokoll 5: LightCycler™ Instrument 1.0/1.5

Schritt	T [°C]	t [s]	ΔT [°C/s]	n [Zyklen]
Initiale Denaturierung	95	600		1
Amplifikation				
Denaturierung	95	10		} x45
Hybridisierung*	55	5		
Hybridisierung	55	5		
Elongation	72	10		
Schmelzkurvenanalyse				
Denaturierung	95	0		1
Hybridisierung	45	15		1
Schmelzen	95	0	0,1	1
Abkühlung	40	∞		

* Fluoreszenzmessung

Von allen Proben wurden in einem Experiment Dubletten gemessen, und jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt. Zwei Standardreihen der zu bestimmenden HPV-Typen wurden mitgeführt, jeweils mit 10000, 1000, 100 und 10 Viruskopien. Die 2 Negativkontrollen enthielten Wasser beziehungsweise 1 ng Plazenta-DNA. Auch hier wurde

zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse eine Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte in einem 3%igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese durchgeführt, um die Amplikongröße zu dokumentieren.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Q-PCR

Oligonukleotid	Sequenz 5'–3'	Position ORF	Produktgröße	MgCl ₂	T _{hyb}	Verwendung
LC-B-GLOB F	ACA CAA CTg TgT TCA CTA gC	70558–577	167 bp	4 mM	58°C	β-Globin (NG_000007) Q-PCR (Zelläquivalente)
LC-B-GLOB R	Tgg TCT CCT TAA ACC TgT CTT g	70703–724				
LC HPV-3 E6 F	TgT gCA Cgg TgT TTA CTT gT	297–316	154 bp	3 mM	60°C	HPV-3 E6 spezifisch
LC HPV-3 E6 R	CTT CCT TTA CCA gTg gTT TgT	430–450				
LC HPV-8 E6 F	TAC gTT gTT ACT gCg TgT TgT C	391–412	87 bp	4 mM	65°C	HPV-8 E6 spezifisch
LC HPV-8 E6 R	gCC TAg CAC AgT TTg CTC ATA A	456–477				
LC HPV-14 E6 F	ggC gAC AAC TgA CTC TTC AAC	198–218	150 bp	4 mM	65°C	HPV-14 E6 spezifisch
LC HPV-14 E6 R	AgT ggT ATT TCC AAT Agg TTT gC	325–347				
LC HPV-20 E6 F	ggC AAC AgC gAC ATA TgA gTT	469–489	83 bp	3 mM	63°C	HPV-20 E6 spezifisch
LC HPV-20 E6 R	AgA TTT gCC TgT TAC TTg CTC	530–551				
LC HPV-21 E6 F	GCC CTA GTA CTC ATG GCT GAC	188–208	141 bp	3 mM	63°C	HPV-21 E6 spezifisch
LC HPV-21 E6 R	CAG ATT GGC TAG GTC ACG AA	309–328				
LC HPV-36 E6 F	ATA ATT AAg gCA AAT gGC AgA gC	187–209	153 bp	4 mM	65°C	HPV-36 E6 spezifisch
LC HPV-36 E6 R	AAT TTg CCA CAA AAg TTA CAA gg	317–339				
LC 27&57 F	TYT ggA gCT AgA ggA TTT gA	173–192	230 bp	3 mM	55°C	HPV-27 und -57 E6/E7 spezifisch
LC 27&57 A (R)	gTA Tgg gTA TYC CTg TCT Cg	383–402				
HPV-27 FL	ATg CCA ATg TCTg TAT TgT CTA AgT TTT CC	353–324	Hybridisierungssonden spezifisch für HPV-27			
HPV-27 640 _{LCRed}	gCT gCA ATC Agg CAT TTT CCA CAT	322–299				
HPV-57 FL	AAT gCC AgT RCC TgT ATT gTC TAA gTT T	342–315	Hybridisierungssonden spezifisch für HPV-57			
HPV-57 720 _{LCRed}	gCT gCT gCA ATT AAg CAT TTT TCA CAT	313–287				
LC Mn-Aktin F	AgA TgA CAA TCT TgA ggC CAT A	306-327	78 bp	3 mM	63°C	β-Aktin spezif. für <i>M. coucha</i>
LC Mn-Aktin R	ATg CCA CAg gAT TCC ATA CC	364-383				
LC MnPV-1 E7 F	tgc agt ggc tgg ttt gat ag	820-839	95 bp	3 mM	60°C	MnPV-1 E7 spezifisch
LC MnPV-1 E7 R	tgc aac atg tcc gca ata ga	895-914				

bp, Basenpaare; F, vorwärts; FL, Fluorescein; LCRed, LightCycler Red (Fluorophore, emittieren bei 640 oder 720 nm); ORF, offener Leserahmen; R, rückwärts; Q-PCR, quantitative PCR; T_{hyb}, Hybridisierungstemperatur

