

# **INAUGURAL - DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
**Diplom-Biologin Esther Glastetter**  
aus Ludwigshafen am Rhein  
Tag der mündlichen Prüfung:

**Inhibition der Interaktion von humanpathogenen  
Papillomaviren (*HPV*) und Zellen:  
Untersuchung von HPV11-kapsidspezifischen Peptiden**

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

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken,  
die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und vor allem für seine jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft und die ermutigende Unterstützung, die während der härteren Phasen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Prof. Dr. Ingrid Haas danke ich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens und für die netten, konstruktiven Gespräche auch über das Fachliche hinaus.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Dr. Martin Müller für die unzähligen fachlichen Ratschläge, seine ständige Bereitschaft für Fragen zur Verfügung zu stehen, die Überlassung von Arbeitsmaterial, die entspannten Gespräche auch außerhalb der HPV-Problematik und vor allem für die Durchsicht dieser Arbeit.

Das gilt auch für Dr. Massimo Tommasino, dem ich für die Übernahme meiner Betreuung bei hefespezifischen Fragestellungen, seinem regem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und besonders für seinen ansteckenden Optimismus danken möchte.

Der AG Ruppert, ZMBH danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel für HPLC und Massenspektroskopie, vor allem Magrit Ellis für die Hilfe bei der HPLC, Margot Kraft für die Hilfe bei der Oxidation von Peptiden und Armin Bosserhoff für die Durchführung der Massenspektroskopie und auch hier wieder für die herzliche Atmosphäre und die netten Gespräche.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Birgit Aengeneyndt, Steffen Bannert, Annette Henn und Corinna Klein, ohne deren Hilfe ich bei den VLP-Präparationen nicht ausgekommen wäre. Bei Katja Parsche möchte ich mich u.a. herzlich für die guten Ratschläge bezüglich der VLP-Zell-Interaktionsassays bedanken.

Der Firma Pfizer, ganz besonders Manos Perros, danke ich für ihr ermutigendes Interesse an meinem Projekt und für die technische Unterstützung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Stimmungskanonen aus dem Labor 2.121 der ATV für die entspannte Arbeitsatmosphäre, sie alle haben ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihr Verständnis für meine knappe Zeit, vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit, für ihr Interesse daran und für die nette Zerstreuung.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern Ingrid und Erhard ganz besonders herzlich für ihre Liebe und Geduld, sowie meinem Freund Jens Lausenmeyer für die Gestaltung dieser Arbeit und vor allem für seine liebevolle moralische Unterstützung in der Endphase.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1998 bis Oktober 2001, in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr.Lutz Gissmann, am Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorvirologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt.

**Für meine Eltern**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Vielfalt der Papillomaviren und Humanpathogenese	1
1.2.	Die Genome von Papillomaviren sind sehr einheitlich organisiert	2
1.3.	Die frühen Gene regulieren die Virusvermehrung in der Wirtszelle	3
1.4.	Papillomaviren haben ein ikosaedrisches Kapsid	5
1.5.	Virus-ähnliche Partikel (VLPs) erleichtern die Erforschung von Papillomaviren	6
1.6.	Das Kapsid präsentiert zahlreiche lineare und diskontinuierliche Epitope, die Antikörper induzieren können	6
1.7.	VLPs liefern die Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen	7
1.9.	Zielsetzung dieser Arbeit	10
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1	Chemische Reagenzien	12
2.2.	Verbrauchsmaterialien	13
2.3.	Geräte	14
2.3.1.	Zentrifugen	14
2.3.2.	Sonstige Geräte	15
2.6.2.	Sekundärantikörper	16
2.6.	Antikörper	16
2.6.1.	Primärantikörper	16
2.5.	Verwendete Kits	16
2.4.	Radiochemikalien	16
2.8.	Plasmide	17
2.9.	Peptide	17
2.10.	Größen- und Konzentrationsstandards	17
2.7.	Oligonukleotide für Sequenzierungen	17
2.12.2.	Hefestämme	18
2.12.	Biologische Materialien	18
2.12.1.	Bakterienstämme	18
2.11.	Allgemeine Puffer	18
2.12.4.	Bakulovirus-Stocks	19
2.12.3.	Eukarontische Zelllinien	19
2.14.	Enzymatische Manipulationen von DNA	20
2.13.	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien	20
2.15.	Medien und Lösungen für die Kultivierung eukaryontischer Zellen	21
2.16.	Medien und Lösungen für Arbeiten mit Hefen	22
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
3.1.	Allgemeine mikrobiologische Methoden	23
3.1.1.	Lagerung und Kultur von Bakterien	23
3.1.2.	Messen der Bakteriendichte	23

3.1.3.	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	23
3.1.4.	Elektrotransformation kompetenter Bakterien	24
3.2.	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	24
3.2.1.	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	24
3.2.2.	Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen	24
3.2.3.	Konzentrationsbestimmungen wässriger Lösungen von Nukleinsäuren	25
3.2.4.	Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Plasmid-Minipräparation)	25
3.2.5.	Großaufarbeitung von Plasmid-DNA über Ionenaustauschsäulen (Maxipräparation)	26
3.2.6.	Enzymatische Manipulationen von DNA	27
3.2.6.1.	Restriktionsspaltung von DNA	27
3.2.6.2.	DNA Ligationen	27
3.2.6.3.	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	28
3.2.7.	DNA-Elektrophorese in Agarosehorizontalgelen	28
3.2.8.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.2.9.	Sequenzierung von DNA	29
3.2.9.1.	Denaturierung von doppelsträngiger DNA	30
3.2.9.2.	Anlagerung von Primern an DNA (Annealing)	30
3.2.9.3.	Sequenzierungsreaktionen	32
3.2.9.4.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.3.	Allgemeine Arbeiten mit Zellkultur	32
3.3.1.	Kultivierung eukaryontischer Zellen	32
3.3.2.	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	33
3.3.3.	Inkulturnahme eukaryontischer Zellen	33
3.3.4.	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung	34
3.3.5.	Resuspension adhärenter Zellen ohne Trypsin	34
3.3.6.	Amplifikation von rekombinanten Bakulovirus-Stammpräparationen (Stocks)	34
3.4.	Arbeiten mit Hefen	35
3.4.1.	Herstellung von Glycerinkulturen	35
3.4.2.	Kultivierung von Hefezellen der Art <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.4.3.	Herstellung kompetenter Hefezellen (nach Gietz und Schiestl, 1995)	35
3.4.4.	Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA	36
3.4.4.1.	Transformation einer Peptidbibliothek in Hefen	36
3.4.5.	Kolokalisierung von Plasmiden durch Hefepaarung (Mating) – Durchführung eines Two-Hybrid-Screenings	37
3.4.6.	Aufreinigung von Plasmid DNA aus Hefe-Hoffmann/Winston Methode	38
3.5.	Arbeiten mit Phagen	38
3.5.1.	Kultivierung des Bakterienstammes ER2267	38
3.5.2.	Wichtige Regeln für die Kultivierung von rekombinanten Bakteriophagen	39
3.5.3.	Bestimmung des Phagentiters	39
3.5.4.	Durchführung des „Phage-Display-Library“-Screenings-Affinitätsselektion	40
3.5.5.	Amplifikation und Aufreinigung von Phagenklonen	41

3.5.6.	Präzipitation von Phagen-DNA	41
3.6.	Arbeiten mit Proteinen	42
3.6.1.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.6.2.	Silberfärbung von Proteingelen	43
3.6.3.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
3.6.4.	Dialyse von Proteinen	44
3.6.5.	Kopplung von Biotin an Proteine	44
3.6.6.	VLP-Produktion und Aufreinigung	44
3.6.7.	VLP-Dichtebestimmung	46
3.7.	Immunologische Nachweisverfahren	46
3.7.1.	Enhanced chemoluminescence (ECL) Western Blot	46
3.7.2.	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	47
3.7.3.	Festphasen-VLP-Zellbindungssassay	48
3.7.4.	Durchfluß-Zytometrie – Nachweis zellgebundener HPV11-L1-VLPs durch Immunfluoreszenz	49
3.7.5.	Theoretische Kalkulation potentieller Bindungsepitope auf HPV11-L1 VLPs	50
3.8.	Arbeiten mit Peptiden	51
3.8.1.	Analytische und präparative HPLC (high performance liquid chromatography)	51
3.8.2.	Oxidation von Cystein-flankierten Peptiden	51
3.8.3.	Massenspektroskopie	52
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1.	Screening einer Random-Peptidbibliothek mit dem Hefe-Two-Hybrid-System (THS)*	53
4.1.1.	Prinzip des Systems und Verwendung	53
4.1.2.	Konstruktion der GAL4-Domänenhybride und Transformation in Hefen unterschiedlichen Paarungstyps	54
4.1.2.1.	Fusion von HPV16-L1 mit GAL4-DB und Transformation in den Hefestamm PJ 69-4a	54
4.2.	Screening von HPV11-L1-VLPs mit einer phagen-präsentierten zyklischen 7mer Peptidbibliothek (Phage Display)	57
4.2.1.	Prinzip des Systems und Verwendung	57
4.2.2.	Präparation von HPV11-L1-VLPs	58
4.2.3.	Identifizierung von Phagen-präsentierten Peptiden, die spezifisch mit HPV11-L1-VLPs interagieren	60
4.2.3.1.	Affinitätsselektion einer zyklischen 7mer Phagen-Peptidbibliothek	60
4.2.3.2.	Überprüfung der isolierten Phagen auf HPV11-VLP Spezifität mittels Antigen-Capture-ELISA	61
4.2.3.3.	Sequenzen HPV11-L1 VLP spezifischer, rekombinanter Phagen	63
4.3.	Charakterisierung von HPV11-spezifischen, rekombinanten Phagenklonen	65
4.3.1.	Bindung von HPV11-spezifischen Phagenklonen an eine Auswahl verschiedener Papillomavirus-Typen	65
4.3.2.	Interaktion von HPV11-VLPs mit Säugetier-Zellen – Beeinflussung der Rezeptorbindung durch HPV11-spezifische Phagen	69
4.3.2.1.	Eigenschaften und Nachweis biotinylierter VLPs	69
4.3.2.2.	Etablierung der experimentellen Bedingungen für den CV1-Zellbindungssassay	71
4.3.2.3.	Untersuchung der HPV11-spezifischen Phagen auf inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen	72

4.4.	Versuche zur VLP-Bindungsinhibition mit von Phagen abgeleiteten Sequenzen	76
4.4.1.	Aufreinigung und Oxidation von Cystein-flankierten Peptiden	76
4.4.1.1.	Analyse des Peptids PD8 per analytischer HPLC	76
4.4.1.2.	Aufreinigung von PD8 per präparativer HPLC	77
4.4.1.3.	Oxidation von PD8	79
4.4.2.	Interaktion von HPV11-VLPs mit Säugetier-Zellen – Beeinflussung der Rezeptorinteraktion durch HPV11-spezifische, synthetische Peptide	80
4.4.2.1.	Etablierung der experimentellen Bedingungen für den K562-Zellbindungsassay	80
4.4.2.2.	Untersuchung der, von Phagen abgeleiteten HPV11-spezifischen Peptide, auf inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Bindung von VLPs an Zellen	82
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
5.1.	Das Haupt-Kapsidprotein L1 von Papillomaviren ist für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening ungeeignet	86
5.2.	Voraussetzungen für die Selektion von HPV11-spezifischen Peptiden aus phagen-präsentierten Peptidbibliotheken	88
5.3.	Die identifizierten HPV11-spezifischen Peptidsequenzen sind sehr unterschiedlich	90
5.4.	Einige HPV11-spezifischen Peptide reagieren im Phagenkontext mit anderen Papillomavirus-Typen kreuz	92
5.5.	Die Bindung von VLPs an Zellen kann durch einige der HPV11-spezifischen Phagenklone reduziert werden	94
5.6.	Die HPV11-spezifischen Peptide haben keinen Einfluß auf die Bindung von HPV11-VLPs an K562-Zellen	96
5.7.	Weitere experimentelle Möglichkeiten für die Untersuchung der HPV11-spezifischen Peptide hinsichtlich neutralisierender Eigenschaften	98
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>IX</b>
A.	Literaturverzeichnis	IX
B.	Abkürzungen	XXI
C.	Englische Fachbegriffe	XXV



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Vielfalt der Papillomaviren und Humanpathogenese

Papillomaviren infizieren viele Wirbeltier-, Vogel- und Amphibien-Spezies (*Sundberg, 1987*), sind aber strikt Wirts- und gewebsspezifisch (*Rowson & Mahy, 1967*). Alleine von humanen Papillomaviren (HPV) sind bereits 86 verschiedene Typen bekannt, 120 mögliche neue Typen sind teilweise charakterisiert (*zur Hausen, 2000*). Sie bilden inzwischen die eigene Virusfamilie der Papillomaviridae (*Van Regenmortel, 2001*). Die Klassifizierung erfolgt anhand des Genoms. Direkte Sequenz-Vergleiche der Leseraster von L1- und E6-Genen und der URR (*Abschnitt 1.2*) definieren einen neuen Papillomavirus-Typ, wenn diese Sequenzen weniger als 90% Homologie zu bekannten Typen aufweisen. Beträgt die Homologie zwischen 90-98% handelt es sich um einen Subtyp, bei einer Homologie von über 98% wird der Virus als Variante eines bekannten Typs bezeichnet (*Tyring, 2000*).

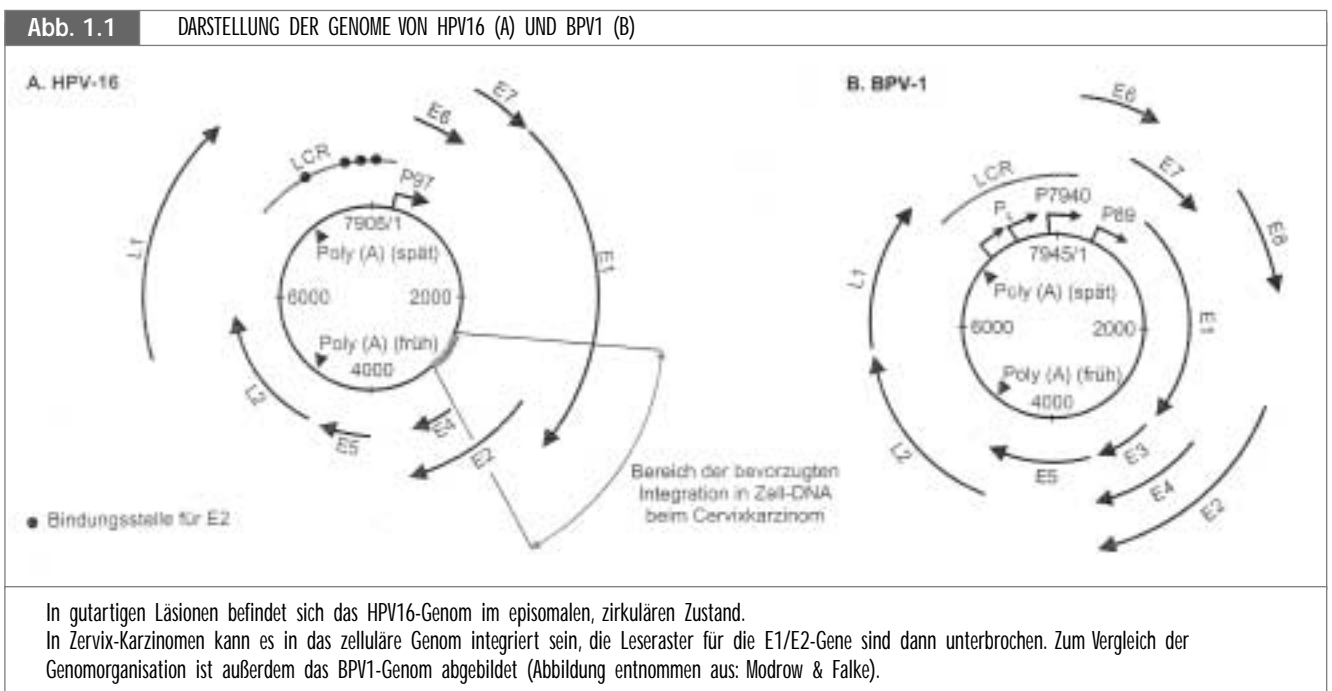
Alle bisher identifizierten humanen Papillomaviren sind strikt epitheliotrop, sie infizieren ausschließlich Haut und Schleimhäute des Menschen. Man unterscheidet zwischen kutanen und mukosotropen HPV-Typen. In der Gruppe der kutanen HPV-Typen findet man z.B. den Erreger der plantaren Fußwarze (HPV1) oder der multiplen Warzen, die vorwiegend an den Händen vorkommen (HPV2 und 4). Mindestens 20 verschiedene kutane HPV-Typen sind ausschließlich mit der seltenen, erblichen Krankheit Epidermodysplasia verruciformis (EV) assoziiert. Hier resultieren Infektionen mit den HPV-Typen 5 und 8 häufig in Krebs, wenn die Läsionen zusätzlich UV-Strahlung ausgesetzt wurden (*Pfister, 1992*).

Mukosotrope HPV-Typen infizieren die Schleimhäute der Atemwege und des Genitalbereichs. Die mukosotropen HPV-Typen, die durch sexuelle Übertragung den Genitalbereich infizieren, werden üblicherweise in „high-risk“ oder „low-risk“ HPV-Typen unterteilt, je nach der Häufigkeit mit der sie in Tumoren, insbesondere des Gebärmutterhalses (*Zervix*) vorkommen. Infektion mit einem high-risk HPV-Typ resultiert dabei nicht zwangsläufig in der Entwicklung eines bösartigen Tumors, es handelt sich vielmehr um ein seltenes Ereignis das von zusätzlichen, onkogenen Faktoren abhängt. Die meisten zervikalen Dysplasien bilden sich von selbst wieder zurück (*Nasiell et al, 1986*). Dennoch ist das Zervixkarzinom die weltweit dritthäufigste Tumorart bei Frauen (*Ponten et al, 1995*). Die high-risk Typen HPV16 und 18 sind häufig mit HSIL (*high grade squamous intraepithelial lesion*) und Karzinomen der Zervix, Anus, Penis und Vulva verbunden. Zusammen mit weiteren high-risk Typen sind sie an der Induktion von mindesten 90% aller Zervixkarzinome (*zur Hausen, 1996*) beteiligt, wobei sensitivere Detektionsmethoden die Mutmassung erlauben, dass 100% der Zervixkarzinome virus-assoziiert sind (*Walboomers et al, 1999*).

Die HPV-Typen 6 und -11, sowie -16 und -18 stellen die Prototypen für die low- bzw. high-risk Klassifizierung von Papillomaviren dar. HPV6/11 findet man in über 90% aller Condylome (*Condyloma acuminata; Feigwarzen*) und in sog. LSILs (*low grade squamos intraepithelial lesions*), aber äußerst selten in Tumoren. HPV6/11 Infektionen stellen dennoch eine hohe Belastung für die Patienten dar. Nach chirurgischer Entfernung der Warzen bilden sich rasch neue aus. Besondere Bedeutung kommt in diesem Sinne HPV6/11 Infektionen des Respirationstraktes zu.

Die wiederkehrende, laryngeale Papillomatose (*recurrent respiratory papillomatosis; RRP*) kann durch multiples Auftreten von Warzen zu lebensbedrohender Atemnot führen. Entfernung der Warzen resultiert oftmals in Ausbreitung der Infektion (*Übersicht in: Shah & Howley, 1996*). Die Wiederkehr der Infektion resultiert zum Einen aus latent infizierten scheinbar gesunden Zellen (*Steinberg et al, 1983*), die Ausbreitung der Papillome in Respirations- und Genitaltrakt ist zum Anderen auf Infektion gesunder Zellen durch freigesetzte Virionen zurückzuführen. Besonders schlimme Ausmaße nimmt RRP bei Kindern an. Die Infektion erfolgt während der Geburt und die Krankheit ist bei den meisten Kindern noch vor dem 5. Lebensjahr ausgeprägt Hier können die Infektionen in äußerst seltenen Fällen zu Krebs führen (*Giullou et al, 1991*).

## 1.2. Die Genome von Papillomaviren sind sehr einheitlich organisiert

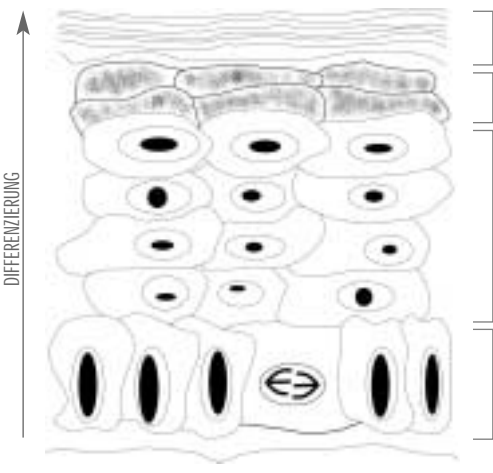


Das Genom von Papillomaviren hat eine Größe von ca. 8kB und ist im Virion mit zellulären Histonen assoziiert (*Pfister et al, 1978*). Die schematische Darstellung des HPV16-Genoms (*Abb. 1.1.*) ist in seiner Organisation auf andere PV-Viren übertragbar, allerdings variiert die Länge der einzelnen Leseraster sowie die Positionen wichtiger Promotoren. Nur einer der beiden DNA-Stränge, der für 7-8 frühe und 2 späte Gene codiert, wird transkribiert. Dazwischen liegt eine Region von ca. 1kB Länge, die man als URR (*upstream regulating region*) oder LCR (*long control region*) bezeichnet. In der URR befinden sich der ori für die Replikation des viralen Genoms und die Promotoren für die Expression der viralen Transkripte.

