

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Christof Alexander Gänzler

aus Nußloch

Tag der mündlichen Prüfung

Thema

Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen frühe und späte Proteine des Humanen Papillomvirus Typ 6b.

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Felix Wieland

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Manuskripten enthalten:

- "Antibody Response to Late but not to Early Proteins of HPV type 6b in Patients with Anogenital Condyloma Acuminata"
Christof Gänzler, Peter Sehr, Herbert B.Slade, Karen Malcolm, Ian Frazer and Michael Pawlita (eingereicht zu Publikation)
- "Antibody Response to HPV Type 6b Early and Late Proteins in Patients with Juvenile- and Adult-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis"
Christof Gänzler, Leena-Maija Aaltonen, Peter Sehr, Ren Wei Chen and Michael Pawlita (eingereicht zu Publikation)

Teile dieser Arbeit sind in folgender Patentanmeldung enthalten:

- US 60/305259 "A generic capture ELISA using recombinant fusion proteins for detecting and/or quantifying antibodies in biological samples"
Peter Sehr, Christof Gänzler, Michael Pawlita (13.07.2001 zum Patent angemeldet)

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Betreuung von Dr. med. Michael Pawlita und Prof. Dr. rer. nat. Lutz Gissmann im Zeitraum Juni 1999 bis Dezember 2001 in der Abteilung Genomveränderungen und Carcinogenese des Deutschen Krebsforschungszentrums im Institut für Angewandte Tumorstudiologie angefertigt. Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich zusammengearbeitet habe und die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Michael Pawlita für die fruchtbaren Diskussionen und die Unterstützung bedanken. Bei meinem Doktorvater Lutz Gissmann bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft, zahlreiche Anregungen und die Überlassung des Arbeitsthemas.

Für die Hilfsbereitschaft und sehr gute Zusammenarbeit im Labor sowie das Korrigieren des Manuskripts bedanke ich mich bei Peter Sehr. Ute Koch und Jana Fauth danke ich für technische Hilfe im Labor. All meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, besonders Cornelia Oetke und Martin Beisiegel danke ich für die anregenden Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und das wundervolle Arbeitsklima.

Ich danke Leena-Maija Aaltonen (Helsinki, Finnland), Ian Frazer (Brisbane, Australien) und Herbert B. Slade (St. Paul/MN, USA) für die unkomplizierte Kooperation. Martin Müller danke ich für die Bereitstellung der monoklonalen Antikörper und der VLP, Axel Benner für Unterstützung in statistischen Fragestellungen und Thomas Holz für den umfassenden IT Support.

Nicht zuletzt danke ich Prof. Dr. Felix Wieland für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt hat.

Danke Julia für die Liebe, die wir teilen.

Inhaltsverzeichnis

THEMA	II
DANKSAGUNG	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	2
Papillomaviridae (Papillomviren).....	2
Genomaufbau des HPV Typs 6b.....	3
Genprodukte und viraler Replikationszyklus.....	3
Mucosotrope Hochrisiko und Niederrisiko HPV und assoziierte Erkrankungen	4
Genitale Condylome und orale Papillome	6
Behandlung der HPV assoziierten Erkrankungen.....	7
Immunantwort auf HPV-Infektionen	7
MATERIAL UND METHODEN	10
Geräte, Arbeitsmaterialien und Software	10
Lösungen, Feststoffe und Hilfsmaterialien.....	10
Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien	11
Bakterienstämme	13
Medien für Bakterien.....	13
Plasmide	13

ELISA Materialien.....	14
Humanseren.....	15
Condylom-Gruppe	15
RRP-Gruppe.....	15
Seren von gesunden Individuen	15
DNA Klonierung	16
DNA-Gelelektrophorese.....	Error! Bookmark not defined.
Restriktionsverdau von DNA	16
Gelextraktion.....	16
CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) Behandlung, Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol- Extraktion und DNA-Präzipitation	17
Ligation	17
Hitzeschock Transformation, Plasmid-DNA Präparation, Glycerinstock	17
Sequenzierung mit dem Pharmacia T7 Sequenzier Kit.....	18
Polymerase Kettenreaktion zur Klonierung der Antigene aus dem HPV6b Genom	19
Klonierungsschema.....	21
Expression und Präparation der Antigene.....	23
SDS-Proteingel (SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese).....	24
Färbung mit kolloidalem Coomassie	24
Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid Gelen.....	25
Western-Blot.....	25
Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	27
Herstellung des Gluthathion-Caseins.....	27
ELISA Ablauf	29
Waschen der ELISA Platten.....	29
Plattenelektion	29
Antigen-Titration	30
Vorinkubation der Seren zur Blockierung unspezifischer Reaktionen.....	30
Serum-ELISA	31
Detektion von GST-6bL1tag mit monoklonalen Antikörpern gegen Papillomvirus-Kapside	32
L1-VLP Kompetitionsversuch	32
Statistische Methoden.....	33
Regressionsgerade	33
Spearman Rangkorrelation.....	33
Boxplot (Tukey).....	34
Der U-Test von Mann-Whitney (Mann-Whitney-U-test)	35
Vorzeichenrangtest von Wilcoxon (Wilcoxon matched pairs signed rank test)	35

Fisher Exact Test einer Vierfeldertafel	35
Serumreaktivitäten	33
Statistik der Cut-offs für L2, E2, E4, E6 und E7	33
Statistik des L1 Cut-off.....	34
ERGEBNISSE	36
DNA Klonierung zur bakteriellen Expression von HPV6b-Antigenen als Fusionsproteine	37
Expression und Aufreinigung der HPV6b Antigene.....	38
Glutathion-Casein	38
Expression der ELISA Antigene als GST-Xtag Fusionsproteine in Bakterien.....	39
Aufreinigung der ELISA Antigene	39
Optimierung der ELISA Parameter	44
Titration der Antigene auf der Platte.....	44
GST-6bL1tag ELISA.....	47
Reproduzierbarkeit des GST-6bL1tag ELISA.....	47
HPV-Typ Spezifität des GST-6bL1tag ELISA	48
Kompetitive Hemmung von GST-6bL1tag reaktiven Seren durch HPV11 VLP	50
Validierung des GST-6bL1tag ELISA mit Gold-Standard HPV6 VLP-ELISA	51
Antikörperprävalenzen gegen 4 frühe und 6 späte HPV6b Proteine bei gesunden und Patienten mit Papillomvirus assoziierten Erkrankungen	53
Häufigkeitsverteilungen der ELISA Reaktivitäten in den Serumgruppen	53
ELISA Reaktivitäten.....	55
Patientinnen mit genitalen Condylomen.....	56
RRP-Gruppe.....	58
Geschlechtsabhängigkeit von HPV6b L1 Antikörpern bei gesunden und RRP-Patienten.....	59
Follow-up der RRP Patienten.....	60
DISKUSSION.....	63
Ätiopathogenese HPV-induzierter, proliferativer Erkrankungen.....	63
HPV6b als Vertreter der Niederrisiko HPV-Typen.....	64
GST-Xtag ELISA.....	65
Der L1 ELISA	67
Validierung des L1 ELISA.....	68

HPV6b L1 Serologie.....	70
RRP Follow-up.....	71
Die E2, E4, E6 und E7 ELISA.....	72
ANHANG	74
Expressionsplasmide	74
pGEX/tag.....	74
pGEX/6bL1tag.....	74
pGEX/6bL2tag.....	75
pGEX/6bE2tag.....	75
pGEX/6bE4tag.....	76
pGEX/6bE6tag.....	76
pGEX/6bE7tag.....	77
LITERATUR.....	78

Tabellenverzeichnis

TAB. 1: HOMOLOGIEEN DER PROTEINE ZWISCHEN HPV6A, 6B UND 11 UND DEREN FUNKTIONEN.....	5
TAB. 2: PCR-PRIMER	20
TAB. 3: ANTIGENE.....	20
TAB. 4: ANTIKÖRPERREAKTIVITÄTEN BEI GRUPPEN VON CONDYLOM PATIENTINNEN UND KONTROLLEN IM GST-XTAG ELISA	57
TAB. 5: POSITIVE RRP-PATIENTEN UND KONTROLLEN	58
TAB. 6: L1 ANTIKÖRPERREAKTIVITÄT IN RRP PATIENTEN WÄHREND DES FOLLOW-UP	61

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DES LINEARISIERTEN HPV6B GENOMS	3
ABB. 2: KLONIERUNGSSCHEMA ZUR HERSTELLUNG DER EXPRESSIONSPLASMIDE.....	22
ABB. 3: REAKTIONSFOLGE FÜR DIE KOPPLUNG VON GLUTATHION AN CASEIN	28
ABB. 4: SCHEMATISCHER AUFBAU DES GST-XTAG ELISA	36
ABB. 5: RESTRIKTIONSANALYSE VON PUC/HPV6B	37
ABB. 6: TYPISCHE WACHSTUMSKURVEN VON BL21 ANTIGEN-EXPRESSIONSKULTUREN	39
ABB. 7: EXPRESSION UND EIN-SCHRITT AUFREINIGUNG VON GST-TAG UND DEN HPV6B-ANTIGENEN L1, E6 UND E7 ALS GST-XTAG FUSIONSPROTEINE	40
ABB. 8: EXPRESSION UND EIN-SCHRITT AUFREINIGUNG DER HPV6B ANTIGENE L2, E2 UND E4 ALS GST-XTAG FUSIONSPROTEINE	42
ABB. 9: TITRATIONEN DER ANTIGENE FÜR DEN GST-XTAG ELISA.....	46
ABB. 10: REPRODUZIERBARKEIT DES GST-6BL1TAG ELISA	48
ABB. 11: REAKTIVITÄT MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN HPV KAPSID MIT GST- 6BL1TAG IM ELISA.....	49
ABB. 12: KOMPETITIVE HEMMUNG VON GST-6BL1TAG REAKTIVEN SEREN DURCH HPV11 L1 VLP	51
ABB. 13: ÜBEREINSTIMMUNG DER HPV6B L1 ANTIKÖRPERREAKTIVITÄTEN IM GST- 6BL1TAG UND HPV6 VLP-ELISA	52
ABB. 14: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER PATIENTEN- UND KONTROLL-SEREN AM BEISPIEL VON L1 UND E7.....	54
ABB. 15: ANTIKÖRPERREAKTIVITÄTEN MIT 6 HPV6B ANTIGENEN IM GST-XTAG ELISA VON RRP-PATIENTEN, CONDYLOM-PATIENTEN (COND.AC.) UND GESUNDEN ERWACHSENEN (KONTR.)	56
ABB. 16: GESCHLECHTSABHÄNGIGKEIT DER HPV6BL1 ANTIKÖRPER BEI RRP PATIENTEN.....	60
ABB. 17: PERSISTENZ VON HPV6BL1 ANTIKÖRPERN IN INITIAL SEROPOSITIVEN RRP PATIENTEN.....	62
ABB. 18: ANTIKÖRPER GEGEN HPV PENTAMERE.....	69

Zusammenfassung

Mucosotrope humanpathogene Papillomviren (HPV) werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Viren der Hochrisikogruppe, vor allem die HPV-Typen 16 und 18, werden u.a. für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs und ca. 15% der Kopf-Hals Plattenepithelkarzinome verantwortlich gemacht. Viren der Niederrisikogruppe, vor allem HPV 6 und 11, rufen gutartige anogenitale Condylome und orale Papillome hervor. Die gesamte Virusreplikation findet in den Zellen der sich bildenden Warze statt, dabei werden sowohl die regulatorischen Proteine (E1 bis E7), als auch die Kapsidproteine (L1 und L2) des Virus exprimiert. Die Ausprägung der Läsionen ist in den Patienten – möglicherweise bedingt durch unterschiedliche Immunantwort - stark variabel. Es liegen in der Literatur Daten zur Antikörperantwort gegen die Kapsidproteine vor, während die Antwort gegen frühe Proteine mangels geeigneten Untersuchungsverfahrens bisher kaum untersucht wurden. In dieser Arbeit wurden sechs neue, einheitlich aufgebaute ELISA entwickelt und die Antikörperantwort in 68 gesunden Erwachsenen (Kontrollgruppe), 81 Patientinnen mit Genitalcondylomen und 101 Patienten mit rekurrender respiratorischer Papillomatose (RRP) gegen die Kapsidproteine L1 und L2 sowie gegen die frühen regulatorischen Proteine E2, E4, E6 und E7 untersucht. Als Antigene dienten bakteriell exprimierte, lösliche GST-Fusionsproteine. Der GST-L1tag ELISA reproduzierte die Daten eines konventionellen HPV Kapsid-ELISA mit der selben Serumgruppe sehr gut ($r = 0,79$). Mit dem Hauptkapsidprotein L1 reagierten 31% der Kontrollgruppe, 88% der Condylomgruppe und 51% der RRP-Gruppe positiv. Die erhöhte L1 Antikörperprävalenz bei den RRP-Patienten war durch 83% L1 positive Patientinnen bedingt, während bei den männlichen Patienten mit 38% Seroprävalenz kein Unterschied zur Kontrollgruppe bestand. Die Reaktivitäten der L1 positiven Condylompatientinnen waren deutlich höher, als die der RRP-Patientinnen. In einer Verlaufsbeobachtung von 47 RRP-Patienten klang die Antikörperantwort bei ca. 20% der initial L1 Antikörperpositiven innerhalb eines Jahres und bei ca. 30% innerhalb von 2 Jahren trotz Fortbestand der Erkrankung ab. Antikörperreaktionen mit den frühen HPV6b Proteinen waren insgesamt sehr selten und schwach, lediglich für E2 und E4 wurde bei Condylompatientinnen mit 15% bzw. 33% positiven Reaktivitäten eine statistisch signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe (2% und 0% Positive) gefunden. Diese Erhöhung war bei RRP-Patienten nicht nachweisbar.

Einleitung

Diese Arbeit untersucht die humorale Immunantwort gegen sechs frühe und späte Proteine des humanpathogenen Papillomvirus Typ 6b. Dazu wurden Seren von Patienten mit Papillomvirus-assoziierten Erkrankungen und von gesunden Individuen mit sechs neu entwickelten ELISA untersucht.

Papillomaviridae (Papillomviren)

Papillomviren sind eine große Gruppe von Wirbeltier DNA-Viren, die mehrschichtiges Plattenepithel infizieren und je nach Typ verschiedene gutartige oder maligne Tumore, beim Menschen z.B. Papillome, Hautwarzen, oder das Zervixkarzinom, hervorrufen können (Shah and Howley, 1996). Alleine beim Menschen gibt es weit über 80 dokumentierte Papillomvirus Typen, die aufgrund ihres Tropismus in Haut- und Schleimhaut-Typen unterteilt werden. Eine Klassifizierung der Papillomviren wurde anhand ihrer Sequenzhomologien durchgeführt (Chan et al., 1995). Die einzelnen Papillomvirus-Typen sind zur Identifikation nummeriert.

Das human Papillomvirus (HPV) infiziert die Zellen der Basalschicht der Haut oder Schleimhaut vermutlich über Mikroläsionen. Danach findet der komplette virale Replikationszyklus in den infizierten Zellen der sich bildenden Warze statt, wobei das Virus die Zelle nicht lysiert. Bei der Abschuppung infizierter Hautzellen werden die replizierten Viren freigesetzt und können erneut infizieren. Die Übertragung zu einem neuen Wirt ist bei Hautwarzen durch direkten Kontakt sehr einfach möglich. Die Schwimmbadwarze am Fuß und an den Händen wird durch HPV 1 bzw. 2, die im feuchtwarmen Milieu von Holzrosten infektiös bleiben, hervorgerufen. Alle Papillomviren bleiben sehr lange außerhalb der Wirtszelle stabil und infektiös. Die mucosotropen HPV infizieren orale Schleimhäute, sowie die Schleimhäute des Genitalbereichs. Genitale Infektionen werden fast ausnahmslos beim Sexualkontakt übertragen. Es kann auch eine Übertragung bei der Geburt vom infizierten Genitalbereich der Mutter auf das Kind stattfinden, welche bei diesem eine Infektion des Kehlkopfes (Larynx) mit sich bringen kann.

Genomaufbau des HPV Typs 6b

Das Genom aller Papillomviren ist gleich aufgebaut. Alle Papillomviren besitzen ein ringförmiges, geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom, dessen ca. 8000 bp in einen regulatorischen Abschnitt und einen codierenden Abschnitt unterteilt wird (Abb. 1).

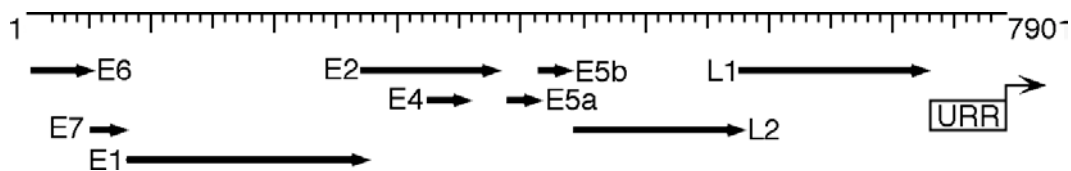


Abb. 1: Schematische Abbildung des linearisierten HPV6b Genoms

Die Pfeile symbolisieren die offenen Leserahmen (nach www.nlm.ncbi.nih.gov/Entrez). Die regulatorische Region (URR) ist mit Transkriptionsstart (↗) für das E6-Gen (1) eingezeichnet.

Genprodukte und viraler Replikationszyklus

Die Expression der viralen Gene hängt vom Differenzierungsgrad der Hautzelle ab, in der sich das Virusgenom befindet. In der Basalschicht des Epithels und in den direkt darüberliegenden Zellschichten werden die frühen Gene (E1, E2, E5, E6 und E7) zur Replikation des viralen Genoms exprimiert. In den oberen Hautschichten werden die späten Gene (L1, L2) exprimiert, deren Genprodukte das virale Kapsid bilden. Das E4 Gen ist eine Ausnahme, obwohl das Gen in der frühen Region lokalisiert ist, ist es ein spätes Gen (Howley, 1996).

Das E1 Protein trägt zur Replikation des HPV Genoms bei und E2 ist ein DNA-bindender Transaktivator/Transrepressor, für den es mehrere Bindestellen in der viralen Kontrollregion gibt. E2 steuert dadurch unter anderem die Expression von E6 und E7. Zu den Funktionen des E6 Proteins gehören die Degradation des Tumorsuppressors p53 und die Aktivierung der Telomerase. Das E7 Protein bindet unter anderem den zellulären Tumorsuppressors pRB₁₀₅. Die Funktionen des E4 Proteins sind noch nicht bekannt. Welche Aufgabe das E4 Protein im Replikationszyklus der Papillomviren hat ist unbekannt. Das membranständige E5 Protein wird mit mehreren Signalübertragungswegen in Verbindung gebracht.

In Zellen aus Condylomen wurden in erster Linie Transkripte des E4 Gens gefunden, aber auch E2, E6, E7, L1 und L2 mRNA (Sherman et al., 1992). Die viralen Gene zu diesen nachgewiesenen mRNAs wurden als Antigene im ELISA in dieser Arbeit verwendet.

Mucosotrope Hochrisiko und Niederrisiko HPV und assoziierte Erkrankungen

Auf der ganzen Welt sind die durch genitale HPV Infektionen hervorgerufenen Krankheiten verbreitet und gehören zu den am häufigsten sexuell übertragenen Krankheiten. Es ist geschätzt worden, daß mehr als 50% aller Erwachsenen während ihrer sexuell aktiven Zeit mit mehr als einem genitalen HPV Typ infiziert werden. Durchschnittlich sind zu einem gegebenen Zeitpunkt 15% aller sexuell aktiven Erwachsenen HPV-positiv, wobei in den USA Genitalwarzen in ca. 1% der Normalbevölkerung nachgewiesen wurden (Koutsky, 1997).

Über 40 mucosotrope HPV Typen wurden aus oralen und genitalen Schleimhautdysplasien isoliert und sind weiter in eine Niederrisikogruppe und eine Hochrisikogruppe unterteilt werden.

Die mit dem Gebärmutterhalskrebs und einem Teil der Kopf-Hals Plattenepithelkarzinome assoziierten HPV Typen 16 und 18 sind die Hauptvertreter der Hochrisikogruppe (Gissmann, 1992). Sie können die infizierte Zelle mit ihren viralen Onkogenen E6 und E7 transformieren und invasive Tumore hervorrufen.

Hauptvertreter der Niederrisikogruppe sind die nah verwandten HPV Typen 6 und 11. Sie induzieren hauptsächlich gutartige Neoplasien: orale Papillome und genitale Feigwarzen (*Condylomata acuminata*, im Folgenden als Condylome bezeichnet).

HPV11 wurde häufiger als HPV6 in Larynxpapillomen gefunden und HPV6 ist neben HPV11 der am häufigsten gefundene HPV Typ in in genitalen Condylomen (Gissmann et al., 1983). In einer weiteren Studie von 39 Patienten (27 Männer, 12 Frauen) mit Genitalcondylomen waren alle 37 testbaren Biopsien HPV6 und/oder HPV11 PCR positiv, wobei HPV6 der weitaus häufigere Typ war (Greer et al., 1995).

Da die HPV Typen 6 und 11 sehr nahe verwandt sind und sich die HPV6 Subtypen (z.B. HPV6a, 6b, 6c, etc.) untereinander noch weniger unterscheiden, wurde in dieser Arbeit HPV6b als Vertreter für die Niederrisiko HPV-Gruppe verwendet. Die Homologie-Vergleiche der hier verwendeten Proteine von HPV6b mit den Proteinen von HPV6a und HPV11 zeigen die große Ähnlichkeit (Tab. 1).

Tab. 1: Homologien der hier verwendeten Proteine zwischen HPV6b und HPV6a und HPV11 und deren Funktionen

Aminosäure-Identität der Proteine von			
Protein	HPV 6b / HPV 6a	HPV 6b / HPV 11	Funktion *
E2	97%	78%	Transaktivator / Transrepressor
E4	97%	83%	spätes Protein, Wechselwirkung mit dem Cytokeratin-Gerüst
E6	99%	81%	Interaktion mit und Induktion der proteolyt. Spaltung von p53, Telomerase-Aktivierung
E7	99%	85%	Interaktion mit und Inhibition von pRB105, Induktion von Zellpromotoren
L1	100%	92%	Hauptkapsidprotein
L2	99%	84%	kleines Kapsid- strukturprotein

* Die Funktionen der HPV Proteine sind nur teilweise aufgeklärt. Viele Untersuchungen wurden mit den Genprodukten anderer Papillomviren durchgeführt und die Funktionen wurden auf die HPV6/11 Proteine übertragen.

Das icosaedrische HPV-Kapsid besteht aus 72 L1-Pentameren. Das zweite Kapsidprotein L2 ist wesentlich seltener im Kapsid vorhanden, als das L1-Protein (Kirnbauer et al., 1993) und zum Großteil im Inneren des Kapsids lokalisiert (Chen et al., 2000). Beide Kapsidproteine besitzen Kernlokalisierungssignale und sind im C-Terminus reich an basischen Aminosäuren (Zhou et al., 1991), wodurch sie das HPV Genom binden (Touze et al., 2000; Zhou et al., 1994).

Genitale Condylome und orale Papillome

Mucosotrope HPV der Niederrisikogruppe können an der Schleimhaut gutartiges Zellwachstum induzieren. Diese Neoplasien haben die Eigenschaft gemeinsam, sich spontan und ohne Behandlung wieder zurückzubilden. Oft verlaufen HPV Infektionen sogar subklinisch und fallen den infizierten Personen gar nicht auf (Handsfield, 1997). Außerdem können zum Teil lange Latenzphasen des Virus von mehreren Monaten bis hin zu mehreren Jahren gerade bei oralen Infektionen auftreten (Derkay, Rimell, and Thompson, 1998).

Die meist deutlich erhabenen Condylome im Anogenitalbereich sind für die Patienten störend, und bedeuten oft eine große psychische Belastung (Gall, 2001).

Die orale Infektion mit Niederrisiko HPV kann im Kindesalter, aber auch später im Erwachsenenalter zu oralen Papillomen führen. Bei den adulten Patienten mit Oralpapillomen ist aber nicht geklärt, ob die Viren seit einer perinatalen Infektion persistieren oder durch genito-orale Sexualverkehr übertragen wurden.

Larynxpapillome sitzen dabei oft auf den Stimmbändern im Kehlkopf, wo sie durch ihr Wachstum Heiserkeit und Aphonie hervorrufen können. Larynxpapillome verursachen Schluckbeschwerden und können schon durch ihre schiere Größe und die Rezidive besonders bei Kleinkindern lebensbedrohlich sein. Die durch wiederkehrende orale Papillome verursachte Erkrankung bezeichnet man als rekurrende respiratorische Papillomatose (RRP). RRP ist am Kehlkopf die häufigste, gutartige Neoplasie bei Kindern und wird meistens im Alter zwischen 2 und 4 Jahren - bei Jungen und Mädchen gleich häufig - diagnostiziert (4,3 Fälle pro 100000 Kindern in den USA pro Jahr) (Kimberlin and Malis, 2000). Adult-einsetzende RRP tritt häufiger bei Männern im Alter von 20 bis 40 auf,

zeigt aber oft einen mildereren Verlauf, als bei Kindern (Kashima, Mounts, and Shah, 1996).

Behandlung der HPV assoziierten Erkrankungen

Obwohl Larynxpapillome nicht invasiv wachsen können verläuft RRP gerade bei Kleinkindern oft sehr aggressiv. Patienten mit juvenile-einsetzender RRP benötigen durchschnittlich in einem Zeitraum von 5 Jahren fast 20 Behandlungen (Derkay, 2001).

Genitale Warzen und orale Papillome werden meist mit CO₂-Laser entfernt, wobei die Larynxpapillome unter Vollnarkose behandelt werden müssen. Oft kehren Oral- und Genitalwarzen nach dem Entfernen wieder und beeinträchtigen die Gesundheit der Patienten stark. Gerade für Kinder, die über Jahre hinweg im Abstand von wenigen Wochen Larynxpapillome bekommen, bedeutet das eine extreme Belastung. Eine zusätzliche Behandlung durch Immunstimulanzien ist möglich und kann in vielen Fällen zumindest eine Abschwächung der Krankheit oder eine Verlängerung der Zeit bis zum Wiederkehren der Warzen bewirken (Kimberlin and Malis, 2000).

Momentan befinden sich verschiedene Impfstoffe gegen die genitalen Viruserkrankungen in der klinischen Erprobungsphase (Schiller and Lowy, 2001).

Immunantwort auf HPV-Infektionen

Man nimmt an, daß das Immunsystem in der Regel die HPV-infizierten Zellen beseitigt. Es ist unklar, warum das Immunsystem der Patienten mit rekurrenden Condylomen und Papillomen das Virus nicht bekämpfen kann, obwohl es durchaus fähig ist, anderen Infektionen zu begegnen. Bei immunsupprimierten Patienten kamen genitale HPV-Infektionen 17x häufiger vor, als bei Kontrollen (Halpert et al., 1986). Bei HIV-Infizierten ist eine ähnliche Tendenz zu beobachten, wobei die erhöhten HPV-Infektionen der Patienten gegenüber den Kontrollen z.T. durch ein anderes Sexualverhalten erklärt werden können (Ho et al., 1994). Die Warzen werden zwar vom zellulären Immunsystem durch infiltrierende Leukozyten attackiert, die Regression hängt aber von Faktoren ab, die bisher nicht bekannt sind (Knowles, O'Neil, and Campo, 1996; Selvakumar et al., 1997).

Das humorale Immunsystem bildet bei der Infektion mit HPV16 nach wenigen Wochen oder Monaten Antikörper gegen das HPV16 Kapsid und diese Antikörper sind über Jahre in den Menschen nachweisbar (Dillner, 1999).