2.2.6.4 Auswertung der quantitativen PCR

Die Analyse der CP-Werte erfolgte bei Experimenten mit SYBR Green mittels der aufgezeichneten Fluoreszenzintensität von Kanal F1. Bei der Verwendung von Hybridisierungs sonden wurden die Messwerte der Fluoreszenz von Kanal 2 (LC640) und Kanal 3 (LC705) mit dem Hintergrundsignal korrigiert (F2/Back-F1 und F3/Back-F1). Die Rohdaten der Q-PCR wurden unmittelbar im Anschluss an den PCR-Lauf durch die LightCycler Software (Roche) analysiert und die CP-Werte als Endergebnis ausgegeben.

Für die Auswertung wurde aus den CP-Werten der mitgeführten Standards mittels eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel, Microsoft Office 2003) eine Geradengleichung ermittelt. Nach der Umstellung der Gleichung konnten mit den CP-Werten unbekannter Proben die Anzahl der Viruskopien beziehungsweise die Menge genomischer DNA berechnet werden. Für jede Probe wurde aus den 2 Doppelwerten eines Laufs ein Mittelwert gebildet. Mit dem CP-Mittelwert des zweiten Experimentes der Probe wurde die Standardabweichung (SD) berechnet, die innerhalb von 10% Abweichung liegen sollte.

2.2.6.5 Bestimmung der Viruslast

Für die Etablierung wurde für jeden Virustyp ein neues PCR-Protokoll optimiert, während die Bestimmung der zellulären DNA-Menge für jeden Organismus nur einmal optimiert und für jede Probe nur einmal bestimmt wurde. Bei Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen Papillomaviren wurden von einer Probe mehrere HPV-spezifische Q-PCR durchgeführt:

1. Etablierung einer konventionellen, typenspezifischen PCR.
2. Optimierung der Magnesiumkonzentration (2–6 mM Mg^{2+}) für die Q-PCR im LightCycler Instrument (Roche)
3. Generierung der Standardkurve eines zellulären Gens mit einer Verdünnungsreihe des bekannten Standards mit Werten von 100, 10, 1,0 und 0,1 ng DNA.
4. Generierung einer Standardkurve, mit einer Verdünnungsreihe quantifizierter Plasmide, mit 10000, 1000, 100 und 10 viraler Kopien bei einem Hintergrund von 1 ng DNA des zu bestimmenden Gewebes (DNA aus humaner Plazenta oder MnPV-1-negative *M. coucha* DNA).

Die Ergebnisse der Q-PCR wurden für die Berechnung der Viruslasten eingesetzt. Für jede Probe wurden die absoluten Werte an Virusgenomen pro Mikroliter und der DNA-Menge pro Mikroliter bestimmt. Die DNA-Menge wurde auf die Zellanzahl umgerechnet. Aus beiden Einzelwerten wurde dann die Anzahl der PV-Kopien pro Zelle oder bei sehr geringer Kopyendichte die Anzahl der Zellen pro PV-Kopie berechnet. So konnte die absolute Virenanzahl bezogen auf ein Zelläquivalent in der Probe bestimmt werden. Für eine Berechnung der SD der Viruslast wurde mittels der SD der Einzelwerte die maximale und minimale Viruslast kalkuliert und die Hälfte der Differenz beider Werte als SD des Gesamtwertes verwendet.

2.2.7 DNA *in situ* Hybridisierung

2.2.7.1 Grundlagen der DNA *in situ* Hybridisierung

Die Methode der DNA *in situ* Hybridisierung (ISH) wird angewandt, um die Lokalisation bestimmter Nukleinsäuren im Gewebe zu bestimmen. Es können mit markierten Nukleinsäuresonden spezifische Bereiche von Chromosomen, bakterielle und virale Sequenzen oder Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden. Für einen direkten Nachweis werden die Sonden radioaktiv oder auch mit fluoreszierenden Molekülen wie Fluorescein markiert. Für einen indirekten Nachweis werden sie an Antigene wie Biotin oder Digoxigenin gekoppelt.