Der produktive Infektionszyklus aller HPVs ist eng an den Differenzierungsstatus des epithelialen Gewebes gebunden (*Abb. 1.2*) Die Infektion erfolgt über Verletzungen des Hautgewebes. Dabei werden Zellen des Stratum basale infiziert. Dort etabliert sich das Virus-Genom extrachromosomal im Nukleus, mit ca. 50-100 Kopien pro Zelle (*Dürst et al, 1985*). Wenn sich die Basalzellen teilen,

wird die virale DNA auf die beiden Tochterzellen verteilt. Eine der beiden Tochterzellen wird normalerweise keine weitere Mitose durchlaufen und von Stratum basale in das Stratum spinosum wandern, wo die Differenzierung der Keratinozyten beginnt. Die andere Tochterzelle verbleibt im Stratum basale und behält so einen „Vorrat“ an viralen Genomen (*Persistenz*). Mit der Ausdifferenzierung der Zelle beginnt im Stratum granulosum die verstärkte Replikation des Virus-Genoms, die Synthese der viralen Kapsidproteine und die Zusammenlagerung des Viruskapsids (*Stubenrauch et al, 1999*). Die Virionen werden von abschilfernden Zellen des Stratum corneum freigesetzt. Wenn Zellen des Epithels mit der Differenzierung beginnen, teilen sie sich nicht mehr und der Nukleus wird degadiert. Da die Replikation von Papillomaviren von Wirtszell-Enzymen abhängig ist, ist es für das Virus folglich notwendig, die Zelle in einem teilungsfähigen Stadium zu halten (*Abb. 1.2*).

**Abb. 1.2** DIFFERENZIERUNGSSTADIEN DES EPITHELS UND DAMIT VERBUNDENER PRODUKTIVER INFEKTIONSZYKLUS VON HUMANEN PAPILLOMAVIREN

		NORMALE ZELLE	HPV-INIFZIERTE ZELLE	
↑ DIFFERENZIERUNG		stratum corneum	Keratin gefüllte, tote Hautzellen	Virus-Freisetzung
	stratum granulosum	Akkumulation von Kerato-Hyalin-Granulat	Virale Kapsid-Synthese	
	stratum spinosum	Beginn der Differenzierung, Synthese von hochmolekularen Keratinen	Aktivierung später viraler Promotoren, Amplifikation viraler Genome	
	stratum basale	DNA-Synthese und Zellteilung, Stammzellen	Infektion von Stammzellen, Etablierung als extrachromosomales Element in hoher Kopienzahl, Expression früher Virus-Gene, Stimulierung der Zellteilung	
		Übernommen aus Stubenrauch et al, 1999.		

### 1.3. Die frühen Gene regulieren die Virusvermehrung in der Wirtszelle

Nach der Infektion werden zunächst die Proteine **E1** und **E2** exprimiert, sie spielen v.a. beim produktiven Infektionszyklus eine Rolle. **E1** ist ein Phosphoprotein mit einer Größe von 70-80 kDa, das für die Initiation der Replikation erforderlich ist und hat eine Helikase sowie ATPase Aktivität (*DelVecchio et al, 1992; Chiang et al, 1992*). E1 bindet zunächst schwach an den viralen ori, diese Bindung wird durch Interaktion mit E2 verstärkt, welches mit hoher Affinität an den ori bindet (*Mohr et al, 1990; Frattini et al, 1994*). E2 wird dann wieder freigesetzt und E1 initiiert mit Hilfe der zelleigenen DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase die Replikation des Virus-Genoms (*Park et al, 1994; Masterson et al, 1998*).

**E2** besteht aus 3 funktionellen Domänen und reguliert die virale Transkription. Die N-terminale Domäne fungiert als Transkriptionsaktivator (*Bouvard et al, 1994*), die C-terminalen 90 AS beinhalten die Dimerisierungsdomäne sowie die DNA-Bindedomäne, an die E2 als Dimer bindet. Die dazwischen liegende Region bindet an palindromische Promotor-Sequenzen in der URR und

reprimiert dadurch die Transkription der E6- und E7-Gene (*Cripe et al, 1987; Bernard et al, 1989; Romanczuk et al, 1992*). Im produktiven Viruszyklus wird so wahrscheinlich von der Expression der frühen auf die Expression der späten Gene umgeschaltet.

In HPV-assoziierten Karzinomen ist das HPV-Genom meistens in das Wirtsgenom integriert, die Öffnung des zirkulären Genoms erfolgt bevorzugt im E1/E2-Leseraster, das dabei oftmals unterbrochen wird. Folglich wird die Expression von E6 und E7 nicht mehr reprimiert (*Dürst et al, 1985; Cullen et al, 1991*). Beide Proteine werden konstitutiv exprimiert (*Schwarz et al, 1985*) und greifen über mehrere Wechselwirkungen in den Zellzyklus ein.

Es ist weitaus mehr über die Rolle der **E6** und **E7**-Genprodukte von high-risk HPV-Typen bei der Transformation bekannt, als über ihre eigentliche Funktion im produktiven Infektionszyklus. Vereinfacht gesagt bewirkt die konzertierte Interaktion von E6/E7 mit zellulären Proteinen die kontinuierliche Proliferation der Wirtszelle durch Stimulation des Zellzyklus. Dabei werden wichtige Kontrollmechanismen der Zelle außer Funktion gesetzt (*DNA-Reparatur, Apoptose*). Die wichtigsten, bekannten Interaktionen von E6 und E7 sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst (*Übersicht in: zur Hausen, 2000*).

Tabelle 1.1a WECHSELWIRKUNGEN VON E6 MIT ZELLULÄREN PROTEINEN			
Zell-Protein	Konsequenz der Interaktion		Referenz
E6-AP vermittelt Ubiquitinierung von p53	E6-bedingte p53 Degradation	Chromosomale Instabilität, Blockierung p53-vermittelter Apoptose	Scheffner et al, 1990 Werness et al, 1990
	E6 Bindung behindert Degradation der Blk Tyrosin Kinase	Stimulation der Mitose	Oda et al, 1999
Telomerase	Aktivierung	Immortalisierung (?)	Klingelhutz et al, 1996
Bak	Interaktion mit E6	Blockierung Bak-vermittelter Apoptose	Thomas et al, 1998; 1999

Tabelle 1.1b WECHSELWIRKUNGEN VON E7 MIT ZELLULÄREN PROTEINEN			
Zell-Protein	Konsequenz der Interaktion		Referenz
pRB-Familie	Inaktivierung und Freisetzung des Transkriptionsaktivators E2F	Stimulation der Mitose	Dyson et al, 1989
Cykline A&E	Aktivierung der Kinaseaktivität	Stimulation der Mitose	Arroyo et al, 1993; Zerfass et al, 1995
Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren p21 <sup>CIP1</sup> & p27 <sup>KIP1</sup>	Inaktivierung	Cyclin-abhängige Kinasen bleiben aktiv Stimulation der Mitose	p21: Funk et al; 1997 Jones et al, 1997 p27: Zerfass-Thome et al, 1996

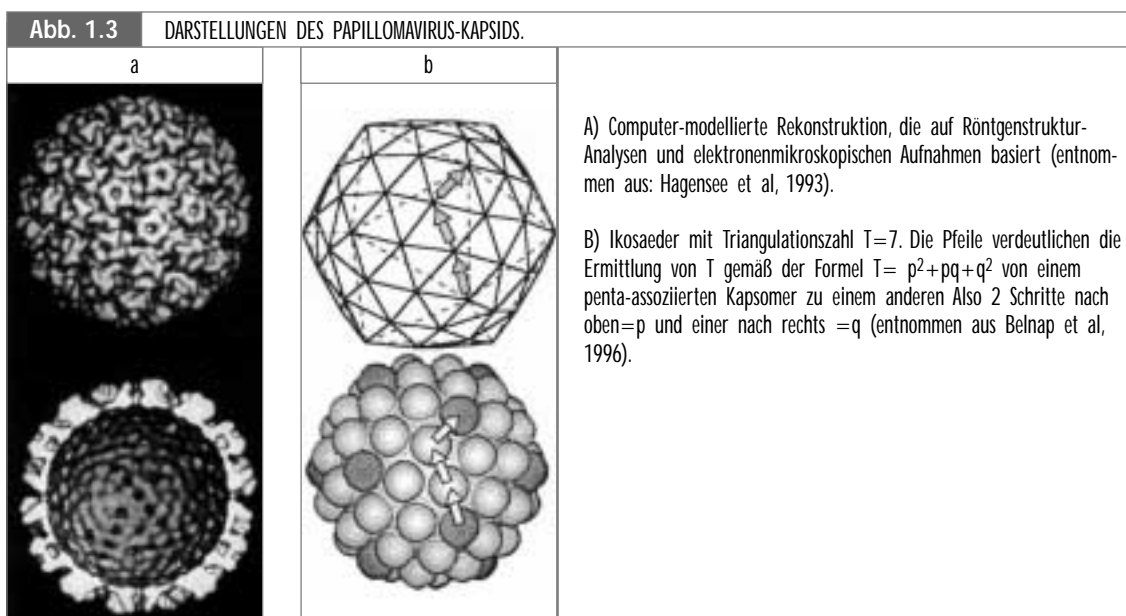
**E5** gilt bei bovinen Papillomaviren als das virale Protein mit dem höchsten onkogenen Potential (*Burkhardt et al, 1986*). Das E5-Protein von BPV1 ist in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren (*Martin et al, 1989*). Es ist allerdings keine virus-bedingte Krebsart bei Rindern bekannt. Das hydrophobe Transmembranprotein kommt v.a. im Golgi-Apparat vor, die Zellproliferation ist auf Wechselwirkungen von E5 mit zellulären Wachstumsfaktor-Rezeptoren zurückzuführen (*Cohen et al, 1993*).

Die Rolle von **E5** bei den natürlichen Infektionen, insbesondere mit humanen PV-Typen, ist bisher unklar, obwohl auch dieses Protein in den zellulären Stoffwechsel eingreift, beispielsweise beeinflusst es durch diverse Interaktionen die Aktivierung membran-assoziiertes Proteinkinasen (*Crusius et al, 1997*).

**E4** ist trotz gegenteiliger Bezeichnung ein spätes Protein, im produktiven Infektionszyklus kann es in großen Mengen gemeinsam mit L1 nachgewiesen werden (*Doorbar et al, 1986; Crum et al, 1990*). Es akkumuliert im Cytoplasma und erleichtert wahrscheinlich die Freisetzung von Viruspartikeln durch Interaktion mit dem Cytokeratinskelett (*Roberts et al, 1993*).

#### 1.4. Papillomaviren haben ein ikosaedrisches Kapsid

Die Virushülle besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 52-55nm, das aus dem Hauptstrukturprotein L1 und dem Strukturprotein L2 aufgebaut ist. Das molare Verhältnis von L1:L2 wird auf 1:30 geschätzt (*Hagensee et al, 1993; Kirnbauer et al, 1993*). L2 ist für den Aufbau des Kapsids nicht erforderlich (*vgl. Abschnitt 1.5.*), hat aber wichtige Aufgaben bei Bindung und Enkapsidierung des Virus-Genoms (*Zhou et al, 1994, Zhao et al 1998*) und ist für die Internalisierung des Virus beim Infektionsprozess verantwortlich (*Kanda et al, 2001*). Ein Kapsid wird aus 72 Pentameren von L1, den Kapsomeren aufgebaut, beinhaltet also 360 L1-Moleküle. Man unterscheidet 60 hexavalente und 12 pentavalente Kapsomere, d.h. sie sind entweder von 6 oder 5 Nachbarn umgeben. Pentavalente Kapsomere sind notwendig, um das Kapsid in die ikosaedrische Form zu bringen. Der Abstand zwischen 2 pentavalenten Kapsomeren definiert die Triangulationszahl. Bei dem Papillomavirus-Kapsid beträgt sie  $T=7$ , wie aus der Abb. 1.3b hervorgeht (*Baker et al, 1991*). Das Kapsid wird durch interkapsomere Disulfidbrücken (*Sapp et al, 1995, 1998*) und Kalzium-Ionen (*Li et al, 1998, Painsil et al, 1998*) stabilisiert. Die 12 L2-Moleküle befinden sich möglicherweise inmitten der pentavalenten Kapsomere (*Trus et al 1997*), wobei nur die N-terminalen Aminosäuren 63-123 an der Kapsidoberfläche zugänglich sind (*Liu et al, 1997*).



## 1.5. Virus-ähnliche Partikel (VLPs) erleichtern die Erforschung von Papillomaviren

Es ist nicht möglich humane Papillomaviren in einfachen experimentellen Systemen zu produzieren und den vollständigen viralen Vermehrungszyklus zu untersuchen, da Papillomaviren nur bei Differenzierung der Keratinozyten in den produktiven Infektionszyklus übergehen. Erst die seit kurzem standardisierten Techniken der organotypischen Zellkultur erlauben eine Virusvermehrung, zumindest im analytischen Maßstab (*Meyers et al, 1992*). Damit beschränkten sich nahezu alle Studien, die auf Interaktion von Papillomaviren mit Zellen und Internalisierung des Virus abzielten sowie die Charakterisierung immunogener Eigenschaften von Papillomavirus-Kapsiden auf BPV-Virionen, die in ausreichenden Mengen aus Rinderpapillomen extrahiert werden können.

Die Ausbildung virus-ähnlicher Partikel durch Expression der Strukturproteine L1 und L2 in eukaryontischen Expressionssystemen wurde erstmalig 1991 (*Zhou et al, 1991*) gezeigt. Diese VLPs, die sowohl elektronenmikroskopisch als auch aufgrund ihrer Antigen-Determinanten nicht von nativen Virionen zu unterscheiden sind, können auch durch alleinige Expression von L1 aufgebaut werden (*Kirnbauer et al, 1992, 1993; Zhou et al, 1991, 1993; Rose et al, 1993 u.v.m.*).

Mit der Entwicklung von VLPs war die Basis für Entwicklung von prophylaktischen Impfstoffen gegeben (*Abschnitt 1.7*). Außerdem repräsentieren die VLPs ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der frühen Schritte einer Infektion. Eine Weiterentwicklung der VLPs stellen HPV-Pseudovirionen dar. Überexpression der Strukturproteine von HPV16 in Anwesenheit von zirkulären BPV-Genomen führt zur Enkapsidierung der Genome unter Ausbildung von Pseudovirionen (*Roden et al, 1996*). Auch DNA nicht verwandter Spender wird enkapsidiert, wenn die Größe des zirkulären Plasmids die Größe des HPV-Genoms nicht wesentlich überschreitet (*Touze & Coursaget, 1998*). Auf diesem Weg wurden einige Reportergene, welche die Internalisierung des Virus visualisieren können, in HPV-Kapside verpackt (*Unckell et al, 1997; Stauffer et al, 1998; Rossi et al, 2000*). Sie liefern wichtige Informationen über neutralisierende Antikörper (*Roden et al, 1996; Unckell et al, 1997; White et al, 1998*) und sind daher für die Evaluierung von HPV-Impfstoffen in klinischen Studien bedeutsam.

## 1.6. Das Kapsid präsentiert zahlreiche lineare und diskontinuierliche Epitope, die Antikörper induzieren können

Neutralisierende Antikörper liefern wichtige Informationen über die Oberfläche der Viruspartikel und helfen daher zum Verständnis der Vorgänge, die zu einer Infektion führen sowie bei der Optimierung von Impfstoffen. Zahlreiche Arbeiten haben sich daher mit der Charakterisierung von Epitopen befaßt, die von Antikörpern erkannt werden. Man unterscheidet lineare und diskontinuierliche Epitope (*Konformationsepitope*). Lineare Epitope werden von einer kontinuierlichen Abfolge von Aminosäuren innerhalb des Strukturproteins definiert, die auf der Oberfläche des

Viruskapsids präsentiert werden. Antikörper, die gegen solche Epitope gerichtet sind, erkennen auch die entsprechenden Peptidsequenzen und sind daher leicht zu lokalisieren (*für L1: Zhou et al, 1991; Heino et al 1995; Christensen et al 1996a; Kulski et al, 1998*). Diskontinuierliche Epitope werden über die Tertiär- und Quartärstrukturen innerhalb eines Viruskapsids ausgebildet. Kritische Aminosäure-Reste können sich daher innerhalb der AS-Primärsequenz weit entfernt bzw. auf unterschiedlichen L1-Molekülen befinden. Im Wesentlichen haben die beiden Epitop-Typen folgende Eigenschaften:

Lineare Epitope induzieren Antikörper, die oftmals mit VLPs anderer PV-Typen kreuzreagieren (*Heino et al, 1995; Christensen et al, 1996a*), dabei bleibt unklar, ob solche Antikörper eine Infektion auch neutralisieren können.

Antikörper die gegen diskontinuierliche Epitope gerichtet sind, sind fast immer PV-Typ spezifisch (*White et al, 1999*) und immunodominant, d.h. viele Antikörper gegen lineare Epitope werden von intakten Kapsid gar nicht induziert. Alle als neutralisierend definierten Antikörper erkennen diskontinuierliche Epitope und sind PV-Typ spezifisch (*Christensen et al, 1996b*).

Für L2 sind hingegen Antikörper gegen lineare Kapsid epitope bekannt, die neutralisierende Eigenschaften haben und kreuzreaktiv sind (*Kawana et al, 1999; Roden et al, 2000*).

## 1.7. VLPs liefern die Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen

Genitale HPV-Infektionen bewirken die weltweit am häufigsten sexuell übertragene Krankheit. Schätzungsweise 50% aller sexuell aktiven Menschen sind infiziert. Infektionen mit den sog. high-risk HPV-Typen führen in seltenen Fällen und nach langer Zeit zur Entstehung von Gebärmutterhalskrebs. Im Rahmen eines in Industrieländern etablierten Früherkennungsprogramms (*zytologische Untersuchung nach Papanicolaou*), können der Tumor bzw. seine Vorstufen rechtzeitig erkannt und behandelt werden. Vor allem in Entwicklungsländern, wo eine solche Prävention flächendeckend, durch routinemäßig durchgeführte PAP-Abstriche nicht möglich ist, würden prophylaktische Impfungen das Infektions- und Krebsrisiko deutlich mindern. Die derzeit entwickelten HPV-Impfstoffe, von denen einige bereits in klinischen Studien der Phase I/II getestet werden, erfüllen 2 Kriterien:

- 1) Stimulierung der humoralen Immunantwort durch Induktion neutralisierender Antikörper (*prophylaktische Impfung*).
- 2) Stimulierung der zellulären Immunantwort durch Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (*therapeutische Impfung*).

Kombination beider Ziele führt zu den sog. chimären Impfstoffen. Virus-ähnliche Partikel von Papillomaviren präsentieren die Antigen determinanten, die nötig sind, um neutralisierende Antikörper zu induzieren. Untersuchungen mit Tiermodellen, wie BPV und CRPV haben

demonstriert, dass die VLP-Immunisierung gegen Neuinfektionen schützt (*Breitbart et al, 1995; Christensen et al, 1996*). Immunisierung mit VLPs die nur aus dem Hauptstrukturprotein L1 bestehen, bieten dabei einen ausreichenden prophylaktischen Schutz gegen PV-Infektionen und dadurch bedingte Tumoren (*Breitbart et al, 1995 ; Suzich et al, 1995*). Solche Beobachtungen erlaubten die Schlußfolgerung, dass L1-VLPs für die Bestimmung inhibierender Peptide geeignet wären (*siehe Zielsetzung*). Auch Immunisierung mit Kapsomeren induziert neutralisierende Antikörper die zu einer protektiven Immunantwort führen (*Rose et al, 1998; Fligge et al, 2001; Yuan et al, 2001*).

Um virus-infizierte Zellen und Tumore gezielt zu erkennen und abzutöten, ist eine zelluläre Immunantwort erforderlich. Obwohl auch VLPs zytotoxische T-Zell Epitope präsentieren (*Dupuy et al, 1999; Rudolf et al, 1999*), ist die Eliminierung infizierter Zellen nicht möglich, da die Strukturproteine in basalen, infizierten Keratinozyten oder Tumorzellen nicht exprimiert werden (*vgl. produktiver Infektionszyklus*). Ziel einer Vakzinierung mit therapeutischem Effekt sind die frühe Gene, insbesondere E6 und E7, da sie in Tumoren die einzigen Virusprodukte sind, die konstitutiv exprimiert werden. Im experimentellen Mausmodell konnte die Eliminierung von infizierten Zellen und auch Tumorregression gezeigt werden (*Peng et al, 1998; Schäfer et al, 1999*). In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten Impfstoff-Entwicklungen zusammengefaßt. Impfung mit einem bestimmten HPV-Typ schützt nur gegen diesen Typ (*monovalenter Impfstoff; Christensen et al, 1996*). Ein umfassender Impfstoff sollte daher zumindest die Genital-PV-Typen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 beinhalten, die gemeinsam für mind. 90% aller virus-induzierter Cervix-Karzinome verantwortlich sind sowie die low-risk Typen HPV6 und 11, um einen umfassenden Schutz gegen PV-Infektionen zu erreichen. Letztere PV-Typen sind für 90% der gutartigen Condylome verantwortlich, die zu einer ernsthaften Belastung Betroffener führen können. Die Entwicklung polyvalenter Impfstoffe ist das nächste wichtige Ziel der Impfstoffentwicklung (*Breitbart et al, 1999*).