Die Unterschiede der Immunsysteme von Patienten mit rezidivierenden Warzen zu den Patienten, die die Warzen bekämpfen können, werden gegenwärtig erforscht.

Diese Arbeit dient dazu, genauere Einsichten in die humorale Immunantwort gegen die Humanen Papillomviren der Niederrisikogruppe zu erhalten. Wie sich das Papillomvirus vor dem Immunsystem sowohl während der Latenzphasen, aber auch während der Phasen produktiver Virusvermehrung und damit einhergehender Warzenbildung versteckt, ist rätselhaft. Einige Studien beschäftigten sich mit dem Immunsystem von Patienten mit wiederkehrenden Warzen und mit HPV induzierten Tumoren, ohne ein klares genetisches oder immunologisches Muster zu entdecken (Aaltonen et al., 1999; Coleman et al., 1994; Lin et al., 2001). Trotz der teilweise starken Expression viraler Antigene scheint das Immunsystem des Wirts bei rekurrenden Warzen nicht in der Lage zu sein, die Läsion schnell zu erkennen und effizient zu kontrollieren. Allerdings wurde in einer Follow-up Studie gezeigt, daß in 92% der anfangs im Genitaltrakt HPV-DNA positiven Frauen nach 5 Jahren keine HPV-DNA mehr detektierbar war (Elfgrén et al., 2000). Die Antikörperantwort gegen das Viruskapsid von Hoch- und Niederrisiko HPV wurde in vielen Patientengruppen analysiert (Dillner, 1999). Einige Publikationen zeigten, daß Antikörper gegen das Viruskapsid häufig sind und gehäuft in Seren von Condylom- und RRP-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden (Aaltonen et al., 2001; Bonnez et al., 1991; Bonnez et al., 1992; Carter et al., 1995; Eisemann et al., 1996; Greer et al., 1995; Leiserowitz et al., 1997; Li et al., 1987; Peng et al., 1999; Rose et al., 1998). Der zur Zeit meistgebrauchte immunologische Test basiert auf einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hierbei werden Viruskapside als Antigene verwendet, um Serumantikörper nachzuweisen. Die Viruskapside aus L1 oder L1/L2 Proteinen werden meist in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren hergestellt (Rose et al., 1993).

Die Immunantwort auf die frühen HPV Proteine der Hochrisiko HPV-Gruppe in Patientinnen mit zervikalen, intraepithelialen Neoplasien (CIN) und mit Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) wurden ebenfalls im ELISA untersucht (Meschede et al., 1998; Muller et al., 1992). Die Antikörper gegen die frühen Proteine E6 und E7 der Hochrisiko HPV werden selten in den Vorstufen des Gebärmutterhalskrebses (CIN) gefunden, sondern erst in Patientinnen mit invasivem Tumor (Hopfl et al., 2000). Auch die HPV induzierten Kopf-Hals Karzinome erzeugen in den Patienten eine Antikörperantwort gegen frühe Virusproteine (Zumbach et al., 2000).

Die Antikörperantwort gegen andere Proteine als L1 der HPV Typen 6 und 11 in Condylom- und RRP-Patienten ist bisher nur sehr wenig untersucht (Sameshima et al., 1997; Tachezy et al., 1994). Die Daten, die mittels Serum-ELISA ermittelt wurden, sind sehr limitiert (Le Cann et al., 1995; Suchankova et al., 1990).

Das Ziel dieser Arbeit war es, Antikörperantworten gegen 4 frühe und 2 späte HPV6b Proteine sowohl in Condylom-Patienten, wie auch in Patienten mit RRP zu untersuchen.

Sechs GST-Xtag ELISA mit den frühen Proteinen E2, E4, E6 und E7 sowie den späten Proteinen L1 und L2 von HPV6b wurden entwickelt und serologisch angewendet. Hierbei wurden Virusproteine (X) mit voller Länge als Fusionsproteine mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) und einem C-terminalen Markerepitop (tag) bakteriell exprimiert und im GST-Xtag ELISA als Antigene eingesetzt. Das GST-Xtag ELISA Format wurde schon erfolgreich bei der Detektion von Serumantikörpern gegen HPV 16 und 18 E6 und E7 in Gebärmutterhalskrebs Patientinnen eingesetzt und zeigte eine hohe Sensitivität und Spezifität (Sehr, Zumbach, and Pawlita, 2001).

In RRP- und Condylom-Patientinnen konnte eine sehr hohe Prävalenz von Antikörpern gegen HPV6b L1 mit starken Reaktivitäten gezeigt werden. Die Reaktivitäten derselben Seren gegen die anderen viralen Antigene waren durchweg sehr schwach, zeigten aber im Falle von E2 und E4 eine statistisch signifikante Krankheits-Assoziation in Condylom-Patientinnen gegenüber den untersuchten Kontrollen.

Material und Methoden

Geräte, Arbeitsmaterialien und Software

- Präparation kleiner Mengen Plasmid DNA, QIAprep Spin Minipräp Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland
- Präparation großer Mengen Plasmid DNA, QIAGEN-tip 100, Tropfsäule, QIAGEN
- PCR Maschine, PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
- Hochdruckhomogenisator, Emulsiflex-C5, Avestin, Heidelberg, Deutschland
- Proteingel Apparaturen, MiniGel Serie für SDS-PAGE und Western Naßblot mit Biorad Netzteil, Bio-Rad, München, Deutschland
- ELISA Platten Lesegerät, Titertek Microscan, $\lambda = 450$ nm Filter, Titertek, Huntsville/Alabama, USA
- COSTAR 1,2 mL Cluster Tubes im 12 x 8 Rahmen für die Vorinkubation der Seren, Corning, Wiesbaden, Deutschland
- ELISA 96-Loch Platten, Polysorb, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Computerprogramme (Sequenzvergleich: Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, DKFZ-Heidelberg; virtuelle Klonierung: Clone Manager, Durham/North Carolina, USA; Daten: Microsoft Excel, Unterschleißheim, Deutschland; Statistik: MacAnova, Ch. Bingham and G. Oehlert, University of Minnesota, School of Statistics, <http://www.stat.umn.edu/macanova>, SISA-Binomial, Uitenbroek, 1992/97, SISA, <http://home.clara.net/sisa>; Grafik: Deneba Canvas, Miami/Florida, USA; Cricket Graph 1.3, Malvern/Pennsylvania, USA; MacPlasmap, Jindong Liu, University of Utah, Biology Department, Salt Lake City/Utah, USA)

Lösungen, Feststoffe und Hilfsmaterialien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien, Enzyme und sonstige Reagenzien wurden sofern möglich in p.a. Qualität verwendet und von den nachstehenden Firmen bezogen: Difco, Hamburg; Gibco-BRL, Eggenstein; Merk, Darmstadt;

New England Biolabs, Schwalbach; Pierce Rockford, Illinois/USA; Pharmacia, Freiburg; Roche (ehem. Boehringer), Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, München.

Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid

Äthanol (EtOH)

Agarose

Agar, Bacto-Agar

Ampicillin, Natriumsalz

β -Mercaptoäthanol

Bisacrylamid

Bradford Reagenz

Bromphenolblau (BPB)

Casein

Chloroform

1,4 Dithiothreitol (DTT)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure Dinatriumsalz)

Ethidiumbromid (EtBr)

Formaldehyd

Glucose

Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin)

Glycerin

Glycin

Harnstoff (Urea)

Hefeextrakt, Bacto-Yeast Extract

Isoamylalkohol

Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)

Isopropanol

Lithium Azetat (LiAc)

Luminol, Natriumsalz

Magermilchpulver

Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)

Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)

Methanol (MetOH)

N-Ethylmaleimid (NEM)

Natriumazetat (NaAc)

Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Natriumhydroxid

Pepton

Phenol

Salzsäure (HCl)

N-Lauroylsarkosin (Sarkosyl)

Schwefelsäure (H_2SO_4)

Silbernitrat ($AgNO_3$)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Tetramethylbenzidin (TMB)

Thiosulfat ($Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris Base, Tris Puffer)

Polyethylenglycol-mono[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]ether (Triton X-100)

Trypton, Bacto-Tryptone

Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Tween[®] 20)

Wasser (H₂O, hochreines, vollentsalztes Wasser, MilliQ, Millipore, Eschborn)

4-Hydroxy-Zimtsäure

Bakterienstämme

Zur DNA Klonierung wurden kommerziell erhältliche, kompetente TOP10 Bakterien (OneShot[™], Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in den Protease reduzierten BL21 Bakterien, die von U.Koch für Hitzeschock Transformation mit der RbCl Methode kompetent gemacht wurden. Beide Bakterienstämme sind Derivate des *E.coli* K12 Laborstamms.

Medien für Bakterien

- **LB-Medium:** Alle Prozentangaben in w/v: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl. Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Bei der Anfertigung von LB-Agar Platten wurden 1,5% Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Für die Herstellung von LB(Amp) wurde in beiden Fällen erst nach dem Abkühlen unter 50°C Ampicillin beigelegt. Die Ampicillin Endkonzentration betrug 0,3 mM.
- **SOC-Medium:** alle Prozentangaben in w/v : 2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄. Die Bestandteile wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Glucose wurde nach Erkalten der Lösung zugefügt (Glucose Endkonzentration von 0,02 mM).

Plasmide

- Das genomische Ausgangsplasmid pUC/HPV6b wurde von E. Schwarz (DKFZ, Heidelberg) bereitgestellt. Das HPV6b Genom war über BamH1 in einen pUC-Vektor einkloniert.
- Im modifizierten pBluescript Plasmid pBS/tag (pL441) wurde das Antigen C-terminal mit dem terminalen Undecapeptid (Aminosäuresequenz:

KPPTPPPEPET) des SV40 T-Antigens (tag) fusioniert (Meschede et al., 1998).

- Mit dem Expressionsplasmid **pGEX4T3** (Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg) wurden die Antigene als Fusionsproteine mit der 26 kD großen Glutathion S-Transferase (GST) am N-Terminus exprimiert. Das GST Gen enthält ein ATG und eine Ribosombindungsstelle und wird von einem tac-Promotor (IPTG induzierbar) getrieben.

ELISA Materialien

- **Phosphat gepufferte Salzlösung:** PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4) wurde als 10x Konzentrat mit H_2O angesetzt und zum Gebrauch mit H_2O auf 1x verdünnt.
- **Beschichtungspuffer:** Coat Puffer (50 mM Na-Carbonat, pH 9,6) aus 4 Teilen 50 mM Na_2CO_3 und einem Teil 50 mM NaHCO_3
- **Waschpuffer:** PBST, PBS mit 0,05% (v/v) Tween-20
- **Block Puffer:** Casein Block Puffer, 0,2% (w/v) Casein (Sigma) in PBST gelöst (Erhitzen auf ca. 50°C und 5 min. rühren, Aufbewahrung bei 4°C für maximal zwei Tage).
- **Primärantikörper:** polyklonales Kaninchen anti-Glutathion-S-Transferase Serum (Sigma), monoklonaler Maus anti-SV40-T-tag Antikörper (MacArthur and Walter, 1984), aufgereinigt von P. Sehr und U. Koch aus KT3 Hybridomüberstand.
- **Peroxidase gekoppelte, polyklonale Sekundärantikörper:** Peroxidase Esel anti-Human IgG (Dianova, Hamburg), Peroxidase Ziege anti-Maus IgG/IgM (Dianova) und Peroxidase Ziege anti-Kaninchen IgG (Dianova)
- **Substratpuffer:** 0,1 M Natriumazetat (pH 6,0) und Schwefelsäure (1 M H_2SO_4) als Stopp der Substratreaktion
- **Substrat:** 10 mg/ml Tetramethylbenzidin (TMB) in DMSO gelöst, Aufbewahrung in kleinen Aliquots bei -20°C. Vor der Reaktion in der ELISA Platte wurde die Substratlösung mit 0,6% (v/v) H_2O_2 versetzt.

Humanseren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Humanseren wurden im ELISA 1:50 verdünnt eingesetzt. Vor ihrer ersten Verwendung wurden die Seren einmalig für 30 min. bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Condylom-Gruppe

Analysiert wurden Seren von 81 weiblichen, nordamerikanischen Genitalwarzenpatientinnen (Median 27 Jahre, Altersverteilung von 18 bis 72 Jahre), deren Condylome über eine Biopsie bestätigt waren (3M Aldara Studie 1174-IMIQ). Ein Teil dieser Seren wurde schon zuvor untersucht (Peng et al., 1999). Die Seren wurden von I. Frazer (University of Brisbane, Australien) und H.B. Slade (3M Pharmaceuticals, St. Paul MN/USA) bereitgestellt.

RRP-Gruppe

Die RRP-Gruppe mit 94 Patienten aus Finnland (Median 53 Jahre, Altersverteilung von 5 bis 81 Jahre) bestehend aus 11 Patienten mit juvenil einsetzenden und 83 mit adult einsetzenden RRP beinhaltet Seren vom ersten Besuch in der Klinik und 76 Folgeseren (Follow-up) von 47 Patienten. Ein Teil der Seren wurde bereits publiziert (Aaltonen et al., 2001). Die Seren wurden von L.-M. Aaltonen (Univ. Central Hospital, Helsinki, Finland) bereitgestellt. Alle Serumproben waren zunächst codiert. Nach den Tests wurde der Code für die Auswertung gebrochen.

Seren von gesunden Individuen

Seren von 68 gesunden, deutschen Individuen mit unbekannter Warzenhistorie (Median 37 Jahre, Altersverteilung von 18 bis 76 Jahre, Verhältnis Männer zu Frauen = 1:1) dienten als Kontrollen. Die Seren waren im Labor vorhanden und kamen aus einer großen deutschen Ernährungsstudie (Anders, Rosenbauer, and Matiaske, 1990), die die deutsche Normalbevölkerung repräsentieren.

DNA Klonierung

DNA-Gelelektrophorese

In Elektrophoresepuffer (40 mM Tris, 2,5 mM NaAc, 1 mM EDTA) wurde Agarose (1%ig (w/v)) durch kochen aufgelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde 0,5 µg/mL EtBr zugegeben und das Gel in einer Agarosegelkammer blasenfrei gegossen. Die Elektrophorese mit den in BPB-Glycerin Probenpuffer aufgenommenen Proben erfolgte bei 100 V für ca. 30 min. Als Marker diente der kommerziell erhältliche Smart Ladder DNA Marker (Eurogentec, Seraing, Belgien), der 14 Banden zwischen 200 bp und 10000 bp mit einer hervorgehobenen 1000 bp Bande zeigt. Die Markerbanden dienten zusätzlich zur Mengenabschätzung im Gel. Die Überprüfung einer analytischen Restriktionsspaltung wurde bei kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) durchgeführt. Präparative Gele wurden nur langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgesetzt.

Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden zur präparativen und analytischen Restriktionsspaltung eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden je nach Enzym in den Endkonzentrationen 1x oder 2x Y-Tango Puffer (MBI, St.Leon-Roth) angesetzt und bei 37°C, oder der vom Hersteller empfohlenen Temperatur 1 bis 3 Stunden inkubiert. Es wurde mit einem Enzymüberschuß gearbeitet und darauf geachtet, daß das dabei zugegebene Volumen der Enzymlösung weniger als 10% des Endvolumens betrug. Dadurch wurde das im Enzymlagerungspuffer enthaltene Glycerin ausreichend verdünnt.

Gelextraktion

Aus dem Agarosegel wurden bei langwelligem UV-Licht Vektor- und Insert-DNA als möglichst kleine Blöcke mit dem Skalpell ausgeschnitten und nach Hersteller Protokoll (Qiagen GelExtraction Kit, Spinocolumn) aus dem Gel aufgereinigt und die Mengen für die weitere Verarbeitung in einem Agarosegel anhand des Markers abgeschätzt.

CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) Behandlung, Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und DNA-Präzipitation

Um die Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde sie vorher mit CIAP an den Enden dephosphoryliert. CIAP katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphatenden der DNA. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 10 mM Tris (pH 5,2) und 10 mM MgCl₂ und 0,02 U/μl CIAP eine halbe Stunde bei 30°C durchgeführt. Danach wurde die CIAP hitzeinaktiviert (85°C, 15 min.). In einigen Fällen wurde die DNA-Lösung zusätzlich noch mittels Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Dazu wurde die wässrige DNA-Lösung mit jeweils einem Teil Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 30 sek. gemischt und 5 min. in der Tischzentrifuge bei R.T. zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 2,5 vol. eiskaltem 100 % EtOH 45 min. bei 4°C und 15000 U/min. (Umdrehungen pro Minute) in der Zentrifuge präzipitiert. Das Sediment wurde mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen und 10 min. bei 4°C und 15000 U/min. zentrifugiert. Das Sediment wurde bei 37°C getrocknet und in Wasser aufgenommen.

Ligation

Die Ligation wurde mittels 0,1 U/μl T4-Ligase in 1x Ligase-Puffer ü.N. bei 16°C durchgeführt. Die molaren Verhältnisse zwischen Insert und Vektor wurden zwischen 1:1 und 5:1 gehalten. Es wurde immer eine Vektorkontrolle ohne Insert mitgeführt. Bei dem Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile wurde darauf geachtet, die DNA nicht zu stark zu scheren.

Hitzeschock Transformation, Plasmid-DNA Präparation, Glycerinstock

Um kompetente TOP10 Bakterien zu transformieren wurde ein bei -80°C gelagertes Aliquot für 10 min. auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1 bis 4 μL Ligationsansatz zugegeben und für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde 30 sek. einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und danach 2 min. auf Eis inkubiert, bevor 250 μl 37°C warmes SOC-Medium zugegeben wurde. Nach 1 Stunde Schütteln des Ansatzes bei 37°C wurden bis zu drei unterschiedliche Volumina der Transformation auf getrocknete und

vorgewärmte LB(Amp)-Platten ausplattiert und mindestens 10 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die Klonierungsprodukte zu überprüfen wurden 6 bis 10 Einzelklone von den Platten gepickt und in 3 mL LB(Amp)-Kulturen für mindestens 6 Stunden bei 37°C schüttelnd wachsen gelassen. Aus 1,5 mL der Kulturen wurde die Plasmid-DNA mit Qiagen Minipräp Zentrifugiersäulchen (QIAprep, Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurden durch Testverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen analysiert. Die DNA von ein bis zwei richtigen Klonen wurde in kompetente BL21 Expressionsbakterien transformiert. Der Ablauf der Transformation wurde analog der Transformation der TOP10 Bakterien durchgeführt, mit der Änderung des Flüssigmediums von SOC zu LB. Ein Klon wurde direkt in 50 mL LB(Amp) für eine Übernachtskultur bei 37°C überführt, um mit der dichtgewachsenen Kultur (Midipräp, Qiagen-Tropfsäule 100) eine größere Menge Plasmid-DNA als Stock bei -20°C in wässriger Lösung wegfrieren zu können. Die gereinigte DNA wurde der gleichen Restriktionsanalyse wie die Minipräp-DNA unterzogen. Mit 0,75 mL der Midipräpkultur wurde außerdem ein Glycerinstock durch Zugabe von 0,75 mL sterilem 50% Glycerin in Gefriererörchen (Nalgene, Nalge Nunc, Wiesbaden) hergestellt und bei -70°C gelagert.

Sequenzierung mit dem Pharmacia T7 Sequenzier Kit

Die zu sequenzierende DNA (2 µg, Midipräp) wurde in 0,4 M NaOH für 15 min. bei 37°C denaturiert und durch Zugabe von 0,4 M NaAc (pH 5,2) und 3 vol. 100% EtOH für 15 min. in der Tischzentrifuge (4°C, 13500 U/min.) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 150 µL 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Sediment für 15 min. bei 37°C getrocknet und bei -20°C ü.N. eingefroren. Die Probe wurde 5 min. bei R.T. aufgetaut und in 10 µL H₂O und 2 µL Anlagerungspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 pmol Sequenzierprimer wurde für 25 min. bei 45°C und anschließend 15 min. bei R.T. inkubiert. 6 µL des Labelling Master Mixes (enthielt nach Vorschrift des Herstellers Nukleotide, radioaktiv markiertes ³⁵SdATP und 0,5 U/µl T7-Ligase) wurden zugegeben und 5 min. bei R.T. inkubiert und dann mit 5 µL Terminations-Mix abgestoppt. In einem 6%igem Harnstoff-Acrylamid Gel wurden jeweils 2 bis

4 µl der Proben bei 60 bis 80 W aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels wurde ein Röntgenfilm 5 Tage exponiert, entwickelt und gelesen.

Polymerase Kettenreaktion zur Klonierung der Antigene aus dem HPV6b Genom

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zur gezielten Klonierung von HPV6b Genen (aus dem pUC/HPV6b Plasmid) benutzt. Durch die verwendeten PCR-Primer wurden mit Ausnahme von L1 und L2 die kompletten offenen Leserahmen (ORF) der viralen Gene amplifiziert (Tab. 2). Bei L2 wurde lediglich das Startkodon weggelassen. Bei L1 wurde der ORF N-terminal um 10 Kodons verkürzt (Chen et al., 2001). Alle Polymerase Kettenreaktionen wurden nach dem Pwo Standardprotokoll (Reaktionspuffer enthielt 2 mM MgSO₄) mit der Pwo Polymerase (Boehringer, Mannheim). Die verwendeten Reagenzien wurden nach Herstellerprotokoll eingesetzt und bis auf die Primer und den Nukleotid-Mix vom Hersteller bezogen. Die Pwo-Polymerase besitzt eine Korrekturfunktion (Proofreading), die einer 3'-5' Exonuklease entspricht. Deshalb wurde der Ablauf der PCR an die Empfehlungen des Herstellers angelehnt und als sog. Hotstart-PCR begonnen. Hierbei wurden alle Bestandteile der PCR-Reaktion außer der Polymerase für 2 min. auf 94°C erhitzt und dann wurden vor dem ersten Zyklus die Pwo-Polymerase zugegeben. Die 25 Zyklen setzten sich zusammen aus einer 15 sek. dauernden Denaturierungsphase (94°C), einer 30 sek. dauernden Anlagerungsphase (annealing), die 5°C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares durchgeführt wurde, und einer einminütigen Elongationsphase (72°C). Am Ende wurde noch einmal 7 min. elongiert und die Reaktion dann durch Kühlung auf 4°C unterbrochen. Die restriktionsverdauten PCR-Produkte wurden über präparative Agarosegele aufgereinigt, und in den analog dazu verdauten, CIAP-behandelten Vektor inkloniert. Die daraus resultierenden Fusionsgene und die Beschreibung der Vektoren sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 2: PCR-Primer

Gen	Richtung	PCR-Primer Sequenz (codierender Strang 5'→3')*
L1	sense	GCAGT CCCCG GGGTGCCTCC TCCTAACCCCT G
L1	antisense	GCGCGCCAAA ACTAAA AGGG TCGACTCATG C
L2	sense	GCAGAC CCCCG GGCACATAGT AGGGCCCCG
L2	antisense	TTTTTTCAGA TGTGGCGGCC GTCGACATTT GC
E2	sense	GCAGT CGGAT CCATGGAAGC AATAGCCAAG CG
E2	antisense	GGATTTATGT CACTGCACCT ATT GGTCGAC TCATGC
E4	sense	GCAGT CGGAT CCCCCGGGAT GGGAGCACCA AACATTGGG
E4	antisense	GTAACAGTTC AGCTACGCCT AGTCGACAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA mit tag ACCTGAAACA TA ACTCGAGT CATGG
E6	sense	ATTTGCT CTA GATCTATGGA AAGTGCAAAT GCCTCCACG
E6	antisense	ATTTGCGGAT CCGGGTA ACA TGTCTTCCAT
E7	sense	ATTTGCT CTA GATCTATGCA TGAAGACAT GTT
E7	antisense	ATTTGCGGAT CCGGTCTTCG GTGCGCAGAT

* Restriktionsenzym Erkennungstellen wurden fett gedruckt.

Tab. 3: Antigene

Antigen	Nukleotide ^o	Größe des Fusionsproteins	Plasmid*
L1	5789-7291	82,2 kD (731 AS)	pGEX/6bL1tag
L2	4423-5802	77,4 kD (701 AS)	pGEX/6bL2tag
E2	2723-3826	70,0 kD (607 AS)	pGEX/6bE2tag
E4	3255-3581	40,0 kD (350 AS)	pGEX/6bE4tag
E6	102-554	45,0 kD (389 AS)	pGEX/6bE6tag
E7	530-826	38,5 kD (337 AS)	pGEX/6bE7tag
GSTtag	-	28,2 kD (243 AS)	pGEX/tag

^o Sequenznummerierung nach Entrez/Genome (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)

*Alle Expressionsplasmide sind im Anhang als Plasmidkarten mit offenen Leserahmen aufgeführt.

Klonierungsschema

Die Klonierung der PCR-Produkte als GST-X-tag Fusionen in den pGEX-Vektor erfolgte im Falle von E6 und E7 über das Bluescript Plasmid pBS/tag, welches bereits das SV40-tag enthielt (Meschede et al., 1998). Diese beiden X-tag Fusionsproteine wurden dann in den pGEX-Vektor inkloniert. Mit dem Antisense-Primer für E4 wurde das SV40-tag direkt in das pGEX-Plasmid mit inkloniert. Nach dem Herausschneiden der E4 Sequenz wurde das resultierende pGEX-tag Plasmid für alle weiteren Klonierungen verwendet. Im Klonierungsschema (Abb. 2) sind die oben genannten Klonierungswege beschrieben. Für die Klonierung von L2 mußte das HPV6b Genom mit BamHI aus dem Plasmid pUC/HPV6b herausgeschnitten und vor der PCR religiert werden. Alle pGEX-Xtag Plasmide wurden mit Restriktions- und Sequenzanalysen verifiziert.