Es ist bekannt, dass vor allem in kutanem Gewebe die Viruslast sehr niedrig sein kann, so dass für den Nachweis geringer Mengen besonders sensitive Methoden zur Signal-Amplifikation wie mittels Biotinyltyramid notwendig sind. Zur Herstellung der Sonde wird das Plasmid des nachzuweisenden PV durch eine so genannte *nick translation* mit Biotin markiert. Dabei führt die DNase I Einzelstrangbrüche (engl. *nick*) in die doppelsträngige DNA ein, die eine DNA-Polymerase erkennt und am 3'-Ende des Bruches Nukleotide entfernt. Gleichzeitig füllt die Polymerase die Lücke durch den Einbau neuer, teilweise Biotin-markierter Nukleotide wieder auf.

In Abbildung 2.5 ist das Prinzip der DNA-ISH mittels Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA-ISH) dargestellt. Initial wurde die spezifisch gebundene, biotinylierte Sonde (1) durch eine Peroxidase-gekoppeltes Steptavidin (SAP) aufgespürt (2). Die aktive Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) überführt die Phenolgruppe des Biotinyltyramids in ein Radikal, das mit einem elektronenreichen Molekül in unmittelbarer Nähe reagiert (3). Auf

diese Weise wird eine Vielzahl an Biotinylytyramid gebunden (Han et al., 2002). Durch einen zweiten Inkubationsschritt mit SAP können an den Biotin-Anteil des Biotinylytyramids erneut weitere Enzyme gebunden werden (4). Die vielfache Bindung von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin ermöglicht die Umsetzung einer wesentlich höheren Substratmenge (3-Amino-9-ethylcarbazol, AEC), was in einer deutlichen Verstärkung des Signals resultiert (5).

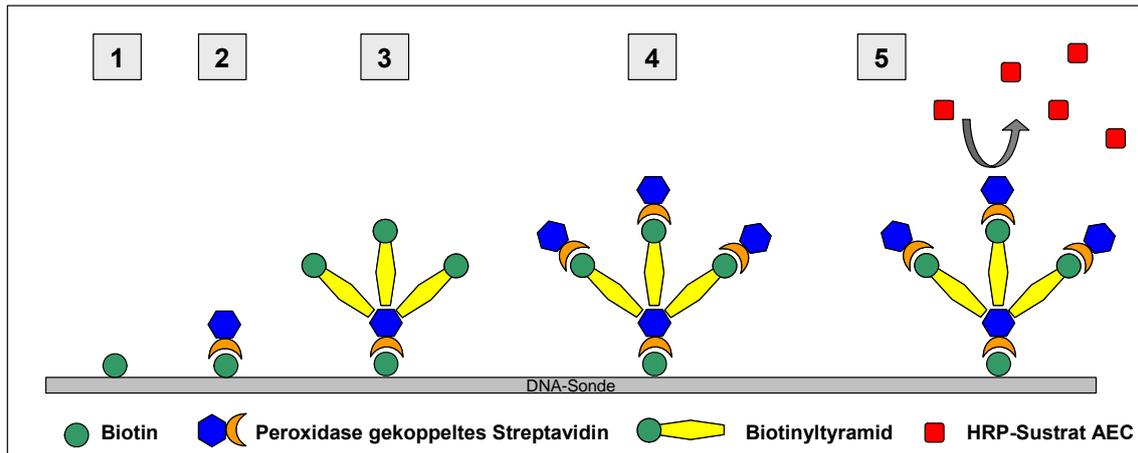


Abbildung 2.5: Prinzip der *in situ* Hybridisierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation. Die biotinylierte Sonde (1) bindet ein Peroxidase (HRP) gekoppeltes Streptavidin-Konjugat (2). Durch die Peroxidase-Aktivität wird das hinzu gegebene Biotinylytyramid kovalent gebunden (3). Erneut hinzu gegebenes Peroxidase-Streptavidin bindet an den Biotin-Anteil von Biotinylytyramid (4), und die Peroxidase kann das Substrat AEC zu einem sichtbaren Signal umsetzen (5).