Impfstoff	Art des Immunsstimulanz	Effekt im experimentellen Mausmodell	Referenzen
VLPs	Leere PV-Kapside, Strukturproteine L1 und L2	Humorale Antwort: Induktion neutralisierender Antikörper gg. L1/L2	Kirnbauer et al, 1992; Suzich et al, 1995; Rose et al, 1998; Brown et al, 2001
Chimäre VLPs	Fusion von Strukturproteinen und „frühen Proteinfragmenten“	Humorale Immunantwort (L1/L2); zelluläre, zytotoxische Immunantwort gg. E6/E7	L1-E7: Müller et al, 1997; Greenstone et al, 1998; Peng et al, 1998; Schäfer et al, 1999
Pseudovirionen	DNA: verpackt in VLPs		Shi et al, 2001
Synthetische Peptide	Peptide, die T-Zellepitope repräsentieren; v.a. gegen E6/E7	Zelluläre, zytotoxische (CTL)-Immunantwort gg. E7	Ressing et al, 1996; van Driel et al, 1999; Castellanos et al, 2001
DNA-Vakzine	L1 und E7	Zelluläre, zytotoxische (CTL)-Immunantwort gg. E7 und Humorale Immunantwort (L1/L2)	Smahel et al, 2001; Osen et al, 2001; Cheng et al, 2001; Leder et al, 2001



## 1.8. Die initiale Bindung von Papillomaviren an Zellen erfolgt über einen weit verbreiteten, proteinogenen Rezeptor

Alle Studien zur Bindung von VLPs an Zellen kamen zu der Schlußfolgerung, dass der erste Kontakt von Papillomaviren und Wirtszellen über ein hoch konserviertes Zelloberflächen-Molekül erfolgen muß (Roden *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1995; Volpers *et al.*, 1995). Die Interaktion kann durch typenspezifische Antisera, aber auch durch heterologe VLPs, inhibiert werden. VLPs verschiedener Papillomavirus-Typen binden an nahezu jede getestete Zelllinie und konkurrieren um vorhandene Rezeptoren (Roden *et al.*, 1994). Die restriktive Wirts- und Gewebespezifität von Papillomaviren wird daher nicht von der Virus-Rezeptor-Bindung definiert. Die VLP-Bindung erreicht eine Sättigung, die auf ca.  $1-2 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle schließen läßt (Volpers *et al.* 1995, Qi *et al.* 1996). Da der Rezeptor trypsin-sensitiv ist, muß es sich um ein Protein oder Glykoprotein handeln (Roden *et al.*, 1995; Volpers *et al.*, 1995). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden potentielle Rezeptor-Kandidaten identifiziert. Der Vergleich von  $^{35}\text{S}$  markierten VLP-Zellextrakt-Immunopräzipitaten HPV16-VLP-bindungspositiver (CV1, HaCaT) und negativer (DG75) Zellen ermittelte  $\alpha 6$ -Integrin als möglichen Rezeptor (Evander *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2001). Da dieses Integrin speziell von Keratinozyten während der Wundheilung exprimiert wird, scheint eine Funktion als PV-Rezeptor logisch, jedoch beziehen sich bisherige Studien nur auf die Bindung von VLPs an  $\alpha 6$ -Integrin, eine Internalisierung konnte noch nicht demonstriert werden. Zudem existieren gegenteilige Befunde, die eine VLP- $\alpha 6$ -Integrin Interaktion mit BPV und HPV33, aber auch mit HPV16 nicht bestätigen konnten (Joyce *et al.* 1999; Sibbet *et al.* 2000; Giroglou *et al.* 2001; Dr. M.Müller, K.Parsche, pers. Kommunikation). Mit VLPs des HPV11-L1 Proteins wurde Heparin-Sulfat als weiterer Rezeptor-Kandidat identifiziert (Joyce *et al.*, 1999). Dabei soll ein basischer Bereich am C-Terminus von L1 für die Interaktion verantwortlich sein. Diese Interaktion konnte für HPV16, -33 und -39 VLPs bestätigt werden (Giroglou *et al.* 2001), wobei der L1-C-Terminus keine Rolle spielte. Studien mit HPV33-Pseudovirionen ergaben zudem, dass die initiale, heparinase-sensitive Bindung in eine resistente Bindung übergeht. Diese Beobachtung erlaubt die Hypothese, dass die erste Bindung von Papillomaviren über ein weitverbreitetes, konserviertes Zelloberflächenmolekül erfolgt, während die eigentliche Infektion über einen bisher nicht identifizierten Sekundärrezeptor eingeleitet wird. Zusätzliche Studien sind nötig, um die initiale Interaktion von Papillomaviren mit ihren Wirtszellen zu verstehen.

Die Internalisierung von Papillomaviren erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (Müller *et al.* 1995, Volpers *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1995). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen virale Kapside in Endosomen, die mit Lysosomen zu Phagosomen verschmelzen. Im Nukleus sowie an der perinuklearen Membran sind allerdings keine Virionen sichtbar. Es ist wahrscheinlich, dass die Freisetzung des viralen Genoms im Phagosom erfolgt, von wo aus die Hüllproteine zur Degradation in den Golgi-Apparat transportiert werden.

## 1.9. Zielsetzung dieser Arbeit

Es sollten Peptide ermittelt werden, die spezifisch mit dem Hauptstrukturprotein L1 bzw. dem Kapsid interagieren. Ziel war die Identifizierung von Peptiden, die das Virus-Kapsid an dem Epitop binden, welches für die Bindung des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle verantwortlich ist, und dadurch die Virus-Rezeptorinteraktion blockieren können. Solche inhibitorischen Peptide können als Leitstruktur für die Entwicklung eines Therapeutikums genutzt werden. Ein Medikament das die Fähigkeit besitzt, die Infektion von Zellen zu blockieren, ist vor allem bei der Therapie von HPV6 und HPV11 bedingten Infektionen von Interesse. Insbesondere das Krankheitsbild der wiederkehrenden, laryngealen Papillomatose („*recurrent respiratory papillomatosis*“) stellt eine ernsthafte, bisweilen sogar lebensbedrohliche Belastung für die Betroffenen dar. Wie auch in Abschnitt 1.1 beschrieben, resultiert die Infektion des Respirationstraktes in der Ausbildung von zahlreichen Warzen. Eine Behandlung dieser multiplen Papillomatosen ist nur durch chirurgische Entfernung möglich. Dabei werden infektiöse Viren freigesetzt die benachbarte, gesunde Zellen infizieren, so dass neue Warzen entstehen. Im Extremfall müssen diese Warzen alle zwei Wochen entfernt werden. Ein Medikament das die Bindung des Virus an gesunde Zellen verhindert, könnte zeitgleich mit der chirurgischen Entfernung der Warzen appliziert, eine Neuinfektion verhindern. Um inhibitorisch aktive Peptide zu identifizieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet:

### **1) Das Screening einer Peptidbibliothek mit dem Hefe Two-Hybrid-System:**

Im Rahmen dieser Dissertation sollte das Hauptstrukturprotein L1 des humanen Papillomavirus Typ16 (*HPV16*) und anschließend auch von Typ11, mit einer 16mer Random-Peptidbibliothek durchsucht werden. HPV16 wurde zunächst gewählt, da der Virus-Typ aufgrund seines häufigen Vorkommens in Zervix-Karzinomen besonders gut erforscht ist. Es wurden vor allem Peptide erwartet, die mit linearen Neutralisierungsepitopen auf dem Papillomavirus-Kapsid interagieren, weil bei diesem System ein L1-Monomer als Zielprotein vorlag (*siehe Abschnitt 1.6*). Theoretisch war durch spezifische Peptide zudem die Identifizierung von weiteren Interaktionen möglich, die L1 während des viralen Infektionszyklus eingeht. Beispielsweise die Charakterisierung von L1-L1 und L1-L2 Interaktionen beim Aufbau des Virus-Kapsids, die Identifizierung des Wirtszell-Rezeptors oder die Identifizierung von endosomalen Proteinen, die möglicherweise am „Uncoating“ des Viruspartikels beteiligt sind.

### **2) Das Screening einer Phagen-präsentierten Peptidbibliothek (*phage display screening*).**

Dazu wurden virus-ähnliche Partikel verwendet, die aus dem Hauptstrukturprotein L1 des HPV-Typs 11 aufgebaut waren. Es wurde eine kommerziell erhältliche Peptidbibliothek ausgewählt, die aus zyklischen 7mer Peptiden bestand. Zyklische Peptide sind vor allem für die Identifizierung von Peptiden geeignet, die an Konformationsepitope binden. Die meisten bekannten neutralisierenden Antikörper sind gegen solche Epitope des Papillomavirus-Kapsids gerichtet. Daher war die Identifizierung eines Peptids mit bindungsinhibitorischen Eigenschaften mit dieser Methode besonders wahrscheinlich.

**Folgende experimentelle Schritte waren vorgesehen:**

- Das Kapsidprotein L1 wurde zunächst für das Screening von Peptidbibliotheken vorbereitet. Für das Hefe Two-Hybrid-Screening wurde HPV16-L1 an die DNA-Bindedomäne eines GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Virus-ähnliche Partikel von HPV11-L1 wurden produziert und eingesetzt, um eine Phagen-präsentierte Peptidbibliothek hinsichtlich HPV11-spezifischer Peptide anzureichern.
- Nach Bestätigung der L1-Spezifität, wurden die erhaltenen Peptide durch Sequenzierung weitercharakterisiert. Interessante Peptide wurden dann im Auftrag synthetisiert.
- Um die inhibitorische Aktivität von Peptiden bzw. Phagen zu bestimmen, wurden geeignete experimentelle Ansätze für die Untersuchung der VLP-Wirtzell-Interaktion entwickelt.
- Bindungsinhibitorische Peptide sollten außerdem genutzt werden, um das für die Rezeptorbindung verantwortliche Epitop des Virus-Kapsids zu lokalisieren.

## 2. Material

### 2.1 Chemische Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
30% Acrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Hamburg
Agarose	FMC, Rockland, ME, USA
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
3-Aminotriazol	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Hamburg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
b-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
b-Cumarinsäure	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
dNTPs	AGS, Heidelberg
EDTA, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung, 37%	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	GERBU, Gaiberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Difco, Hamburg
Hefe-Pepton	Difco, Hamburg
Hefe-Stickstoffbase	Difco, Hamburg
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel de Haën, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt

Kalziumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Lachssperma-TrägerDNA	Sigma, Deisenhofen
Lithiumacetat	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haën, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumjodid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/CIA (1:1)	Roth, Karlsruhe
Polyethylen Glykol 4000, 8000	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Roche Diagnostics, Mannheim
Repel-Silan ES Plus-one	Pharmacia Biotech, Freiburg
RNase	Roche Diagnostics, Mannheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	GERBU, Gaiberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Thiamin	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylbenzidin (TMB)	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	GERBU, Gaiberg
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Sigma, Deisenhofen

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

0,22µm Hefepaarungsfilter, Typ G5	Millipore, Eschborn
0,025µm –Dialysefilter, Typ VS	Millipore, Eschborn
Einweg Handschuhe	Meditrade, Baxter, Thetford, UK
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Groningen, NL
96-well ELISA-Platten	Falcon, über Becton Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher&Schuell, Dassel
Filter-Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Frischhaltefolie, Melitta Toppits	Melitta, Minden

Glaskugeln zum Plattieren	Sigma, Deisenhofen
Glaskügelchen, säuregewaschen (425-600µm)	Sigma, Deisenhofen
Kryokonservierungsröhrchen, 2ml	Nalgene, Rochester, USA
Mikrotiterplatten	Nunc, Roskilde, DK
Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher&Schuell, Dassel
Parafilm	American National Can, Chicago, IL, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen, Ø20mm, Cellstar®	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen 94/16	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme, Eberbach
Plastikküvetten	Greiner, Frickenhausen
Plastikröhrchen mit Schraubverschluß 50ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Plastikröhrchen mit Schraubverschluß 15ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikspritzen und Kanülen	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
1,5ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak/NEN Life Sciences Prod., Köln
Röntgenfilme X-Omat Blue	Kodak/NEN Life Sciences Prod., Köln
Skalpell	Feather, PMF, Köln
Sterilfilter; 0,2µm; 0,45µm	MembraPure, Lörzweiler
Sterilfiltrationsapparatur, Bottletop-Filter	Nalgene, Rochester, USA
Whatman 3MM Papier	Schleicher&Schuell, Dassel
96-well Zellkulturplatten	NUNC, Roskilde, DK

## 2.3. Geräte

### 2.3.1. Zentrifugen

Kühlzentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Dupont, Bad Nauheim
Rotoren:	
SA-600 (Festwinkel)	
SLA-3000 (Festwinkel)	
Beckman XL 70 Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Rotoren:	
Ti70-Ausschwingrotor	
SW28-Festwinkelrotor	

## 2.3.2. Sonstige Geräte

Analysenwaage 2002 MP1	Sartorius, Göttingen
Agarosegel Fotographierapparat MP4	Polaroid, St. Albans, UK
Analytische HPLC-Anlage HP1050	Hewlett Packard,
Begasungsbrutschrank, Stericult 200	Labotect, Göttingen
Durchflußzytometer, FACSort®	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-3	Scotsman, Glasgow, Schottland
Elektroblot Apparatur, Semidry-Transfer Cell	Biorad, München
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Elektrophorese Kammern- Horizontal für Agarosegele	Renner, Heidelberg
Doppel-Elektrophorese Kammer- Vertikal MBT90EL 8x10cm Proteingele	über NeoLab Migge, Heidelberg
Doppel-Elektrophorese Kammer- Vertikal MBT70EL 10x15cm Proteingele	über NeoLab Migge, Heidelberg
Elektroporationsgerät, Gene Pulser®	Biorad, München
ELISA Lesegerät, Titertek Multiskan MKII	Labsystems, Turku, Finnland
-80°C-Kühlschrank	Labotect, Göttingen
Kolben mit Schikane, Bellco	über Dunn Labortechnik, Asbach
30°C Inkubator, Wärmeschrank allgemein	WTB Binder/Heraeus, Hanau
Laborwaage Basic	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Lyophylle, Vacuum Concentrator	Ikamag/Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer, heizbar	Janke/Kunkel, Stauffen
Massenspektrometer	LCQ, Egelsbach
Mikrowelle	Bosch, Labotect, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Migge, Heidelberg
Pipetboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Präparative HPLC-Anlage	Gilson/Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfen Gilson, 20-,200- und 1000µl	Gilson/Abimed, Langenfeld
Quarzglasküvetten QS1000 Hellma® über NeoLab Migge, Heidelberg	über NeoLab Migge, Heidelberg
Röntgenfilm Expositionskassetten	Kodak, Stuttgart
Sequenzgel-Elektrophoresekammer ADJ-2	Owl Scientific, USA
Spannungsgerät Pherostab 500	Fischer-Biotec über NeoLab-Migge, Heidelberg
Spannungsgerät Powersupply EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektral Photometer, U-1100	Hitachi, Tokyo, Japan
Sterile Werkbank, Bio Gard Hood	Labotect, Göttingen
Stickstofftank „Chronos“	Messer, Krefeld
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät, Sonifier B-12	Branson, Danbury, CT, USA
UV-Leuchttisch 254nm	K.Benda, Wiesloch
UV-Leuchttisch 366nm	Vetter, Wiesloch
Vakuum Geltrockner	Biorad, München
Vortex „Reax Top“	Heidolph, Kelheim
Wasserbad Thermomix U	Braun, Melsungen
Wippe Typ Rockomat	Tecnomara; Zürich, CH
1,5ml Tisch-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

## 2.4. Radiochemikalien

$\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)

AmershamPharmaciaBiotech, Braunschweig

## 2.5. Verwendete Kits

Quiagen Maxipräp Kit

Qiagen, Hilden

Jetsorb Gel Extraction Kit

Genomed, Bad Oeynhausen

T7 Sequencing Kit

AmershamPharmacia Biotech, Braunschweig

Ph.D.-C7C™ Phage Display Peptide Library Kit

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

## 2.6. Antikörper

### 2.6.1. Primärantikörper

$\alpha$  HPV11-Virion A3.2

Maus, monoklonal

über Dr. M. Müller, DKFZ  
(Christensen et al, 1991)

$\alpha$  HPV11-Virion B2

Maus, monoklonal

über Dr. M. Müller, DKFZ  
(Christensen et al, 1991)

$\alpha$  HPV11-Virion F1

Maus, monoklonal

über Dr. M. Müller, DKFZ  
(Christensen et al, 1991)

$\alpha$  HPV11-Virion G5

Maus, monoklonal

über Dr. M. Müller, DKFZ  
(Christensen et al, 1991)

$\alpha$  HPV11-Virion H3

Maus, monoklonal

über Dr. M. Müller, DKFZ  
(Christensen et al, 1991)

$\alpha$  HPV16-L1 CamVir1

Maus, monoklonal

Pharming, San Diego, CA, USA  
(McLean et al, 1990)

### 2.6.2. Sekundärantikörper

$\alpha$  Maus, IgG

HRP-konjugiert

Dianova, Hamburg

$\alpha$  Biotin, IgG

Avidin-konjugiert

Dianova, Hamburg

$\alpha$  Maus IgG Fab-Fragmen

FITC-konjugiert

Dianova, Hamburg

$\alpha$  M13, IgG

HRP-konjugiert

Pharmacia Biotech, Freiburg



## 2.7. Oligonukleotide für Sequenzierungen

Analysierte Sequenz	Sequenz des Primers	Orientierung	Ursprung der Primersequenz
N-Terminus HPV16-L1	5'-ttttgtattgtaggtttttt-3'	antisense	HPV16.L1
Inserts in pGAD.GH (Hefebibliothek)	5'- taccactacaatggatg-3'	sense	GAL4-AD
Phagen-Peptidbibliothek in M13	5'- gtagggattttgctaaacaa-3'	antisense	M13-pIII

## 2.8. Plasmide

pGBT9 (*Clontech, Heidelberg*):

5,5 kB, GAL4 (1-147)DNA-BD, TRP1 Tryptophan-Synthase, amp<sup>r</sup> Ampicillin-Resistenzgen, ADH1 Promotor und Terminationssequenz, Col E1 ori; 2 $\mu$  ori, MCS: EcoR I, Sma I, BamH I, Sal I und Pst I, Insertion des HPV16-L1 Gens über Eco RI und Hind III.

pGAD.GH (*Clontech, Heidelberg*):

7,9kB, GAL4 (768-881) AD, LEU2 Leucinsynthase, amp<sup>r</sup> Ampicillin-Resistenzgen, ADH1 Promotor und Terminationssequenz, Col E1 ori; 2 $\mu$  ori, MCS: Spe I, Bam HI, Sma I, Pst I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Cla I, Hinc III, Sal I, Acc I, Xho I, Apa I und Kpn I. Insertion der Random-Peptidbibliothek über Bam HI und Eco RI.

## 2.9. Peptide

Die HPV11-spezifischen Peptid-Sequenzen sind in Abbildung 4.9 aufgelistet. Die Synthesen wurden zunächst von der DKFZ-Peptidsynthese hergestellt. Präparative Aufreinigung und Zyklisierung der verunreinigten Peptide PD2, PD5, PD8 und PD11 wurden mit Hilfe der AG Ruppert, ZMBH durchgeführt.

Die Peptide PD1, 9, 11, 14, 18 und K wurden noch mal synthetisiert und zyklisiert von Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg.

Die Peptide PD2, 3, 4, 7, 8, 12, 13, 15, 16 und PD17 wurden noch mal synthetisiert und zyklisiert von der Firma Pfizer, Sandwich, UK geliefert.