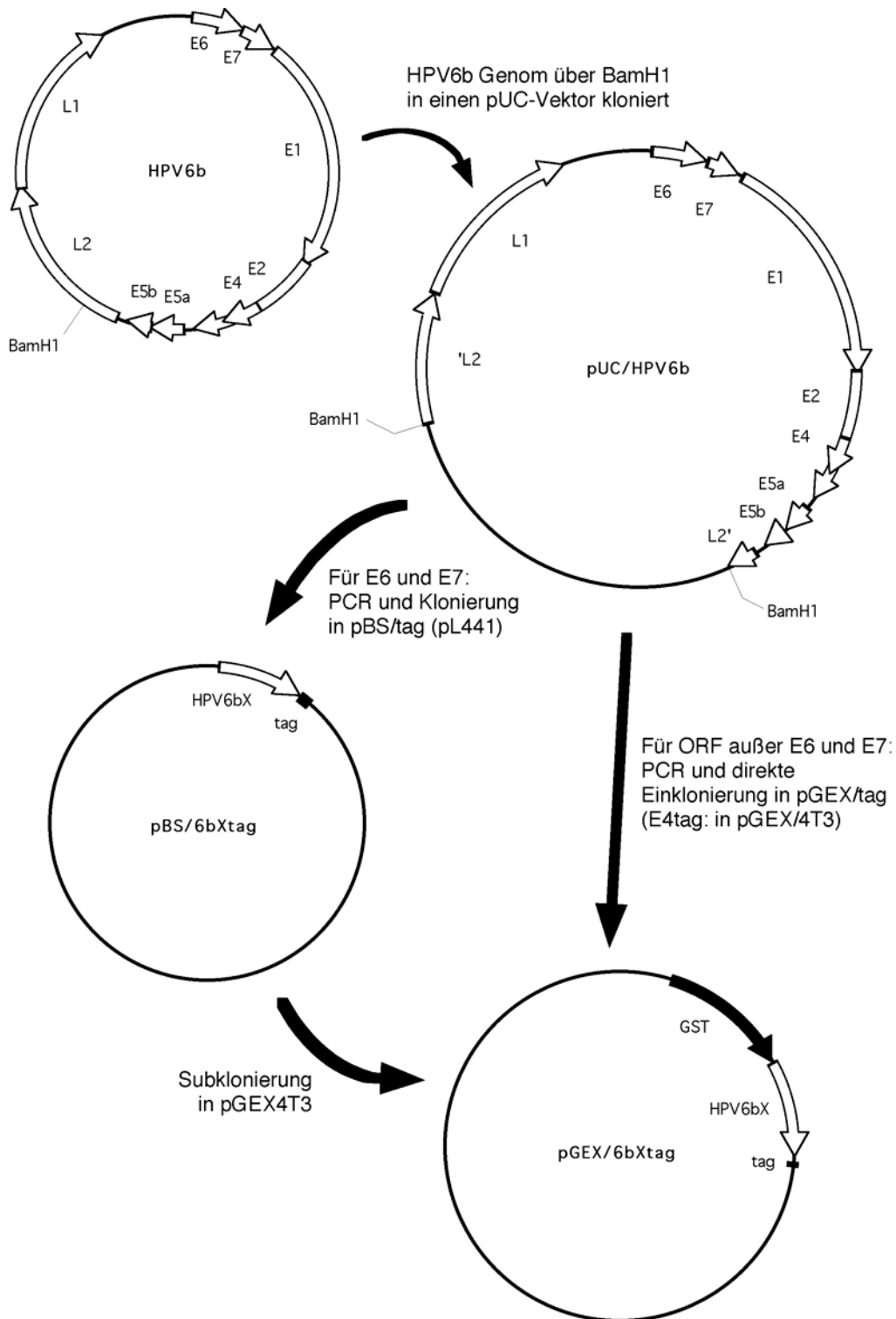


Abb. 2: Klonierungsschema zur Herstellung der Expressionsplasmide

Die offenen Leserahmen wurden für alle Antigene außer L2 direkt aus dem von E.Schwarz erhaltenen pUC/HPV6b (Schwarz et al., 1983) amplifiziert und in pGEX/tag kloniert. Der antisense Primer für den E4 ORF enthielt das Markerepitop tag (MacArthur and Walter, 1984). E4tag wurde in pGEX4T3 kloniert, genau wie E6tag und E7tag, die zuvor in pBS/tag kloniert wurden.

Expression und Präparation der Antigene

Um die Fusionsproteine zu exprimieren, wurde aus dem Glycerinstock eine 25 mL Vorkultur der BL21 Bakterien, die das gewünschte pGEX-Plasmid trugen, in LB(Amp) angeimpft und ü.N. bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die dicht gewachsene Vorkultur wurde komplett in 1 L LB(Amp) überführt und bei R.T. auf einem Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$ gemessen gegenüber LB-Medium) von 0,5 kultiviert. Die GST-tag Expressionskultur wurde immer bei 37°C inkubiert, alle anderen bei R.T. Um die Expression zu induzieren, wurde IPTG zur Kultur gegeben (IPTG Endkonzentration 0,25 mM). Die optische Dichte der Expressionskultur wurde während der Expressionsphase mehrmals kontrolliert.

Nachdem die induzierten Kulturen insgesamt 4,5 bis 6 h gewachsen waren, wurden sie für 5 min. bei 6000 U/min. in einer Sorvall Zentrifuge mit SLA3000-Rotor abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Sedimente aus einem Liter Bakterienkultur wurden in 20 mL PBS resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Die GST-tag Lysate wurden analog den HPV Antigenen präpariert. Nach dem Auftauen der resuspendierten Bakterien bei R.T. im Wasserbad wurde pro Liter Kultur eine halbe, in 1 mL Wasser gelöste Tablette Protease Inhibitor Cocktail Complete™ (Roche) und DTT (Endkonzentration 2 mM) zugegeben, um Degradation der Proteine und Bildung neuer, unspezifischer Disulfidbrücken zu vermindern. Der Lysepuffer für L1, L2, E2 und E4 erhielt zusätzlich das Detergenz Sarkosyl mit einer Endkonzentration von 0,5% (w/v), um die Löslichkeit der Proteine in den Lysaten zu erhöhen. Danach wurde die Bakterien in drei Durchgängen mit einem Hochdruckhomogenisator Emulsiflex-C5 unter ständiger Kühlung aufgeschlossen und sofort danach 30 min. bei 4°C und 30000xg zentrifugiert und somit geklärt. Von den Lysaten wurde zuvor ein kleiner Teil für die Auftrennung in Proteingelen zurückgehalten, die Sedimente der Zentrifugation wurden verworfen. Die Proteinkonzentration der 30000xg Überstände (im Weiteren als geklärte Lysate bezeichnet) wurde mittels Bradford Reagenz (200 µL Bradford Reagenz, 790 µL Wasser, 10 µL des 1:10 in Wasser verdünnten geklärten Lysats) bestimmt, wobei die optische Dichte von 0,1 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{ nm}$ gegenüber dem Leerwert ohne Protein, einer

Proteinmenge (BSA) von 1,75 µg zugeordnet wurde. Die Konzentration der Lysate wurde zunächst parallel zu der Konzentration des geklärten Lysats bestimmt, die Werte wichen aber kaum voneinander ab, man konnte somit die Konzentration des Lysates mit der des geklärten Lysats gleichsetzen. Die vermessenen geklärten Lysate wurden in 200 µL- und 400 µL-Aliquots bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden einzelne Aliquots in einem Wasserbad bei R.T. aufgetaut; die nicht benötigten Reste eines Aliquots wurden verworfen.

SDS-Proteingel (SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Die Lysate und geklärten Lysate wurden mit einer Proteinendkonzentration von 1 µg/µL in SDS-Gel-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) aufgenommen und 5 min. zum Denaturieren der Proteine auf 95°C erhitzt. Die SDS-Polyacrylamid Mini-Gele wurden mit Sammel- und Trenngel (13,5% Acrylamid) gegossen. Es standen max. 15 Spuren pro Gel zur Verfügung, in eine Tasche wurde nie mehr als 25 µL Proteinprobe geladen; nicht benötigte Taschen wurden mit 1x Probenpuffer aufgefüllt. Der Gellauf wurde immer für 50 min. bei 200 V Spannung mit frischem 1x Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS) durchgeführt.

Färbung mit kolloidalem Coomassie

Um eine gute Färbung der Proteinbanden von Bakterienlysaten mit dem kolloidalen Coomassie Farbstoff GelCode (Pierce) zu erreichen, wurden zwischen 10 und 20 µg Protein pro Spur eines Mini-Gels aufgetragen. Als Marker wurde eine Spur mit 4 µL Mid-Range Marker (Promega, Mannheim) beladen. Nach dem Gellauf wurde auf dem Kippschüttler bei R.T. für 30 min das SDS mit Wasser (2x Wechsel) aus dem Gel gewaschen. Danach wurde das Gel mindestens 1 h in 8 mL GelCode auf dem Kippschüttler bei R.T. inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Um den Kontrast zu erhöhen und den Hintergrund zu reduzieren, wurde das Gel mindestens 30 min. mit Wasser gewaschen. Zur Konservierung wurde das Gel zwischen zwei Geltrocknungsfolien (Promega) in einen Plexiglasrahmen gespannt und bei R.T. mehrere Tage getrocknet.

Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid Gelen

Zur Detektion von geringen Proteinmengen wurde eine Silberfärbung der SDS-Gele durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, daß Silber-Kationen an die Proteine angelagert und dann zu Silber reduziert und damit unlöslich werden. Dadurch erhalten die Proteinbanden im Gel eine braune bis schwarze Färbung. In Silbergelen wurde der Mid-Range-Marker 1:100 verdünnt verwendet. Nach dem Gellauf wurde das Gel mindestens 30 min. in Fixier-Lösung (alle v/v: 50% MetOH, 12% Essigsäure, 0,02% Formaldehyd) inkubiert und dreimal 10 min. in 50% (v/v) EtOH gewaschen. Alle Schritte dieser Färbung wurden bei R.T. auf dem Kippschüttler durchgeführt. Nach einminütiger Inkubation in frischer Thiosulfat-Lösung (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) wurde das Gel dreimal 20 sek. in Wasser gewaschen. Die Imprägnierung mit Silberkationen wurde in frischer Silbernitrat-Lösung (0,02% (w/v) AgNO_3 , 0,03% (v/v) Formaldehyd) 20 min. lang durchgeführt und das Gel danach 2x 20 sek. gewaschen. Frische Natriumcarbonat-Lösung (6% (w/v) Na_2CO_3 , 0,02% (v/v) Formaldehyd und 0,2% (v/v) der Thiosulfat-Lösung) setzte die Farbreaktion in Gang, welche abgestoppt wurde, nachdem die Banden gut sichtbar waren. Dazu wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen und 10 min. in Stopp-Lösung (50% (v/v) MetOH, 12% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Das gefärbte Gel inkubierte danach für mindestens eine halbe Stunde in 50% (v/v) MetOH und dann in 30% (v/v) MetOH, bevor es in Gel Trocknungsfolie eingespannt wurde.

Western-Blot

In der PAGE wurde ein vorgefärbter low-range Proteinmarker (NEB) verwendet. Das Gel wurde in einer Biorad Naßblotkammer zwischen zwei Whatman-Papieren auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μm (Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert. Der Transfer wurde mit 1x Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,2 mM SDS, 20% (v/v) MetOH) eine Stunde bei einer Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 350 mA durchgeführt und durch Färbung mit Ponceaurot überprüft (1 min. Inkubation in Ponceau S-Lösung, Boehringer, und Abspülen mit Wasser). Freie Proteinbindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation (1h) mit 10% (w/v) Milchpulver (Roth) in

PBST abgesättigt (blockiert). Alle Schritte wurden bei R.T. auf dem Kippschüttler durchgeführt. Die Erstantikörper Maus anti-tag in einer Verdünnung von 1:1000 und Kaninchen anti-GST Serum (1:10000) wurden jeweils in 5% (w/v) Milchpulver in PBST zu der Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST für mindestens 5 min. wurden die mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper Ziege anti-Maus oder Ziege anti-Kaninchen in einer Verdünnung von 1:10000 eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Lichtreaktion (enhanced chemiluminescence) mit 1,25 mM Natrium-Luminol in 0,1 M Tris/HCl (pH 8,6), 2,7 mM H₂O₂ und 27 µM 4-Hydroxy-Zimtsäure als Enhancer gestartet. Dazu wurde die Membran eine Minute in der Luminollösung inkubiert und dann in eine durchsichtige Doppelfolie gelegt und luftblasenfrei gestrichen. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mit Röntgenfilmen, die zwischen 25 sek. und 5 min. exponiert und dann entwickelt wurden.

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Die ELISA Methoden ermöglicht die quantitative oder zumindest semiquantitative Bestimmung von Antigen oder Antikörper. Die Methode wurde zuerst von Engvall und Perlman beschrieben (Engvall and Perlman, 1971).

In dieser Arbeit wurden ELISA mit 6 unterschiedlichen Antigenen in einer neuen Form des capture ELISA als serologische Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen diese HPV-Proteine etabliert. Diese am Deutschen Krebsforschungszentrum von P. Sehr, M. Pawlita und C. Gänzler entwickelte Methode wurde in den USA zum Patent angemeldet (US 60/305259).

Die in *E.coli* überexprimierten Proteinantigene enthielten die Glutathion S-Transferase (GST) als Fusionspartner. Durch Bindung des GST an immobilisiertes Glutathion wurde das lösliche Antigen in einem Schritt auf der ELISA Platte aus dem bakteriellen Lysat immobilisiert und aufgereinigt.

Herstellung des Glutathion-Caseins

Die folgenden Schritte wurden in Zusammenarbeit mit P. Sehr durchgeführt.

Die Lysine des Caseins sollten an die Sulfhydryl-Gruppe des Glutathions gebunden werden. Als für die Kopplungsreaktion relevante Aminosäuren besitzt α -Casein 12 und β -Casein 15 Lysine. Um eine Quervernetzung der Caseine bei der Kopplungsreaktion zu vermeiden, wurden zunächst die Sulfhydryl-Gruppen der Caseine durch Reaktion mit N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. Dazu wurde Casein mit einer Konzentration von 5 mg/mL in PBS gelöst und für 15 min. bei R.T. mit 0,4 mM NEM inkubiert. Der heterobifunktionelle Crosslinker Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl] butyrat (SSMPB, Pierce) wurde über die aminoreaktive Succinimidyl-Gruppe an die Lysine des Caseins gebunden (Abb. 3). Dafür wurde 4 mM SSMPB für eine halbe Stunde bei R.T. zu der Reaktion gegeben. Freies NEM und SSMPB wurden über eine PD10-Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Freiburg) vom Casein abgetrennt. Die Verknüpfung des mit dem Crosslinker aktivierten Caseins erfolgte über das Cystein des Glutathions mittels der sulfhydrylreaktiven Maleimid-Gruppe des Crosslinkers. Zur Proteinfraction der Säulenchromatographie wurde 10 mM

Glutathion zugegeben und die Reaktion für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde freies Glutathion durch erneute Gelfiltration mit einer PD10-Säule und PBS als Puffer vom Glutathion-Casein abgetrennt. Die Proteinfraction wurde in kleinen Aliquots bei -20°C aufbewahrt und kurz vor Gebrauch im ELISA im Wasserbad bei R.T. aufgetaut.

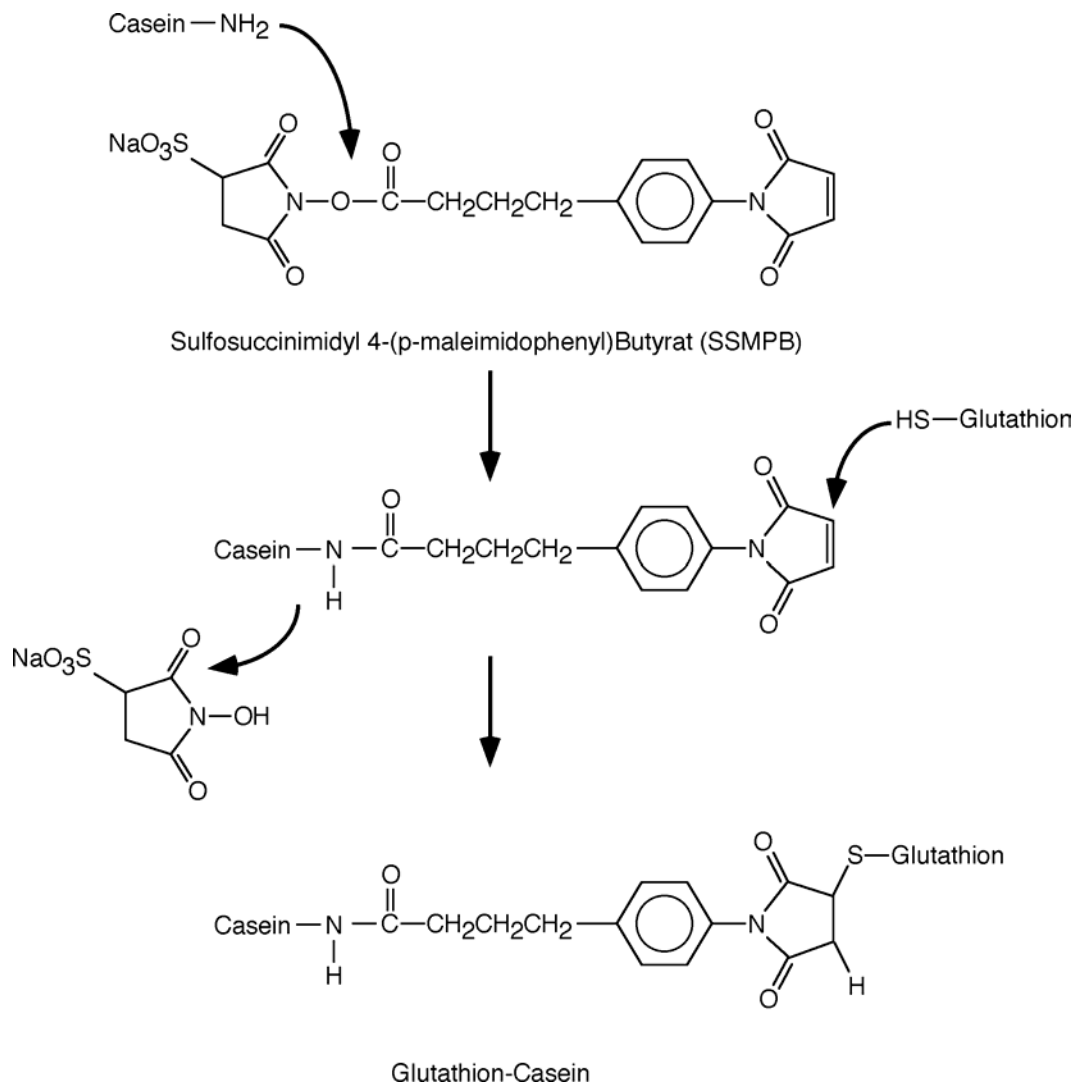


Abb. 3: Reaktionsfolge für die Kopplung von Glutathion an Casein

Die Abgangsgruppe (Sulfosuccinimidol) des Vernetzers (SSMPB) wurde im ersten Schritt mit der Aminogruppe eines Lysinrest des Caseins substituiert. In einem zweiten Schritt wurde die Sulfhydryl-Gruppe des Glutathions an die Doppelbindung des Maleimid-Rings des Vernetzers addiert.

ELISA Ablauf

Bei allen ELISA Versuchen, die hier beschrieben werden, betrug das Standardvolumen 100 μL pro Loch der 96-Loch ELISA Platte in allen Schritten, falls nicht anders angegeben. Die 96-Loch Platte (Polysorb, Nunc) wurde mit 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ Glutathion-Casein in 50 mM Na-Carbonat-Puffer (pH 9,6) $\ddot{u}.$ N. bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde ausgeschüttet und einmal kurz auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Der Schritt zur Blockierung frei gebliebener Protein Bindungsstellen der Plattenoberfläche wurde mit einer 0,2%igen (w/v) Lösung von Casein in PBST (Block) eine Stunde bei 37°C mit 180 μL Block-Puffer pro Loch durchgeführt. Die bei der Blockierung zusätzlichen 80 μL pro Loch stellten dabei sicher, daß über dem Standardvolumen von 100 μL keine unspezifische Anlagerung der weiteren ELISA Reagenzien stattfanden. Nach der Blockierung wurde die Platte ausgeschüttet und einmal auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Alle weiteren Schritte des ELISA, mit Ausnahme der Farbreaktion, wurden in der Block-Lösung durchgeführt.

Waschen der ELISA Platten

Da alle ELISA Reagenzien im Überschuß auf die Platte gegeben wurden, mußte zwischen den Schritten die Platte gewaschen werden. Dabei wurde das gesamte Loch mit PBST (250 μL) jeweils sechs mal gewaschen. Dies erfolgte durch Eintauchen der gesamten Platte in eine mit PBST gefüllte Glaswanne. Das PBST des ersten Waschschriffs wurde ausgekippt und die Platte einmal ausgeschlagen. Die folgenden Waschschriffe wurden, um Waschpuffer zu sparen und den Ablauf zu beschleunigen, wieder in die Wanne zurückgeschüttet. Am Ende des Waschvorgangs wurden die Platten auf einem Papierhandtuchstapel mehrfach ausgeklopft. Danach wurde darauf geachtet, daß die Platten binnen 5 min. wieder befüllt wurden, um eine Austrocknung zu verhindern.

Plattenelution

Um zu bestimmen, welche Proteine des Bakterienlysats auf der ELISA Platte durch das Glutathion-Casein aufgereinigt werden, wurden Glutathion-Casein beschichtete und blockierte 24-Loch Zellkulturplatten (Corning) mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Antigen beladen. Für die Plattenelution wurde die Oberfläche eines Lochs der Zellkulturplatte verwendet, die sechs Löchern einer 96-Loch ELISA Platte entsprach. Das sechsfache Volumen aller Reagenzien beim ELISA wurden pro Loch bei der Plattenelution verwendet. Sechs Waschschritte wurden pipettiert und das PBST verworfen. Die mit 50 μL SDS-Probenpuffer pro Loch eluierten Proteine wurden mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Silber gefärbt, oder per Western-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulose Membran übertragen und dort mittels anti-tag oder anti-GST Antikörpern detektiert.

Antigen-Titration

Die ü.N. gecoateten und blockierten Platten wurden mit einer 1:2 Verdünnungsreihe der Antigene beladen. Die Anfangskonzentration der Antigene war 1 μg Lysat-Protein/ μL Blockpuffer. Es wurden Doppelproben für jede Verdünnungsstufe auf die Platte pipettiert und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden die Erstantikörper Maus anti-tag in einer Verdünnung von 1:1000 oder Kaninchen anti-GST (1:10000) zugegeben und es wurde eine Stunde bei R.T. inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper Ziege anti-Maus oder Ziege anti-Kaninchen, beide in einer Verdünnung von 1:10000, eine Stunde bei R.T. inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurde die Farbreaktion mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetramethylbenzidin und 0,003% (v/v) H_2O_2 als Substrat in Substratpuffer (0,1 M Natriumacetat, pH 6,0) durchgeführt und nach 5 bis 8 min. mit 50 μL 1 M Schwefelsäure pro Loch abgestoppt. Die optische Dichte wurde am ELISA Lesegerät bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm gemessen und grafisch ausgewertet (Beispiele in Abb. 9). Hierzu wurden die Meßwerte gegen die Titrationsstufen linear/linear oder linear/logarithmisch aufgetragen. Der linear/linear Liniengraph diente zur Bestimmung der Sättigungsmenge des Antigens und der linear/logarithmische Graph zeigte den Titrationsverlauf.

Vorinkubation der Seren zur Blockierung unspezifischer Reaktionen

Humanseren wurden immer 1:50 in Blockpuffer, der 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ GST-tag Lysat enthielt, verdünnt und mindestens eine dreiviertel Stunde in Cluster Tubes (COSTAR) bei 4°C inkubiert, bevor sie im ELISA verwendet wurden. Diese

Präabsorption verhinderte das Entstehen von Hintergrundreaktionen mit bakteriellen Proteinen auf der Platte und den GST- und tag-Anteilen der Antigen Fusionsproteine.

Serum-ELISA

In allen folgenden Tests wurde die benötigte Anzahl an ELISA 96-Loch Platten ü.N. mit Glutathion-Casein beschichtet und die Antigene in Spalten auf die Platte aufgebracht. Jedes Serum wurde zusätzlich zu den Antigenen auch einmal mit GST-tag untersucht, dieser Hintergrundwert wurde von der Reaktivität mit dem Antigen abgezogen wurde. Jedes Serum wurde mit GST-tag in Blockpuffer vorinkubiert und am selben Tag auf zwei verschiedenen ELISA Platten untersucht.

Nach der Blockierung der ELISA Platte wurden Antigene und GST-tag zu einer Konzentration von 0,25 µg/µL Lysatprotein in Blockpuffer verdünnt und auf die Platte aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C wurde die Platte gewaschen und die mit GST-tag Lysat vorinkubierten Seren in die Platte gefüllt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die gebundenen humanen IgG Antikörper mittels polyklonalem, peroxidasegekoppelten Esel anti-human IgG Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung detektiert. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei R.T., danach wurde ein letztes Mal gewaschen, die Farbreaktion durchgeführt (s.o. Titration der Antigene) und die optische Dichte im ELISA Lesegerät gemessen. Die netto OD-Werte wurden mit Hilfe des Hintergrundwertes für beide Tests berechnet.

Um Platten- und Tages-Reaktivitätsunterschiede im E6 und E7 ELISA kompensieren zu können, wurde ein Plattenfaktor x berechnet: ein Standardserum auf jeder Platte wurde mitgeführt dessen mOD durch $mOD * x = 1000 mOD$ den Faktor x für die Normierung ergab. Mit Hilfe dieses Faktors x wurden alle OD-Werte der Platte normiert. Die bei E6 und E7 mitgeführte Kontrolle war ein stark HPV16E7 positiver Serum-Pool von Zervixkarzinom-Patientinnen und wurde 1:200 verdünnt im ELISA eingesetzt. Dieser Serum-Pool sowie das Antigen GST-HPV16E7tag wurden von P. Sehr bereitgestellt. Das Antigen GST-HPV16E7tag wurde mit einer Konzentration von 0,25 µg Lysat-Protein /µL verwendet. Die im

L2, E2, E4 und L1 ELISA verwendete Positivkontrolle war ein 1:50 verdünntes L1 Antikörperpositives Blutspender-Plasma (Nr. 13), gegenüber dem nicht normiert wurde. Die Positivkontrollen befanden sich immer in der unteren rechten Ecke der ELISA Platte.

Detektion von GST-6bL1tag mit monoklonalen Antikörpern gegen Papillomvirus-Kapside

Die monoklonalen Maus Antikörper wurden alle von N.D. Christensen beschrieben (Dank an M. Müller für das Bereitstellen der aufgereinigten Ascites Antikörper) und 1:1000 verdünnt eingesetzt. Der Antikörper H6.L12 (HPV6 L1) ist ein IgM Antikörper und reagiert mit intakten HPV6 und HPV11 VLPs und neutralisiert HPV11 Virionen (Christensen et al., 1996). Der H11.A32 Antikörper (HPV11 L1) erkennt spezifisch HPV11 Kapside, B1.A1 (BPVL1) erkennt intakte Kapside des Bovinen Papillomvirus (Christensen and Kreider, 1993) und CRPV5A (CRPVL1) erkennt intakte Kapside des Cottontail Rabbit Papillomvirus (Christensen and Kreider, 1991). Der 1:5000 verwendete, mit Peroxidase gekoppelte, Ziege anti-Maus Zweitantikörper (Dianova) detektiert sowohl IgG als auch IgM der Maus. Der ELISA mit den monoklonalen Antikörpern wurde analog dem Serum-ELISA durchgeführt.

L1-VLP Kompetitionsversuch

Wie im Serum-ELISA wurde hier die Platte mit den Antigenen GST-tag und GST-6bL1tag beladen. Die Präabsorption der Seren wurde mit vier unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt. Erstens wurden die Seren, wie im Serum-ELISA, mit GST-tag Lysat in Blockpuffer (Endkonzentration 0,25 µg/µl) vorinkubiert, um die Reaktivität des Serums im L1 ELISA zu definieren. Zweitens wurden die Seren als Positivkontrolle mit GST-6bL1tag Lysat in Blockpuffer (Endkonzentration 0,25 µg/µl) vorinkubiert, um die im Serum vorhandenen L1 Antikörper an das bakteriell exprimierte L1 Antigen zu binden. Drittens wurden die Seren mit einem Überschuß (20 µl der Peak-Fraktion eines CsCl-Gradienten, M.Müller, DKFZ) an HPV11 L1 VLP in GST-tag Blockpuffer vorinkubiert, um die Serumantikörper gegen VLP zu binden und viertens wurden die Seren mit 20 µl CsCl (2 M) in GST-tag Blockpuffer inkubiert, um die Auswirkung der

geänderten Salzkonzentration im ELISA zu testen. Die verschiedenen vorinkubierten Seren wurden entsprechend dem Serum-ELISA eingesetzt. Die weitere Durchführung entsprach dem Serum-ELISA.

Statistische Methoden

Regressionsgerade

Die lineare Regressionsgerade wird mit möglichst geringer Abweichung von den Werten durch die Wertewolke gelegt, indem der Vorhersagefehler für die Gerade durch die Methode der kleinsten Quadrate minimiert wird.