2.2.7.2 Herstellung der Biotin-markierten Sonde

Die Sonden wurden aus DNA-Plasmiden hergestellt. Für den positiven Nachweis enthielt dieses Plasmid den nachzuweisenden PV-Typ (HPV oder MnPV-1). Als Negativkontrolle wurde ein nah verwandter PV-Typ im gleichen Vektor eingesetzt.

Das zu markierende DNA-Plasmid (1 µg) wurde mit 4 µl Enzymmischung (*Biotin nick translation mix*, Roche) vermischt und in einem Endvolumen von 16 µl bei 15°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8) abgestoppt. Abschließend wurden die Enzyme bei 65°C für 10 min hitzedeaktiviert. Die markierte Sonden-DNA (1 µg / 20 µl, entspricht 50 ng/µl) war bei einer Aufbewahrung unter -20°C über mehrere Monate stabil.

2.2.7.3 *In situ* Hybridisierung mittels Tyramid-Signal-Amplifikation

Die TSA-ISH wurde mit Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe durchgeführt. Es wurden Serienschnitte von 5 µm Schichtdicke angefertigt, die direkt nach dem Schneiden auf Glasobjektträger übertragen und bei etwa 60°C für 2 h im Trockenschrank getrocknet wurden. Wenn unmittelbar im Anschluss daran keine ISH durchgeführt wurde, erfolgte eine nochmalige Inkubation bei 60°C für mindestens 0,5 h im Wärmeschrank direkt vor der Deparaffinierung. Das verflüssigte Paraffin konnte mit einer Xylol/Alkohol-Reihe entfernt und das Gewebe für die weiteren Schritte rehydriert werden. Dafür wurden die Schnitte in 2 aufeinander folgenden Xylolbädern für jeweils 10 min deparaffiniert und für jeweils 1 min in eine absteigende Alkoholreihe getaucht (1x Xylol / 99% Ethanol (1:1), 2x 99% Ethanol, 1x 96% Ethanol, 1x 80% Ethanol, 1x 70% Ethanol). Abschließend wurden die Objektträger in PBS gespült.

Für einen optimalen Nachweis der Nukleinsäuren folgten 2 Permabilisierungsschritte. Chemische Veränderungen wurden durch die Formalin-Fixierung mit einer Hitzebehandlung entfernt und Nukleinsäuren durch eine Proteolyse besser zugänglich gemacht. Für das Aufbrechen von Quervernetzungen wurde das Gewebe in vorgewärmtem Natriumcitratpuffer in einer Mikrowelle bei 600 Watt für 10 min gekocht. Für die Proteolyse wurde die Proteinase K Lösung (20 mg/ml) in 50 ml 0,05 M Tris/HCl pH 7,5 verdünnt und auf 37°C erwärmt (4 µg/ml für humanes Gewebe, 8 µg/ml für murines Gewebe). In der ebenfalls vorgewärmten Küvette wurden die Gewebeschnitte für 12–14 min inkubiert (Hautschnitte: 12 min; murines Gehirngewebe: 14 min). Mit einem Spülschritt für 10 min in 1x PBS mit 4% Formaldehyd wurde die Reaktion gestoppt.

Die gewebeinterne Peroxidase wurde mit einer Inkubation für 20 min in frisch hergestellter H₂O₂-Lösung (1%) in 1x PBS abgesättigt. In dieser Zeit wurde die Prähybridisierungslösung aus 500 µl Formamid, 100 µl 20x SSC, 100 µl SSSDNA (10 mg/ml) 100 µl 0,5 M NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 198 µl *Aqua ini.* angesetzt. Die Lösung wurde bei 98°C für 1 min in einem Thermoblock erhitzt und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Die Gewebeschnitte wurden luftgetrocknet und anschließend, je nach Schnittgröße, mit 50–100 µl Prähybridisierungslösung bei Raumtemperatur für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die anschließende Hybridisierung wurde die Sonde in Prähybridisierungslösung auf 0,5 ng/µl verdünnt, bei 98°C für 1 min in einem Thermoblock erhitzt und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Von den prähybrisierten Gewebeschnitten wurde die Flüssigkeit so gut wie möglich entfernt und mit 50–100 µl

Hybridisierungslösung benetzt. Die Objektträger wurden vorsichtig in einen auf 98°C vorgeheizten Hybridisierungssofen für 5 min erhitzt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Sonde im Gewebe in einer feuchten Kammer bei 42°C über Nacht im Hybridisierungssofen.