## 2.10. Größen- und Konzentrationsstandards

$\lambda$ -Hind III Längen- und Konzentrationstandard für DNA	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Smart Ladder DNA-Längenstandard	Eurogentech, Seraing, Belgien
Protein-Größenstandard	Biorad, USA
BSA-Proteinkonzentrationsstandard [1 $\mu$ g/ml]	Sigma, Deisenhofen

## 2.11. Allgemeine Puffer

TE-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 8.0 0,1mM EDTA
PBS-Puffer	140mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
HS-Puffer	149mM NaCl 1mM HEPES 0,5mM KCl, pH 7.2

## 2.12. Biologische Materialien

### 2.12.1. Bakterienstämme

E.coli SURE	Präparation von Plasmid-DNA Genotyp: e14 (McrA)D ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC</i> ::TN 5 (Kan <sup>r</sup> ) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lac<sup>l</sup> ZΔM15 Tn 10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ] <sup>c</sup>
E.coli HB101	Präparation von LEU-Marker tragenden Hefepiasmiden pGAD.GH Genotyp: <i>SupE44 (ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS<sup>-</sup> (r<sup>-</sup>m<sup>-</sup>)</i>
E.coli ER2267	Vermehrung von M13 Bakteriophagen Genotyp: <i>F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lac<sup>l</sup> Δ(lacZ)M15 zff::mini-Tn10 (Kan<sup>r</sup>)/λ- e14- (McrA-) endA1 glnV44 thi-1 relA1? RfbD1? SpoT1? Δ(mcrC-mrr) 114::IS10 Δ(argF-lac)U169 recA1</i>

### 2.12.2. Hefestämme

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm PJ 69-4α (Matingtyp α)	Verwendung im Hefe Two-Hybrid System. Genotyp: -MATα <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i> (Philip James et al, 1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm PJ 696 (Matingtyp α)	Verwendung im Hefe Two-Hybrid System. Dieser Hefestamm geht aus PJ69-4a hervor. Genotyp: -MATα <i>ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i>

### 2.12.3. Eukarontische Zelllinien

#### Insektenzelllinien

Für die Amplifikation rekombinanter Baculovirusstocks wurden **Sf9-Zellen** (*Ovariales Gewebe von Spodoptera frugiperda*) verwendet.

Die Expression von VLPs erfolgte in **TN high five** Zellen (*von Trichoplusia ni*)

---

#### Säugetierzelllinien

Für VLP-Zellbindungsstudien wurden:

##### CV1-Zellen

Nieren-Fibroblasten der grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops* für den Festphasen VLP-Zellbindungsassay verwendet

##### K562-Zellen

humane Leukämie-Blutzelllinie; Lymphoblasten. Die Suspensionszellen wurden für die Analyse zellgebundener VLPs mittels Durchflußzytometrie verwendet

---

### 2.12.4. Bakulovirus-Stocks

#### zur Expression des Haupt-Strukturproteins L1 von Papillomaviren

Papillomavirus-Typ:

HPV6b

HPV11

HPV16

HPV18

BPV1

Erhalten von:

Prof. Dr. R.Kirnbauer, Universität Wien

Dr. M. Müller, DKFZ

Dr. M. Müller, DKFZ

T. Steinberg, DKFZ

Dr. M. Müller, DKFZ

## 2.13. Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Hefe Extrakt 5g NaCl ad 1l H <sub>2</sub> O bidest
LB-Agarplatten	1l LB-Medium 15g Bacto-Agar
SOC-Medium	20g Bacto-Trypton 5g Hefe Extrakt 0,5g NaCl 2,5mM KCl mit NaOH auf pH 7.0 einstellen ad 1l H <sub>2</sub> O bidest autoklavieren, anschließend Zugabe von 10mM MgCl <sub>2</sub> 0,4% Glukose
Ampicillin	50µg/ml in Medien zur Selektion von Bakterien, die das Resistenzgen via Plasmid enthielten
M9-Minimalmedium	200ml 5xM9-Salze 0,4% Glukose 1mM Thiamin 4mg Prolin ad 1l H <sub>2</sub> O bidest
5x M9-Salze	64g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 15g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5g NaCl 5g NH <sub>4</sub> Cl ad 1l H <sub>2</sub> O bidest

## 2.14. Enzymatische Manipulationen von DNA

Alle Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme, Alkalische Phosphatase (*CIP*) und T4 DNA-Ligase wurden von New England Biolabs (*NEB*) oder MBI Fermentas bezogen. Die entsprechenden Reaktionspuffer wurden von den Firmen mitgeliefert.

NEB1	10mM Tris/HCl, pH 7.5 10mM MgCl <sub>2</sub> 1mM DTT
NEB2	10mM Tris/HCl, pH 7.5 50mM NaCl 10mM MgCl <sub>2</sub> 1mM DTT 100ng/µl BSA

NEB3	50mM Tris/HCl, pH 7.5 100mM NaCl 10mM MgCl <sub>2</sub> 1mM DTT
NEB4	20mM Tris/CH <sub>3</sub> COOH, pH 7.5 50mM Kaliumacetat 10mM Mg-Acetat 1mM DTT
CIP-Puffer	0,5M Tris /HCl pH 8,0 1mM EDTA
T4 DNA-Ligase Puffer	400mM Tris/HCl 100mM MgCl <sub>2</sub> 100mM DTT 5mM ATP, pH 7.8

## 2.15. Medien und Lösungen für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

RMPI 1640/2mM L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein Supplementiert mit: - 10% FCS - 1% Penicillin/Streptomycin
Dulbecco's MEM/2mM L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein Supplementiert mit: - 10% FCS - 1% Penicillin/Streptomycin
TMN-FH	Sigma, Deisenhofen Supplementiert mit: - 10% FCS - 1% Antibiotikum/Antimykotikum-Mix
ExCell 405	JRH Bioscience Supplementiert mit: - 1% Penicillin/ Streptomycin
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein Vor Zugabe zu Kulturmedium für 30min bei 56°C inaktivieren.
Antibiotikum/Antimykotikum-Mix Penicillin (10.000U/ml)/ Streptomycin (10.000µg/ml)-Stammlösung	GibcoBRL, Eggenstein GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	GibcoBRL, Eggenstein 0,125% Trypsin 0,125% EDTA 0,115% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,02% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,8% NaCl 0,02% KCl 0,01% CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O 0,01% MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

Cell dissociation buffer	GibcoBRL, Eggenstein
0,4% Trypanblau-Stammlösung	Sigma, Deisenhofen

## 2.16. Medien und Lösungen für Arbeiten mit Hefen

Alle aufgeführten Lösungen können zumindest einmalig autoklaviert werden.

40% Glukose Stammlösung (*als Kohlenstoffquelle*)

YPD-Medium	20g Difco Pepton 10g Hefe Extrakt ad 1l H <sub>2</sub> O bidest Mit HCl <sub>konz</sub> auf pH5.8 einstellen, autoklavieren. Vor der Kultivierung der Hefen, 2% Glukose zufügen.
SD synthetisches Medium	Für selektives Wachstum von Hefen 6,7g Difco Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren ad 1l H <sub>2</sub> O bidest Mit HCl <sub>konz</sub> auf pH5.8 einstellen, autoklavieren. Vor der Kultivierung der Hefen mit 2% Glukose sowie 100ml der benötigten 10x „Dropout“ Lösung versetzen.

### 10x Aminosäuren „Dropout“ Lösung

Die Lösung besteht aus einem Gemisch aller für das Hefewachstum benötigten Aminosäuren und Nukleotide. Ausgenommen sind Aminosäuren/Nukleotide, die durch das Einschleusen genetischer Information autotroph produziert werden und daher als Selektionsmarker fungieren.

Eine zehnfache Dropout-Lösung setzt sich folgendermaßen zusammen:

<b>L-Adenin, Hemisulfat Salz</b>	300 mg/l
L-Arginin-HCl	200 mg/l
<b>L-Histidin-HCl Monohydrat</b>	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
<b>L-Leucin</b>	1.000 mg/l
L-Lysin-HCl	300 mg/l
L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2.000 mg/l
<b>L-Tryptophan</b>	200 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Uracil	200 mg/l
L-Valin	1.500 mg/l

Von den markierten Aminosäuren bzw. Nukleotiden wurden einzeln 100-fache Stammlösungen hergestellt, die nach Bedarf einer -HALT-Dropout-Lösung beigefügt wurden, um flexibel die verschiedenen Selektionmedien herstellen zu können.

Für die Herstellung von Agarplatten wurden stets 20g Bactoagar/1l zu den verschiedenen Medien gegeben.

## 3. Methoden

### 3.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1. Lagerung und Kultur von Bakterien

Für allgemeine Transformationen und Produktion von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes *sure* verwendet. Die Anzucht und Kultivierung erfolgte in LB- (*Luria Broth*) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten (2.13) bei einer Temperatur von 37°C. Hinzugefügt war stets das Antibiotikum Ampicillin, da alle produzierten Plasmide als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten. Für Plattenkulturen wurden Bakterien mit einem Drigalski-Spatel auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Flüssigkulturen wurden durch Animpfen einer geeigneten Menge Nährmedium hergestellt. Bakterien-Kulturen können mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Für die langfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurde 1ml einer Übernachtskultur mit 0,5ml 50% Glycerin (*sterilfiltriert*) versehen, in Kryokonservierungsröhrchen überführt und bei -70°C eingefroren.

#### 3.1.2. Messen der Bakteriendichte

Die Bakteriendichte wurde am Spektralphotometer durch Messung der optischen Dichte (*OD*) bei einer Wellenlänge von 595nm ermittelt. Dazu wurden 1ml der Bakteriensuspension in Plastikküvetten überführt und nach Abgleich gegen steriles LB-Medium vermessen.

Eine  $OD_{600nm}=1$  entspricht bei *E. coli* einer Dichte von ca.  $8 \times 10^8$  Bakterien/ml (Gassen & Schimpf, 2000).

#### 3.1.3. Herstellung elektrokompeterer Bakterien

Mit einer Glycerinkultur des benötigten Bakterienstammes wurden mit einer ausgeglühten Platinöse 20ml LB-Medium für eine über Nacht Kultur (*ÜN*) angeimpft. Am folgenden Tag wurden 1l LB-Medium mit 10ml dieser ÜN-Kultur beimpft und 2-3h bei 37°C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine  $OD_{600nm}$  von 0,5-0,7 erreicht hatte. Dann wurde die Kultur auf vier 250ml Zentrifugenröhrchen verteilt und für 15-30min auf Eis gekühlt. Durch fünfzehnminütige Zentrifugation (*5.000rpm, 4°C in einem SLA-3000 Rotor*) wurden die Bakterien sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in je 250ml eiskaltem, sterilen Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in je 125ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Sorgfältiges Waschen ist nötig, um die Bakterien in ein ionenfreies Milieu zu überführen. Anschließend wurde ein weiterer Waschschrift mit 20ml H<sub>2</sub>O/10% Glycerin durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde in 50ml Spitzbodenröhrchen überführt, erneut zentrifugiert (*5.000rpm, 4°C in einer Heraeus-Biofuge 28RS*) und schließlich in 2ml H<sub>2</sub>O/10%

Glyzerin aufgenommen. 50µl-Portionen wurden in vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der erfolgte bei -70°C.

### 3.1.4. Elektrotransformation kompetenter Bakterien

Aliquots kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 0,1-1µg Plasmid-DNA wurde zugegeben und vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Nach einer Minute wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. In der Elektroporationskammer wurde dann ein Impuls auf die Küvette angelegt ( $2,5kV$ ;  $20\mu F$ ;  $200\Omega$  Schutzwiderstand). Direkt nach dem Impuls wurden die transformierten Bakterien in 1ml SOC-Medium (2.13) suspendiert und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden je 100µl dieser Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen LB-Mediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 3.2. Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

### 3.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um kontaminierende Moleküle, z.B. Proteine zu entfernen, wurde eine DNA-Lösung (*wässrige Phase*) mit einem äquivalenten Volumen an Phenol ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation ( $1min$ ,  $13.000rpm$  in einer *Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) getrennt, dann wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die Phenol-Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen eines 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches ausgeschüttelt und zentrifugiert, um Phenolreste zu entfernen. Danach wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert.

### 3.2.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Zur Fällung von DNA wurde eine DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetat, pH 5.2 und 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol gemischt und 20min bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation ( $13.000rpm$ ,  $4^{\circ}C$  in einer *Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) sedimentiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, dann wurde das Sediment mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, restliches Ethanol wurde unter Vakuum entfernt. Die DNA wurde zur Lagerung in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren.



### 3.2.3. Konzentrationsbestimmungen wässriger Lösungen von Nukleinsäuren

Die Ermittlung der DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge  $\lambda=260\text{nm}$ . Für die Messung wurde die entsprechende DNA- Lösung 1:100 verdünnt und in Quarzglasküvetten überführt.

Es gelten folgende Näherungswerte :

- für einzelsträngige DNA und für RNA  $OD_{260\text{nm}} = 1$   $c \sim 40 \mu\text{g/ml}$
- für doppelsträngige DNA  $OD_{260\text{nm}} = 1$   $c \sim 50 \mu\text{g/ml}$

Um die DNA auf Verunreinigungen hin zu prüfen, wurde zusätzlich eine Messung der optischen Dichte bei  $\lambda=280\text{nm}$  durchgeführt. Bei einer sauberen DNA-Lösung sollte der Quotient  $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$  zwischen 1,7 und 1,8 liegen.

### 3.2.4. Schnellpräparation von Plasmid-DNA (*Plasmid-Minipräparation*)

Mit einer Bakterienkolonie wurden 3ml LB-Medium/Ampicilin angeimpft und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Schüttler inkubiert. Von der ÜN-Kultur wurden 1,5ml in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die Bakteriensuspension (*30s, 13.000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 150 $\mu\text{l}$  Lösung A resuspendiert und nach Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  Lösung B für 5min auf Eis inkubiert. Dann wurden 150 $\mu\text{l}$  Lösung C beigemischt und 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysat mit 450 $\mu\text{l}$  Phenol/CIA (*1:1*) gemischt. Durch Zentrifugation (*5min, 4°C und 13.000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) wurden Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA von der Plasmid-DNA abgetrennt. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem äquivalenten Volumen an Isopropanol vermischt und 15min bei  $-70^\circ\text{C}$  gefällt. Die Lösung wurde dann 20min zentrifugiert (*13.000rpm, 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*), um Plasmid-DNA und RNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 60 $\mu\text{l}$  TE-Puffer (*2.8*) resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  oder  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Restriktionsanalysen von Plasmid-Minipräparationen wurde RNase beigefügt.

**Lösung A:** 25mM Tris/HCl, pH 8.0  
10mM EDTA, pH 8.0  
50mM Glukose

**Lösung B:** 0,2N NaOH  
1% SDS

**Lösung C:** 3MKaliumacetat, pH 4.8  
2N Essigsäure

### 3.2.5. Großaufarbeitung von Plasmid-DNA über Ionenaustauschsäulen (Maxipräparation)

Plasmid-Großaufarbeitungen wurden mit dem Maxipräp-Kit von Qiagen vorgenommen. 500ml einer Bakterien ÜN-Kultur wurden durch 20-minütige Zentrifugation sedimentiert (*5.000rpm und 4°C in einem SLA-3000 Rotor*). Das Bakteriensediment wurde in 10ml Puffer P1 resuspendiert, dann vorsichtig mit 10ml Puffer P2 gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Mischen mit 10ml Puffer P3 folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Ausgefällte Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation vom plasmidhaltigen Überstand getrennt (*30min, 4°C, 10.000rpm in einem SA-600 Rotor*). Der Überstand wurde über einen Faltenfilter auf eine QUIAGEN-tip 500 Ionenaustauschsäule aufgetragen. Diese wurde zuvor mit 10ml Puffer QBT äquilibriert. Der Durchlauf erfolgte über die Schwerkraft. Nach der Adsorption der DNA an das Säulenmaterial wurde die Säule zweimal mit 30ml Puffer QC gewaschen, anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15ml Puffer QF von dem Säulenmaterial in ein 50ml Spitzbodenröhrchen eluiert. Dann wurde die DNA mit 10,5ml Isopropanol gefällt und durch 45minütige Zentrifugation sedimentiert (*6.000rpm, 4°C in einer Heraeus-Biofuge 28RS*). Das DNA-Sediment wurde mit 2ml 70% Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation bei 37°C getrocknet und anschließend in 200-400µl TE-Puffer resuspendiert.

<b>Puffer P1:</b>	50mM Tris/HCl, pH 8.0 10mM EDTA, pH 8.0 100µg/ml RNase A	<b>Puffer QBT:</b>	0,75M NaCl 50mM MOPS, pH 7.0 15% Ethanol 0,15% Triton X-100
<b>Puffer P2:</b>	0,2N NaOH 1% SDS	<b>Puffer QC:</b>	1M NaCl 50mM MOPS, pH 8.2 15% Ethanol
<b>Puffer P3:</b>	2,5mM Kaliumacetat, pH 4.8	<b>Puffer QF:</b>	1,25 M NaCl 50mM MOPS, pH 8.2 15% Ethanol

### 3.2.6. Enzymatische Manipulationen von DNA

#### 3.2.6.1. Restriktionsspaltung von DNA

Weil Restriktionsenzyme in 50% Glycerin gelagert werden, ist das Endvolumen des Reaktionsansatzes abhängig von der eingesetzten Enzymmenge, da die Glycerinkonzentration für optimale Reaktionsbedingungen 10% nicht überschreiten sollte.

##### **Analytische Spaltung (10µl Ansatz)**

1µg Plasmid-DNA  
2-5U Restriktionsenzym  
1µl 10xReaktionspuffer (Abschnitt 2.14)  
ad 10µl TE-Puffer

##### **Präparative Spaltung (100µl Ansatz):**

10-20µg Plasmid-DNA  
50-100U Restriktionsenzym  
10µl 10xReaktionspuffer (Abschnitt 2.14)  
ad 100µl TE-Puffer

Restriktionsspaltungen wurden für mindestens 2h bei 37°C durchgeführt und entweder durch Phenolextraktion, Fällung oder Zugabe von 6xBPB gestoppt. Präparative Spaltungen wurden mindestens 4h oder ÜN inkubiert.

#### 3.2.6.2. DNA Ligationen

Die zu inserierende DNA und die mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittene, gegebenenfalls dephosphorylierte Vektor-DNA wurden im Verhältnis 1:1 bis 10:1 eingesetzt. Die Gesamtmenge an Vektor-DNA betrug in der Regel 0,1-0,5 µg.

##### **Reaktionsansatz**

1µl Vektor- DNA  
xµl Insert- DNA  
1µl 10xLigationspuffer (Abschnitt 2.14)  
1µl T4-DNA-Ligase (30U/µl)  
ad 10µl H<sub>2</sub>O bidest

Für Ligationen von DNA mit glatten Enden wurde die T4-DNA Ligase in höherer Konzentration (400U/µl) eingesetzt. Ligationen wurden meistens über Nacht, mindestens aber 4h bei 16°C inkubiert.



### 3.2.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht ( $\lambda = 300\text{nm}$ ) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte durch Adsorption an Silica-Kügelchen (*Jetsorb DNA-Extraktionskit*).

Zunächst wurde das isolierte DNA-Fragment abgewogen und mit dem doppelten Volumen an Puffer P1, sowie einem Zehntelvolumen an Silicagel versehen. Das Gemisch wurde für 5min auf  $55^\circ\text{C}$  erhitzt und anschließend eine Minute zentrifugiert ( $13.000\text{rpm}$ ,  $4^\circ\text{C}$  in einer *Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit je  $500\mu\text{l}$  Puffer P2 gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Durch Zugabe von  $60\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ idest und fünfminütige Erwärmung auf  $55^\circ\text{C}$  wurde die DNA von den Silica-Kügelchen eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Agarosegels durch Vergleich mit dem Molekulargewichts-Standard  $\lambda$  Hind III abgeschätzt.

**Silica-Adsorptionskit:** 5g Silica in 45ml 3M Natrium-Jodid

**Puffer 1:** 6M NaI

**Puffer 2:** 10mM Tris/HCl; pH 7.5  
2,5mM EDTA  
50% (v/v) Ethanol

### 3.2.9. Sequenzierung von DNA

#### 3.2.9.1. Denaturierung von doppelsträngiger DNA

Für die Anlagerung des Sequenzierungsprimers an das komplementäre DNA-Fragment wurde doppelsträngige (*ds*) DNA zunächst denaturiert. In einem 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden

$32\mu\text{l}$  ds-DNA ( $2\mu\text{g}$  in TE-Puffer)  
 $8\mu\text{l}$  1N NaOH

vermischt und 10min bei RT inkubiert. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von  $7\mu\text{l}$  3M Natriumacetat, pH 4.5. Anschließend wurde die DNA mit  $120\mu\text{l}$  100% Ethanol präzipitiert, gewaschen und nach Trocknen des DNA-Präzipitats in  $10\mu\text{l}$  destilliertem Wasser resuspendiert.

### 3.2.9.2. Anlagerung von Primern an DNA (Annealing)

5-10pmol des jeweiligen Sequenzierungsprimers wurden pro Reaktion benötigt. Die Molarität berechnet sich folgendermaßen:

$$x \text{ pmol} = \frac{\text{DNA Menge in } \mu\text{g} \times (10^6 \text{ pg}/\mu\text{g})}{\text{Anzahl d. Basen} \times (330 \text{ pg}/\text{pmol})}$$

Die Konzentration des Primers wurde in TE-Puffer verdünnt, so dass 2µl der genannten Molarität entsprachen. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen gemischt:

10µl DNA-Template  
 2µl Primer  
 2µl Annealing-Puffer

#### 1) für Doppelstrang-DNA-Matrizen gilt:

Die Mischung wurde für 5min in einem Eppendorf-Thermomixer auf 65°C erhitzt, dann für 10min in ein 37°C Wasserbad überführt und schließlich mindestens 5min bei RT abgekühlt. Die Prozedur ermöglicht eine langsame Ausbildung von komplementären Basenpaaren zwischen Primer und DNA-Matrize.