Spearman Rangkorrelation

Die Rangkorrelation nach Spearman ermittelt das Maß für den Zusammenhang zweier ordinalskalierten Variablen. Vom Rang des Werts der ersten Variable in der Rangfolge aller ersten Variablen wird der jeweils nach Wertepaar dazugehörige Rang der zweiten Variable abgezogen. Alle so erhaltenen Differenzen werden quadriert und dann zur "Summe der quadrierten Differenzen der Rangplätze" aufsummiert. Daraus wird der Spearman Rangkorrelationskoeffizient ρ (rho) berechnet. ELISA Reaktivitäten einer Serumgruppe in zwei unterschiedlichen Testsystemen (GST-6bL1tag ELISA und HPV6 VLP ELISA) wurden so verglichen.

Serumreaktivitäten

Da jedes Serum zusätzlich zu den Antigenen auch mit GST-tag im Serum ELISA getestet wurde, konnte die Hintergrundreaktivität von der Reaktivität mit dem Antigen abgezogen und somit eine netto optische Dichte (netOD) berechnet werden. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Messungen oder der Median aus drei Messungen und wurden in milli-OD (mOD) Einheiten angegeben.

Statistik der Cut-offs für L2, E2, E4, E6 und E7

Um entscheiden zu können, ob ein Serum in einem ELISA Test positiv oder negativ reagierte, wurde mit dem asymptotischen Fisher Test (Gart et al., 1986)

für jedes Antigen ein spezifischer Cut-off Wert aus den Meßwerten der Kontrollgruppe berechnet. Von der Normalverteilung der Reaktivitäten ausgehend, wurde iterativ der Mittelwert + 3 Standardabweichungen unter Wegfall der außerhalb dieser Grenzen liegenden Meßwerte berechnet. Der Cut-off für den jeweiligen ELISA ist derjenige Wert, bei dem kein Meßwert mehr wegfällt.

Statistik des L1 Cut-off

Der Cut-off Wert für HPV6b L1 wurde mit einem Test auf Cut-off über maximal selektierte Chi-Quadrat Statistiken geschätzt (Miller and Siegmund, 1982). Hierfür wurden die L1-Werte der Kontrollgruppe und die L1-Werte der Condylomgruppe verwendet. Zum Prinzip: derjenige Wert wurde Cut-off, bei dem die Chi-Quadrat Statistik der Vierfeldertafel (s. Fisher Exact) die Kontroll- und Patientengruppe am besten unterschied. Da der L1 Cut-off aus dem Vergleich zwischen Patientenseren und Kontrollen ermittelt wurde, standen die Testergebnisse durch die Mittelwerte aus der Zweifachbestimmung fest.

Boxplot (Tukey)

Die Verteilung der ELISA Reaktivitäten einer Serumgruppe mit einem GST-Xtag Antigen wurden in Boxplots nach Tukey (Tukey, 1977) dargestellt. Die Box beinhaltet die Werte zwischen der 25 und der 75 Perzentile, also die mittleren 50% der Werte (Interquartile Range, IQR). Der Strich innerhalb der Box zeigte den Median der Werte an. Werte, die einen bis zwei Steps (1 Step = 1,5 x IQR) oberhalb der oberen Quartile oder unterhalb der unteren Quartile lagen, wurden als Ausreißer (Outlier) bezeichnet. Werte außerhalb dieser Grenzen waren extreme Outliers. Outlier wurden im Boxplot durch Sterne und extreme Outlier durch Rauten gekennzeichnet. Die senkrechten Linien auf und unter der Box erstreckten sich bis zum letzten Wert, der kein Outlier war. Wenn es keine Werte gab, die der Outlier-Regel entsprachen, wurden die senkrechten Linien bis zum letzten Wert gezogen und keine einzelnen Outlier angezeigt.

Der U-Test von Mann-Whitney (Mann-Whitney-U-test)

Der U-Test vergleicht die Rangplätze zweier Gruppen und zeigt an, ob eine der beiden Gruppen zu höheren Meßwerten tendiert, als die andere. Hier wurde der Test angewendet, um die Reaktivitäten zweier Serumgruppen im selben GST-Xtag ELISA zu vergleichen. Ein signifikanter U-Test deutet auf unterschiedliche Mediane der beiden Gruppen hin. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p = 0,01$ festgesetzt. Die Werte der Gruppen wurden nach Größe sortiert und eine Rangfolge festgelegt. Die Ränge jeder Gruppe wurden summiert und ergaben die Rangsummen aus denen die U-Werte und daraus die Wahrscheinlichkeit p berechnet wurden.

Vorzeichenrangtest von Wilcoxon (Wilcoxon matched pairs signed rank test)

Der Vorzeichenrangtest von Wilcoxon überprüft, ob sich zwei abhängige Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Hier wurde der Test dazu verwendet die Reaktivitäten einer Serumgruppe aus zwei Tests miteinander zu vergleichen. Die Differenzen jedes Meßwertpaares wurden nach der Größe ihrer Absolutwerte geordnet und danach Rangplätze vergeben. Den ersten Rang bekam die absolut niedrigste Differenz. Anschließend wurde die Summe der Ränge mit negativer Differenz und die Summe der Ränge mit positiver Differenz gebildet. Die kleinere der beiden Summen wurde als Ausgangswert für den Wilcoxon Test herangezogen.

Fisher Exact Test einer Vierfeldertafel

Mit dem Fisher's Exact Test kalkuliert man eine exakte Wahrscheinlichkeit (p) für die Beziehung dichotomer Variablen in einer 2×2 Kreuztabelle (Vierfeldertafel). Er wurde in dieser Arbeit angewendet, um zwei Serumgruppen im selben ELISA aufgrund der Anzahl ihrer positiven und negativen Meßwerte zu vergleichen. Der Fisher Exact Test wurden dem Chi-Quadrat Test vorgezogen weil er den Unterschied zwischen den vorhanden und den erwarteten Daten nicht abschätzt, sondern berechnet; ein Vorteil, der vorallem bei Zahlen kleiner 5 in einer Zelle der Kreuztabelle zum Tragen kommt.

Ergebnisse

Es wurden ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen insgesamt 6 von HPV6b codierten Proteinen entwickelt (Abb. 4). Dazu wurden die Antigene (X) als Fusionsproteine mit N-terminaler Glutathion S-Transferase (GST) und C-terminalem Markerepitop (tag) als GST-Xtag bakteriell exprimiert. Als Antigene wurden die frühen HPV6b Proteine E2, E4, E6 und E7, sowie die späten Proteine L1 und L2 kloniert.

Die Antigene werden durch eine Ein-Schritt Aufreinigung direkt aus dem bakteriellen Lysat auf der ELISA Platte von den anderen Lysatbestandteilen abgetrennt. Dies geschieht durch Bindung der fusionierten GST an immobilisiertes Glutathion. Das einheitliche Markerepitop (tag) am C-Terminus ermöglicht die vergleichende Quantifizierung aller eingesetzten Antigene mit einem einheitlichen Verfahren.

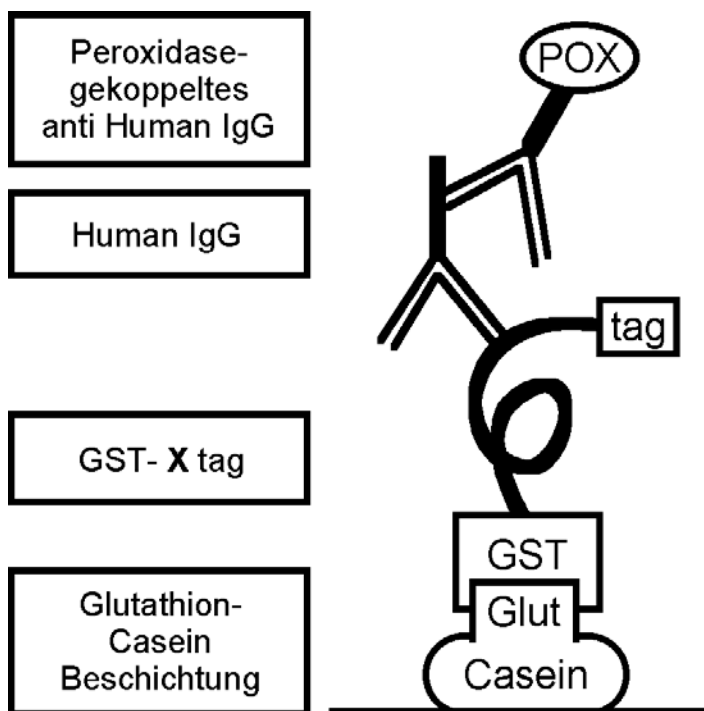


Abb. 4: Schematischer Aufbau des GST-Xtag ELISA

Der GST-Xtag ELISA besteht aus den 4 übereinanderstehenden Komponenten. Humane IgG Antikörper, die spezifisch das Antigen (X) erkennen, werden nachgewiesen. Durch die Verwendung von anderen Antigen/Antikörper-Kombinationen ist der GST-Xtag ELISA einfach anzupassen.

DNA Klonierung zur bakteriellen Expression von HPV6b-Antigenen als Fusionsproteine

Die Grundlage für alle in dieser Arbeit verwendeten HPV6b Gene bildete das von E. Schwarz et al. publizierte Isolat (Schwarz et al., 1983). Das HPV6b Genom lag über Klonierung mittels BamH1 in einen pUC-Vektor vor. Die BamH1 Restriktionsschnittstelle im HPV6b Genom liegt im L2 Leserahmen. Die Restriktionsanalyse des pUC/HPV6b Plasmids mit EcoR1/Xba1 ergab die aus der Sequenz erwarteten Fragmente (Abb. 5). Weiterhin bestätigte die Sequenzierung eines 30 bp langen Stückes aus dem E7 Leserahmen und später die Sequenzierung aller in das Expressionsplasmid inserierten HPV Gene den Prototyp des HPV6b Genoms.

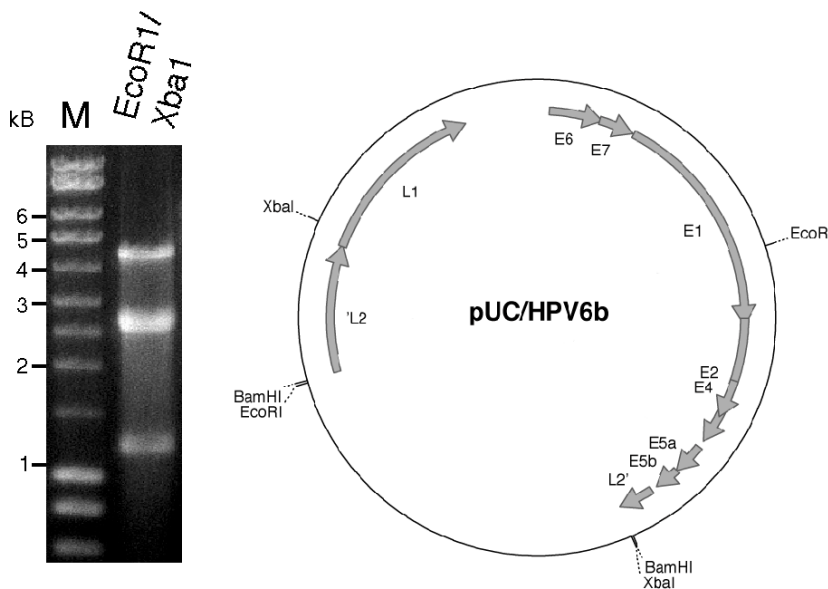


Abb. 5: Restriktionsanalyse von pUC/HPV6b

Die Restriktionsanalyse der pUC/HPV6b Plasmids ergab mit EcoR1/Xba1 die erwarteten Fragmente (1,2 kB, 2,5 kB, 2,7 kB, 4,2 kB) und bestätigten die Identität.

Vom genomischen HPV6b Plasmid wurde einmal eine DNA Midi-Präparation angefertigt, die als Vorlage für alle weiteren Schritte diente. Die vollständigen Leserahmen der HPV6b Gene E2, E4, E6 und E7 und der N-terminal verkürzte L1 Leserahmen wurden direkt aus pUC/HPV6b mittels PCR amplifiziert. Um L2 zu

amplifizieren, wurde das HPV6b Genom aus dem Plasmid pUC/HPV6b isoliert und zirkularisiert, da der L2 Leserahmen durch die Klonierung des HPV6b Genoms in in den pUC-Vektor auseinandergeschnitten war. Die Amplifikate wurden in das Expressionsplasmid pGEX unter Beibehaltung des Leserahmens hinter das Glutathion S-Transferase Gen (GST) kloniert. Die dafür passenden Restriktionsschnittstellen wurden über die PCR-Primer eingeführt. Dritter Fusionspartner war ein abschließendes Undecapeptid (Aminosäure-Sequenz: KPPTPPPEPET), der C-Terminus des großen T-Antigens des SV40-Virus (MacArthur and Walter, 1984).

Die erhaltenen Expressionsplasmide wurde mittels Restriktionsschnittstellen, über die das Antigen einkloniert wurde, überprüft (Tab. 2). Alle Antigene wurden mit Standard-Primern für das Expressionsplasmid sequenziert und entsprachen der publizierten HPV6b Sequenz.

Expression und Aufreinigung der HPV6b Antigene

Glutathion-Casein

Die in dieser Arbeit verwendete ELISA Methode des GST-Xtag ELISA (Abb. 4) basiert auf der Bindung der Glutathion-S-Transferase an Glutathion, welches kovalent an Casein gekoppelt und auf eine solide Plastikoberfläche gebunden wurde. Diese Methode wurde von P. Sehr in der Arbeitsgruppe entwickelt (Sehr, Zumbach, and Pawlita, 2001).

Casein wurde als Träger von Glutathion gewählt, weil das Milchprotein als Blockierungsreagenz im ELISA kaum Hintergrundreaktion zeigte (Meschede et al., 1998). Das hier verwendete, aufgereinigte Casein besteht zum Hauptteil aus α - und β -Casein, welche beide ein Molekulargewicht von ca. 25 kD haben. Mittels eines kommerziellen, heterobifunktionellen Vernetzers (Crosslinker, SSMPB, Pierce Rockford, Illinois, USA) wurde Glutathion an das Casein gebunden. Bei dieser Reaktion blieb die für die Bindung an GST wichtige γ -Glutamylgruppe des Glutathions erhalten (Wilce and Parker, 1994). Somit wurde ein wasserlösliches Casein mit einer maximalen Anzahl an funktionellen Glutathion-Resten hergestellt.

Expression der ELISA Antigene als GST-Xtag Fusionsproteine in Bakterien

Die in Abb. 6 gezeigten Wachstumskurven zeigen den typischen Verlauf der Zunahme der Bakteriendichte in einer 1 L Expressionskultur. Zur Ernte wurden die Bakterien mit 6000 xg sedimentiert, in PBS aufgenommen und für die Lyse im Homogenisator mit Proteaseinhibitor, DTT und teilweise mit Detergenz aufgenommen. Die Versuche mit den Antigenen E6 und E7 wurden ohne Detergenz durchgeführt, den Lysaten der anderen Antigenen wurde wegen der erhöhten Stabilität der Proteine das Detergenz Sarkosyl zugesetzt.

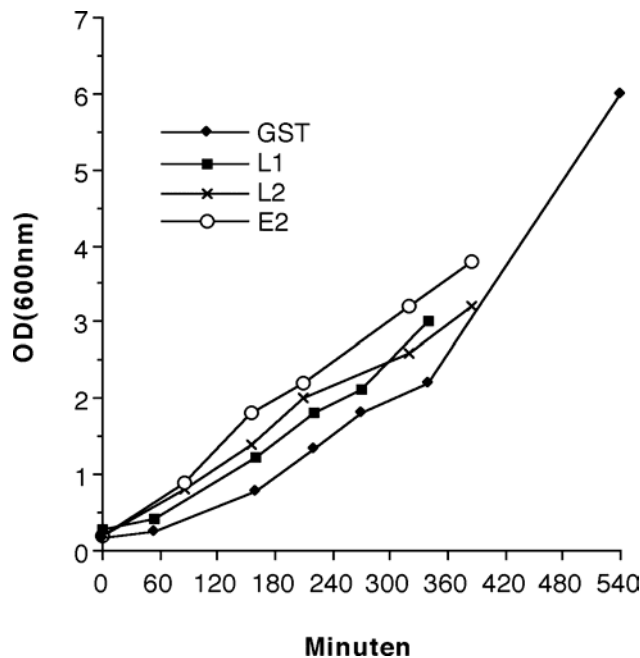


Abb. 6: Typische Wachstumskurven von BL21 Antigen-Expressionskulturen

BL21-Kulturen mit GST-Xtag Expressionsplasmiden wurden zum Zeitpunkt 0 min. inokuliert und bei R.T. geschüttelt (37°C bei GST-tag). Bei einer ungefähren Dichte von $OD_{600} = 0,5$ wurde die Antigen-Expression induziert. Die Bakterien wurden nach Erreichen einer Dichte von $OD_{600} > 3,0$ geerntet.

Aufreinigung der ELISA Antigene

Die Lysate der Expressionskulturen wurden durch Zentrifugation bei 30000 xg geklärt. Die Proteinkonzentrationen der geklärten Lysate lagen zwischen 5 und 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Um die Löslichkeit der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die

geklärten Lysate mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt, oder mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen und dort über anti-GST oder anti-tag Antikörper detektiert. Mit letzterem konnten Antigene mit voller Länge (Tab. 3) identifiziert werden (Abb. 7 und Abb. 8).

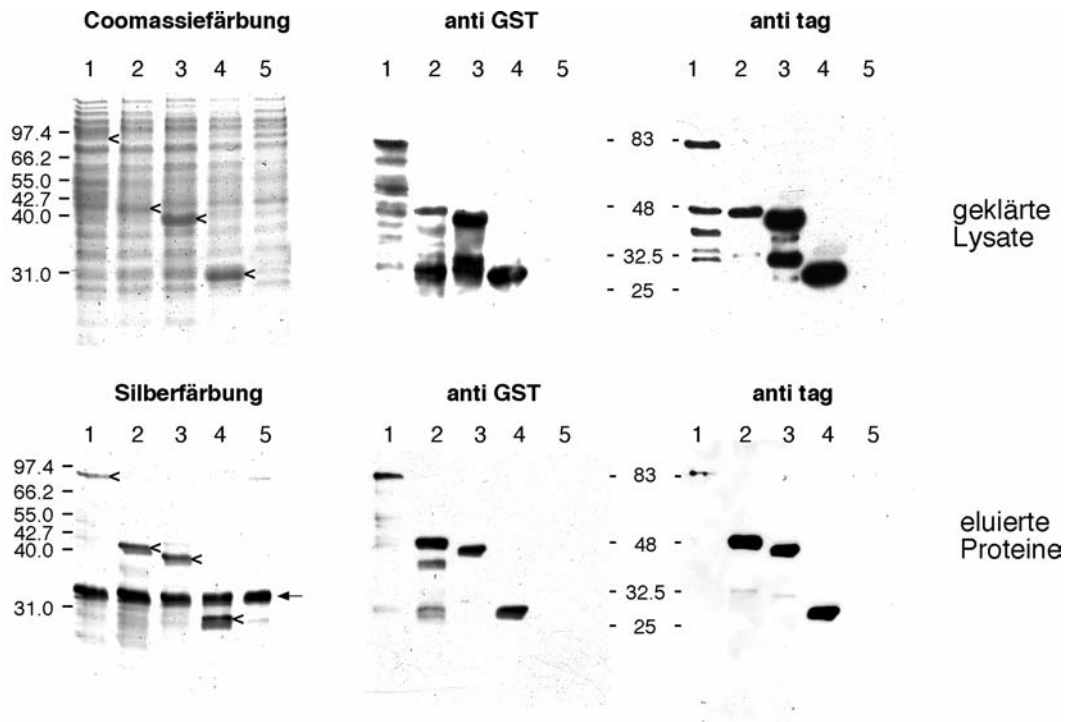


Abb. 7: Expression und Ein-Schritt Aufreinigung von GST-tag und den HPV6b-Antigenen L1, E6 und E7 als GST-Xtag Fusionsproteine

Oben: Geklärte Lysate von Expressionskulturen der GST-Xtag Antigene L1 (Spur 1), E6 (2), E7 (3), von GST-tag (4) und bakteriellem wt Lysat (5) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links), oder nach Transfer auf Nitrocellulosemembran mit polyklonalem anti-GST (Mitte), oder monoklonalem anti-tag Antikörper (rechts) mittels ECL (enhanced chemiluminescence) immundetektiert.

Unten: Glutathion-Casein beschichtete 24-Loch Zellkulturplatten wurden mit Casein blockiert und mit geklärten Lysaten ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Casein-Blockpuffer) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Platten wurden die gebundenen Proteine mit denaturierendem Probenpuffert eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Silber gefärbt (links), oder wie oben immundetektiert (Mitte und rechts).

Die Positionen der Fusionsproteine mit voller Länge sind durch Pfeilspitzen (<) markiert. Der Pfeile an den Silbergelen (→) zeigen die Banden des eluierten Caseins aus dem Blockpuffer.

Die Fusionsproteine aller Antigene erwiesen sich als löslich und waren in voller Länge in den geklärten Lysaten nachweisbar. Daneben zeigten sich Abbaubanden oder inkomplett exprimierte Proteine, wobei Verkürzungen des C-Terminus häufiger auftraten und durch den Abbruch der Expression zum Teil kein Bandenmuster zeigten, sondern über einen Größenbereich schmierten. Gerade bei den großen Antigenen L1, L2 und E2 zeigten sich ein bis 4 distinkte N-terminale Abbauprodukte. Nur GST-tag zeigte weder C- noch N-terminale Verkürzungen.

- L1 (Abb. 7, Spur 1): Die Proteinbande von GST-L1tag hob sich im geklärten Lysat nur schwach von den Banden der bakteriellen Proteine ab. In den anti-GST und anti-tag Western-Blots war dagegen sehr deutlich die Proteinbande des Antigens mit voller Länge als prominenteste Bande erkennbar. Mehrere verkürzte GST- oder tag- haltige Proteine wurden ebenfalls detektiert.
- L2 (Abb. 8, Spur 6): Das GST-L2tag Protein zeigte das für 6bL2 typische langsame Laufverhalten im SDS-Gel (Sun et al., 1995). Die Proteinbande war im Coomassie gefärbten Gel sowie in den anti-GST und anti-tag Western-Blots sichtbar. In den Western-Blots waren zwei stark N-terminal verkürzte (31 und 32 kD), sowie zwei C-terminal verkürzte Nebenprodukte (ca. 35 und 80 kD) erkennbar.
- E2 (Abb. 8, Spur 7): Die Proteinbande des GST-E2tag Proteins mit voller Länge wurde im Coomassie-gefärbten Gel des Lysats genau von der Bande eines abundanten bakteriellen Proteins überdeckt, konnte aber mit Hilfe der Western-Blots eindeutig zugeordnet werden. Zwei minimal N-terminal verkürzte und ein stark N-Terminal verkürztes Nebenprodukt (26 kD) waren zu erkennen.
- E4 (Abb. 8, Spur 8): Das GST-E4tag Protein war sehr gut exprimierbar, was in einer prominente Proteinbande im Coomassie Gel der Lysate resultierte. Der anti-GST Western-Blot zeigte nur ein ca. 30 kD großes Nebenprodukt. Bei der E4 Expression waren keine N-terminalen Fragmente erkennbar.
- E6 (Abb. 7, Spur 2): Ähnlich wie bei E2 wurde auch die Proteinbande von GST-E6tag von einem bakteriellen Protein überlagert, war aber im anti-tag und anti-GST Western-Blot nachweisbar. Hauptsächlich ein N-terminal

verkürztes Nebenprodukt (ca. 26 kD) und nur ein sehr schwaches Signal eines C-terminal verkürzten Proteins (32,5 kD) waren erkennbar.

- E7 (Abb. 7, Spur 3): Das GST-E7tag Protein wurde gut exprimiert und seine Bande hob sich von den bakteriellen Proteinen im Coomassie-gefärbten Gel ab. Es waren bei E7 in den Western-Blots zwei N-terminal verkürzte Nebenprodukte (30 und 31 kD) und ein ca. 31 kD großes C-terminal verkürztes Protein zu erkennen.
- GST-tag (Abb. 7, Spur 4): Das "leere" GST-tag Protein wurde sehr stark exprimiert und seine Bande hob sich eindeutig von den anderen Lysatproteinen im Coomassie-Gel ab. Sowohl der anti-GST wie auch der anti-tag Western-Blot zeigten nur jeweils eine einzelne, starke Bande des Proteins mit voller Länge.

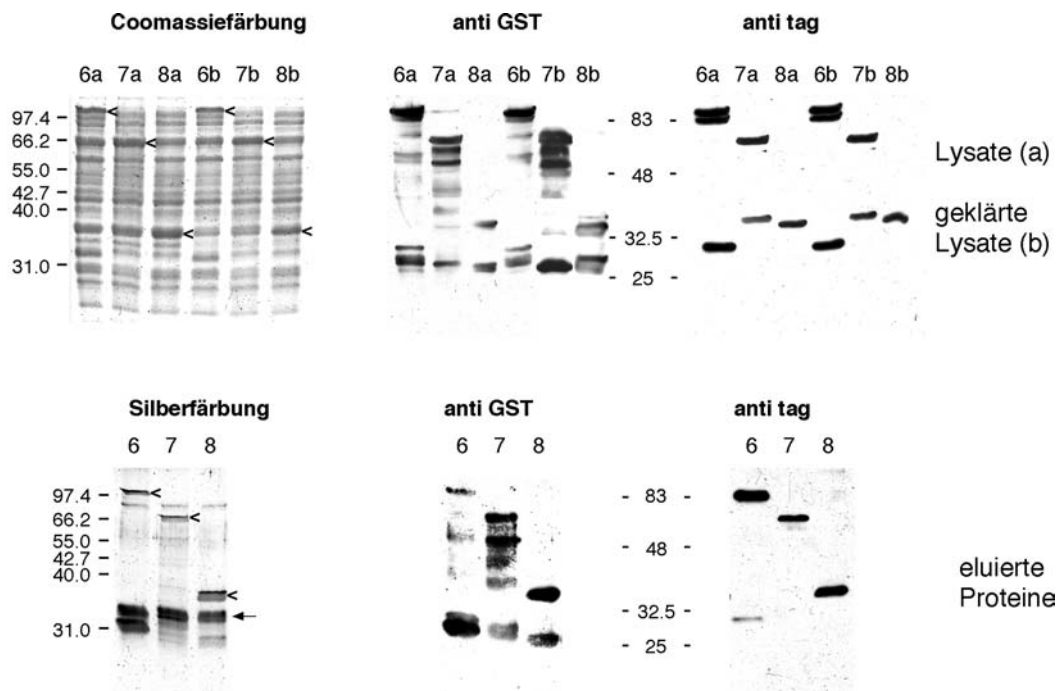


Abb. 8: Expression und Ein-Schritt Aufreinigung der HPV6b Antigene L2, E2 und E4 als GST-Xtag Fusionsproteine

Oben: Rohlysate (a) und geklärte Lysate (b) von Expressionskulturen der GST-Xtag Antigene L2 (Spur 6), E2 (7), E4 (8). Für weitere Beschreibung siehe Legende zu Abb. 7.

Die Effektivität der Ein-Schritt Aufreinigung der einzelnen GST-Fusionsproteine wurde an Glutathion-Casein beschichteten Zellkultur-Platten simuliert. Dazu wurden die Antigene nach Bindung an die Platte mittels 1x SDS-PAGE Probenpuffer eluiert. Ein Volumen, welches umgerechnet dem Eluat aus zwei Löchern einer ELISA Platte entsprach, wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Die eluierten Proteine wurden mittels Silberfärbung und Western-Blot mit anti-GST oder anti-tag nachgewiesen. Das Silbergel zeigte deutlich die Antigene als prominenteste Banden neben der Casein-Bande (ca. 32 kD) mit nur geringen Kontaminationen bakterieller Proteine.