Am nächsten Tag wurden unspezifisch gebundene Sonden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Je einmal wurden die Schnitte für 10 min in 2x SSC (42°C), 1x SSC (RT) und 0,5x SSC (RT) gespült und anschließend in 1x TBS-Puffer für 3 min gewaschen. Für den nachfolgenden Nachweis der biotinylierten Sonde wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer 100 µl Human-Serum Inkubation für 30 min in einer feuchten Kammer geblockt. Anschließend wurde die Flüssigkeit dekantiert und mit 80 µl eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Konjugat (TSA-Biotin-System, Perkin Elmer) 1:500 in Human-Serum für 30 min inkubiert. Durch zweimaliges Waschen in 1x TBS für 3 min wurde überschüssiges Konjugat entfernt. Für die Signal-Amplifikation wurde Biotinylytyramid 1:50 in Verdünnungslösung (*amplification diluent*, TSA-Biotin-System) verdünnt und jeder Schnitt mit etwa 60 µl für 20 min inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde zweimal mit 1x TBS für 3 min entfernt. Ein zweiter Inkubationsschritt mit Streptavidin-Konjugat 1:500 in Serum für 30 min schließt die Signal-Amplifikation ab, gefolgt von 2 Spülschritten in 1x TBS für 3 min.

Die Substratlösung (AEC-Gebrauchslösung, DAKO) wurde großzügig (>100 µl) auf die Schnitte gegeben und die Signalentwicklung unter dem Mikroskop verfolgt. Das Substrat AEC wurde durch die Peroxidase zu einem roten Farbstoff umgesetzt. Nach spätestens 15 min wurde die Reaktion durch einen 5 min Spülschritt in demineralisiertem Wasser (millipore) gestoppt. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Hämatoxylin für 2 min und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Die Objektträger wurden mit Glyceringelantine eingedeckelt.

2.2.8 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die histologische Begutachtung wurden Gewebeschnitte mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Hämalaun färbt alle sauren und basophilen Strukturen blau (DNA-haltigen Zellkern), während acidophile, eosinophile und basische Strukturen (vor allem Zellplasmaproteine) durch Eosin rot angefärbt wurden.

Die Schnittherstellung, Trocknung und Deparaffinierung erfolgte analog wie zuvor beschrieben (ISH, 2.2.7.3). Die rehydrierten Gewebeschnitte wurden für 2 min in

Hämatoxylinlösung getaucht und anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. In der Eosinlösung verblieben die Gewebeschnitte für 4 min und wurden wiederum anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden mit Glyceringelantine eingedeckelt.

2.2.9 Statistik

Eine statistische Auswertung wurde zur generellen Überprüfung von Unterschieden zwischen 2 statistischen Populationen durchgeführt (Toutenburg, 2005; Zöfel, 2002). In der Statistik werden Unterschiede als signifikant bewertet, deren Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) unter 5% ($p < 0,05$) liegt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung von verschiedenen Signifikanztests (chi²-Test, Fisher-Exakt-Test, Mann-Whitney-U-Test), die eine Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit erlauben.

Der Vierfeldertest (auch X²-, chi²- oder Chi-Quadrat-Test) dient dazu, die Häufigkeit eines Merkmals in 2 statistisch unabhängigen Gruppen zu vergleichen. Vierfeldertests sind erst ab einer bestimmten Stichprobengröße zuverlässig. Pro Feld einer Kontingenztafel (Vierfelderdiagramm) werden mindestens 5 Beobachtungen erwartet. Bei weniger Beobachtungen findet der Fisher-Exakt-Test Anwendung.

Der Mann-Whitney-Test ("Mann-Whitney-U-Test" oder kurz "U-Test") dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen A und B (z. B. eine unbeeinflusste und eine beeinflusste) mit jeweils einer Anzahl von Werten (n₁ und n₂). Jeder Wert der Stichprobe A wird dabei mit jedem Wert der Stichprobe B verglichen.

Statistische Auswertungen erfolgten mittels SPSS 13.0 (SPSS Inc.) und SigmaPlot 2000 (Systat Software Inc.) Für den Vierfeldertest (chi²-Test) wurde das Programm Epi Info des CDC (*Centers for Disease Control*) verwendet. Die Berechnung des p-Wertes erfolgte sowohl mittels SPSS als auch mit dem im Internet verfügbarer U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>).