#### 2) für Einzelstrang-DNA-Matrizen (Phagen) gilt:

Das Reaktionsgemisch wurde für 10min auf 60°C erhitzt und anschließend für mindestens 10min bei RT abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation kondensierten Wassers wurde danach sofort mit den Sequenzreaktionen begonnen.

Annealing Puffer:      1M Tris/HCl, pH 7.5  
                               100mM MgCl<sub>2</sub>  
                               160mM DTT

### 3.2.9.3 Sequenzierungsreaktionen

Die Sequenzierungsmethode nach Sanger (*Sanger et al, 1977*) basiert auf Verlängerung des angelagerten Primers durch DNA-Polymerase. In 4 parallelen Reaktionsansätzen wird jeweils ein Desoxyribonukleotid (*dNTP*) zum Teil durch das korrespondierende Didesoxyribonukleotid (*ddNTP*) ersetzt. Durch multiple Simultanreaktionen werden bei jeder möglichen Termination ausreichende Mengen produziert, um eine Bande nach Auftrennung im Polyacrylamidgel zu erzeugen. Die Visualisierung erfolgt mittels Autoradiographie, da das verwendete dATP mit <sup>35</sup>S markiert ist. Die Banden ergeben von unten (*kurze DNA-Fragmente*) nach oben gelesen,

die Sequenz in 5' → 3' Orientierung.

Für alle Sequenzierungen wurde der T7-Sequenzierungskit von USB verwendet. Er beinhaltet bis auf das radioaktiv markierte dNTP alle benötigten Komponenten. Zunächst wurde die T7-Polymerase entsprechend den Anweisungen mit Enzym- Verdünnungspuffer versehen. Pro DNA-Matrize wurden 0,5µl T7-Polymerase (8U/µl) mit 2µl des Puffers verdünnt. Der markierenden Elongationsreaktion wurden folgende Komponenten beigemischt:

14-15µl Matrize/Primer

3µl Markierungsmix (Gemisch aller Deoxynukleotide, außer dATP)

1µl <sup>35</sup>S dATP (1µCi/µl)

2µl T7-Polymerase, verdünnt

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden jeweils 2,5µl der 4 dNTP/ddNTP-Gemische-„short“ auf Mikrotiterplatten pipettiert und 2 min im 37°C Wasserbad schwimmend erwärmt. Die Termination der Reaktion erfolgte durch Transfer von 4,5µl des Markierungsgemischs zu jedem Didesoxyribonukleotid und folgender fünfminütiger Inkubation bei 37°C. Danach wurde das Enzym durch Zugabe von 5µl Stop-Lösung denaturiert. Die Proben wurden für 5 min aufgeköcht und sofort auf ein denaturierendes PAGE übertragen. 3µl pro Nukleotid wurden dazu verwendet.

<b>Enzym-Verdünnungspuffer:</b>	25mM Tris/HCl, pH 7.5 5mM DTT 100µg BSA/ml 5% Glycerin	<b>A'- Mix kurz:</b>	840µM dCTP, dGTP und dTTP 93,5µM dATP 14µM ddATP 40mM Tris/HCl, pH 7.5 50mM NaCl
<b>dATP-Markierungsmix:</b>	1,375µM dCTP, dGTP und dTTP 333,5mM NaCl	<b>,C', ,G' und ,T'-Mix kurz:</b>	entsprechende Anteile an jeweiligem dNTP sowie ddNTP
		<b>Stop-Lösung:</b>	0,3% Bromphenolblau 0,3% Xylen Cyanol 10mM EDTA, pH 7.5 97,5% Formamid, deionisiert

### 3.2.9.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zwei Glasplatten (20x40 cm) wurden mit Ethanol abgerieben, die Ohrenplatte wurde zusätzlich mit Repellsilan behandelt. Die Platten wurden aufeinandergelegt und mit Klammern fixiert, wobei durch Abstandhalter ein Zwischenraum von 0,4mm erzeugt wurde. 33ml Sequenziergel-Verdünner wurden mit 12ml Acrylamid-Konzentrat und 5ml Sequenzierpuffer versehen. Anschließend wurde die Polymerisation des Acrylamids durch Zugabe von 400µl 10% APS und 20µl TEMED gestartet, die noch flüssige Lösung zwischen die Glasplatten gefüllt und ein Probenkamm mit der Rückseite eingeschoben. Das polymerisierte Gel wurde in eine vertikale Elektrophorese-Vorrichtung eingespannt und nach Auffüllen der Gelkammern mit 1xTBE-Puffer durch einen 30-minütigen Vorlauf (25 mA; 40W; 3000V) erwärmt. Die vorbereiteten DNA-Proben wurden 10min bei 90°C denaturiert und dann auf Eis gelagert. Nach dem Ausspülen von Harnstoff aus der Tasche wurde der Kamm eingesteckt, so dass die Zähne ca. 0,5-1mm in das Gel ragten, danach wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1-2 Stunden mit den oben angegebenen Einstellungen. Anschließend wurde die mit Repellsilan behandelte Ohrenplatte vom Gel abgelöst und das Gel auf ein 3 MM Whatmanpapier übertragen. Das Gel wurde für 2h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

#### denaturierendes Polyacrylamid-Gel:

12ml Sequenziergel-Konzentrat (Roth, Karlsruhe)  
 33ml Verdünner (Roth, Karlsruhe)  
 5ml Puffer-Konzentrat (Roth, Karlsruhe)  
 400µl 10% APS  
 20µl TEMED

#### 10xTBE-Puffer: 890mM Tris, pH 8.3

890mM Borsäure  
 20mM EDTA  
 in 1l H<sub>2</sub>O bidest

## 3.3. Allgemeine Arbeiten mit Zellkultur

### 3.3.1. Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Säugetier-Zelllinien wurden im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 6% CO<sub>2</sub> in beschichteten Kunststoffgefäßen kultiviert. CV1-Zellen wurden in D-MEM/10%FCS gehalten. Die Zellen wurden bei Konfluenz passagiert, dazu wurde das Kulturmedium entfernt, einmal mit 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung gespült und nach Zugabe von weiteren 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen von der Gefäßoberfläche bei 37°C inkubiert (das angegebene Volumen bezieht sich auf eine 75cm<sup>2</sup> Flasche). Die abgelösten Zellen wurden in gewünschter Verdünnung in Kulturmedium resuspendiert, dabei wurde das Trypsin inaktiviert, und in frische Zellkulturflaschen überführt. Die Lymphom Zelllinie K562 wuchs als Suspensionskultur in RMPI mit 10% FCS. Sie wurde 1:5 verdünnt, wenn eine Zelldichte von 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml erreicht war.



Die Ausbildung rekombinanter Baculoviren, sowie die Produktion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe der Insektenzelllinien Sf9 und High Five. Sf9 Zellen wurden bei einer Wachstumstemperatur von 27°C in einem Brutschrank gehalten. Die Zufuhr von CO<sub>2</sub>, sowie die Luftfeuchtigkeit spielen bei der Kultivierung von Insektenzellen keine Rolle. Die Zellen wurden in TNM-FH Medium, supplementiert mit 10% FCS und einem Antibiotikum/Antimykotikum-Mix überwiegend als Suspensionskultur in Kolben mit Schikane unter leichtem Schütteln (150 rpm) kultiviert. Zur Weiterzucht wurden die Sf9 Zellen 1:10 verdünnt, wenn eine Zelldichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml erreicht war. Gleichmaßen wurden auch High-five Zellen kultiviert, statt TMN-FH wurde für diese Zelllinie Ex-cell 405-Medium verwendet.

Medien und Lösungen: Abschnitt 2.15

### 3.3.2. Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Sollten Zellen für längere Zeit gelagert werden, wurden sie wie beschrieben trypsiniert, neutralisiert und 5min bei 1300rpm sedimentiert. 5x10<sup>6</sup>-1x10<sup>7</sup> Zellen wurden in 1,5ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt und zunächst bei -70°C eingefroren. Nach mehreren Tagen wurden die eingefrorenen Zellen in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt und so langfristig gelagert.

Einfriermedium:           50% Kulturmedium  
                                  40% FCS  
                                  10% DMSO

### 3.3.3. Inkulturnahme eukaryontischer Zellen

Zum Auftauen wurden eingefrorene Zellen zügig unter leichtem Schütteln im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort in, auf 37°C vorgewärmtes, Kulturmedium überführt. Um Reste des zytotoxisch wirkenden DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension sedimentiert (5 min, RT, 1300rpm in einer Heraeus-Biofuge 28RS). Das Zellsediment wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und konnte nun wie in 3.3.1. beschrieben kultiviert werden. Erfahrungsgemäß erholten sich frisch aufgetaute Zellen leichter, wenn das Kulturmedium in den folgenden Tagen jeweils erneuert wurde.

### 3.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblaufärbung

10µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit 0,04% Trypanblau gemischt. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Blau gefärbte Zellen wurden nicht gezählt, da das Eindringen des Farbstoffes über die defekte Plasmamembran einer bereits toten Zelle erfolgt. Die Zelldichte (*Zellen/ml*) ergibt sich aus der Multiplikation aller gezählten Zellen eines großen Feldes (*entsprechend 16 kleinen Feldern*) mit dem Faktor  $1 \times 10^4$ .

### 3.3.5. Resuspension adhärenter Zellen ohne Trypsin

Der Rezeptor über den die Papillomavirus-Infektion erfolgt ist trypsin-sensitiv. VLP-Zellbindungsstudien, die mit adhärenenten Zellen durchgeführt werden, müssen daher ohne Trypsin auskommen. Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber führt zu Verklumpungen die eine Zellzahlbestimmung erschweren. Zudem trägt ein beträchtlicher Anteil an Zellen Schäden davon die zum Zelltod führen. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurde daher Zell-Dissoziationspuffer (*GibcoBRL*) verwendet. Die genaue Zusammensetzung des Puffers ist unbekannt. Es handelt sich gemäß Beschreibung des Herstellers um einen Enzym-freien Puffer der chelatierende, zell-konditionierende Agenzien beinhaltet.

Die Kultur adhärenter Zellen (*CV1-Zellen*) wurde zunächst zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend 5-10 min bis zum Ablösen der Zellen mit dem Zell-Dissoziationspuffer bei Raumtemperatur inkubiert, dabei wurden ca. 5ml für eine konfluente Kultur in 75cm<sup>2</sup>-Flaschen benötigt. Anschließend erfolgte die gewünschte Verdünnung mit dem üblichen Medium.

### 3.3.6. Amplifikation von rekombinanten Bakulovirus-Stammpräparationen (*Stocks*)

Virus-ähnliche Partikel von Papillomaviren wurden mit Hilfe des Bakulovirus-Protein-expressionsystem hergestellt. Um Virusstocks zu amplifizieren, wurden zunächst 20ml Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 125cm<sup>2</sup>-Flaschen pipettiert. Nachdem sich die Zellen nach ca. 10-20min am Flaschenboden abgesetzt hatten, wurde das Medium entfernt und durch 2ml des zu amplifizierenden Bakulovirusstocks in 10ml frischem TMN-FH Medium ersetzt. Infektion und Amplifikation erfolgte für 6 Tage bei 27°C. Schließlich wurden im Überstand des Mediums befindliche Bakuloviren abgenommen und in 50ml-Spitzbodenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen sedimentiert (*10min, 20°C und 5000rpm in einer Heraeus-Biofuge 28RS*). Der Bakulovirus-haltige Überstand wurde in ein frisches Behältnis pipettiert und so bei 4°C gelagert.

### 3.4. Arbeiten mit Hefen

#### 3.4.1. Herstellung von Glycerinkulturen

Die Hefen wurden in flüssigem YPD-Vollmedium bei 30°C geschüttelt, bis eine Zelldichte von  $5 \times 10^7$  erreicht war. Die Zellsuspension wurde nach Zugabe von 20% Glycerin in 2ml Kryokonservierungsröhrchen überführt. Einfrieren der Zellen sowie die langfristige Lagerung erfolgten bei -80°C.

#### 3.4.2. Kultivierung von Hefezellen der Art *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefen wurden zunächst aus der -80°C Glycerinkultur auf Platten des entsprechenden Mediums ausgestrichen und bei 30°C 2-5 Tage kultiviert. Diese Stammkultur konnte nun mehrere Wochen, bei 4°C gelagert, für die Inokulation von flüssigem Medium verwendet werden.

Medien und Lösungen: Abschnitt 2.16

#### 3.4.3. Herstellung kompetenter Hefezellen (*nach Gietz und Schiestl, 1995*)

Zunächst wurden 5ml YPD-Vollmedium mit Hefen angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. 50ml frisches, vorgewärmtes YPD-Medium wurde am folgenden Tag so angeimpft, dass die Hefekultur eine Ausgangsdichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml hatte. Diese Kultur wurde bei 30°C und 200rpm geschüttelt, bis nach ca. 5 Stunden eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht war. Die Kompetenz der Hefezellen wurde dann durch mehrere Waschschrte erhöht. Die Hefekultur wurde sedimentiert (*5min, 20°C und 5000rpm in einer Heraus-Biofuge 28RS*), danach wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 25ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert und erneut sedimentiert. Nach Resuspension der Kultur in 1ml sterilem 100mM Lithiumacetat wurden die Zellen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (*5min, 20°C und 6000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) wurde das Hefezellpellet in 400µl 100mM LiAc aufgenommen, dabei sollte die Zelldichte ca.  $2 \times 10^9$  Zellen/ml betragen.

Pro Transformationsansatz wurden 50µl der so vorbereiteten Zellen verwendet.

1M Lithium-Acetat Stammlösung, pH 8,4-8,9

### 3.4.4. Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA

Den kompetenten Hefezellen wurden folgende Lösungen zugefügt:

240µl Polyethylen Glykol (PEG, MW4000)

36µl 1M LiAc

25µl ss-TrägerDNA (Lachssperma)

50µl H<sub>2</sub>O bidest, inklusive 2µg des gewünschten Plasmids

Die Agenzien sollten in dieser Reihenfolge zugefügt werden, da PEG die Hefen vor Zerstörung durch die hohe Konzentration an Lithiumacetat (*LiAc*) bewahrt. LiAc erhöht die Permeabilität der Zellwände und somit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transformation. Die so vorbereitete Transformationsmischung wurde durch „Vortexen“ sorgfältig vermischt und für 30min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch anschließenden Hitzeschock für 25min bei 42°C. Dabei ist zu beachten, dass die Länge des Hitzeschocks vom zu transformierenden Hefestamm abhängig ist.

Der Transformationsmix wurde anschließend durch Zentrifugation entfernt (*15s, RT und 6000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*). Die Zellen wurden in 1ml sterilen H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert. Davon wurden ca. 100µl auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Für den Transfer des Zielproteins HPV16-L1 in den Hefestamm PJ69-4a genügte ein Transformationsansatz dieser Art. Erfolgreiche Transformanten wurden auf die Fähigkeit zur Tryptophan-Synthese selektiert. Das Plasmid pGBT9 enthält die entsprechende Information (*Abschnitt 2.8*).

#### 10mg/ml Lachssperma-Träger-DNA-Stammlösung:

in TE-Puffer, für Transformation von Hefen auf 2mg/ml verdünnen und 5min aufkochen

50% Polyethylenglykol-4000 Stammlösung

#### 3.4.4.1. Transformation einer Peptidbibliothek in Hefen

Die Übertragung der Random-Peptidbibliothek in den Hefestamm PJ696 erforderte die Gewinnung von über 10<sup>7</sup> unabhängigen Klonen, da die Komplexität dieser Bibliothek 10<sup>7</sup> unterschiedliche rekombinante Peptidsequenzen beträgt. Diese Anzahl an Transformanten konnte mit ca. 80 der in Abschnitt 3.4.4. beschriebenen Ansätze erreicht werden. Dazu waren 4 Transformationsexperimente nötig, wobei zweimal 20% sowie 35% und 63% der Bibliothek gewonnen wurden. Jeweils 300µl der, gemäß Abschnitt 3.4.4, transformierten Hefen wurden mit Hilfe von sterilen Glas-Kügelchen auf 30x30cm großen Agarplatten verteilt, so dass ca. 40.000 Klone pro Platte wachsen konnten. Die Selektion erfolgte mit SD/-Leucin Minimalmedium, da das eingeschleuste Plasmid pGAD.GH die Information zur Leucinsynthese trägt. Die einzelnen Kolonien wurden in etwas SD-Medium von den Platten abgeschabt und nach Bestimmung der Zelldichte bei -80°C eingefroren.

### 3.4.5. Kolokalisierung von Plasmiden durch Hefepaarung (*Mating*)- Durchführung eines Two-Hybrid-Screenings

Nach der Übertragung der Plasmide pGBT9-HPV16.L1 (*Bait= Zielprotein*) in PJ69-4a und pGAD.GH-Lib in PJ 696, befanden sich Zielprotein und Bibliothek in Hefen von unterschiedlichem Paarungstyp. Die beiden Plasmide wurden durch Paarung in diploiden Hefezellen vereinigt. Im Vergleich zu der herkömmlichen Methode der Kotransformation reduziert sich der Hintergrund (*BG*) von Zellen, die nur ein Plasmid beinhalten um den Faktor 100. Dadurch wird das Wachstum von positiven Klonen erleichtert.

Für die Vorbereitung der Hefepaarung wurde der Hefestamm PJ69-4a/ pGBT9-16.L1 zunächst über Nacht in SD/-Tryptophan Medium selektiert. Mit der ÜN-Kultur wurden am folgenden Tag 20ml YPD-Vollmedium inokuliert und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Nach 10-12 Stunden (*dabei ist darauf zu achten, dass die OD600nm=0,8 nicht überschreitet*) wurden 3x500ml YPD-Vollmedium angeimpft, so dass die OD600nm=0,01; 0,03 oder 0,05 betrug. Die so angeimpften Kulturen wurden eine weitere Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Paarung der Hefen wurde am folgenden Tag durchgeführt. Dazu wurde die OD der drei ÜN-Kulturen überprüft. Die ausgewählte Kultur sollte mindestens  $2 \times 10^9$  Hefezellen enthalten, ohne eine OD600nm=0,8 zu überschreiten.

Der Hefestamm PJ 696, der die Random-Peptidbibliothek enthält, wurde nun langsam auf Eis aufgetaut. Dabei wurden die 4 Bibliothekspools entsprechend ihrem prozentualen Anteil an der Gesamtkomplexität der Bibliothek vermischt. Konkret wurden je 125µl der Pools 20%a, 20%b und 39% sowie 400µl des 63% Pools (*Zelldichte je  $1,25 \times 10^9$* ) vereinigt, so dass die Gesamtzahl an Bibliothekshefen  $1 \times 10^9$  betrug, diese Zellmenge wurde nach dem ersten Paarungsversuch verdoppelt. Zwecks kurzer Regeneration wurde die Hefebibliothek 10min in 20ml YPD-Voll-medium bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur mit  $2 \times 10^9$  Baithefen vermischt und mit Hilfe einer Sterilfiltrationsapparatur auf 0,22µm Filter übertragen. Es ist wichtig die Hefen unterschiedlichen Paarungstyps auf kleinstem Raum anzunähern, damit die Paarung effizient erfolgen kann. Etwa 15 Filter waren notwendig, um die insgesamt  $3 \times 10^9$  Zellen zu übertragen. Die Filter wurden nun für 5h auf YPD-Agarplatten bei 30°C belassen. In dieser Zeit erfolgte die Paarung. Anschließend wurden die Hefen mit je 2x0,8ml Selektionsmedium SD/-HALT pro Filter resuspendiert (*Abschnitt 2.12.2.*). Das Volumen der vereinigten Hefesuspension betrug ca. 20ml. Je 50µl einer  $10^{-3}$  Verdünnung dieser Suspension wurden auf 15mm -L; -T bzw. -LT Selektionsplatten ausplattiert, um die Matingeffizienz sowie den Anteil der diploiden Hefezellen an dem Gesamtbibliothekspool bestimmen zu können (*siehe Tab. 4.2*).

Zur Selektion auf Aktivierung der Reportergene Histidin und Adenin wurden je 1ml der Hefesuspension auf 30x30cm -His, Ade, Leu, Trp-Agarplatten übertragen. Der Selektionsdruck auf falsch-positive Klone wurde durch Zugabe von 2mM 3-Aminotriazol, einem Inhibitor des HIS3-Genprodukts, erhöht. Das Wachstum von positiven Klonen unterstreicht dadurch die anhaltende starke und somit spezifische Aktivierung des HIS-Reportergens. Die Selektion positiver Klone erfolgte 5 Tage bei 30°C.

### 3.4.6. Aufreinigung von Plasmid DNA aus Hefe-Hoffmann/Winston Methode

Je 2ml YPD-Medium wurden mit einem Hefeklon inokuliert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Hefekultur wurde am folgenden Tag in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (5s, RT und 13.000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 200µl Hefe-Lysepuffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200µl Phenol/CIA und 300mg säuregewaschenen Glaskügelchen (425-600µm). Diese Mixtur wurde anschließend für 2min gevortext, um die Zellwand zu zerstören. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000rpm wurde der DNA-haltige Überstand (CIA-Phase) in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde wie üblich mit Ethanol präzipitiert. Die so gewonnenen Hefepasmide wurden nach Elektroporation in E.coli HB101 amplifiziert und auf M9-Minimalplatten (Abschnitt 2.13) auf Synthese von Leucin selektiert. HB101 ist auxotroph für Leucin und vermag daher nur nach erfolgreicher Transformation eines LEU-Marker beinhaltenden Plasmides zu wachsen.