- L1 (Abb. 7, unten, Spur 1): Die Silberfärbung des Platten-Eluats von GST-L1tag zeigte neben dem Fusionsprotein in voller Länge nur sehr schwache zusätzlichen Banden, die ebenso schwach im anti-GST Western-Blot erkennbar waren und mit denen aus dem anti-GST Western-Blot des Lysats korrespondierten. Der anti-tag Western-Blot des Eluats zeigte keines der vier Nebenprodukte aus dem anti-tag Western-Blot des L1-Lysats mehr.
- L2 (Abb. 8, Spur 6): Das GST-L2tag Protein mit voller Länge zeigte sich als distinkte Bande im Silbergel, ebenso wie in den Western-Blots. Das schon in den L2 Lysaten stark exprimierte ca. 30 kD große C-terminal verkürzte Nebenprodukt war im Silbergel, wie auch im Anti-GST Western erkennbar. Die zwei im anti-tag Western des L2 Lysats sichtbaren Nebenprodukte war nicht mehr erkennbar.
- E2 (Abb. 8, Spur 7): Die im Silbergel des E2-Eluats nur sehr schwachen Banden von C-terminal verkürzten Nebenprodukten waren im anti-GST Western deutlich erkennbar. Das N-terminal verkürzte Nebenprodukt konnte im anti-tag Western-Blot des Eluats nicht mehr detektiert werden.
- E4 (Abb. 8, Spur 8): Die Aufreinigung des GST-E4tag Lysats auf der Platte zeigte im Silbergel, wie auch im anti-GST Western-Blot neben dem Antigen das C-terminal verkürzte Nebenprodukt der Expression. Das Mengenverhältnis wurde aber im Vergleich zum Lysat zugunsten des Antigens verschoben.

- E6 (Abb. 7, Spur 2): Das Platteneluat des E6-Lysates zeigte nur geringe bakterielle Kontaminationen im Silbergel und zwei N-terminal verkürzte, GST-haltige Nebenprodukte, die auch schon im anti-GST Western des geklärten Lysats detektierbar waren. Der anti-tag Western des E6-Eluats zeigte das volle-Länge Antigen als prominenteste Bande mit nur einer schwachen Bande eines Abbauproduktes, wie auch schon im Lysat.
- E7 (Abb. 7, Spur 3): Das Antigen E7 zeigte die beste Aufreinigung auf der Platte, da hier ein starker Unterschied zwischen Lysat und Eluat festzustellen war. Die teilweise sehr starken Banden der Nebenprodukte in beiden Western-Blots des Lysats konnten nach der Elution nicht mehr detektiert werden.
- GST-tag (Abb. 7, Spur 4): Wie schon im Lysat war GST-tag auch nach der Aufreinigung auf der Platte das am meisten vorhandene Protein. Die Western-Blots zeigten jeweils nur eine distinkte Bande GST-tag.

Die Silbergele sowie auch die Western-Blots zeigten eine Anreicherung der GST-Fusionsproteine mit voller Länge gegenüber den geklärten Lysaten. Eine Ausnahme bildet hier E2, bei dem die Anreicherung des volle-Länge Fusionsproteins nicht so stark ausgeprägt war, wie bei den anderen Antigenen.

Optimierung der ELISA Parameter

Die von Sehr et al. vorgeschlagene Menge für die Beschichtung der ELISA Platte von 200 ng Glutathion-Casein pro Loch wurde in allen Versuchen verwendet (Sehr, Zumbach, and Pawlita, 2001).

Titration der Antigene auf der Platte

Der erste Schritt zur Optimierung bestand in der Titration der Lysate, um die Bindungskapazität der Glutathion-Casein beschichteten ELISA Platte möglichst gut auszunutzen und dadurch eine möglichst große für Antikörper zugängliche Antigenmenge zu präsentieren. Alle geklärten Lysate (im folgenden als Lysate bezeichnet) wurden zunächst titriert. Sie wurden seriell zwischen 100 und 0,2 µg Lysatprotein/Loch verdünnt und in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Gebundene Antigene wurden über das C-terminale Markerepitop (tag) quantifiziert (Abb. 9 A und B). Dies mißt ausschließlich Fusionsproteine mit

voller Länge. Mit allen Antigenen außer L2 wurde ein Sättigungsplateau zwischen 2 bis 20 μg erreicht. Mit dem L2 Lysat war im Titrationsbereich kein Sättigungsplateau zu erreichen, die Kurve stieg fast stetig an. Die Verläufe aller anti-tag Titrations waren mit Ausnahme von L2 ähnlich, wobei die Dauer der Farbreaktion (5 bis 8 min.) für jedes Experiment nach Intensität der Färbung individuell festgelegt wurde.

Gebundene Antigene wurden am N-Terminus mit anti-GST detektiert (Abb. 9 C). Bei allen getesteten Proteinen wurden 75% des Wertes der höchsten Proteinkonzentration der GST-spezifischen Titration unter 10 μg pro Loch erreicht. Die Antigene L1, L2, E2, E6 und E7 zeigten bei den anti-GST Titrations einen ähnlichen, über alle Titrationsstufen fast parallelen Kurvenverlauf, E4 wurde nicht mit GST titriert. Auch bei den höchsten Proteinmengen bis 100 μg Lysatprotein pro Loch war trotz Sättigung und somit einer eventuellen sterischen Hinderung der Proteine untereinander, nur eine minimale Abnahme der Reaktivität von E2 und E6 mit den N-Termini der Antigenproteine erkennbar. Die anti-tag Titrationskurven von L1, E2, E4, E6 und E7 verliefen annähernd über die gesamte Titration parallel (Abb. 9 D). Die Titrationskurve von L2 lag weit unterhalb den anderen.

Die Titrationsverläufe (C und D) waren trotz der unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der HPV6b Antigene ähnlich. Die Antigene erreichten alle eine Sättigung mit vergleichbaren Lysat-Proteinmengen und sind sowohl N-terminal, wie auch C-terminal für Antikörper zugänglich. Alle Proteine wurden mit 25 μg Lysatprotein pro Loch (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in allen folgenden Versuchen eingesetzt.

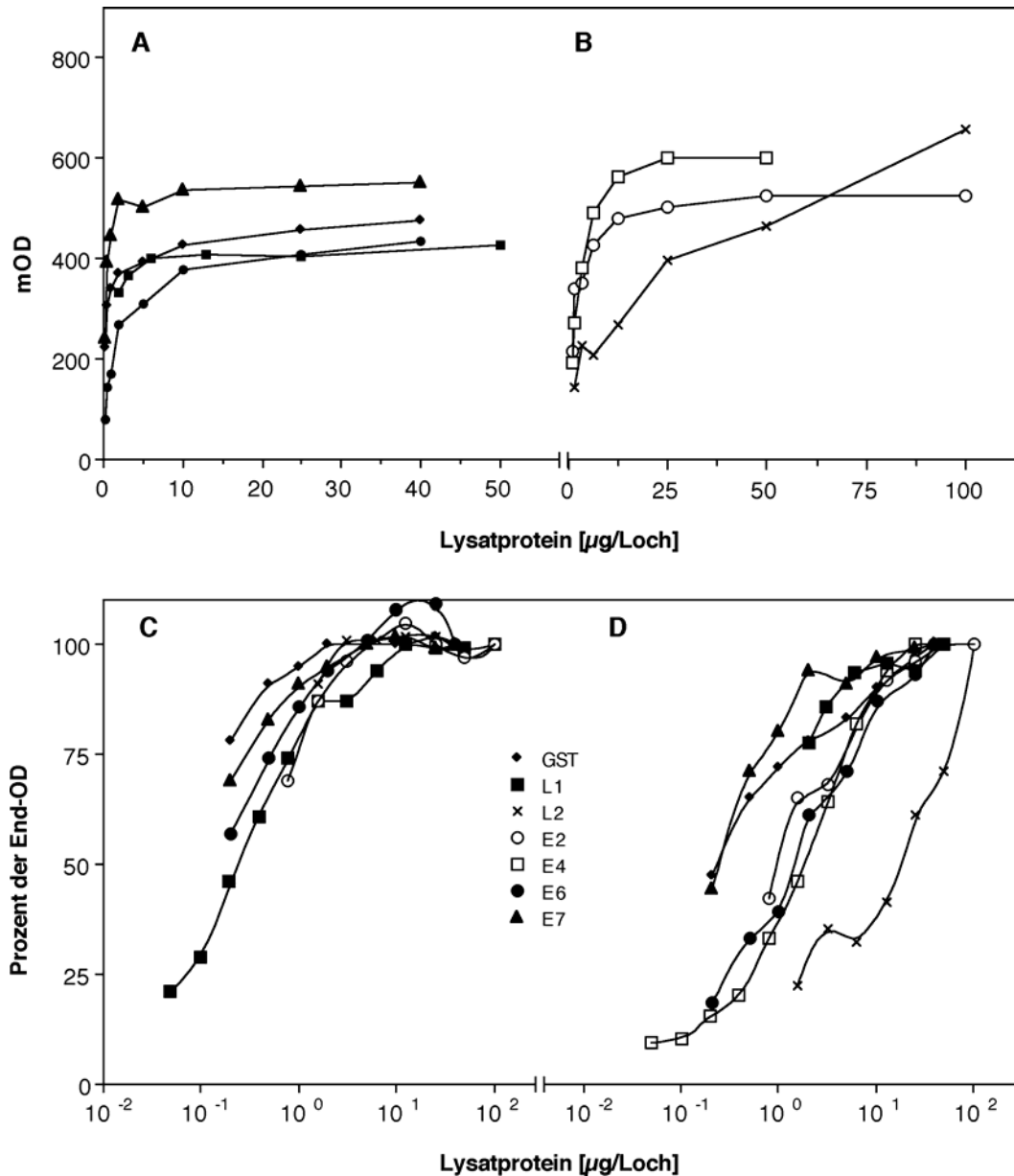


Abb. 9: Titrations der Antigene für den GST-Xtag ELISA

Glutathion-Casein beschichtete ELISA Platten wurden mit den seriell zwischen 100 und $0,2 \mu\text{g}$ Lysatprotein/Loch verdünnten geklärten Lysaten der GST-Xtag überexprimierenden *E.coli* BL21-Bakterien inkubiert. In A und B sind Mittelwerte der Doppelbestimmungen linear aufgetragen. Die gebundenen Antigene wurden mittels monoklonalem anti-tag Antikörper (A, B und D) oder polyklonalem anti-GST Antikörper (C) quantifiziert. Die 100%-Werte in C und D sind die Titrationsendwerte und alle anderen Werte sind zu diesen in Relation gesetzt (normierte logarithmische Auftragung).

GST-6bL1tag ELISA

Für die Validierung des GST-6bL1tag ELISA standen spezifische monoklonale Antikörper und im VLP-ELISA voruntersuchte Seren zur Verfügung.

Reproduzierbarkeit des GST-6bL1tag ELISA

Die Reproduzierbarkeit der L1 ELISA Messungen von 24 im VLP-ELISA hoch- bis niederreaktiven Humansenen aus der Gruppe der Condylom-Patientinnen wurden in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Um die Seroreaktivitäten gegen die bakteriellen Proteine und die Fusionsanteile GST und tag im ELISA zu vermindern, wurden alle Seren, bevor sie auf die ELISA Platte gegeben wurden, mit geklärtem GST-tag Lysat vorinkubiert. Die in Abb. 10 aufgeführten OD-Werte sind jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Die Tests wurden an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt, an denen zwei verschiedene GST-6bL1tag Antigenpräparationen verwendet wurden. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,97$. Die Wertepaare unterschieden sich statistisch nicht voneinander ($p_{\text{Wilcoxon}} = 0,75$). Damit war der GST-6bL1tag ELISA sehr gut reproduzierbar.

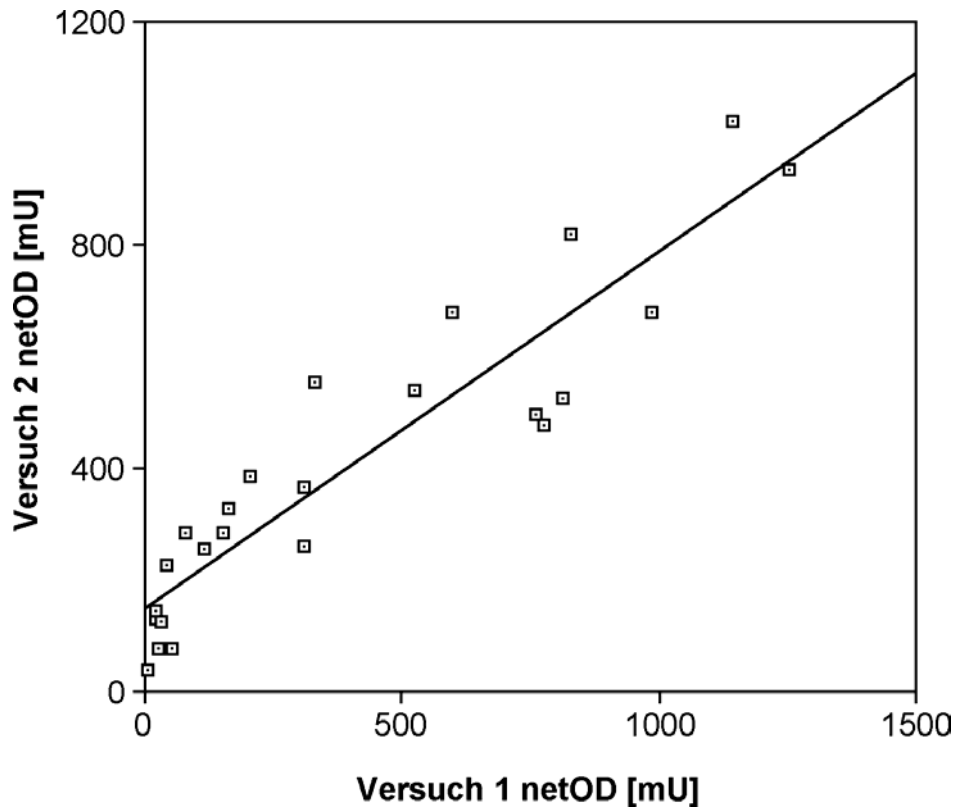


Abb. 10: Reproduzierbarkeit des GST-6bL1tag ELISA

Vierundzwanzig Seren von Condylom-Patientinnen wurden an zwei verschiedenen Tagen und mit zwei verschiedenen GST-6bL1tag Lysatpräparationen untersucht. Mittelwerte der Doppelbestimmung sind dargestellt. Die lineare Regressionsgerade ist eingezeichnet ($r = 0,97$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Versuche ($p_{\text{Wilcoxon}} = 0,75$).

HPV-Typ Spezifität des GST-6bL1tag ELISA

Christensen et al., beschrieben mehrere typspezifische, monoklonale Antikörper, die an intakte L1-VLP banden (Christensen et al., 1996). Im GST-6bL1tag ELISA reagierte der monoklonale Antikörper H6.L12 (HPV6L1, Abb. 11) mit dem Antigen, aber nicht die Parallel untersuchten, monoklonalen Antikörper gegen HPV11, BPV und CRPV L1 VLP.

Die Funktionalität der eingesetzten Antikörperpräparationen wurden in der Arbeitsgruppe in parallel laufenden Versuchen bestätigt. Für den HPV11 Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, daß er im VLP-ELISA HPV11 VLP detektierte (E.Glastetter, pers. Mitteilung). Der verwendete BPV L1

Antikörper erkannte native BPV Kapside im ELISA (K.Parsche, pers. Mitteilung). Für den CRPV Antikörper stand keine Positivkontrolle zur Verfügung.

Der monoklonale Camvir-Antikörper (McLean et al., 1990) detektiert ein lineares L1 Epitop, das in vielen Papillomvirus Typen konserviert ist (6bL1 Aminosäuren 200-206, GFGAMNF) und nicht auf der Oberfläche des L1-Pentamers liegt (Chen et al., 2000). Die Antikörper anti HPV6b L1 (H6.L12) und Camvir reagierten im ELISA mit GST-6bL1tag. Dies zeigt, daß konformationsspezifische Antikörper L1 erkennen und GST-6bL1tag auch Epitope präsentiert, die nicht auf der Kapsidoberfläche liegen. Das deutet auf eine native Faltung der 6bL1 Proteine als Pentamere oder Oligomere auf der ELISA Platte hin.

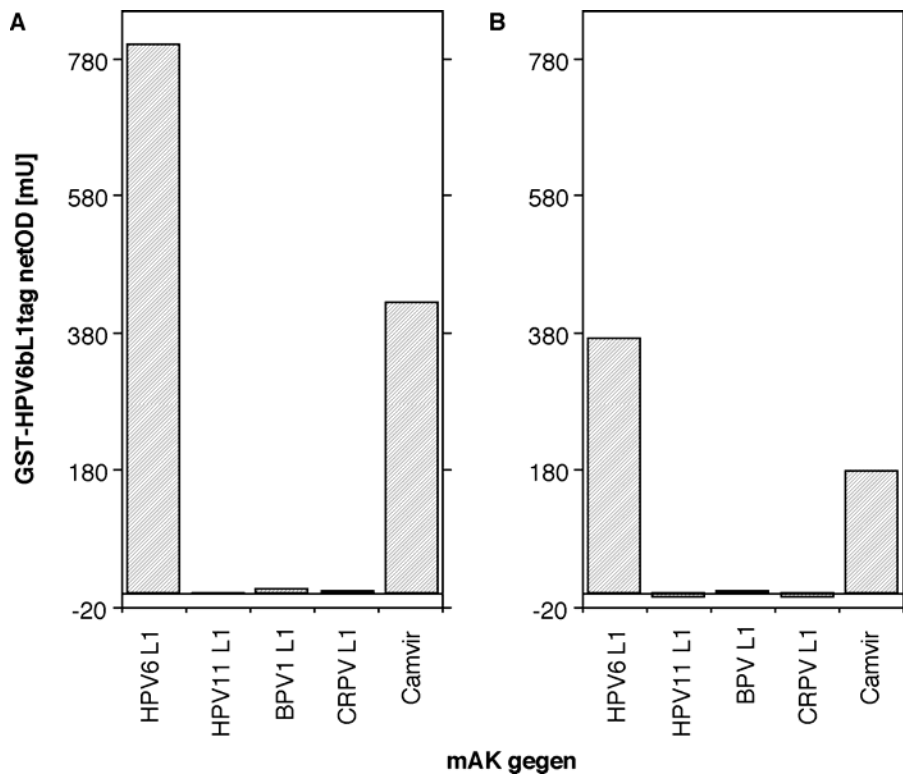


Abb. 11: Reaktivität monoklonaler Antikörper gegen HPV Kapside mit GST-6bL1tag im ELISA

Dargestellt sind 2 Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (s. Material und Methoden: ELISA Ablauf) und damit unterschiedlich hohen OD-Werten. Monoklonale Antikörper (aufgereinigte Ascites; 1:1000 verdünnt) gegen VLP von HPV6b (H6.L12), HPV11 (H11.A32), BPV (B1.A1), CRPV (CRPV5A) und der monoklonale Camvir Antikörper wurden im GST-6bL1tag ELISA verwendet.

Kompetitive Hemmung von GST-6bL1tag reaktiven Seren durch HPV11 VLP

Die eng verwandten HPV-Typen 6 und 11 besitzen eine 92%ige Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz ihrer L1 Proteine. Damit kann eine Kreuzreaktivität mit gemeinsamen Epitope postuliert werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß polyklonale Seren gegen HPV11 Kapside auch HPV6 Kapside erkennen (Christensen et al., 1994).

Drei GST-6bL1tag positive Humansenen wurden mit

- GST-tag Lysat im Blockpuffer (GST-tag Blockpuffer, 100% Reaktivität ohne Inhibition)
- GST-6bL1tag Lysat in Blockpuffer als Positivkontrolle für Inhibition,
- CsCl-gereinigten HPV11 VLP in GST-tag Blockpuffer (Inhibitor), oder
- CsCl in GST-tag Blockpuffer (Pufferkontrolle)

vorinkubiert und die verbliebene Reaktivität im GST-6bL1tag ELISA bestimmt. Die OD-Werte der mit GST-tag vorinkubierten Seren wurden als 100% Werte herangezogen (Abb. 12). Als Positivkontrolle für die Inhibition diente die Vorinkubation mit GST-6bL1tag Lysat.

Die Inhibition der Reaktivitäten mittels GST-6bL1tag war bei Serum A über 80% und bei den Seren B und C über 90%. Die Inhibition der Reaktivitäten durch die Vorinkubation mit HPV11 VLP im Überschuß war mehr als 80% bei Serum A und mehr als 90% bei den Seren B und C, wobei durch die Vorinkubation mit CsCl im GST-tag Blockpuffer die Reaktivitäten bei zwei der drei Seren gegenüber dem GST-tag blockierten Serum um 25% bei Serum B bzw. 50% bei Serum C abnahmen, was auf die durch CsCl erhöhte Salzkonzentration zurückzuführen war.

Die Vorinkubation mit HPV11 VLP, wie auch mit GST-L1tag, absorbierte einen Großteil der mit HPV6b L1 reaktiven Serumantikörper in drei von drei getesteten Seren. Dies zeigt die Kreuzreaktivität der Antikörper gegen HPV6b und HPV11 Kapside im GST-6bL1tag ELISA.

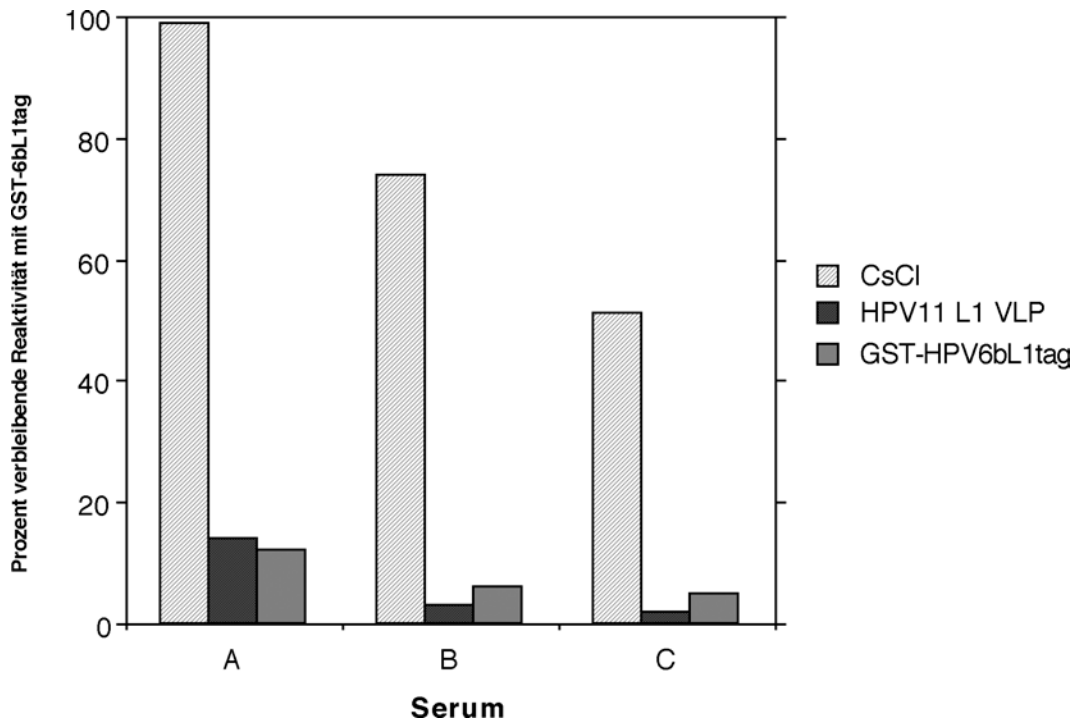


Abb. 12: Kompetitive Hemmung von GST-6bL1tag reaktiven Seren durch HPV11 L1 VLP

Drei im GST-L1tag ELISA positive Seren wurden mit GST-tag Lysat vorinkubiert und im ELISA eingesetzt. Die netOD-Werte (100%) der Seren betragen 203 mOD für Serum A, 410 mOD für Serum B und 279 mOD für Serum C. Parallel dazu wurden die Seren mit einem Überschuss (20 µl der VLP-Peak-Fraktion eines CsCl-Gradienten) an HPV11 L1 VLP in GST-tag Blockpuffer, oder mit CsCl (Endkonzentration 60 mM) in GST-tag Blockpuffer inkubiert. Als Positivkontrolle für die Hemmung der L1 Reaktivität diente die Inkubation mit GST-6bL1tag Lysat (Endkonzentration 0,25 µg Lysatprotein/µl). Die Meßwerte der alternativ vorinkubierten Seren sind relativ zu den mit GST-tag vorinkubierten Werten dargestellt.

Validierung des GST-6bL1tag ELISA mit Gold-Standard HPV6 VLP-ELISA

Der GST-L1tag ELISA mit bakteriell exprimiertem Antigen wurde mit dem "Gold-Standard" VLP-ELISA verglichen. Dafür standen Seren und HPV6 VLP-ELISA Daten von 72 Condylom-Patientinnen (Peng et al., 1999) zur Verfügung. Die OD Werte aus GST-6bL1tag ELISA stimmten mit denen des HPV6 VLP-ELISA gut überein ($\rho = 0,79$, Abb. 13). Die lokal gewichtete Regressionkurve (Cleveland and Devlin, 1988) zeigte eine sehr gute, fast lineare Korrelation der beiden Tests auf der Winkelhalbierenden für OD-Werte unterhalb einer optischen

Dichte von 400 mOD. Für höhere Meßwerte divergierten die beiden Testsysteme mehr. Der GST-L1 ELISA produzierte für Seren mit OD-Werten größer 600 mOD häufig höhere Meßwerte, als der VLP-ELISA. Die gute Korrelation vor allem der niedrigen Werte der beiden Testsysteme legt nahe, daß der GST-6bL1tag ELISA und der VLP-ELISA das gleiche messen.