Hefe Lysepuffer:           2% Triton X-100  
                                  1% SDS  
                                  100mM NaCl  
                                  10mM Tris, pH8  
                                  1mM EDTA

## 3.5. Arbeiten mit Phagen

### 3.5.1. Kultivierung des Bakterienstammes ER2267

Da die Infektion von Bakterien mit Bakteriophagen über den F-Pilus erfolgt, wurden die verwendeten Wirtsstämme zuerst auf die Präsenz des F-Pilus selektiert. Dazu wurden die Bakterienstämme aus der Glyzerinkultur heraus auf Minimalplatten ausplattiert und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die Information zur Prolin-Biosynthese wird über das Gen des F-Faktors reguliert und komplementiert dadurch eine chromosomale Deletion, so dass Kultivierung ohne exogenes Prolin die Aufrechterhaltung infizierbarer (*F-Pilus positiver*) Bakterien gewährleistet. Die so kultivierten Bakterien sollten maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Flüssigkultivierung erfolgt ausschließlich in LB-Medium. Der daraus resultierende Verlust an F-Pilus positiven Bakterien war vernachlässigbar, solange die Kulturen stets frisch mit Bakterien der Minimalplatte angeimpft wurden.

### 3.5.2. Wichtige Regeln für die Kultivierung von rekombinanten Bakteriophagen

Die Initiierung einer Infektion mit dem Bakteriophagen M13 erfolgt durch Interaktion des Phagenschwanzproteins pIII und dem F-Pilus des Wirts. Die Effizienz der Vermehrung rekombinanter Phagen wird wegen der n-terminalen Fusion von, insbesondere Cys-haltigen, peptidcodierenden Sequenzen an das Hüllprotein pIII, vermindert. Jede Kontamination mit Wildtyp-M13 führt dadurch zu einer starken in vivo Selektion zugunsten des Wildtyps.

Wt-Kontaminationen können durch konsequenten Gebrauch gestopfter Pipettenspitzen vermieden werden. Dennoch auftretende Kontaminationen können durch die Verwendung X-Gal haltiger LB-Platten visualisiert werden. Rekombinante Phagen beinhalten die Information zur Synthese von  $\beta$ -Galaktosidase, wodurch die phagen-induzierten Hemmhöfe (*Plaques*) im Bakterienrasen blau erscheinen. Wt-Kontaminanten sind hingegen durchsichtig. Kontaminierte Kulturen rekombinanter Phagen können durch wiederholte Isolierung einzelner blauer Plaques von wt-Kontaminationen gereinigt werden.

### 3.5.3. Bestimmung des Phagentiters

Die Bestimmung der Konzentration einer Phagensuspension erfolgt über die Auszählung von Hemmhöfen (*Plaques*) im Bakterienrasen, wobei ein Hemmhof auf einen einzelnen Phagen zurückzuführen ist. Serielle Verdünnungen der Phagensuspension ermöglichen das Auszählen der Hemmhöfe.

Für die Bestimmung des Phagentiters wurden 5ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase für ca. 4h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde Agarose Top in der Mikrowelle aufgekocht und in 3ml Portionen in sterilen 5ml-Reagenzgläsern bei 45°C gehalten. LB-Agarplatten (+X-Gal) wurden bei 37°C vorgewärmt. Um die Phagen-Aufreinigungen zu verdünnen, wurden je 18 $\mu$ l LB Medium in 1,5ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Je 2 $\mu$ l der originalen Phagen Aufreinigungen wurden entnommen und seriell 1:10 verdünnt, bis die gewünschte Verdünnung erreicht war. Für jede Verdünnung wurde eine frische Pipettenspitze verwendet. Plaques von Eluat der Affinitätsselektion waren im Bereich  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$ , amplifizierte Phagenpräparationen bei einer Verdünnung von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  auszählbar. Den Phagenverdünnungen wurden dann je 200 $\mu$ l der vorbereiteten Bakterienkultur beigefügt, durch Vortexen gemischt und nach einer Minute mit der Agarose vermengt. Die Agarose wurde anschließend durch sanftes Schwenken der LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt. Nach Erstarrung der Agarose wurden die Platten bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Bestimmung der Phagenkonzentration erfolgte am folgenden Tag durch Auszählen der entstandenen Phagenhemmhöfe. Diese Zahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch 20 geteilt, um den Phagentiter als PFU/ $\mu$ l (*plaque forming unit*) anzugeben.

<b>IPTG/X-Gal Stammlösung:</b>	1g X-Gal 1,25g IPTG ad 25ml Dimethylformamid
<b>LB-IPTG/X-Gal Agarplatten:</b>	LB-Medium 20g Bactoagar/l, autoklavieren Vor der Zugabe von 1ml/IPTG/X-Gal Stammlösung auf <70°C abkühlen
<b>Agarose Top:</b>	7g Agarose pro 1l LB-Medium, autoklavieren, bei Bedarf in der Mikrowelle aufkochen.

### 3.5.4. Durchführung des "Phage-Display-Library"-Screenings- Affinitätsselektion

20mm Polystyren-Petrischalen wurden mit 1µg HPV11-L1 VLPs in 1ml PBS-Puffer beschichtet und über Nacht in einer abgedichteten, feuchten Box bei leichtem Schütteln und 4°C inkubiert. Zur Kontrolle der Selektion wurde eine weitere Platte nur mit 1ml PBS-Puffer versehen.

Am nächsten Morgen wurde die Lösung sorgfältig entfernt. Anschließend wurde die Schalen komplett mit Blockpuffer gefüllt und für mindestens eine Stunde bei 4°C belassen. Nach Entfernung des Blockpuffers wurde die Schalen 6x mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen. Anschließend wurden 10µl der Phagenbibliothek, entsprechend  $2 \times 10^{11}$  Phagen insgesamt, in 1ml PBS verdünnt und so zu den mit HPV11-VLPs und PBS-Puffer beladenen Petrischalen gegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur. Nach vollständigem Entfernen der Phagenbibliothek wurden unspezifische Phagen äußerst sorgfältig weg gewaschen. Dafür wurden die Petrischalen 1h mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen, wobei der Waschpuffer ständig erneuert wurde. Zum Entfernen des Waschpuffers wurde jedesmal ein frisches Papier und eine neue gestopfte Pasteurpipette verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Elution gebundener Phagen erfolgte durch Erhöhung der Protonenkonzentration. Nach 10min bei RT wurde das Eluat neutralisiert. 1µl der eluierten Phagen wurde für die Bestimmung der verbliebenen Phagenmengen, wie in 3.3.3. beschrieben, getitert. Das restliche Eluat wurde wie in 3.3.5. beschrieben amplifiziert und aufgereinigt. Von der spezifisch angereicherten, amplifizierten Phagenbibliothek wurden insgesamt  $2 \times 10^{11}$  PFU für eine zweite und später eine dritte Runde der Affinitätsselektion eingesetzt. Dabei wurde die Tween20-Konzentration des Waschpuffers auf 0,5% erhöht. Nach drei Anreicherungsrounden von HPV11-VLP spezifischen Phagen, wurden einzelne blaue Plaques durch Picken mit einem sterilen Zahnstocher isoliert und anschließend amplifiziert.

<b>Blockpuffer:</b>	3% BSA in PBS 0,02% Natriumazid, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
<b>Elutionspuffer:</b>	0,2M Glycin/HCl, pH 2.2
<b>Neutralisierungspuffer:</b>	1M Tris-HCl, pH 9.1



### 3.5.5. Amplifikation und Aufreinigung von Phagenklonen

Der Bakteriophage M13 infiziert E.coli über den F-Pilus und durchläuft dann den lytischen Zyklus zur Produktion von Nachkommen. Für die Amplifikation von rekombinanten Phagen wurde LB-Medium mit E.coli ER2267 inokuliert. Die Infektion mit Phagen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur, die nach 2-4h erreicht war. Alternativ wurde eine ÜN-Kultur 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt. Zwecks Isolierung von Plaques wurde 1ml der Kultur mit einem gepickten Phagen infiziert. Nach 4,5h Inkubation bei 37°C wurde die Suspension sedimentiert (*10min, 4°C und 10.000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*). Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden 0,8ml entsprechend 80% des ÜS in eine frisches Reaktionsgefäß gegeben. Dabei wurde ein Phagenvorrat erhalten, der einige Wochen bei 4°C aufbewahrt werden konnte. Langfristige Lagerung erfolgte nach Zugabe von 50% sterilem Glycerin bei -20°C.

Für einige Anwendungen waren große Phagemengen erforderlich. Je 20ml einer 1:100 in LB-Medium verdünnten E.coli ER2537 ÜN-Kultur wurden mit 10µl eines Phagenvorrates infiziert. Nach 4,5h wurde die Bakteriensuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (*10min, 4°C und 10.000rpm in einem SA-600 Rotor*). Danach wurden 16ml des Überstandes in ein 50ml-Spitzbodenröhrchen überführt, mit 2,5ml PEG/NaCl versehen und ÜN bei 4°C gefällt. Das Phagenpräzipitat wurde am folgenden Morgen zentrifugiert (*15min, 4°C bei 6000 rpm in einer Heraeus-Biofuge 28RS*). Das Sediment wurde in 1ml PBS resuspendiert, in ein 1,5ml Gefäß pipettiert und durch nochmalige Zentrifugation von verbliebenen Bakterien befreit. Anschließend wurde mit 1/6 Volumen, entsprechend 170µl, PEG/NaCl für 1h auf Eis präzipitiert. Das endgültige Phagenpräzipitat wurde nach 10min Zentrifugation bei 12000rpm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R in 50µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde der Phagentiter ermittelt, er betrug im Durchschnitt ca  $1 \times 10^{10}$  PFU/µl.

PEG/NaCl:        20%(w/v) Polyethylen Glykol-8000  
                     2,5M NaCl, autoklavieren

### 3.5.6. Präzipitation von Phagen-DNA

Die Sequenzierung HPV11-spezifischer Phagen erforderte die Aufreinigung von Phagen-DNA, die als beim Bakteriophagen M13 als Einzelstrang-Genom vorliegt.

Dazu wurden 500µl des Phagenvorrats, der wie in Kapitel 3.5.5. durch Isolierung von Plaques produziert wurde, mit 200µl PEG/NaCl versehen. Die Phagen wurden nach 10minütiger Inkubation bei RT mit 12.000rpm in der Tischzentrifuge präzipitiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Phagensediment gründlich in 100µl Jodpuffer resuspendiert und mit 250µl 100% Ethanol versehen. Die einzelsträngige Phagen-DNA wurde für 10min bei RT ausgefällt.

Nach Sedimentation des Präzipitats (10min, RT und 11000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R) folgte der übliche Waschschrift mit 70% Ethanol. Das DNA-Präzipitat wurde nach Trocknung in 30µl TE Puffer aufgenommen. Für eine Sequenzreaktion wurden 10µl dieser Aufreinigung benötigt.

Jodpuffer:        2,7mM KCl  
                       8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                       1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.6. Arbeiten mit Proteinen

#### 3.6.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Verfahren werden Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt. SDS denaturiert die Proteine als starkes Detergenz, gleichzeitig erhalten die Proteine eine einheitlich negative elektrische Ladung, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Wesentlichen nur von ihrem Molekulargewicht abhängt. Die verwendeten Gele sind diskontinuierlich, bestehen also aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporigen Trenngel. Zudem kommt es an der Grenze durch einen pH-Sprung zu einer Fokussierung der Proteine, was die Auflösung deutlich steigert.

Die verwendete Gelkonzentration von 12% Acrylamid erlaubte die Auftrennung von Proteinen mit einem MW zwischen 10-150kDa. Mengenangaben beziehen sich auf ein 10x15cm großes Gel. Zum Gießen der Gele und für die Elektrophorese wurden vertikale Gelapparaturen verwendet.

Für das Trenngel wurden 8ml Acrylamidlösung mit 7,5ml Trenngelpuffer vermischt, auf 20ml mit H<sub>2</sub>O bidest aufgefüllt und 200µl 10%SDS, 200µl APS sowie 8µl TEMED zugegeben. Das Trenngel wurde bis 3cm unterhalb des oberen Ohrenglasplattenrandes eingegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgesaugt, das Sammelgel (5% Acrylamid) gegossen und ein Kamm eingesetzt. Die Sammelgellösung wurde aus 830µl Acrylamidlösung, 500µl Sammelgelpuffer; 3,4ml H<sub>2</sub>O bidest, 50µl 10%SDS, 50µl APS und 5µl TEMED hergestellt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt.

Die Proteinproben wurden mit Proteinlyse-Puffer versetzt, 10 min bei 100°C denaturiert und kurz abzentrifugiert bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Referenz wurden vorgefärbte Standard-Proteinmarker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V mit 1xProtein-Laufpuffer, nach Eintritt der Proben in das Trenngel konnte die Spannung auf 135 V erhöht werden.

Trenngel-Puffer:	1M Tris, pH8.8	2x Protein-Probenpuffer:	1,25ml 1M Tris/HCL, pH 6.8
Sammelgel-Puffer:	1M Tris, pH 6.8		1,7ml 30% Acrylamid-Lösung
10x Protein-Laufpuffer:	125mM Tris		6,8ml H <sub>2</sub> O bidest
	1M Glycin		100µl 10% SDS
	1% SDS		100µl 10% APS
			10µl TEMED

### 3.6.2. Silberfärbung von Proteingelen

Mit dieser Methode lassen sich die über ein PAGE aufgetrennten Proteine anfärben. Das Proteingel wurde dazu unmittelbar nach Abschluß der Elektrophorese für 2 Stunden bei RT in 100ml (*Mengenangaben beziehen sich auf ein Gel der Größe 10x15 cm*) AG-Fix fixiert und danach 3x in 100ml 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Alle verwendeten Lösungen wurden frisch hergestellt. Das Gel wurde für eine Minute in 100ml Natriumthiosulfat geschwenkt, 3x in H<sub>2</sub>O bidest gewaschen und danach 20min mit 100ml Silbernitrat inkubiert. Anschließend wurde 3x gewaschen. Die Silberfärbung wurde dann mit 100ml Natriumcarbonat Lösung entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach Abstoppen der Entwicklung mit 100ml AG-Stop für 20min, konnte das Gel getrocknet werden.

<b>AG-FIX:</b>	50ml Methanol (50%) 12ml Essigsäure (12%) 50µl 37% Formaldehyd ad 100ml H <sub>2</sub> O bidest
<b>Natriumthiosulfat-Lösung:</b>	0,02g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /100ml H <sub>2</sub> O bidest
<b>Silbernitratlösung:</b>	0,2g AgNO <sub>3</sub> /100ml H <sub>2</sub> O bidest 75µl 37% Formaldehyd
<b>Natriumcarbonat-Entwicklungslösung:</b>	6g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /100ml H <sub>2</sub> O bidest 50µl 37% Formaldehyd
<b>AG-STOP:</b>	50% Metanol 12% Essigsäure

### 3.6.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Konzentration von VLPs zu bestimmen, wurden definierte Mengen einer VLP-Aufarbeitung gemeinsam mit BSA-Konzentrationsstandard über ein PAGE aufgetrennt. Der BSA-Standard wurde in den Konzentrationen 5µg; 2µg; 1µg; 0,5µg und 0,2µg auf das Gel mit aufgetragen. Nach Anfärbung des Gels mit Silbernitrat wurden die Bandenintensitäten mit dem Standard verglichen und so die Konzentration abgeschätzt. Eine Proteinbestimmung nach Bradford war nicht sinnvoll, da die VLPs nach Aufreinigung im CsCl-Gradienten noch mit zahlreichen Proteinen, sowie nicht zur Partikelbildung befähigten Degradationsprodukten verunreinigt sind.

### 3.6.4. Dialyse von Proteinen

Hier wurden Dialysen hauptsächlich durchgeführt, um virusähnliche Partikel von zellschädigenden Konzentrationen an CsCl zu befreien. VLPs adsorbieren offenbar leicht an Dialyseschläuche. Um den Verlust von VLPs bei der Dialyse zu minimieren, wurden Dialysefilter mit einer Porengröße von 0,025 µm und einem Durchmesser von 25 mm verwendet. Zunächst wurden die Filter vorsichtig auf eine mit 20 ml HS-Puffer (*Abschnitt 2.8*) gefüllte Petrischale gelegt. Mit einer Pipette wurden ca. 700 µl einer VLP-Präparation auf den Filter gegeben. Die Dialyse wurde für 2 h bei RT bzw. 4 °C ÜN belassen, anschließend wurden die dialysierten VLPs vorsichtig abpipettiert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

### 3.6.5. Kopplung von Biotin an Proteine

Weil die Biotinylierung von Proteinen leicht durchzuführen ist, wurden HPV11-VLPs für den VLP-Festphasen Zellbindungsassay biotinyliert. Biotinylierte Moleküle können nach Bindung an einen HRP-gekoppelten  $\alpha$ -Biotin Antikörper durch Zugabe von Substratlösung detektiert werden. Da Biotin ein kleines Molekül von 244 Da ist, wird in den meisten Fällen kein Einfluß auf die biologische Aktivität des Proteins erwartet. Als Biotinreagenz wurde EZ-link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (*Pierce*) verwendet. Dieses Agens ist hydrophil, der Biotinanteil wird durch einen Spacer-Arm von der Kopplungsgruppe getrennt so dass eine optimale Antigenerkennung gewährleistet werden kann.

Das optimale Biotinylierungsverhältnis für HPV11-Kapside wurde ermittelt. 1 mg HPV11-VLPs wurden mit 100 µl einer frisch in Wasser gelösten Reagenzlösung (*1 mg/ml*) versehen. Das entspricht einem 50-fachen molaren Überschuß an Reagenz, bezogen auf die Molarität eines einzelnen Kapsomers (*es wurden 72 Biotinylierungspositionen pro Kapsid kalkuliert*). Nach 45-minütiger Reaktionszeit wurden die VLPs ÜN bei 4 °C gegen HS-Puffer (*2.11*) dialysiert, um ungekoppelte Biotinreste zu entfernen. Die Biotinylierung der VLPs wurde mittels indirektem ELISA und Western Blot überprüft.

### 3.6.6. VLP-Produktion und Aufreinigung

Für die präparative Produktion von Papillomavirus-VLPs wurden zunächst 400 ml High-five-Zellen mit einer Zelldichte von  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit dem Protein-exprimierenden Bakulovirus infiziert (*ca. 5-10 ml eines Bakulovirus-Vorrates*). Um eine möglichst synchrone Infektion aller Zellen zu erreichen, wurden die Zellen erst sedimentiert (*10 min, RT bei 1500 rpm in einer Heraeus-Biofuge 28RS*) und dann in insgesamt 30 ml frischem Ex-Cell 405 Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Virusstock (*die MOI sollte zwischen 2 und 5 betragen*) und einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die infizierten Zellen mit 200 ml frischem Medium verdünnt und in

Kolben mit Schikane überführt. Nach 3-4 Tagen Schütteln bei 27°C wurden die Zellen wie oben beschrieben pelletiert und einmal mit PBS gewaschen.

Für die Proteinaufreinigung wurden die geernteten Zellen dann in 9ml Extraktions-puffer/0,01% Triton resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 200µl 100mM PMSF wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (*2x45s, Stufe 3, konstanter Impuls*) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (*10min, 4°C bei 10.000rpm in einem SA-600 Rotor*). Der Überstand wurde in einem 50ml Spitzboden-Röhrchen gesammelt, während das Sediment nochmals in 9ml Extraktionspuffer/0,01% Triton resuspendiert und nach Zugabe von 200µl PMSF mit Ultraschall (*45s, Stufe 3, Impuls 60*) behandelt wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereint und auf einen vorbereiteten Zweiphasen-Gradienten aufgetragen.

4,7g Cäsiumchlorid wurden in 8 ml Extraktionspuffer (*ohne Triton!*) gelöst und in ein 25x89 mm Beckman Zentrifugen-Röhrchen überführt. 10ml einer 40%-Saccharoselösung wurden vorsichtig überschichtet, so dass die Phasengrenze deutlich zu erkennen war. Nun wurde das Zellysat auf den Gradienten aufgetragen und für zwei Stunden bei 10°C und 27.000rpm in einem SW28 Ausschwingrotor in einer Beckman XL-70 Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Anschließend waren die Partikel im Bereich der Interphase zwischen CsCl und Sucrose lokalisiert, die darüberliegende Flüssigkeit wurde durch vorsichtiges, flächiges Abtragen entfernt. Interphase und CsCl-Phase wurden mit Extraktionspuffer auf eine Dichte von 1,37g CsCl/ml eingestellt und in ein 16x76 mm Quickseal-Zentrifugenröhrchen (*13,4ml Kapazität*) überführt. Anschließend erfolgte die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für mind. 20 Stunden bei 47.000rpm und 20°C in einem Ti 70-Festwinkelrotor.

Der Gradient wurde durch Austropfen über eine Kanüle in 1ml Aliquots fraktioniert, 5µl jeder Fraktion wurden mit Hilfe eines ECL-Western Blots auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins hin untersucht.

Extraktionspuffer:                    10mM MgCl<sub>2</sub>  
    50mM CaCl<sub>2</sub>  
    150mM NaCl  
    0,01% Triton X-100  
    20mM HEPES, pH 7.4  
    1mM PMSF

Cäsiumchlorid-Lösung:            57,5%(w/v)

Saccharoselösung:                 40% (w/v)

### 3.6.7. VLP-Dichtebestimmung

Wegen Sukroseresten im CsCl-Gradienten konnte die Dichte, bei der VLPs bandieren nicht mittels Refraktometer bestimmt werden. Die Dichte wurde stattdessen durch Abwiegen der VLP-Peak Fraktion ermittelt. Dazu wurde eine 200µl-Pipettierhilfe durch Abwiegen von 100µl H<sub>2</sub>O in einer Analysen-Waage genau justiert. Das 1,5ml-Reaktionsgefäß, dass die zu bestimmende VLP-Fraktion enthielt wurde als Nullreferenz abgeglichen. Die Dichte [g/ml] der Fraktion ergibt sich aus der Differenz zum Nullwert nach Entnahme von 100µl der VLP-Fraktion.

## 3.7. Immunologische Nachweisverfahren

### 3.7.1. Enhanced chemoluminescence (ECL) Western Blot

Mit Hilfe der Western-Blot Technik können die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden. Bei einem ECL-Western Blot erfolgt die Detektion spezifischer Banden mit Hilfe von Chemolumineszenz. An den Primäantikörper, der das Protein spezifisch bindet, heftet sich in der nachfolgenden Reaktion ein Peroxidase-gekoppelter Sekundäantikörper. Nach Zugabe der ECL-Entwicklerlösung, wird die Peroxidase durch das in der Lösung enthaltene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Das aktivierte Enzym oxidiert nun das Luminol, welches daraufhin Licht emittiert, letztere Reaktion wird durch die p-Hydroxy-Cumarinsäure verstärkt (*Enhancer*). Die verstärkte Emission findet bei einer Wellenlänge von 428nm statt, dieses Signal kann durch kurze Exposition auf einem Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilm aufgefangen werden.

Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Trenngel 5-10min in EMBL-Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden auf die untere Graphitplatte der Blotapparatur (*Kathode*) 3 Lagen 3 MM Whatmanpapier gelegt, sowie ein Nitrocellulosefilter in der Größe des Gels, der zuvor ebenfalls mit EMBL-Puffer getränkt worden war. Das Gel wurde auf den Nitrocellulosefilter aufgelegt und nach Entfernung aller Luftblasen mit 3 weiteren Lagen feuchtem Whatmanpapier bedeckt. Anschließend wurde die Blotapparatur mit der, den Minuspol darstellenden Graphitplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 170mA für 45min. Um unspezifische Bindungsstellen abzudecken wurde die Membran anschließend für 30min in der Blocklösung inkubiert, bevor der Erstantikörper, verdünnt in Blockpuffer, eine Stunde bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C mit der NC-Membran inkubiert wurde. Danach wurde die Membran 4x5 min mit Waschlösung gewaschen, für 30min mit dem Zweitantikörper inkubiert und nochmals 4x5 min gewaschen. Zur Entfernung von Milchresten wurde die NC-Membran danach kurz in PBS geschwenkt. Für den Entwicklungsvorgang wurden 8ml der ECL-Lösung mit 2ml Wasser und 20µl Enhancer gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Minute wurde die Reaktion gestoppt, die NC-Membran in einer Folie verpackt und 10sek bis 30min auf einem Röntgenfilm exponiert.



<b>Blockierungs- und Antikörper-Verdünnungspuffer:</b>	5% Magermilchpulver in PBS 0,2% Tween20
<b>Substratlösung:</b>	9,9ml 0,1M Natriumacetat, pH 6.0 0,1ml TMB (Stammlösung 100µg/ml in DMSO) 2µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Stopplösung:</b>	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 3.7.3 Festphasen-VLP-Zellbindungsassay

Ein Zellbindungsassay auf der Basis von 96-Loch Zellkulturplatten wurde vorgenommen, um den Effekt von HPV11-spezifischen Phagenklonen auf die Bindung von VLPs an CV1-Zellen zu studieren. Dieser Versuchsansatz stellt eine Alternative zum Nachweis zellgebundener HPV11-VLPs mittels Durchfluß-Zytometrie dar. Phagen können nicht in den Mengen produziert werden, die für eine Meßprobe in der Durchfluß-Zytometrie erforderlich sind. Daher galt es die Menge an HPV11-VLPs zu reduzieren (*siehe Tabelle 3.2*).

CV1-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^3$ /Loch in 96-Loch Zellkultur Platten ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschank belassen, die mit ca.  $2 \times 10^4$  Zell/Loch erreicht war. Zuvor wurden sie mit Trypsin-freien Zelldissoziationspuffer von der Zellkulturflasche gelöst. Nachdem nach 48h-72h die Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen 5-10min mit einem 1:1 Aceton/Methanol Gemisch fixiert und danach 6x mit PBS/0,5% Tween20 gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit 250µl pro Loch 3%BSA/0,5% Tween20 für eine Stunde bei 37°C geblockt. Die Platte wurde 3x gewaschen. HPV11-spezifische Phagenklone sowie der als Positivkontrolle für Bindungsinhibition eingesetzte Antikörper F1, wurden zuvor über Nacht mit den Partikeln vorinkubiert. Um die von CV1-Zellen präsentierten Rezeptoren abzusättigen, wurden jeweils 200ng HPV11-VLPs je Loch in je 100µl Blockpuffer 1h bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden zellgebundene VLPs über gekoppelte Biotinreste durch Zugabe von 100µl/Loch Avidin αBiotin-HRP gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Platte wurde so 1h bei 37°C inkubiert und dann fünfmal gewaschen. Detektion und Dokumentation des Ergebnisses erfolgten wie für den ELISA beschrieben.

<b>Zellfixierungslösung:</b>	1:1 Aceton/ Methanol (v/v)
<b>Blockierungs-, Wasch- und Inkubationslösung:</b>	3% BSA in PBS 0,2% Tween20
<b>Substrat- und Stopplösung:</b>	Siehe 3.7.2



Tabelle 3.2		
VERGLEICH VON ZELLBINDUNGSASSAYS FÜR DIE UNTERSUCHUNG VON HPV11-SPEZIFISCHEN PHAGEN BZW. PEPTIDEN HINSICHTLICH INHIBITION DER VLP-BINDUNG AN ZELLEN		
	VLP-Festphasen Zellbindungsassay	Durchfluß-Zytometrie
Zellzahl/Meßprobe	2x10 <sup>4</sup> pro well	3x10 <sup>5</sup> pro Meßprobe
Zur Sättigung benötigte Menge an HPV11-VLPs	200ng	15µg
Anzahl möglicher Bindungsepitope pro Kapsid*	2x10 <sup>12</sup>	1,62x10 <sup>14</sup>
Art der VLP-Detektion	Nachweis zellgebundener VLPs durch Substratumsetzung des Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpers	Nachweis zellgebundener VLPs durch FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper
Sensitivität	Inhibitorische Eigenschaften von Molekülen sind aufgrund der Farbreaktion nur tendenziell abschätzbar	Sensitivität ist hoch, da jede Zelle einzeln analysiert werden kann

### 3.7.4. Durchfluß-Zytometrie – Nachweis zellgebundener HPV11-L1-VLPs durch Immunfluoreszenz

Neben zahlreichen anderen Anwendungsmöglichkeiten erlaubt die Durchflußzytometrie (*fluorescence activated cell sorting*= *FACS*) eine Analyse von Zelloberflächenmolekülen. Die Messungen verlaufen voll automatisiert mit Hilfe eines FACSSort™ Gerätes. Stark vereinfacht werden Zellen einer vorbereiteten Probe über einen, durch Druckluft erzeugten, Flüssigkeits-Hüllstrom in Messungskanülen eingesaugt (*Hydrodynamische Fokussierung*). Intern verjüngt sich die Kanüle von 80 auf 20-40µm, so dass die Zellen im Flüssigkeitsstrom nacheinander einzeln eine Lichtquelle passieren. Diese wird von einer Argon-Laser erzeugt, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488nm emittiert. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff, der zur Färbung der Zellen verwendet wurde, angeregt und emittiert seinerseits Licht das dann von diversen Fotodioden aufgezeichnet und amplifiziert wird. Die Zelle selbst erzeugt eine Autofluoreszenz bzw. Lichtbeugung und -streuung, durch die Aussagen über die Größe (*FSC=Forwardscatter*) und Granularität bzw. innere Struktur der Zellen (*SSC=Sidescatter*) möglich ist. Ein Softwareprogramm (*Cellquest™*) dokumentiert jede einzelne Zelle. Eine statistisch aussagekräftige Anzahl an Zellen (*mind. 10.000*) ermöglicht eine qualitative und quantitative Aussage über die untersuchten Moleküle.

Die Methode wurde hier verwendet, um die Bindung von HPV11-L1 VLPs an K562 Zellen zu untersuchen. Dadurch war die Identifizierung von Substanzen mit einer inhibitorischen Funktion bezüglich der Bindung von VLPs an K562 Zellen möglich. Die Etablierung des Experimentes ist in Abschnitt 4.4.2.2. dokumentiert. Für jede Probe wurden 3x10<sup>5</sup> K562 Zellen, resuspendiert in 500µl Kulturmedium, in 1,5ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Zur Sättigung zellulärer HPV-Rezeptoren wurden 15µg HPV11-L1 VLPs benötigt. Die Bindung von VLPs erfolgte 45min auf Eis,

\* Kalkulation von Bindungsepitopen siehe Abschnitt 3.7.6.

ungebundene VLPs wurden durch Waschen entfernt. Dazu wurden die Zellen sedimentiert (*je 2min, 4°C und 2000rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R*) und nach Absaugen des ÜS in 1,5ml RMPI-Medium resuspendiert, dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Die Proben wurde anschließend in 200µl Antikörperlösung resuspendiert und für 45min auf Eis gehalten. Der HPV11-spezifische monoklonale AK B2 wurde 1:500 (*ca. 20µg/Probe*) in RMPI-Medium verdünnt, um zellgebundene VLPs zu detektieren. Nach Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurden die Proben in 200µl einer Sekundärantikörper Lösung resuspendiert und nochmals 45min auf Eis inkubiert. Dafür wurde ein FITC-gekoppeltes, Ziege αMaus-IgG-Fab Fragment 1:100 verdünnt (*entspricht etwa 3µg AK pro Probe*). Schließlich wurden die Proben wie beschrieben 3x in PBS gewaschen, um auch Farbreste des Mediums zu entfernen. Die vorbereiteten Proben wurden in je 300µl PBS aufgenommen und sofort vermessen. Alternativ wurden die Zellen mit PBS/0,1% Formaldehyd fixiert und am folgenden Tag vermessen. Die Vermessung mit dem FACSort Gerät erfolgte mit dem Programm Cellquest.

### 3.7.5. Theoretische Kalkulation potentieller Bindungsepitope auf HPV11-L1 VLPs

1VLP  $\cong$  360 L1-Monomere in 72 Kapsomeren  
 L1  $\cong$  55kDa x 360 = 19.800kDa

1 kDa =  $1,66 \times 10^{-21}$  g  
 19.800 kDa =  $3,3 \times 10^{-17}$ g = 1VLP =  $3,3 \times 10^{-8}$ ng  
 1ng  $\cong$   $3,03 \times 10^7$  VLPs

#### **Molare Verhältnisse beim VLP-Festphasen-Zellbindungsassay:**

200ng VLPs  $\cong$   $6 \times 10^9$  VLPs

bei max. 360 Epitopen würden sich also maximal ca.  $2 \times 10^{12}$  Bindungsepitope ergeben.

Phagen präsentieren das rekombinante Peptid 3-5 mal innerhalb des Schwanzproteins pIII

Als produzierbare Menge erwies sich max.  $5 \times 10^{11}$  Phagen/200ng VLPs

Dies entspricht annähernd einem molaren Ratio von 1:1.

#### **Molare Verhältnisse des VLP-Bindungsassay analysiert per Durchfluß-Zytometrie:**

15µg VLPs pro Probe  $\cong$   $4,5 \times 10^{11}$  VLPs x 360  
 $= 1,62 \times 10^{14}$  max. Anzahl an Peptidbindestellen

100-fach molarer Überschuß an Peptid am Bsp. von PD15:

MW PD15 = 1085 Da  
 1Mol = 1085g  
 1mg = 921 nMol (annähernd 1µMol)

1Mol =  $6 \times 10^{23}$  Teilchen  
 1µMol =  $6 \times 10^{17}$  T.

Peptidlösung [1mg/ml]:  $20\mu\text{l} \cong \text{ca. } 2 \times 10^{16}$  Teilchen

dies entspricht einem 100-fach molaren Überschuß an Peptid bezogen auf die max. mögliche Anzahl von Epitopen auf  $15\mu\text{g}$  HPV11-VLPs.

### 3.8. Arbeiten mit Peptiden

Die Durchführung von HPLC und Massenspektroskopie wurde mit Hilfe der AG Ruppert, ZMBH vorgenommen. Peptide einer ersten Order, die ohne HPLC-Profil geliefert wurden, wurden zunächst per analytischer HPLC charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Peptide extrem verunreinigt waren. Einige dieser Peptide konnten mittels quantitativer HPLC aufgereinigt und anschließend oxidiert werden. Die anderen Peptide wurden verworfen und neu synthetisiert. Die Synthese wurden von erfahrenen Peptidsynthese-Einheiten vorgenommen (2.9).

#### 3.8.1. Analytische und präparative HPLC (*high performance liquid chromatography*)

Peptide werden mit Hilfe der „Reversed-phase“ Chromatographie aufgereinigt. Bei dieser Art der Chromatographie ist die stationäre Phase aus einem Silikarückgrat aufgebaut, an das aromatische- und Alkylreste unterschiedlicher Länge kovalent gebunden sind. Die Adsorption des gelösten Peptids (*mobile Phase*) erfolgt über hydrophobe Interaktion mit der stationären Phase. Durch kontinuierliche Erhöhung der Konzentration an hydrophobem Lösungsmittel (Acetonitril) in der mobilen Phase erfolgt anschließend die Desorption des Peptids gemäß seiner hydrophoben Eigenschaften, es wird dadurch von Verunreinigungen getrennt.

Die HPLC erfolgte vollautomatisiert, das Peptid wurde in  $\text{H}_2\text{O}$ , bei hydrophoberen Peptiden mit Acetonitril-Anteil, gelöst und dann automatisch in die Säule gepumpt. Für die Analyse reichten Peptidmengen im Nanogramm-Bereich in  $100\mu\text{l}$  Volumen aus.

Für die Aufreinigung per präparativer HPLC wurde die gesamte Probe auf die Säule geladen, das Eluat wurde in 1ml Fraktionen gesammelt und die dem Peptid entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt. Nach Entfernen des Lösungsmittels durch Lyophilisierung wurde das Peptid in einem geeigneten Volumen gelöst und oxidiert.

#### 3.8.2. Oxidation von Cystein-flankierten Peptiden

Die Peptide sollten über die endständigen Cysteine unter Ausbildung einer Disulfidbrücke oxidiert und damit zyklisiert werden. Zuerst wurde das Peptid in  $\text{H}_2\text{O}$  und, je nach polaren Eigenschaften, durch Zugabe von etwas Acetonitril in großem Volumen (ca.  $1\text{-}5\mu\text{Mol/ml}$ ) in einem Glasgefäß gelöst. Ein hohes Volumen begünstigt die Ausbildung intrazellulärer Disulfidbrücken und vermeidet

ungewünschte Dimere/Polymere. Die Peptidlösung wurde mit reinem Ammoniak auf einen pH=8.0-8.5 eingestellt. Im basischen Milieu dissoziieren Protonen von den Sulhydrylgruppen, dadurch wird der Schwefel reaktiver. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde gasförmiger Sauerstoff in die Lösung eingeblasen, der Verlauf der Oxidation wurde durch Kontrolle des pH beobachtet, der durch Freisetzung der Protonen ansteigt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel durch Lyophilisierung der Peptidlösung entfernt. Die Oxidation wurde über Massenspektroskopie kontrolliert.

Oxidierete Peptide wurden schließlich mit einer Konzentration von 1mg/ml in H<sub>2</sub>O oder einem Gemisch mit minimal nötigen Acetonitrilanteil gelöst.

### 3.8.3. Massenspektroskopie

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Peptiden mittels Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektroskopie wurde von A. Bosserhoff, ZMBH durchgeführt.

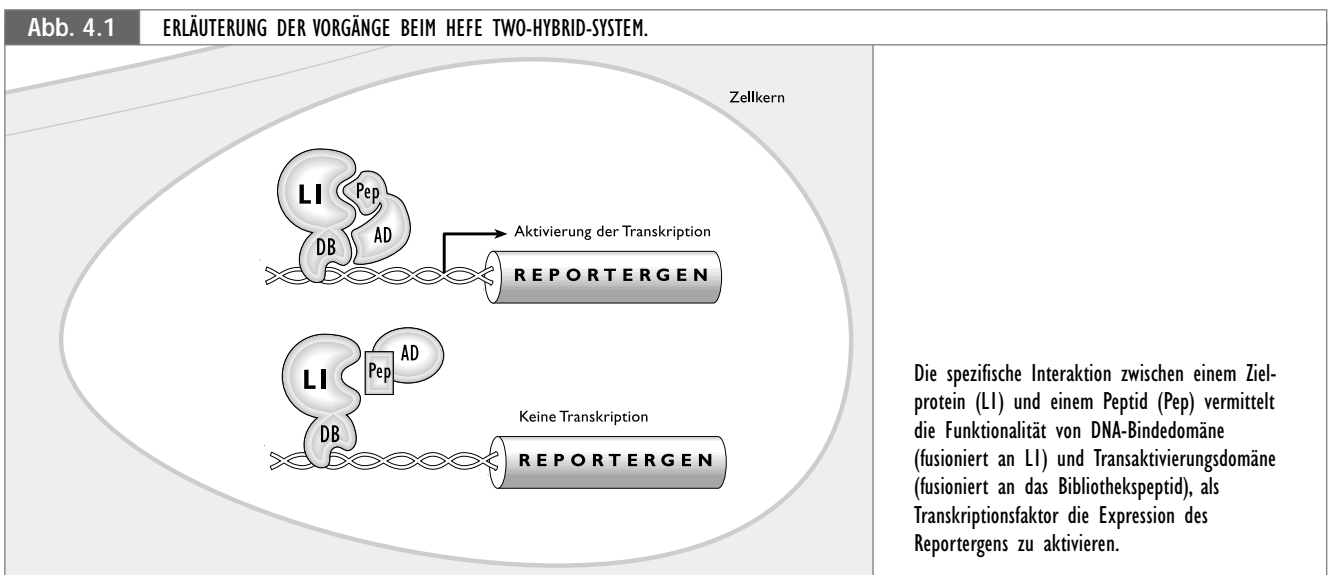
Stark vereinfacht werden die Peptidmoleküle in flüchtigem Lösungsmittel durch Energiezufuhr so fein verteilt, dass sie als Einzelmoleküle gemäß ihrer Ionenladung detektiert werden können. Das Spektrogramm eines Peptids zeigt eine Serie von Ionensignalen, die sich durch unterschiedliche Verhältnisse von <sup>13</sup>C und <sup>14</sup>C in einzelnen Molekülen unterscheiden (*Isotopenmuster; Vgl. Abb. 4.20*) Es handelt sich um ein Peptidmolekül, nicht um verschiedene Oxidationsstadien.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Screening einer Random-Peptidbibliothek mit dem Hefe-Two-Hybrid-System (THS)\*

#### 4.1.1. Prinzip des Systems und Verwendung

Das THS-System basiert auf der modularen Natur eukaryotischer Transkriptionsfaktoren (*TF*). Der bei diesem Screening eingesetzte Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 besteht aus den voneinander separierbaren DNA-Binde- (*DB*) und Transaktivierungsdomänen (*AD*). *DB* erkennt den Promotor des zu aktivierenden Gens und bindet dort, die Anlagerung des Transkriptions-Initiationskomplexes erfolgt über *AD*. Um nun eine Protein-Protein Interaktion mit Hilfe des THS zu identifizieren, werden die zu untersuchenden Proteine bzw. Peptide, unter Ausbildung von Hybridproteinen an jeweils eine der hier getrennt vorliegenden *TF*-Domänen fusioniert. Eine positive, spezifische Protein/Protein-Interaktion kann durch die Expression von Reportergenen detektiert werden. Die Aktivierung der Reportergene erfolgt nur dann, wenn die Zusammenlagerung der beiden Domänen des Transkriptionsfaktors durch die spezifische Interaktion ihrer fusionierten Hybridproteine vermittelt wird (*siehe Abb. 4.1*). Die Aktivierung der Reportergene *HIS* und *ADE* ermöglicht Hefeklonen das Wachstum auf Minimalnährböden, denen kein Histidin und Adenin zugesetzt wurde. Wachstumsfähige Klone enthalten daher potentielle Interaktionspartner des Proteins von Interesse und können leicht isoliert werden. Besonderheiten der in dieser Arbeit angewendeten THS-Methode sind die synchrone, duale Reportergenselektion zur Erhöhung der Selektionsstringenz sowie der effizientere Weg der Vereinigung beider *TF*-Hybridkonstrukte durch Hefepaarung (*Mating*).