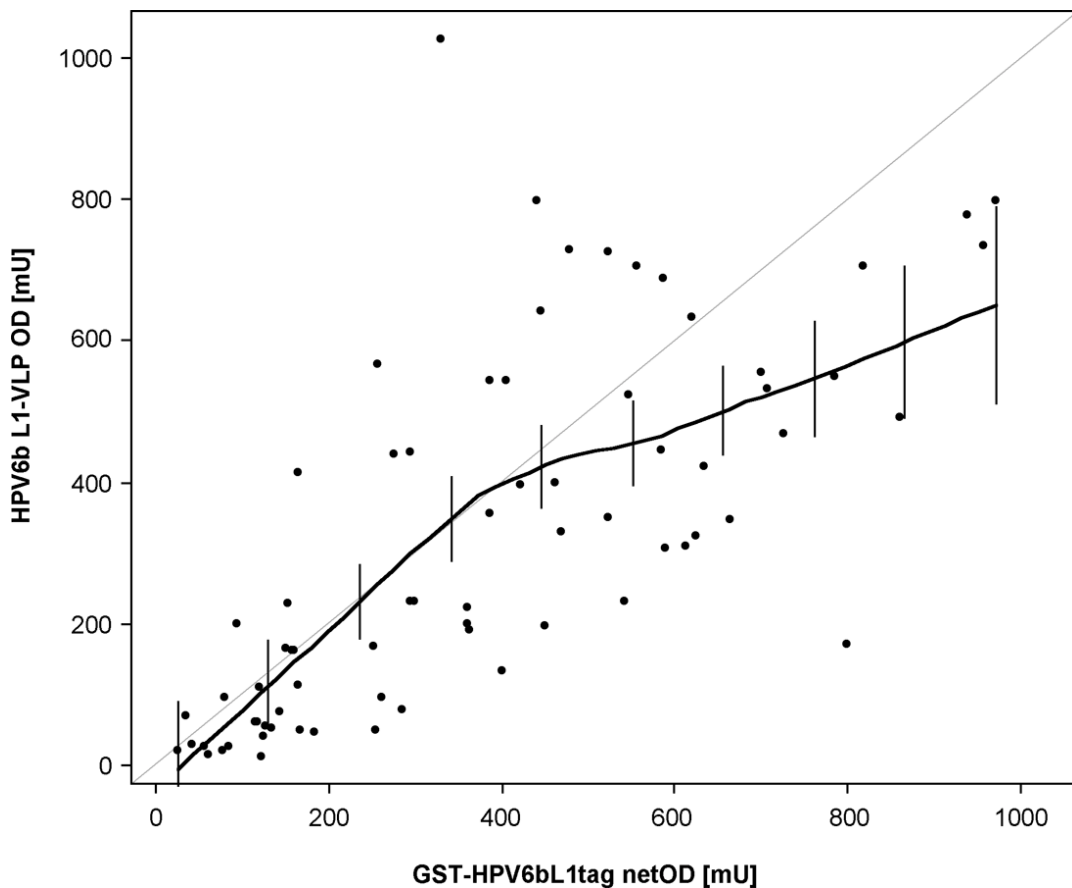


Abb. 13: Übereinstimmung der HPV6b L1 Antikörperreaktivitäten im GST-6bL1tag und HPV6 VLP-ELISA

Die Antikörperreaktivitäten von 72 Condylompatientinnen im HPV6 VLP-ELISA (Peng et al., 1999) sind gegen die Reaktivitäten im GST-6bL1tag ELISA aufgetragen. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient ($\rho = 0,79$) und die Analyse mittels linearer, lokaler Regression (Kurve mit 95% Konfidenzintervallen in senkrechten Linien) zeigen eine gute Übereinstimmung der beiden Testformate. Die Winkelhalbierende zeigt die bestmögliche lineare Korrelation an.

Antikörperprävalenzen gegen 4 frühe und 2 späte HPV6b Proteine bei Gesunden und Patienten mit Papillomvirus assoziierten Erkrankungen

Mit dem GST-Xtag ELISA für die HPV6b Antigene L1, L2, E2, E4, E6 und E7 (im Folgenden: L1 ELISA, L2 ELISA, etc.) wurden drei Serumgruppen untersucht: (I) 81 amerikanische Patientinnen mit genitalen Condylomen, (II) 94 finnische Patienten mit rekurrender, respiratorischer Papillomatose (RRP) und (III) 68 Individuen aus der deutschen Normalbevölkerung als Kontrollgruppe.

Häufigkeitsverteilungen der ELISA Reaktivitäten in den Serumgruppen

Die ELISA Reaktivitäten der drei Serumgruppen (Kontrollen, Condylome und RRP) wurden als Häufigkeitsverteilung in 30 mOD Schritten gruppiert und analysiert und sind beispielhaft für L1 und E7 in Abb. 14 dargestellt. Die Spitze der L1-Häufigkeitsverteilung lag bei der Kontrollgruppe bei 30 bis 60 mOD und zeigte eine nach rechts flach auslaufende Schulter. Bei den Condylomseren war die Verteilung hin zu hohen OD-Werte verschoben, ohne ein klare Spitze aufzuzeigen.

Die L1-Reaktivitäten der RRP-Seren waren ähnlich verteilt, wie die der Kontrollseren, allerdings mit einer höher auslaufenden Schulter. Die RRP-Gruppe unterschied sich in ihrer Häufigkeits-Spitze nur geringfügig von der Kontrollgruppe. Vergleich man alle drei L1 Häufigkeitsverteilungen, so unterschied sich die Condylomgruppe eindeutig von den beiden anderen Serumgruppen.

Im Gegensatz dazu konnten mit der Unterteilung von 30 mOD Schritten keine Unterschiede der Serumgruppen bei den Häufigkeitsverteilungen der anderen Antigene festgestellt werden. Die Häufigkeiten der drei Serum-Gruppen im E7 ELISA sind repräsentativ für die anderen frühen Antigene und L2.

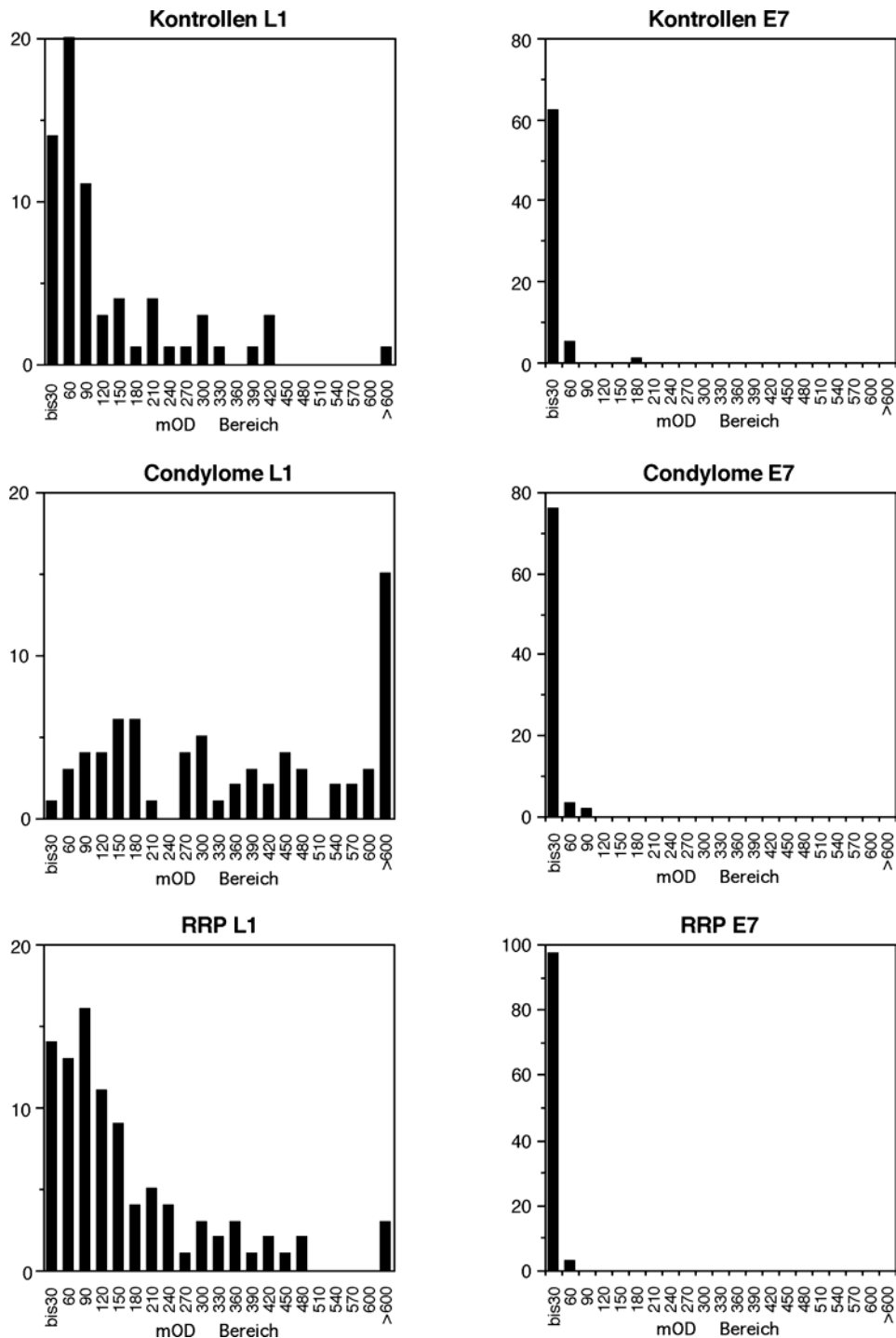


Abb. 14: Häufigkeitsverteilung der Patienten- und Kontroll-Seren am Beispiel von L1 und E7

Die netOD Werte (in mOD) wurden in Gruppen von jeweils 30 mOD Schritten unterteilt und die absoluten Anzahlen als Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Die Balken in der letzten OD-Gruppe enthalten kumuliert alle Reaktivitäten größer 600 mOD. Die 15 Reaktivitäten über 600 mOD im L1 ELISA der Condylomgruppe verteilen sich über 14 30 mOD Schritte und stellen keine Häufigkeitsspitze dar.

ELISA Reaktivitäten

Die Verteilung der Reaktivitäten aller Serum-Gruppen in den hier durchgeführten 6 neuen GST-Xtag ELISA für die HPV6b Antigene L1, L2, E2, E4, E6 und E7 sind in Abb. 15 als Boxplots gezeigt.

Die Reaktivitäten im L1 ELISA waren deutlich stärker, als die Reaktivitäten derselben Seren in allen anderen ELISA.

Im L1 ELISA reagierten Condylomseren mit zum Teil sehr hohen Werten bis 1000 mOD. Der Median der Meßwerte lag bei 360 mOD. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten dabei 75% der Condylomseren eine höhere Reaktivität, als 75% der Kontrollseren. Die RRP-Seren reagierten im L1 ELISA nicht so stark, wie die der Condylom-Gruppe; der Median lag bei 101 mOD. Die Reaktivitäten der Kontrollseren waren niedriger als die der Patientenseren mit einem Median von 60 mOD.

Die Reaktivitäten der Condylom-, RRP- und Kontrollseren mit den anderen untersuchten Antigenen (L2, E2, E4, E6 und E7) waren insgesamt schwach. Die Meßwerte aller Gruppen lagen unter 100 mOD mit zwei Ausnahmen. Diese lagen beide unter 200 mOD und waren die Reaktivitäten eines Condylomserums im E4 ELISA und eines Kontrollserums im E7 ELISA. Die Mediane aller Gruppen für alle Antigene außer L1 lagen unter 20 mOD.

Der Cut-off für alle ELISA außer für den L1 ELISA wurde aus den Reaktivitäten der Kontrollgruppe als Mittelwert + 3 Standardabweichungen unter Wegfall der außerhalb dieser Grenze liegenden Reaktivitäten berechnet. Für L1 wurde wegen der vielen mittel bis hochreaktiven Seren der Kontrollgruppe ein anderes Verfahren für die Bestimmung der Cut-off verwendet. Der L1 Cut-off wurde aus dem Vergleich der Reaktivitäten der Kontrollgruppe mit der Condylomgruppe über maximal selektierte Chi-Quadrat Statistiken geschätzt (Miller and Siegmund, 1982).

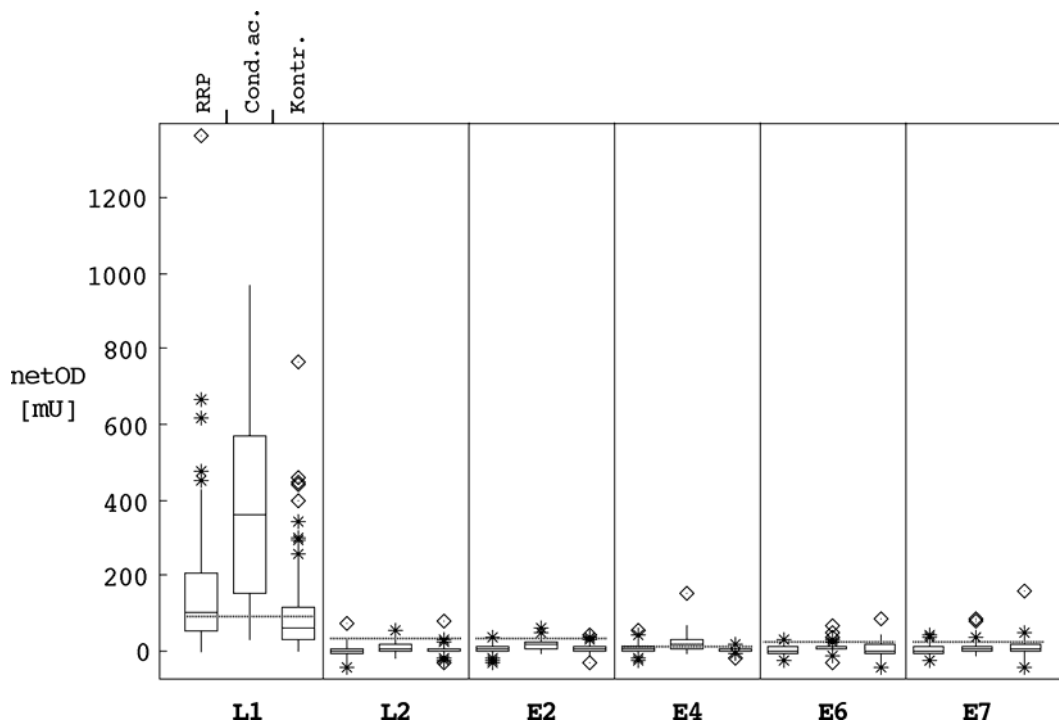


Abb. 15: Antikörperreaktivitäten mit 6 HPV6b Antigenen im GST-Xtag ELISA von RRP-Patienten, Condylom-Patienten (Cond.ac.) und gesunden Erwachsenen (Kontr.)

Die Daten sind in Boxplots (nach Tukey) dargestellt. Die horizontalen, gestrichelten Linien geben den Cut-off Wert für das jeweilige Antigen an. Die Skalierung ist für alle Antigene und Serum-Gruppen gleich.

Patientinnen mit genitalen Condylomen

Im L1 ELISA reagierten 88% der Condylomseren positiv, gegenüber 31% der Kontrollseren (s. Material und Methoden: Statistik des L1 Cut-off). Dieser Unterschied war sowohl im Mann-Whitney U Test (Vergleich der Mediane), wie auch im Fisher Exact Test (Vergleich der Anzahl an Positiven und Negativen) statistisch signifikant (beide $p < 0,001$, Tab. 4).

Im E2 ELISA unterschied sich die Condylomgruppe mit 15% Positiven (s. Material und Methoden: Statistik der Cut-offs für L2, E2, E4, E6 und E7) ebenfalls in beiden statistischen Verfahren signifikant von der Kontrollgruppe mit 2% Positiven. Auch der Unterschied von 33% positiven Condylomseren im E4 ELISA gegenüber keinen Positiven in der Kontrollgruppe war in beiden

statistischen Tests signifikant. Die Anzahl der im E2 und E4 ELISA getesteten Condylomseren war gegenüber den anderen Gruppen klein ($n = 27$) und wird derzeit in größeren Serumgruppen untersucht, um statistisch noch besser abgesicherte Aussagen machen zu können.

Keine statistische Signifikanz konnte dagegen in den ELISA für E6 und E7 beim Vergleich der Condylome (4% und 5% Positive) mit den Kontrollen (8% und 9% Positive) gefunden werden, wobei die Reaktivitäten durchweg sehr niedrig waren.

Der L2 ELISA wurde unter suboptimalen Bedingungen für die Antigensättigung durchgeführt (Abb. 9) und die Ergebnisse wurden nicht statistischen ausgewertet.

Tab. 4: Antikörperreaktivitäten bei Condylompatientinnen und Kontrollen im GST-Xtag ELISA

Antigen X	Condylome		Kontrollen		Mann- Whitney U [°]	Fisher Exact [¶]
	positiv (n)*	Median (Min- Max) in mOD	positiv (n)*	Median (Min- Max) in mOD	p	p
L1	88% (72)	360 (26 – 971)	31% (68)	60 (12 – 821)	< 0,001	< 0,001
E2	15% (27)	19 (-9 – 57)	2% (68)	5 (-32 – 40)	0,001	0,021
E4	33% (27)	17 (-11 – 151)	0% (68)	4 (-22 – 18)	0,007	< 0,001
E6	4% (81)	5 (-32 – 64)	8% (65)	1 (-46 – 84)	0,016	0,177
E7	5% (81)	4 (-17 – 82)	9% (65)	6 (-47 – 158)	0,415	0,165

* Anzahl untersuchter Seren

[°] Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U Tests: $p = 0,01$

[¶] Signifikanzgrenze des Fisher Exact Tests: $p = 0,05$

p-Werte unter der Signifikanzgrenze sind fett gedruckt.

RRP-Gruppe

In der Gruppe der RRP-Patienten waren 51% der Seren positiv im L1 ELISA. Die Reaktivitäten der RRP Gruppe unterschieden sich statistisch signifikant von denen der Kontrollgruppe sowohl im Mann-Whitney U-Test ($p = 0,003$, Tab. 5), wie auch im Fisher Exact Test ($p=0,005$).

In keinem der ELISA (E2, E4, E6 und E7) unterschied sich die Gruppe der RRP Patienten gleichzeitig im Mann Whitney U-Test und im Fisher Exact Test signifikant von der Kontrollgruppe. Die E6 Prävalenzen der RRP-Gruppe im Fisher Exact Test (Anzahl positiver und negativer Seren) lagen signifikant unter denen der Kontrollgruppe, aber ein Vergleich der Reaktivitäten mit dem Mann-Whitney U-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Dagegen waren im E7 ELISA die Reaktivitäten der RRP-Gruppe signifikant schwächer, als die der Kontrollgruppe, was auf einen einzigen, stark positiven E7-Meßwert in der Kontrollgruppe zurückzuführen war. Ein Vergleich der E7 Prävalenzen mit dem Fisher Exact Test ergab keinen signifikanten Unterschied.

Tab. 5: Positive RRP-Patienten und Kontrollen

Antigen X	RRP		Kontrollen		Mann- Whitney U [°]	Fisher Exact [¶]
	positiv (n)*	Median (min- max) in mOD	positiv (n)*	Median (min- max) in mOD	p	p
L1	51% (101)	101 (-1 – 1368)	31% (68)	60 (12 – 821)	0,003	0,005
E2	0% (91)	4 (-35 – 33)	2% (68)	5 (-32 – 40)	0,151	0,428
E4	4% (91)	6 (-30 – 53)	0% (68)	4 (-22 – 18)	0,053	0,104
E6	4% (81)	0 (-29 – 30)	8% (65)	1 (-46 – 84)	0,205	0,032
E7	5% (81)	1 (-27 – 43)	9% (65)	6 (-47 – 158)	0,006	0,067

* Anzahl untersuchter Seren

[°] Signifikanzgrenze des Mann-Whitney U Tests: $p = 0,01$

[¶] Signifikanzgrenze des Fisher Exact Tests: $p = 0,05$

p-Werte unter der Signifikanzgrenze sind fett gedruckt.

Geschlechtsabhängigkeit von HPV6b L1 Antikörpern bei gesunden und RRP-Patienten

Die höhere L1 Antikörperprävalenz bei 94 RRP-Patienten zeigte sich in 51% positiven Reaktivitäten gegenüber nur 31% bei den Kontrollen ($p = 0,003$; Tab. 5). Teilt man die Patienten nach Geschlechtern, so unterschieden sich die Reaktivitäten der RRP-Patientinnen im Mann-Whitney U-Test signifikant von denen der männlichen Patienten. Die Seren aller Patientinnen waren zu 83% positiv, wogegen nur 38% der männlichen Patienten L1 positiv waren ($p < 0,001$).

Die höhere L1 Antikörperprävalenz der Patientinnen mit adult einsetzender RRP (89%) gegenüber den adult erkrankten männlichen Patienten (42%) war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Bei juvenil einsetzender RRP waren drei von fünf Patientinnen L1 Antikörper positiv und nur einer von sechs männlichen Patienten. Wegen der kleinen Fallzahl war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = 0,072$). Die RRP-Patienten wurden anhand des Altersmedians bei der Serumnahme in zwei Gruppen unterteilt. Die L1-Seroreaktivitäten der Patienten über dem Altersmedian unterschieden sich nicht signifikant von den Patienten der jüngeren Hälfte ($p = 0,083$).

Ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den L1-positiven weiblichen (32%) und männlichen (29%) Erwachsenen der Kontrollgruppe ($p = 0,124$). Die Reaktivitäten der männlichen RRP-Patienten unterschieden sich nicht von denen der männlichen Kontrollen ($p = 0,042$).

Nur die Gruppe weiblicher RRP Patientinnen zeigte somit eine krankheitsassoziiert höhere Prävalenz der L1 Antikörperpositiven gegenüber den Kontrollen. Die 89% im L1 ELISA positiven adult erkrankten RRP-Patientinnen ist nur mit der Prävalenz von 88% positiven Patientinnen mit genitalen Condylomen vergleichbar.

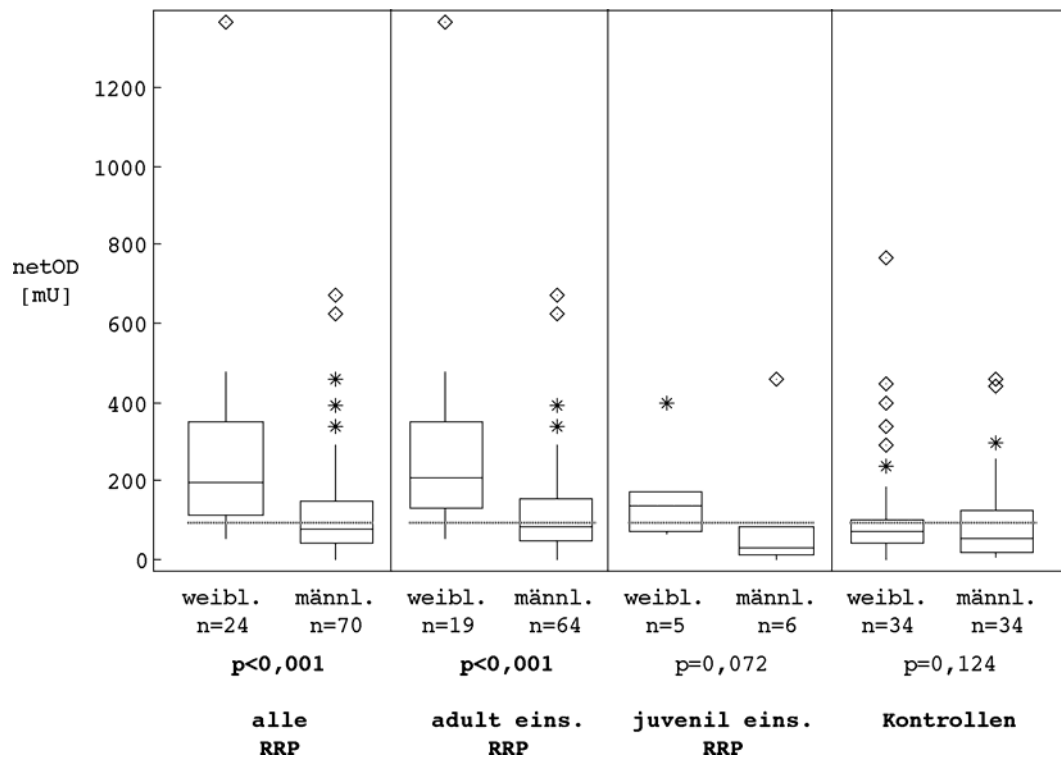


Abb. 16: Geschlechtsabhängigkeit der HPV6bL1 Antikörper bei RRP

Patienten

Die Verteilung der HPV6bL1 Antikörperreaktivitäten in adult einsetzender RRP, juvenil einsetzender RRP und gesunden, erwachsenen Kontrollen ist mittels Tukey-Boxplots getrennt nach Geschlecht gezeigt. Die gestrichelten Linien zeigen den Cut-Off-Wert an. Die Wahrscheinlichkeit (p) eines signifikanten Unterschiedes zwischen 2 Gruppen wurde mit dem U-Test von Mann-Whitney kalkuliert; p-Werte unterhalb der Signifikanzgrenze sind fett gedruckt.

Follow-up der RRP Patienten

Um Veränderungen der Antikörperantwort von RRP Patienten im L1 ELISA während des rekurrenden Krankheitsverlaufes zu beobachten, wurden 76 Follow-up Seren von 47 RRP Patienten untersucht. Die Seren wurden jeweils bei erneutem Auftreten von Papillomen entnommen. Der Median der Follow-up Zeiten betrug 410 Tage, die Studie wird zur Zeit noch weitergeführt.

Der Serostatus, der positive oder negative Ergebnisse des L1 ELISA beschreibt, blieb bei 33 (70%) der Follow-up Patienten über den Beobachtungszeitraum unverändert (Tab. 6).

Tab. 6: L1 Antikörperreaktivität in RRP Patienten während des Follow-up

Serostatus	n (w/m)	Median der Follow-up Tage	Min/Max der Follow-up Tage
+ → + ¹	15 (6/9)	388	34/1077
+ → -	10 (4/6)	698	242/1126
- → - ²	18 (1/17)	366	39/946
- → +	4 (1/3)	410	405/484

¹ mit einem +/+/-/+//+ Patienten, ² mit einem -/+/- Patienten

Von 25 anfangs im L1 ELISA positiven Patienten wurden während der Beobachtungszeit 10 (40%) seronegativ, wobei der Prozentsatz dieser Revertanten bei Frauen und Männern gleich war. Nur vier (18%) von den 22 zuerst im L1 ELISA negativen Patienten serokonvertierten während des Follow-up, sodaß der Anteil der Seropositiven von 53% auf 40% abfiel. Unter den 17 initial L1 Antikörperpositiven Patienten, die für mindestens ein Jahr beobachtet wurden, waren drei (18%) am Ende des ersten Jahres seronegativ. Nach zwei Jahren Follow-up waren drei von 9 Patienten seronegativ (Abb. 17). Je länger man die Gruppe der RRP-Patienten beobachtete, desto weniger L1 positive Patienten gab es. Durch eine Weiterführung der Follow-up Studie könnte noch genauer untersucht werden, wie stark die Rate der L1 Revertanten ist.

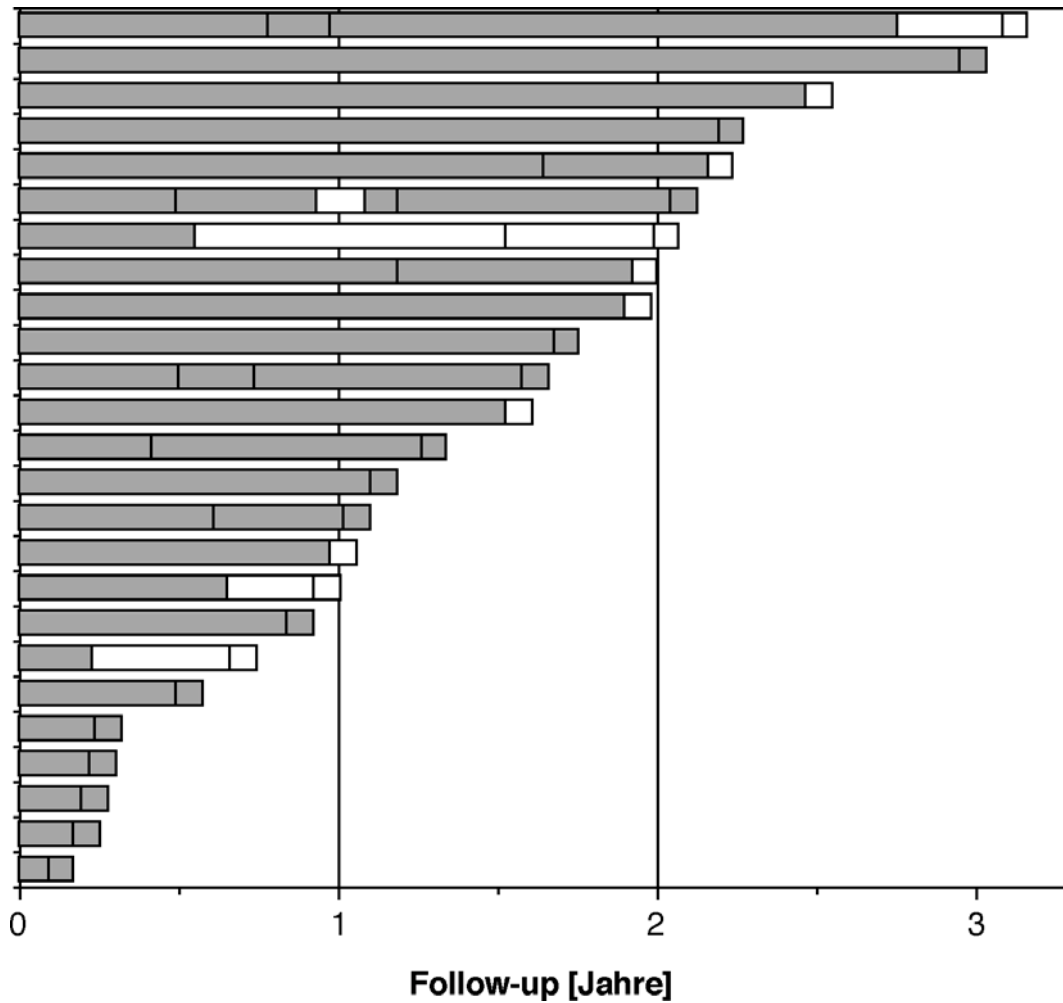


Abb. 17: Persistenz von HPV6bL1 Antikörpern in initial seropositiven RRP Patienten

Jeder waagrechte Balken steht für einen Patienten und die darin enthaltenen schwarzen Unterteilungslinien zeigen die Zeitpunkte der Serumentnahme an. Die grauen Abschnitte in den Balken zeigen die Zeit an, in der der Patient seropositiv war und die weißen Abschnitte zeigen die seronegative Zeit. Den letzten Serostatus des jeweiligen Patienten zeigt der letzte Balkenabschnitt an.

Diskussion

In dieser Arbeit wurden Antikörperprävalenzen gegen frühe und späte HPV6b Proteine in Patienten mit genitalen Condylomen, mit rekurrenden respiratorischen Papillomen sowie in einer Kontrollgruppe aus der Normalbevölkerung untersucht. Die Patienten haben dabei teilweise persistierende oder rekurrende HPV6/11 Infektionen. Trotz teilweise starker Reaktivitäten im L1 ELISA konnten nur sehr schwache Reaktivitäten in den ELISA mit den Antigenen L2, E2, E4, E6 und E7 in denselben Seren gefunden werden.

Ätiopathogenese HPV-induzierter, proliferativer Erkrankungen

Humane Papillomviren (HPV) sind eine große Gruppe epitheliotroper, doppelstängiger DNA-Viren. Die virale DNA codiert für die regulatorischen Proteine (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) und zwei Kapsidproteine (L1 und L2). HPV Infektionen der Genitalschleimhaut (Mucosa) werden hauptsächlich durch Sexualkontakt übertragen. Mucosotrope Papillomviren infizieren die Basalschicht von genitalen und oralen Schleimhautepithelien wahrscheinlich durch kleine Abschürfungen oder Microläsionen und können dort als latente Infektion subklinisch persistieren (Handsfield, 1997; Kashima, Mounts, and Shah, 1996; Maran et al., 1995). Die mit einer produktiven HPV Infektion einhergehende Stimulation der Zellteilungsrate ruft abhängig vom HPV-Typ verschiedene Neoplasien hervor. Durch eine persistierende Infektion mit den Hochrisiko HPV-Typen können maligne Tumore entstehen. Diese Hochrisiko HPV-Typen sind hauptsächlich mit malignen Tumoren der *Cervix uteri* (Zervixkarzinom), des anogenitalen Traktes und Kopf-Hals Plattenepithelkarzinomen (HNSCC) assoziiert (zur Hausen and de Villiers, 1994). Im Gegensatz dazu verursachen die Niederrisiko HPV-Typen nur benigne Tumoren (Warzen) in genitalen und oralen Schleimhäuten. Die Läsionen im Genitaltrakt werden als *Condyloma acuminata* bezeichnet, die im Oropharynx-Bereich als respiratorische Papillome, die gehäuft am Kehlkopf auftreten (Larynxpapillome).

HPV6b als Vertreter der Niederrisiko HPV-Typen

Genitale Condylome und respiratorische Papillome sind hauptsächlich mit den HPV-Typen 6 und 11 assoziiert (Gissmann et al., 1983). Beckman et al. fand in einer Studie von 33 Patienten mit Genitalcondylomen 22 (67%) HPV6 und 6 (18%) HPV11 DNA positive (Beckmann et al., 1991). Hauptsächlich HPV DNA der Typen 6 und 11 wurden zu einem großen Prozentsatz (68% bis 100%) in respiratorischen Papillomen gefunden (Aaltonen et al., 2001; Penaloza-Plascencia et al., 2000).

Mehrere Subtypen sind unter HPV6 zusammengefaßt. Als nächster verwandter Virustyp ist HPV11 zu sehen (Dartmann et al., 1986). Als Repräsentant für die Niederrisiko HPV-Typen wurde in dieser Arbeit HPV6b ausgewählt, der am häufigsten in Condylomen gefunden wurde und dessen Proteinsequenz zu über 95% identisch ist mit dem Subtyp HPV6a und zu über 75% mit HPV11 (Tab. 1). Durch konservierte Epitope in den HPV6 Subtypen und HPV11 kann somit von einer Kreuzreaktivität der Antikörper ausgegangen werden. Christensen et al. (Christensen et al., 1994) fanden eine starke Kreuzreaktivität von zwei Kaninchenseren, die gegen HPV11 L1 VLP hergestellt wurden mit HPV6b L1 VLP. Der hier verwendete monoklonale Antikörper, der gegen HPV6 L1 VLPs hergestellt wurde, erkennt außer intakten HPV6 VLPs auch intakte HPV11 VLPs, aber keine denaturierten virusähnlichen Partikel (Christensen et al., 1996). In einer Studie mit menschlichen Seren zeigten 24 (56%) von 43 Seren, die HPV6 und/oder HPV11 VLP erkannten, auch eine Reaktivität mit dem jeweils anderen Virustyp (Heim et al., 1995). Dies kann sowohl durch Kreuzreaktivität, als auch durch eine Doppelinfektion mit beiden Virustypen hervorgerufen worden sein, wobei Doppelinfektionen mit HPV 6 und 11 ein eher seltenes Ereignis darstellen. Beckmann et al. fanden keine Doppelinfektion mit HPV6 und 11 in mehr als 30 Condylompatienten (Beckmann et al., 1991).

Die in dieser Arbeit gezeigte, vollständige Signalunterdrückung in 3 von 3 Humansenen durch Präabsorption mit entweder GST-6bL1tag oder HPV11 VLP spricht zusätzlich noch für eine außerordentliche starke Kreuzreaktivität zwischen den L1 Proteinen der Niederrisiko Virustypen. Das Ausmaß der Kreuzreaktivitäten zwischen den L1 Proteinen anderer HPV-Typen muß noch

untersucht werden, wozu aber die einfache Herstellung und Handhabung des GST-Xtag ELISA beitragen könnte. Erste Versuche HPV6 positive Seren mit GST-16L1tag zu präabsorbieren lassen nur eine geringe Kreuzreaktivität zwischen Hoch- und Niederrisiko HPV Typen vermuten (P. Sehr pers. Mitteilung).

GST-Xtag ELISA

Das Format der hier beschriebenen GST-Xtag ELISA basiert auf der einheitlichen Antigenpräsentation jeglicher rekombinant exprimierter Proteine als Fusionsproteine zwischen der N-terminal fusionierten, Glutathion S-Transferase und einem kurzen C-terminalen Undeca-Peptid aus dem SV40 T-Antigen als Markerepitop. Die Fusion des 26 kD großen GST-Teils erhöht die Löslichkeit des Antigens und somit die Wahrscheinlichkeit für native Faltung. Die Bindung der GST-Xtag Antigene wird durch die hohe Affinität der Glutathion S-Transferase zu Glutathion, welches zuvor kovalent an Casein gebunden und auf die ELISA Platte aufgebracht wurde, erreicht. Die Ein-Schritt Aufreinigung der Antigene wurde allein durch die Affinität des GST-Anteils an Glutathion-Casein vermittelt.

Sechs GST-Xtag ELISA mit den frühen HPV6b Proteinen E2, E4, E6, E7, sowie mit den späten Proteinen L1 und L2 wurden hier neu entwickelt. Sie wurden zunächst charakterisiert, validiert und dann zur Analyse der humoralen Immunantwort gegen diese HPV6b Proteine eingesetzt.

Alle 6 GST-Xtag Antigene und GST-tag waren in voller Länge in den bakteriellen Lysaten als prominente Bande in Western-Blots identifizierbar und blieben nach einer 30 min. 30000 xg Zentrifugation in Lösung. Der Fusionspartner GST hält die Fusionsproteine in Lösung und ermöglicht deren vollständige Expression. Unterschiedlich große N- und C-terminal verkürzte Nebenprodukte waren ebenfalls vorhanden, deren Auftreten bei Expression von heterologen Proteinen bekannt ist.

Durch die Affinität der Glutathion S-Transferase zu Glutathion war eine einfache Aufreinigung der Antigene aus den geklärten Lysaten möglich. Die Effektivität der Ein-Schritt Aufreinigung der GST-Xtag Antigene auf der ELISA-Platte wurde durch Elution der gebundenen Proteine überprüft. Bei der Elution der Antigene

von der festen Phase waren nur geringe bakterielle Kontaminationen im Silbergel sichtbar. C-terminal verkürzte (GST-haltige) Nebenprodukte wurden bei allen Antigenen außer E7 mit aufgereinigt. Die im Lysat erkennbaren Nebenprodukte der GST-E7tag Expression waren wahrscheinlich nicht nativ gefaltet und konnten weder an Glutathion binden, noch mit nativem GST oder E7 dimerisieren (Abb. 7).

Das große regulatorische HPV Protein E1 wurde von P. Sehr kloniert, konnte aber mit den beschriebenen Methoden nicht in Bakterien exprimiert werden. Die Expression von HPV6b E1 wurde deshalb nicht weiterverfolgt. Das parallel dazu klonierte HPV16 E1 konnte hingegen hergestellt werden. Damit zeigte sich, daß es bei HPV16 Infektionen nur selten eine Antikörperantwort gegen 16E1 in Patientenserum gibt (P. Sehr pers. Mitteilung). Das hydrophobe, bei Infektionen meist im Golgi Apparat und der Plasmamembran vorkommende E5 Protein (Conrad, Bubb, and Schlegel, 1993; Oetke et al., 2000) wurde nicht untersucht, weil bei der bakteriellen Expression von GST-16E5 kein lösliches Antigen detektiert werden konnte (A. Alonso und P. Sehr pers. Mitteilung).

Durch das in jedem Antigen vorhandene C-terminale Markerepitop konnte die Antigenmenge für jedes Antigen mit demselben System ermittelt werden. Das erlaubte die Verwendung vergleichbarer Antigenmengen im ELISA. Ungeachtet ihrer unterschiedlichen Größe und Struktur banden alle Antigene und GST-tag mit ähnlichen Maximalmengen auf der ELISA Platte (Abb. 9). Die Antigene waren auch bei gesättigter Proteinmengen pro Loch nicht zu dicht auf der Platte gepackt, sondern ließen noch die Bindung an ihren an die Plastikoberfläche gebundenen GST-Teil und an ihren tag-Teil durch Immunglobuline zu. Die Bindung relativ großer Antikörpermoleküle (ca. 150 kD) an N- und C-terminale Bereiche der Antigene war somit möglich.

Der Anteil an GST-L2tag Protein mit voller Länge im Bakterienlysat gegenüber kürzeren Nebenprodukten war bei der Expression sehr gering. Dies erklärt allerdings nicht, warum keine Sättigung des anti-tag Signals bei der Titration möglich war. Der stetige Anstieg der Menge an GST-L2tag Protein mit voller Länge könnte darauf hindeuten, daß die Antigene mit voller Länge die kleineren Nebenprodukte von der Platte verdrängen.

Bei der bakteriellen Expression von GST-L2tag ist die native Faltung des L2 in Abwesenheit von L1-Pentameren allerdings fraglich (R. Garcea, pers. Mitteilung). Aktivitäten in Seren von Condylom und RRP Patienten gegen lineare L2 Epitope sind beschrieben (Jenison et al., 1988; Sameshima et al., 1997). Um eventuell vorhandene Seroreaktivitäten gegen L2 detektieren zu können wurde der GST-L2tag ELISA unter suboptimalen Bedingungen (61% des höchsten anti-tag Signals bei 1 µg/µl) mit einer Antigenkonzentration von 0,25 µg/µl Lysatprotein mit allen Serumgruppen durchgeführt. Es wurden allerdings keine erhöhten Reaktivitäten im L2 ELISA gefunden.

Im Gegensatz zu L1 waren bekannt positive Humanseren zur Validierung der Tests mit L2, E2, E4, E6 und E7 nicht vorhanden. Indirekte Argumente sprechen aber dafür, daß die hier entwickelten GST-Xtag ELISA durchaus für diese Antigene spezifische Antikörper detektieren können.

- Die im selben Format erstellten HPV16 und HPV18 E6 und E7 ELISA weisen sehr sensitiv Serumantikörper in Zervixkarzinompatientinnen nach (Sehr, Zumbach, and Pawlita, 2001).
- Der GST-16E4tag ELISA zeigte starke Reaktivitäten in Seren von Zervixkarzinompatientinnen (P. Sehr, pers. Mitteilung).
- Der GST-16E2tag ELISA unterscheidet Patienten- und Kontrollgruppe (Sehr et al., 2000).
- Die anti-GST und anti-tag Titrations von HPV6b und HPV16/18 E2, E4, E6 und E7 Antigenen mit voller Länge erreichen ähnliche Sättigungswerte (P. Sehr, pers. Mitteilung).

Der L1 ELISA

Eine humorale Immunantwort gegen HPV6/11 Kapside wurde sowohl bei Patienten mit genitalen als auch bei Patienten mit oralen Papillomen gezeigt (Bonnez et al., 1991; Bonnez et al., 1992; Eisemann et al., 1996; Greer et al., 1995; Heim et al., 1995; Peng et al., 1999). Die Antikörperantwort gegen die anderen viralen Proteine wurde hingegen nur in wenigen Arbeiten mit sehr

unterschiedlichen Methoden untersucht (Jenison et al., 1988; Le Cann et al., 1995; Sameshima et al., 1997; Suchankova et al., 1990).

Validierung des L1 ELISA

Der neu entwickelte GST-6bL1tag ELISA basiert auf den Beobachtungen von Chen et al. (Chen et al., 2001; Chen et al., 2000) und Rose et al. (Rose et al., 1998), daß bakteriell exprimierte HPV16 und HPV11 GST-L1 Fusionsproteine die Fähigkeit besitzen, (I) sich zu Pentameren zusammen zu lagern und (II) viele bisher identifizierte, serologisch relevante Epitope darzustellen. Ersetzt man die Aminosäuren von HPV16 L1 durch die Aminosäuren von HPV11 L1, so zeigt sich in der Kristallstruktur, daß auch die identifizierten Epitope neutralisierender, monoklonaler anti-HPV11 Antikörper auf der im Kapsid nach außen gewandten Seite eines L1 Pentamers liegen (Chen et al., 2000).

Die Verwendung von intakten VLP macht den momentanen "Gold-Standard" ELISA typspezifisch, da nur die Oberflächen der Viren als Antigen angeboten werden (Abb. 18, 1 und 2). Obwohl das Camvir-Epitop im L1 ELISA für den Antikörper zugänglich war (Abb. 11) und somit gruppenspezifische Epitope im L1 ELISA präsentiert werden (Abb. 18, 3), wurde der L1 ELISA im Vergleich zum VLP-ELISA nicht unspezifischer. Serumantikörper gegen gruppenspezifische L1 Epitope scheinen in der humoralen Immunantwort von Patienten eine untergeordnete Rolle zu spielen.

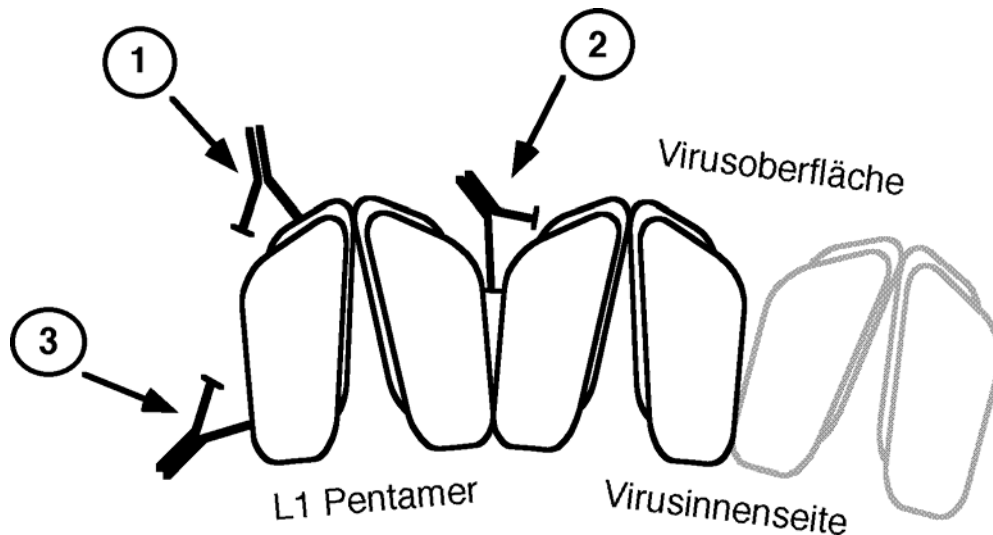


Abb. 18: Antikörper gegen HPV Pentamere

- (1) zeigt schematisch einen typspezifischen Antikörper, der gegen ein Oberflächenepitop eines L1-Pentamers des Papillomviruskapsids gerichtet ist.
- (2) zeigt einen typspezifischen Antikörper, der ein “inter-Pentamer-Epitop” erkennt (bisher ist hierfür kein Beispiel für Papillomviren beschrieben, aber für einen monoklonalen Antikörper gegen das Kapsid des Adeno-Assoziierten Virus, M.Pawlita, pers. Mitteilung).
- (3) zeigt einen Antikörper, der nicht auf der Oberfläche bindet und somit außer typspezifischen, auch gruppenspezifische Epitope im GST-L1tag ELISA erkennen kann, wo keine Kapside sondern L1 Pentamere als Antigen präsentiert werden.

Der direkte Vergleich der Antikörperdetektion mit dem GST-L1tag ELISA und mit dem VLP ELISA, der virusähnliche Partikel als Antigene verwendete und momentan als Standard in der HPV Serologie gilt, zeigte eine gute Übereinstimmung ($r = 0,79$) bei 72 getesteten Seren von Condylom-Patientinnen. Für Seren, deren Reaktivität über 400 mOD Einheiten lag, generierte der GST-L1tag ELISA höhere Werte, als der VLP ELISA. Die Reaktivitäten unterhalb 400 mOD reproduzierte der GST-L1tag ELISA sehr gut mit einer lokalen, linearen Regressionskurve, die fast genau auf der Winkelhalbierenden des x/y-Schaubilds lag. Die Genauigkeit im niedrigen Meßwertbereich ist sehr wichtig, um sicher zwischen positiven und negativen Reaktivitäten unterscheiden zu können.

Der GST-6bL1tag ELISA ist ein neuer Test, dessen Materialien einfacher herzustellen sind und dessen Methodik einfacher auszuführen ist, als die des VLP ELISA, bei vergleichbarer Sensitivität und Spezifität. Sowohl die bakterielle Expression des Antigens, wie auch dessen Ein-Schritt Aufreinigung in der ELISA Platte sind vorteilhaft beim GST-6bL1tag ELISA gegenüber dem VLP ELISA. Die hier gezeigte GST-6bL1tag ELISA Methodik könnte eine einfacher durchzuführende Alternative zu den VLP ELISA für eine parallele Untersuchung vieler HPV Typen, u.a. HPV16/18 bedeuten und das Testen großer Serenzahlen bei epidemiologischen Untersuchungen und Vakzinierungs-Studien erleichtern.

Zusätzlich zum Nachweis von Antikörpern mit dem GST-L1tag ELISA kommen die GST-L1 Pentamere auch als Vakzine in Betracht. Eine erste Studie bei Hunden, die mit bakteriell exprimierten GST-L1 Pentameren des oralen Papillomvirus bei Hunden (COPV) vakziniert wurden verlief erfolgreich, die Hunde waren vor oralen, COPV induzierten Läsionen geschützt (Yuan et al., 2001).

HPV6b L1 Serologie

Unter Verwendung des neuen GST-6bL1tag ELISA wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Antikörperprävalenz in Patientinnen mit Genitalcondylomen (88% Positive) gegenüber gesunden Individuen (31% Positive in der Kontrollgruppe) festgestellt und somit frühere Beobachtungen bestätigt (Bonnez et al., 1993; Carter et al., 1995; Eisemann et al., 1996; Peng et al., 1999). Die bei weiblichen (89% Positive), aber nicht bei männlichen (42% Positive) RRP Patienten erhöhte L1 Antikörperprävalenzen gegenüber der Kontrollgruppe wurden hier mit dem GST-6bL1tag ELISA gefunden, die Aaltonen et al. mit einem HPV11 VLP ELISA bereits in einer Subgruppe der hier getesteten Seren gezeigt hatten (Aaltonen et al., 2001). Es muß allerdings noch gezeigt werden, in wieweit die Antikörper spezifisch gegen orale HPV-Infektionen erzeugt wurden und keine Reaktion auf genitale HPV-Infektionen sind. In der Kontrollgruppe unterschieden sich die L1 Antikörperreaktivitäten allerdings nicht nach Geschlechtern. Das würde den Schluß zulassen, daß beide Geschlechter sich in der humoralen Immunantwort bei einer Warzenerkrankung unterscheiden, sich aber die

Antikörperspiegel bei Männern und Frauen nach einer Warzenerkrankung oder bei subklinisch verlaufender HPV6/11 Infektion angleichen. Slavinsky et al. beschrieben kürzlich in einer Studie mit 687 Patienten einer Klinik für Sexually transmitted diseases, daß Frauen häufiger als Männer Antikörper gegen HPV6/11 Kapside haben (Slavinsky et al., 2001).

Mit den hier entwickelten ELISA wird gegenwärtig eine größere Fall Kontroll Studie mit 108 Seren von männlichen Condylompatienten aus Deutschland und alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrollen aus Deutschland (1:1) untersucht. Die präliminären Daten weisen darauf hin, daß auch bei den männlichen Condylompatienten L1 Antikörper gegenüber den Kontrollen erhöht sind, allerdings in geringerem Ausmaß, als bei den hier untersuchten weiblichen Condylompatientinnen aus USA. Für die frühen Antigene werden nur sehr wenige Antikörperpositive Patientenserien beobachtet. Die hier bei den Condylompatientinnen beobachtete Erhöhung von E2 und E4 Antikörpern scheint bei den männlichen Condylompatienten nicht vorhanden zu sein.

RRP Follow-up

Follow-up Seren von 47 RRP-Patienten wurden auf 6bL1 Antikörper untersucht, um den Verlauf der humoralen Immunantwort bei RRP zu verfolgen. Studien der letzten Jahre zeigten in den meisten HPV6/11-Infizierten mit der Zeit einen Verlust der L1-Antikörperantwort in genital HPV6/11 infizierten Patienten. Wikström et al. zeigten das Ansteigen und wieder Abfallen der Antikörperantwort gegen HPV6 Kapside in Condylom-Patienten und neu HPV6-Infizierten (Wikstrom et al., 1995). Im Gegensatz dazu scheint der Antikörperspiegel gegen HPV16 Kapside über einen längeren Zeitraum stabil zu sein (af Geijersstam et al., 1998). Carter et al. zeigten bei genital HPV-Infizierten sowohl die temporäre Antwort auf eine HPV6 Infektionen, wie auch die eher stabilen Antikörperreaktivitäten auf eine HPV16 oder HPV18 Infektion (Carter et al., 2000). Aus den Daten dieser Autoren für HPV6 kann man den Wegfall der Antikörperreaktivitäten in 32% der ein Jahr lang beobachteten Patienten und in 50% der für zwei Jahre beobachteten Patienten errechnen.

In der hier untersuchten RRP-Patientengruppe konnte der Wegfall der L1 Antikörper nur in ca. 20% der für ein Jahr beobachteten Patienten und in ca. 30% der zwei Jahre lang beobachteten Patienten gezeigt werden, was für eine stabilere Antikörperantwort der RRP-Patienten spricht. Orale HPV-Infektionen bei RRP Patienten sind persistent, im Gegensatz zu genitalen HPV-Infektionen. Bei Condylompatienten kann der rekurrende Krankheitsverlauf auch durch eine Neuinfektion hervorgerufen werden. Dieser Unterschied könnte die stabilere Antikörperantwort in RRP-Patienten gegenüber den Condylompatienten erklären.

Da diese Follow-up Studie der RRP-Patienten zur Zeit noch weitergeführt wird sollten in Zukunft die hier gezeigten Daten in einer größeren Gruppe mit längeren Beobachtungszeiträumen verifiziert werden.

Die E2, E4, E6 und E7 ELISA

Die hier präsentierten Daten zur Antikörperprävalenz gegen die frühen HPV6b Proteine in gesunden Individuen zeigen, daß es nur eine sehr schwache Antikörperantwort gegen E2, E4, E6 und E7 gibt, auch wenn die Seren zum Teil hohe Reaktivitäten im GST-L1tag ELISA besaßen. Ebenso waren die Antikörper gegen frühe Proteine in Patienten mit persistierenden und produktiven oralen und genitalen HPV Infektionen nur selten nachweisbar, obwohl Sherman et al. und Wu and Mounts die Expression der frühen HPV Gene in condylomatösem Gewebe und respiratorischen Papillomen zeigen konnten (Sherman et al., 1992; Wu and Mounts, 1989). In *Condyloma acuminata* wurden die Transkripte von HPV6 E2 und E4 häufiger nachgewiesen, als die von E6 und E7 (Chow et al., 1987; Nasserri et al., 1987). Die erhöhte Expression von E2 und E4 könnte der Grund für die ebenfalls erhöhte Antikörperprävalenz in den Condylompatientinnen gegenüber den Kontrollen sein. Die zwar gegenüber den L1 Reaktivitäten schwachen, aber signifikant höheren Reaktivitäten der kleinen Gruppe von Condylompatientinnen gegenüber den Kontrollen im GST-E2tag und GST-E4tag ELISA sollten daher noch in größeren Gruppen untersucht werden.

Auch die Untersuchung der Seren von Karzinom-Patienten, die sowohl HPV16/18 DNA-positiv, wie auch HPV6/11 DNA-positiv sind könnten einen genaueren Einblick in die humorale Immunantwort gegen die Niederrisiko HPV-Typen

geben (Gorgoulis et al., 1999; Suarez et al., 2000). In Einzelfällen wurden auch maligne Tumore des respiratorischen Trakts beschrieben, die ausschließlich HPV6/11 enthielten (Rady et al., 1998; Venuti et al., 2000). In Analogie zum Zervixkarzinom ist zu vermuten, daß eine Expression der HPV6/11 Gene in den invasiven Tumoren auch eine mit den hier beschriebenen GST-Xtag ELISA meßbar erhöhte Immunantwort gegen diese Proteine hervorruft.

In zukünftigen Untersuchungen sollten die Kontrollgruppen allerdings besser an die Patientengruppen angeglichen werden, da der Unterschied zwischen durchweg sehr niedrigen Reaktivitäten in beiden Gruppen dadurch erhöht werden könnte.

Ausblick

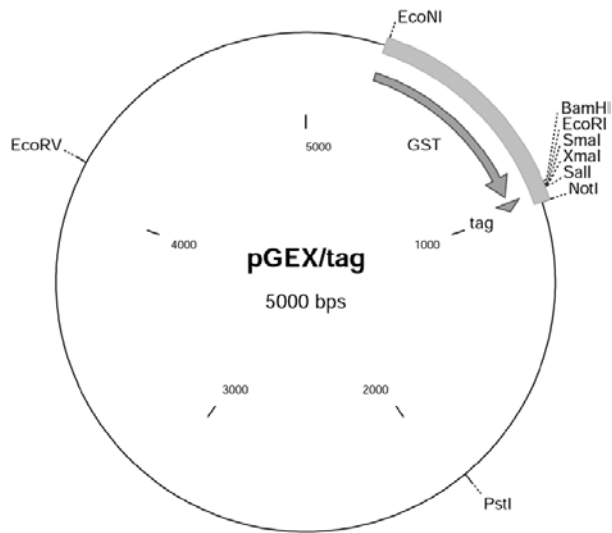
Diese Arbeit beschreibt die Erstellung und Validierung von Antikörper ELISA für 6 HPV6 Proteine. Erste serologische Untersuchungen an kleinen Serumgruppen in dieser Arbeit weisen darauf hin, daß insbesondere gegen L1, aber auch gegen E2 und E4 eine erhöhte Immunantwort in Patientinnen mit Genitalcondylomen gegenüber der Normalbevölkerung vorliegen. Damit legt diese Arbeit den Grundstein für seroepidemiologische Studien zur detaillierten Charakterisierung der Antikörperantworten bei weiblichen und männlichen Genitalcondylompatienten, bei RRP-Patienten und der Normalbevölkerung. Auch die Verlaufsuntersuchung der humoralen Immunantwort junger Patienten auf erstmalige HPV6 Infektion ist mit den hier entwickelten serologischen Tests möglich geworden.

Die hier prototypisch für HPV6b L1 durchgeführte Entwicklung des GST-L1tag ELISA, ermöglicht in breitem Maße die Anwendungen auf andere HPV-Typen, insbesondere für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen cutanen HPV-Typen und den nicht-Melanom Hautkarzinomen (Basaliom/Plattenepithelkarzinom).

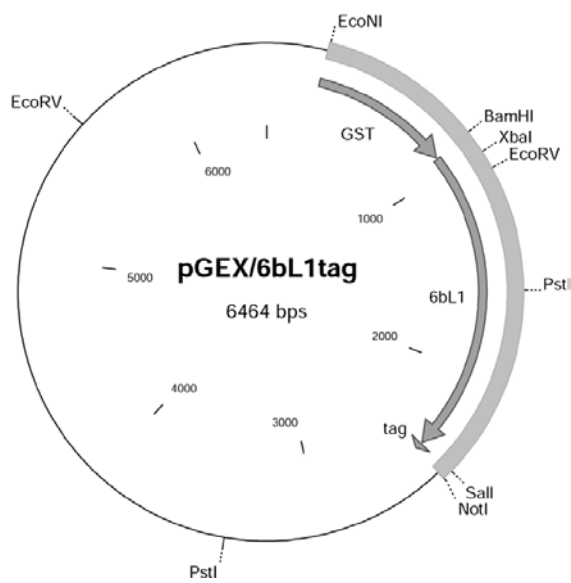
Anhang

Expressionsplasmide

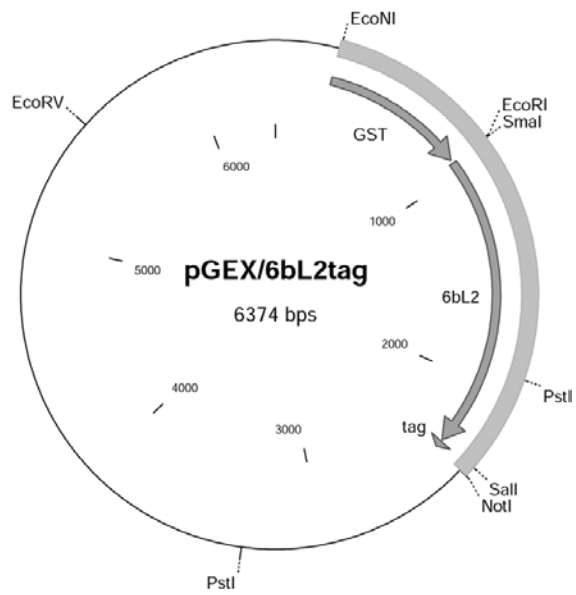
pGEX/tag



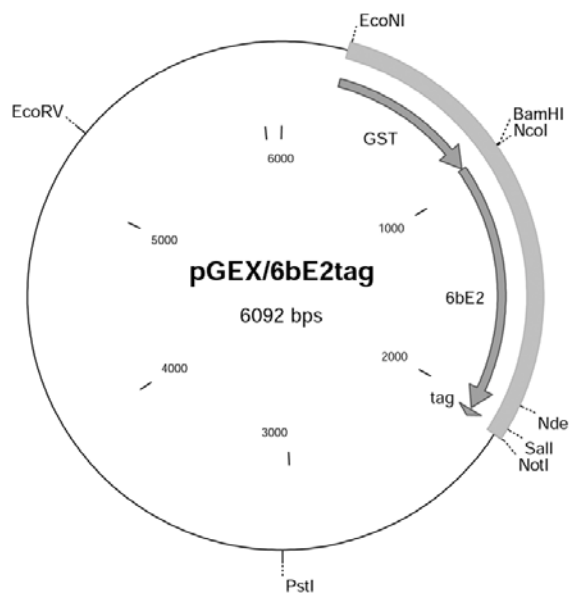
pGEX/6bL1tag



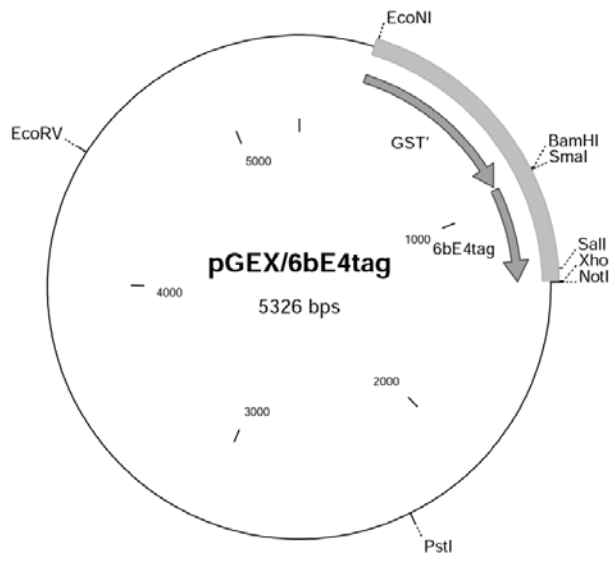
pGEX/6bL2tag



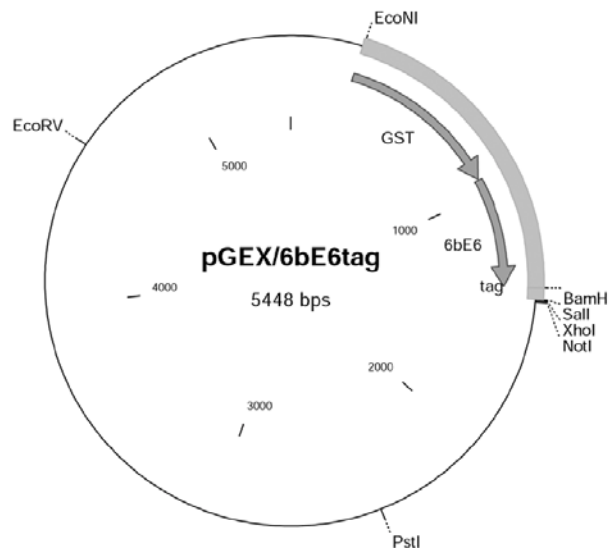
pGEX/6bE2tag



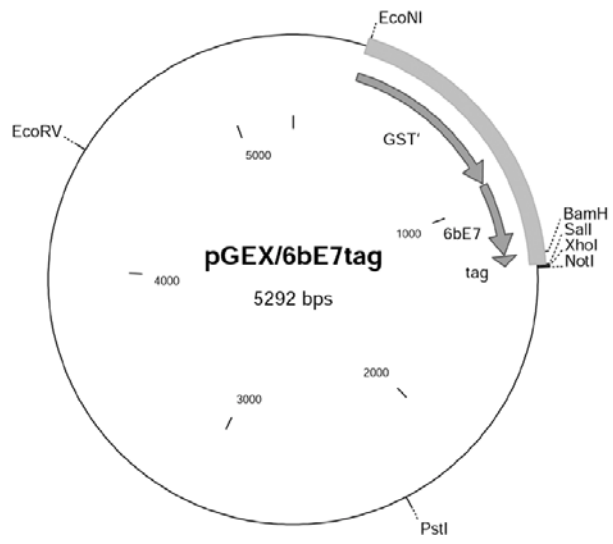
pGEX/6bE4tag



pGEX/6bE6tag



pGEX/6bE7tag



Literatur

- AALTONEN, L., PARTANEN, J., AUVINEN, E., RIHKANEN, H., and VAHERI, A. (1999). HLA-DQ alleles and human papillomavirus DNA in adult-onset laryngeal papillomatosis. *J Infect Dis* **179**(3), 682-5.
- AALTONEN, L. M., AUVINEN, E., DILLNER, J., LEHTINEN, M., PAAVONEN, J., RIHKANEN, H., and VAHERI, A. (2001). Poor antibody response against human papillomavirus in adult-onset laryngeal papillomatosis. *J Med Microbiol* **50**(5), 468-71.
- AF GEJERSSTAM, V., KIBUR, M., WANG, Z., KOSKELA, P., PUKKALA, E., SCHILLER, J., LEHTINEN, M., and DILLNER, J. (1998). Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. *J Infect Dis* **177**(6), 1710-4.
- ANDERS, H.-J., ROSENBAUER, J., and MATIASKE, B. (1990). "Repräsentative Verzehrsstudie in der Bundesrepublik Deutschland incl. West-Berlin : Messung ernährungsphysiologischer Verhaltensweisen (Nationale Verzehrsstudie)". Schriftenreihe der Arbeitsgemeinschaft Ernährungsverhalten (H.-J. Anders, Ed.), 1. 8 vols. Umschau-Verl., Frankfurt am Main.
- BECKMANN, A. M., SHERMAN, K. J., MYERSON, D., DALING, J. R., MCDUGALL, J. K., and GALLOWAY, D. A. (1991). Comparative virologic studies of condylomata acuminata reveal a lack of dual infections with human papillomaviruses. *J Infect Dis* **163**(2), 393-6.
- BONNEZ, W., DA RIN, C., ROSE, R. C., and REICHMAN, R. C. (1991). Use of human papillomavirus type 11 virions in an ELISA to detect specific antibodies in humans with condylomata acuminata. *J Gen Virol* **72**(Pt 6), 1343-7.
- BONNEZ, W., DA RIN, C., ROSE, R. C., TYRING, S. K., and REICHMAN, R. C. (1993). Evolution of the antibody response to human papillomavirus type

11 (HPV-11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment response. *J Med Virol* **39**(4), 340-4.

BONNEZ, W., KASHIMA, H. K., LEVENTHAL, B., MOUNTS, P., ROSE, R. C., REICHMAN, R. C., and SHAH, K. V. (1992). Antibody response to human papillomavirus (HPV) type 11 in children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (RRP). *Virology* **188**(1), 384-7.

CARTER, J. J., KOUTSKY, L. A., HUGHES, J. P., LEE, S. K., KUYPERS, J., KIVIAT, N., and GALLOWAY, D. A. (2000). Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* **181**(6), 1911-9.

CARTER, J. J., WIPF, G. C., HAGENSEE, M. E., MCKNIGHT, B., HABEL, L. A., LEE, S. K., KUYPERS, J., KIVIAT, N., DALING, J. R., KOUTSKY, L. A., and ET AL. (1995). Use of human papillomavirus type 6 capsids to detect antibodies in people with genital warts. *J Infect Dis* **172**(1), 11-8.

CHAN, S. Y., DELIUS, H., HALPERN, A. L., and BERNARD, H. U. (1995). Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* **69**(5), 3074-83.

CHEN, X. S., CASINI, G., HARRISON, S. C., and GARCEA, R. L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* **307**(1), 173-82.

CHEN, X. S., GARCEA, R. L., GOLDBERG, I., CASINI, G., and HARRISON, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**(3), 557-67.

CHOW, L. T., NASSERI, M., WOLINSKY, S. M., and BROKER, T. R. (1987). Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J Virol* **61**(8), 2581-8.

CHRISTENSEN, N. D., 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**(1), 329-35.

- CHRISTENSEN, N. D., and KREIDER, J. W. (1991). Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. *Virus Res* **21**(3), 169-79.
- CHRISTENSEN, N. D., and KREIDER, J. W. (1993). Monoclonal antibody neutralization of BPV-1. *Virus Res* **28**(2), 195-202.
- CHRISTENSEN, N. D., REED, C. A., CLADEL, N. M., HALL, K., and LEISEROWITZ, G. S. (1996). Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology* **224**(2), 477-86.
- CLEVELAND, W. S., and DEVLIN, S. J. (1988). Locally-weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *J. Am. Statist. Assoc.* **83**(403), 596-610.
- COLEMAN, N., BIRLEY, H. D., RENTON, A. M., HANNA, N. F., RYAIT, B. K., BYRNE, M., TAYLOR-ROBINSON, D., and STANLEY, M. A. (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* **102**(6), 768-74.
- CONRAD, M., BUBB, V. J., and SCHLEGEL, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**(10), 6170-8.
- DARTMANN, K., SCHWARZ, E., GISSMANN, L., and ZUR HAUSEN, H. (1986). The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology* **151**(1), 124-30.
- DERKAY, C. S. (2001). Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* **111**(1), 57-69.
- DERKAY, C. S., RIMELL, F. L., and THOMPSON, J. W. (1998). Recurrent respiratory papillomatosis. *Head Neck* **20**(5), 418-24.
- DILLNER, J. (1999). The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* **9**(6), 423-30.

- EISEMANN, C., FISHER, S. G., GROSS, G., MULLER, M., and GISSMANN, L. (1996). Antibodies to human papillomavirus type 11 virus-like particles in sera of patients with genital warts and in control groups. *J Gen Virol* **77**(Pt 8), 1799-803.
- ELFGREN, K., KALANTARI, M., MOBERGER, B., HAGMAR, B., and DILLNER, J. (2000). A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* **183**(3), 561-7.
- ENGVALL, E., and PERLMAN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**(9), 871-4.
- GALL, S. A. (2001). Female genital warts: global trends and treatments. *Infect Dis Obstet Gynecol* **9**(3), 149-54.
- GART, J. J., KREWSKI, D., LEE, P. N., TARONE, R. E., and WAHRENDORF, J. (1986). Statistical methods in cancer research. Volume III--The design and analysis of long-term animal experiments. *IARC Sci Publ*(79), 1-219.
- GISSMANN, L. (1992). Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin Cancer Biol* **3**(5), 253-61.
- GISSMANN, L., WOLNIK, L., IKENBERG, H., KOLDOVSKY, U., SCHNURCH, H. G., and ZUR HAUSEN, H. (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(2), 560-3.
- GORGOLIS, V. G., ZACHARATOS, P., KOTSINAS, A., KYROUDI, A., RASSIDAKIS, A. N., IKONOMOPOULOS, J. A., BARBATIS, C., HERRINGTON, C. S., and KITTAS, C. (1999). Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* **30**(3), 274-83.
- GREER, C. E., WHEELER, C. M., LADNER, M. B., BEUTNER, K., COYNE, M. Y., LIANG, H., LANGENBERG, A., YEN, T. S., and RALSTON, R. (1995). Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol* **33**(8), 2058-63.

- HALPERT, R., FRUCHTER, R. G., SEDLIS, A., BUTT, K., BOYCE, J. G., and SILLMAN, F. H. (1986). Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* **68**(2), 251-8.
- HANDSFIELD, H. H. (1997). Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med* **102**(5A), 16-20.
- HEIM, K., CHRISTENSEN, N. D., HOEPFL, R., WARTUSCH, B., PINZGER, G., ZEIMET, A., BAUMGARTNER, P., KREIDER, J. W., and DAPUNT, O. (1995). Serum IgG, IgM, and IgA reactivity to human papillomavirus types 11 and 6 virus-like particles in different gynecologic patient groups. *J Infect Dis* **172**(2), 395-402.
- HO, G. Y., BURK, R. D., FLEMING, I., and KLEIN, R. S. (1994). Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* **56**(6), 788-92.
- HOPFL, R., HEIM, K., CHRISTENSEN, N., ZUMBACH, K., WIELAND, U., VOLGGER, B., WIDSCHWENDTER, A., HAIMBUCHNER, S., MULLER-HOLZNER, E., PAWLITA, M., PFISTER, H., and FRITSCH, P. (2000). Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV- 16 oncoprotein E7. *Lancet* **356**(9246), 1985-6.
- HOWLEY, P. M. (1996). Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication. 3 ed. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2045-2076. 2 vols. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
- JENISON, S. A., FIRZLAFF, J. M., LANGENBERG, A., and GALLOWAY, D. A. (1988). Identification of immunoreactive antigens of human papillomavirus type 6b by using Escherichia coli-expressed fusion proteins. *J Virol* **62**(6), 2115-23.
- KASHIMA, H. K., MOUNTS, P., and SHAH, K. (1996). Recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* **23**(3), 699-706.

- KIMBERLIN, D. W., and MALIS, D. J. (2000). Juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: possibilities for successful antiviral therapy. *Antiviral Res* **45**(2), 83-93.
- KIRNBAUER, R., TAUB, J., GREENSTONE, H., RODEN, R., DURST, M., GISSMANN, L., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* **67**(12), 6929-36.
- KNOWLES, G., O'NEIL, B. W., and CAMPO, M. S. (1996). Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* **70**(12), 8451-8.
- KOUTSKY, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**(5A), 3-8.
- LE CANN, P., CHABAUD, M., LEBoulLEUX, D., MOUGIN, C., MAYELO, V., LEGRAND, M. C., CALVET, C., AFOUTOU, J. M., COLL-SECK, A. M., and COURSAGET, P. (1995). Detection of antibodies to L1, L2, and E4 proteins of human papillomavirus types 6, 11, and 16 by ELISA using synthetic peptides. *J Med Virol* **45**(4), 410-4.
- LEISEROWITZ, G. S., HALL, K. S., FOSTER, C. A., HITCHCOCK, M. E., CHRISTENSEN, N. D., HEIM, K., and SMITH, L. H. (1997). Detection of serologic neutralizing antibodies against HPV-11 in patients with condyloma acuminata and cervical dysplasia using an in vitro assay. *Gynecol Oncol* **66**(2), 295-9.
- LI, C. C., SHAH, K. V., SETH, A., and GILDEN, R. V. (1987). Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera. *J Virol* **61**(9), 2684-90.
- LIN, P., KOUTSKY, L. A., CRITCHLOW, C. W., APPLE, R. J., HAWES, S. E., HUGHES, J. P., TOURE, P., DEMBELE, A., and KIVIAT, N. B. (2001). HLA Class II DR-DQ and Increased Risk of Cervical Cancer among Senegalese Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(10), 1037-45.

- MACARTHUR, H., and WALTER, G. (1984). Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* **52**(2), 483-91.
- MARAN, A., AMELLA, C. A., DI LORENZO, T. P., AUBORN, K. J., TAICHMAN, L. B., and STEINBERG, B. M. (1995). Human papillomavirus type 11 transcripts are present at low abundance in latently infected respiratory tissues. *Virology* **212**(2), 285-94.
- MCLEAN, C. S., CHURCHER, M. J., MEINKE, J., SMITH, G. L., HIGGINS, G., STANLEY, M., and MINSON, A. C. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* **43**(6), 488-92.
- MESCHÉDE, W., ZUMBACH, K., BRASPENNING, J., SCHEFFNER, M., BENITEZ-BRIBIESCA, L., LUANDE, J., GISSMANN, L., and PAWLITA, M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **36**(2), 475-80.
- MILLER, R., and SIEGMUND, D. (1982). Maximally selected chi square statistics. *Biometrics* **38**, 1011-6.
- MULLER, M., VISCIDI, R. P., SUN, Y., GUERRERO, E., HILL, P. M., SHAH, F., BOSCH, F. X., MUNOZ, N., GISSMANN, L., and SHAH, K. V. (1992). Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* **187**(2), 508-14.
- NASSERI, M., HIROCHIKA, R., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1987). A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* **159**(2), 433-9.
- OETKE, C., AUVINEN, E., PAWLITA, M., and ALONSO, A. (2000). Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* **145**(10), 2183-91.
- PENALOZA-PLASCENCIA, M., MONTOYA-FUENTES, H., FLORES-MARTINEZ, S. E., FIERRO-VELASCO, F. J., PENALOZA-GONZALEZ, J. M., and SANCHEZ-CORONA, J. (2000). Molecular identification of 7 human papillomavirus

- types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **126**(9), 1119-23.
- PENG, S., QI, Y., CHRISTENSEN, N., HENGST, K., KENNEDY, L., FRAZER, I. H., and TINDLE, R. W. (1999). Capture ELISA and in vitro cell binding assay for the detection of antibodies to human papillomavirus type 6b virus-like particles in patients with anogenital warts. *Pathology* **31**(4), 418-22.
- RADY, P. L., SCHNADIG, V. J., WEISS, R. L., HUGHES, T. K., and TYRING, S. K. (1998). Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope* **108**(5), 735-40.
- ROSE, R. C., BONNEZ, W., REICHMAN, R. C., and GARCEA, R. L. (1993). Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* **67**(4), 1936-44.
- ROSE, R. C., WHITE, W. I., LI, M., SUZICH, J. A., LANE, C., and GARCEA, R. L. (1998). Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus- neutralizing antibodies. *J Virol* **72**(7), 6151-4.
- SAMESHIMA, A., FUJIYOSHI, T., PHOLAMPAISATHIT, S., USHIKAI, M., KONO, M., ANTARASENA, S., FUKUDA, K., FURUTA, S., SONODA, S., and OHYAMA, M. (1997). Demonstration of antibodies against human papillomavirus type-11 E6 and L2 proteins in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Auris Nasus Larynx* **24**(2), 185-91.
- SCHILLER, J., and LOWY, D. (2001). Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr*(28), 50-4.
- SCHWARZ, E., DURST, M., DEMANKOWSKI, C., LATTERMANN, O., ZECH, R., WOLFSPERGER, E., SUHAI, S., and ZUR HAUSEN, H. (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *Embo J* **2**(12), 2341-8.
- SEHR, P., NINDL, I., DÜRST, M., SCHNEIDER, A., and PAWLITA, M. (2000). *18th international papillomavirus conference, Barcelona, SPAIN.*

- SEHR, P., ZUMBACH, K., and PAWLITA, M. (2001). A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S- transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods* **253**(1-2), 153-162.
- SELVAKUMAR, R., SCHMITT, A., IFTNER, T., AHMED, R., and WETTSTEIN, F. O. (1997). Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8+ cells and persistence of viral DNA after regression. *J Virol* **71**(7), 5540-8.
- SHAH, K. V., and HOWLEY, P. M. (1996). Papillomaviruses. 3 ed. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2077-2109. 2 vols. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
- SHERMAN, L., GOLAN, Y., MITRANI-ROSENBAUM, S., and BARAM, A. (1992). Differential expression of HPV types 6 and 11 in condylomas and cervical preneoplastic lesions. *Virus Res* **25**(1-2), 23-36.
- SLAVINSKY, J., 3RD, KISSINGER, P., BURGER, L., BOLEY, A., DICARLO, R. P., and HAGENSEE, M. E. (2001). Seroepidemiology of low and high oncogenic risk types of human papillomavirus in a predominantly male cohort of STD clinic patients. *Int J STD AIDS* **12**(8), 516-23.
- SUAREZ, P. A., ADLER-STORHIZ, K., LUNA, M. A., EL-NAGGAR, A. K., ABDUL-KARIM, F. W., and BATSAKIS, J. G. (2000). Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. *Head Neck* **22**(4), 360-8.
- SUCHANKOVA, A., RITTER, O., HIRSCH, I., KRCHNAK, V., KALOS, Z., HAMSIKOVA, E., BRICHACEK, B., and VONKA, V. (1990). Presence of antibody reactive with synthetic peptide derived from L2 open reading frame of human papillomavirus types 6b and 11 in human sera. *Acta Virol* **34**(5), 433-42.
- SUN, X. Y., FRAZER, I., MULLER, M., GISSMANN, L., and ZHOU, J. (1995). Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology* **213**(2), 321-7.
- TACHEZY, R., HAMSIKOVA, E., VALVODA, J., VAN RANST, M., BETKA, J., BURK, R. D., and VONKA, V. (1994). Antibody response to a synthetic peptide

derived from the human papillomavirus type 6/11 L2 protein in recurrent respiratory papillomatosis: correlation between Southern blot hybridization, polymerase chain reaction, and serology. *J Med Virol* **42**(1), 52-9.

TOUZE, A., MAHE, D., EL MEHDAOUI, S., DUPUY, C., COMBITA-ROJAS, A. L., BOUSARGHIN, L., SIZARET, P. Y., and COURSAGET, P. (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol Lett* **189**(1), 121-7.

TUKEY, J. W. (1977). "Exploratory Data Analysis.". Behavioral Science: Quantitative Methods (F. Mosteller, Ed.) Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Massachusetts.

VENUTI, A., MANNI, V., MORELLO, R., DE MARCO, F., MARZETTI, F., and MARCANTE, M. L. (2000). Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol* **60**(4), 396-402.

WIKSTROM, A., VAN DOORNUM, G. J., KIRNBAUER, R., QUINT, W. G., and DILLNER, J. (1995). Prospective study on the development of antibodies against human papillomavirus type 6 among patients with condyloma acuminata or new asymptomatic infection. *J Med Virol* **46**(4), 368-74.

WILCE, M. C., and PARKER, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta* **1205**(1), 1-18.

WU, T. C., and MOUNTS, P. (1989). Sensitive detection of nucleic acids and protein of human papillomavirus type 6 in respiratory and genital tract papillomata. *J Virol Methods* **25**(1), 31-47.

YUAN, H., ESTES, P. A., CHEN, Y., NEWSOME, J., OLCESE, V. A., GARCEA, R. L., and SCHLEGEL, R. (2001). Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* **75**(17), 7848-53.

- ZHOU, J., DOORBAR, J., SUN, X. Y., CRAWFORD, L. V., MCLEAN, C. S., and FRAZER, I. H. (1991). Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* **185**(2), 625-32.
- ZHOU, J., SUN, X. Y., LOUIS, K., and FRAZER, I. H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* **68**(2), 619-25.
- ZUMBACH, K., HOFFMANN, M., KAHN, T., BOSCH, F., GOTTSCHLICH, S., GOROGH, T., RUDERT, H., and PAWLITA, M. (2000). Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* **85**(6), 815-8.
- ZUR HAUSEN, H., and DE VILLIERS, E. M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* **48**, 427-47.