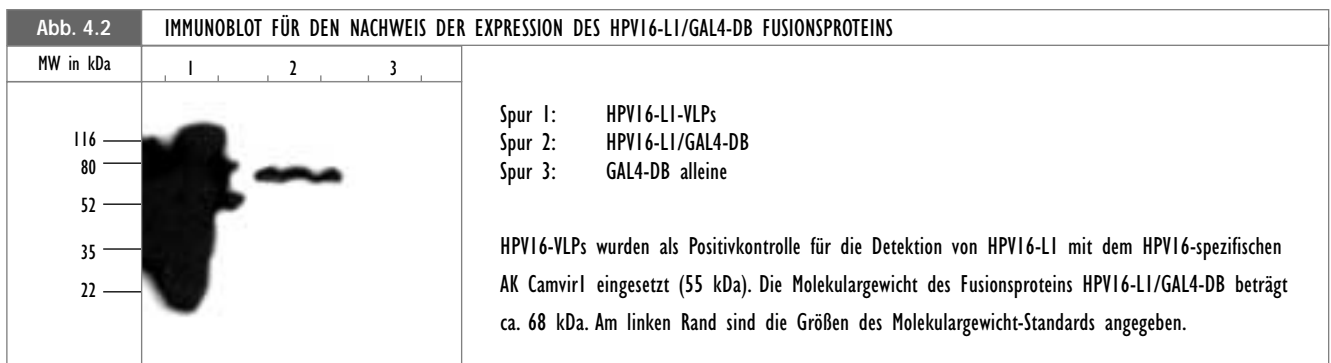
Das Hefe Two-Hybrid-System wurde im Rahmen dieser Dissertation verwendet, um eine 16mer Random-Peptidbibliothek mit dem Hauptstrukturprotein L1 des Humanen Papillomavirus Typ16 (*HPV16*) hinsichtlich spezifisch interagierender Peptide zu durchsuchen (*siehe Abschnitt 1.9*). Anschließend sollte auch HPV11-L1 auf diese Art untersucht werden.

\*Erklärung verwendeter englischer Fachbegriffe siehe Anhang

## 4.1.2. Konstruktion der GAL4-Domänenhybride und Transformation in Hefen unterschiedlichen Paarungstyps

### 4.1.2.1. Fusion von HPV16-L1 mit GAL4-DB und Transformation in den Hefestamm PJ 69-4 $\alpha$

HPV16-L1 wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII aus pBlueskript KSII herausgeschnitten und in pGBT9 übertragen (2.8). Die Aufrechterhaltung des Leserasters wurde durch anschließende Sequenzierung kontrolliert, da es sich um ein Fusionsgen von 5'-terminaler GAL4-DNA-Bindedomäne und HPV16-L1 handelt. Das Plasmid wurde dann in den Hefestamm PJ 69-4 $\alpha$  (Paarungstyp  $\alpha$ ) transformiert. Erfolgreiche Transformanten wurden auf -Trp-Selektionsnährböden identifiziert. Die Expression des HPV16-L1-GAL4-DB Fusionsproteins wurde mittels Immunoblot einer Hefe-Rohextrakt-Aufreinigung von PJ-69-4 $\alpha$ /pGBT9-HPV16-L1 bestätigt (Abb. 4.2).



### 4.1.2.2. Transformation der Bibliothek in den Hefestamm PJ 69 $\beta$

Die Konstruktion der Randompeptid-Bibliothek wurde durch PCR-Amplifikation des in Tab. 1.1 gezeigten Oligonukleotids von Yang et al. 1995 vorgenommen.

Tabelle 1.1	5'-GAACTAGTGGATTCCC-(NNK) <sub>16</sub> -TAGGAATTCGGCCG-3'
	N= alle 4 Nukleotide
	K= G und T (Reduzierung von drei auf ein (tag) mögliches, internes Stopcodon)
Oligonukleotid, auf dem die Konstruktion der Peptidbibliothek basiert, die in dieser Arbeit für das Hefe-Two-Hybrid-Screening verwendet wurde.	

Die dabei entstandenen Random-Oligonukleotide wurden über die flankierenden Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI verdaut und an die GAL4-Aktivierungsdomäne in dem Plasmid pGAD.GH fusioniert. Die Bibliothek wurde dann durch Elektroporation in E.coli DH5 $\alpha$  amplifiziert (Yang et al, 1995). Laut Angaben der Herstellerin (Yang et al, 1995) beträgt die Komplexität der Bibliothek 10<sup>7</sup> unterschiedliche Sequenzen, wobei 15% durch interne Stopcodons trunziert vorliegen. Die theoretische Komplexität einer 16-mer Random-Bibliothek beträgt 16<sup>20</sup>= 1,21x10<sup>24</sup> unterschiedliche Peptide. Ein Viertel der Sequenzen kann davon abgezogen werden, da

interne TAG-Stopcodons enthalten sind. Im Durchschnitt befindet sich nur 1/6 der Sequenzen einer Random-Bibliothek im richtigen Leseraster und in der richtigen Orientierung (*Fields & Sternglanz, 1994*). Die Komplexität wird im wesentlichen von der Transformationseffizienz limitiert, die in verschiedenen Mikroorganismen erreicht werden kann. Diese beträgt zwischen  $10^9$ - $10^{10}$  in *E.coli*, aber nur  $10^7$  in Hefe (*aus Current Protocols in Mol. Biol.*).

Die beschriebene Bibliothek wurde in Form von Plasmid-DNA pGAD.GH-Lib von Dr.M. Tommasino, DKFZ zur Verfügung gestellt. Die DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit in den Hefestamm PJ 696 (*Paarungstyp a*) transformiert. Die Selektion von Transformanten erfolgte über den im Plasmid enthaltenen Leucin-Marker. Es wurden mehr als  $10^7$  Transformanten gewonnen, um die gesamte Bibliothek mit einer Komplexität von  $10^7$  verschiedenen Peptiden zu erfassen (*Details: Abschnitt 3.4.4*).

#### 4.1.3. Two-Hybrid-Screening einer 16mer Peptidbibliothek mit HPV16-L1

Das Zielprotein HPV16-L1 und die Peptidbibliothek befanden sich nun in Hefestämmen unterschiedlichen Paarungstyps, so dass das Screening von HPV16-L1 mit der Bibliothek über Paarung der beiden Hefestämmen durchgeführt werden konnte.

Zellen des Hefestamms *S.cerevisiae* können in haploider und in diploider Form existieren. Diploide Zellen durchlaufen unter ungünstigen Wachstumsbedingungen die Meiose unter Ausbildung von 4 haploiden Tochterzellen, wobei jeweils zwei durch den Paarungstyp *a* oder  $\alpha$  charakterisiert sind. Beide sezernieren spezifische Oligopeptid-Pheromone und den korrespondierenden Rezeptor, wodurch unter günstigen Bedingungen die Paarung haploider Zellen unterschiedlichen Paarungstyps zur diploiden Zelle induziert wird. Die Hefepaarung wird beim Screening von Peptid-Bibliotheken mittels Two-Hybrid System genutzt, da sich im Vergleich zur Kotransformation von zwei Plasmiden in eine Zelle die Anzahl von Zellen, die nur ein Plasmid enthalten, um den Faktor 100 verringert. Dadurch wird das Wachstum von Interaktions-positiven Zellen erleichtert.

Zur Erfassung aller theoretisch vorhandenen unterschiedlichen Peptidsequenzen bezüglich spezifischer Interaktion mit L1 waren insgesamt drei Hefepaarungsansätze (*Details Abschnitt 3.4.5*) notwendig, die Ergebnisse der Hefepaarungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst:

Tabelle 4.2 ZUSAMMENFASSUNG DER HEFEPaarungsANSÄtZE, DIE ZUR AUSBILDUNG VON 107 DIploIDEN HEFEZELLEN NÖtIG WAREN					
Paarungsansatz	-T Anzahl von Hefen mit dem Plasmid pGBT9/HPV16-L1	-L Anzahl von Hefen mit dem Plasmid pGAD.GH-Lib	-LT Anzahl Diploide	Prozentualer Anteil an der Bibliothek [%]	Paarungseffizienz [%]
1	$3 \times 10^9$	$4,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	24	5,45
2	$3 \times 10^9$	$4,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	28	6,36
3	$3 \times 10^9$	$6,2 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	80	12,90

Die Paarungseffizienz gibt den prozentualen Anteil an diploiden Hefen in Bezug auf die Gesamtzahl eingesetzter Bibliothekshefen an.  
-T; -L und -LT: Minimalnährböden, auf denen die jeweiligen Hefen ausgezählt wurden.

Insgesamt 12 Klone wuchsen auf -HALT Selektionsplatten. Ein wachstumsfähiger Hefeklon muß die Plasmide pGBT9 (*Trp-Synthese*) und pGAD.GH (*Leu-Synthese*) enthalten und durch eine erfolgreiche HPV16-L1 Interaktion mit einem Bibliothekspeptid die Reportergene Histidin und Adenin aktivieren. Zur Analyse der Peptidsequenzen wurde das Plasmid pGAD.GH aus den Hefeklonen isoliert und in E.coli HB101 übertragen. Transformanten wurden dort durch Leucin-Selektion identifiziert und isoliert, die Plasmid-DNA wurde amplifiziert und schließlich wurden die enthaltenen Oligonukleotide sequenziert.

#### 4.1.3.1. Identifizierung von falsch-positiven Klonen

Falsch-positive Klone können auf Selektionsplatten wachsen, obwohl die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nicht durch spezifische Interaktion der Hybridproteine bzw. Peptide vermittelt wird. Um die L1-Spezifität der isolierten Bibliothekspeptidklone zu bestätigen, wurden die isolierten Plasmide daher in folgende Hefen transformiert (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3 VORGENOMMENE KONTROLLTRANSFORMATIONEN MIT DEN IDENTIFIZIERTEN BIBLIOTHEKSPLASMIDEN			
Hefestamm/Plasmid	PJ 69-4 $\alpha$ /pGBT9 (Negativkontrolle)	PJ 69-4 $\alpha$ /pGBT9-E7 (Negativkontrolle)	PJ 69-4 $\alpha$ /pGBT9-L1 (Positivkontrolle)
Ziel	Identifizierung von Peptiden, die direkt mit der GAL4-DNA Bindedomäne interagieren	Test der Spezifität des interagierenden Peptids	Bestätigung der spezifischen Interaktion mit L1

Alle identifizierten Peptide interagierten direkt mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (PJ 69-4 $\alpha$ /pGBT9) und konnten dadurch auf den Selektionsplatten wachsen. Somit wurde kein Peptid identifiziert, das spezifisch mit HPV16-L1 interagieren konnte.

Weil das Protein mit 1,6 kB möglicherweise zu groß für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening war, sollte es für ein erneutes Screening in drei etwa gleich große Fragmente unterteilt werden. Ein N-terminales Fragment wurde durch partiellen Verdau des Plasmids pGBT9-16.L1 mit BamHI (*schneidet HPV16-L1 nach 590 BP*) und Religation des Vektors nach Generierung glatter DNA-Enden durch T4-DNA-Polymerase hergestellt und per Hefepaarung mit der Peptidbibliothek durchsucht. Ca.  $6 \times 10^6$  diploide Hefen (*entspricht 60% der Bibliothek*) ergaben 70 wachstumsfähige Klone auf -HALT-Selektionsnährböden. Peptidcodierende Plasmid-DNA (pGAD.GH-Pep) wurde stichprobenartig aus 15 Klonen isoliert und zur Kontrolle via Transformation mit pGBT9 ohne L1-Anteil in Hefen kolokalisiert. Auch diese Peptide reagierten alle direkt mit der DNA-Bindedomäne, so dass eine Fortführung des Deletionsmutanten-Screenings nicht sinnvoll erschien.

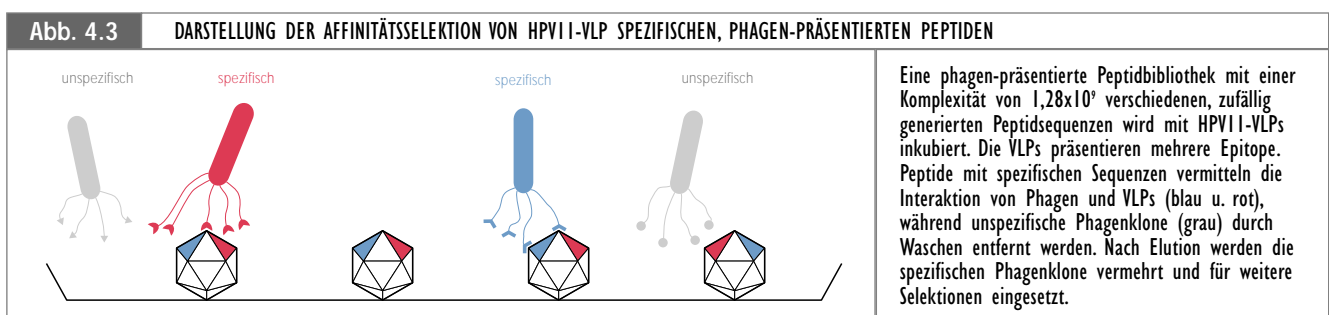
Die Bewertung der Qualität der Peptidbibliothek war durch ein analoges Screening des transformierenden Proteins HPV16-E7 möglich. Das Screening wurde von Fr. cand. biol. T. Trost ,DKFZ durchgeführt.



Es wurden 6 verschiedene Peptide identifiziert, die Interaktion mit E7 konnte für alle Peptide auf der N-terminale Hälfte von E7 lokalisiert werden. Dadurch wurde der Beweis erbracht, dass dieses System für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening geeignet ist und auch korrekt angewendet wurde. Das erlaubt die Schlußfolgerung, dass das L1-Protein für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening ungeeignet ist. Aus diesem Grund wurde auf ein analoges Screening von HPV11-L1 verzichtet.

## 4.2. Screening von HPV11-L1-VLPs mit einer phagen-präsentierten zyklischen 7mer Peptidbibliothek (Phage Display)

### 4.2.1. Prinzip des Systems und Verwendung



Ähnlich dem Hefe-Two-Hybrid-System, erlauben Phagen-präsentierte Peptidbibliotheken über das auf der Bakteriophagen-Außenhülle präsentierte Peptid, die Identifizierung der peptid-codierenden Sequenz, verpackt im gleichen Virion. Dadurch ist das Screening von Peptidbibliotheken von hoher Komplexität und die nachfolgende Analyse der erhaltenen, spezifischen Phagen schnell zu erreichen.

Der Bakteriophage M13 der die verwendete Peptidbibliothek präsentiert, besteht aus einem zirkulären, einzelsträngigen DNA-Genom das in tubuläre Partikel von 65 Å Durchmesser und einer Länge von 1 µm verpackt ist. M13 infiziert exklusiv E.coli-Bakterien mit dem F<sup>+</sup>-Phänotyp, die Infektion erfolgt durch Interaktion seiner Oberflächen-Hüllproteine pIII mit dem F-Pilus des Bakteriums. Das pIII-Protein wird auf jedem Phagenkapsid 3 bis 5 mal präsentiert und toleriert die N-terminale Insertion von Fremdsequenzen mit einer Länge von bis zu einigen hundert Nukleotiden, ohne einen wesentlichen Verlust an Infektiosität.

Die Selektion von Peptiden mit einem zu testenden Bindungsvermögen erfolgt über nicht-kovalente, chemische Wechselwirkungen zwischen Peptid und dem Protein von Interesse, hier HPV11-VLPs. Das Protein wird mit dem gesamten Bibliothekspool inkubiert. Spezifische Sequenzen interagieren mit dem Protein und können auch nach gründlichem Waschen nicht entfernt werden, während irrelevante Bibliotheksphagen dabei eliminiert werden (*Affinitätsselektion, Abb. 4.3*). Die verbliebenen Phagen werden durch pH-Erniedrigung von den VLPs eluiert und in Bakterien vermehrt, bevor sie erneut mit den HPV11-VLPs inkubiert werden. Durch mehrere Runden von Affinitätsselektion und Elution wird die Sammlung von unterschiedlichen Bibliothekssequenzen hinsichtlich spezifischer Peptide angereichert.

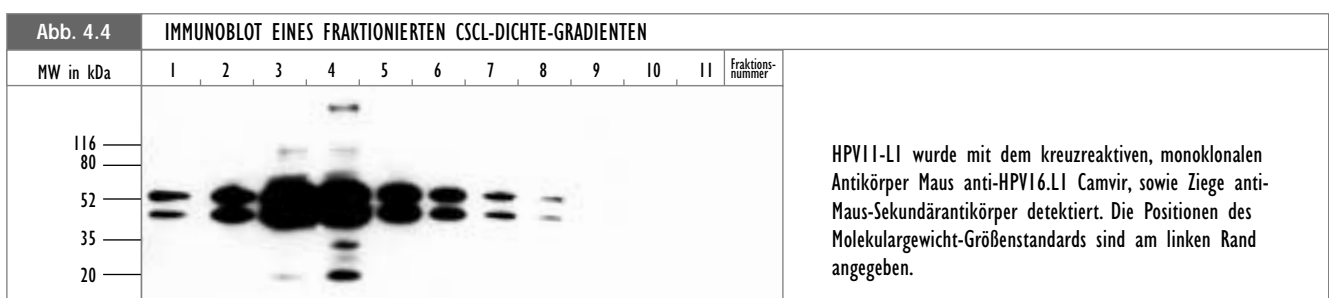
Für die Identifizierung von Peptidsequenzen, die spezifisch mit dem HPV11 Kapsid interagieren, wurde der Ph.D.-C7C™ Phage Display Library Kit von New England Biolabs verwendet.

Die mitgelieferte Bibliothek hatte eine theoretische Komplexität von  $7^{20}$ , entsprechend  $1,28 \times 10^9$  unterschiedlichen Peptidsequenzen, welche aus je 7 Aminosäuren bestehen und beidseitig von Cystein-Resten flankiert sind. Diese Cysteine bilden eine Disulfidbrücke aus und zwingen das Peptid dadurch in einen Ring, der bei Betrachtung der 3-dimensionalen Struktur des rekombinanten Hüllproteins pIII deutlicher exponiert ist als lineare Fremdpeptide. Eine zyklische Struktur eignet sich besonders gut für die Selektion von Peptiden die mit Konformationsepitopen interagieren (Clackson & Wells, 1994). Solche Epitope stellen den Hauptanteil an immunogenen Epitopen, die vom Papillomaviruskapsid als Antigen determinanten präsentiert werden. Lineare Epitope existieren auch, sind aber zumeist schwächer immunogen (Christensen et al, 1990; 1996 Heino et al, 1995; Kulski et al, 1998).

#### 4.2.2. Präparation von HPV11-L1-VLPs

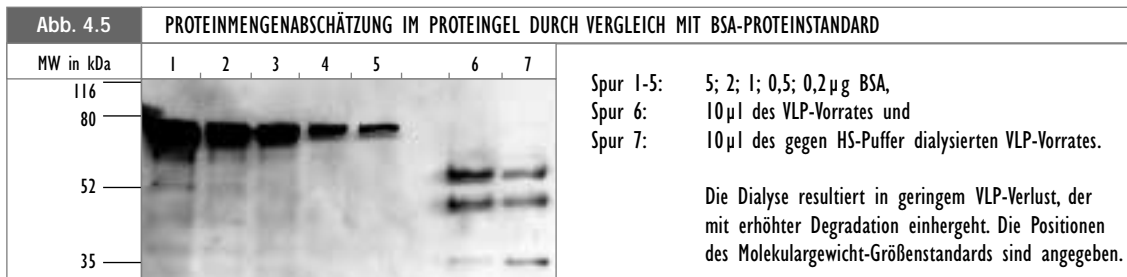
Virus-ähnliche Partikel des humanen Papillomavirus Typs 11 wurden durch Expression des Hauptstrukturproteins L1 im Bakulovirus-Expressionssystem produziert. Weil Peptide mit einer bindungsinhibierenden Funktion gesucht wurden, erschien die Verwendung von VLPs, die auch das Strukturprotein L2 enthielten, unnötig. Vorausgegangene Studien kamen nämlich zu dem Schluß, dass L2 bei der initialen Bindung der viralen Kapside an Zellen keine Rolle spielt (Roden et al, 1994; Müller et al 1995; Volpers et al 1995).

Die Aufreinigung erfolgte, wie in Abschnitt 3.6.7 beschrieben, über zwei Gradienten-Ultrazentrifugationsschritte. Nach der Fraktionierung des abschließenden CsCl-Dichtegradienten, wurden die Fraktionen im Immunoblot (Abb. 4.4) auf die Präsenz von HPV11-L1 hin untersucht.

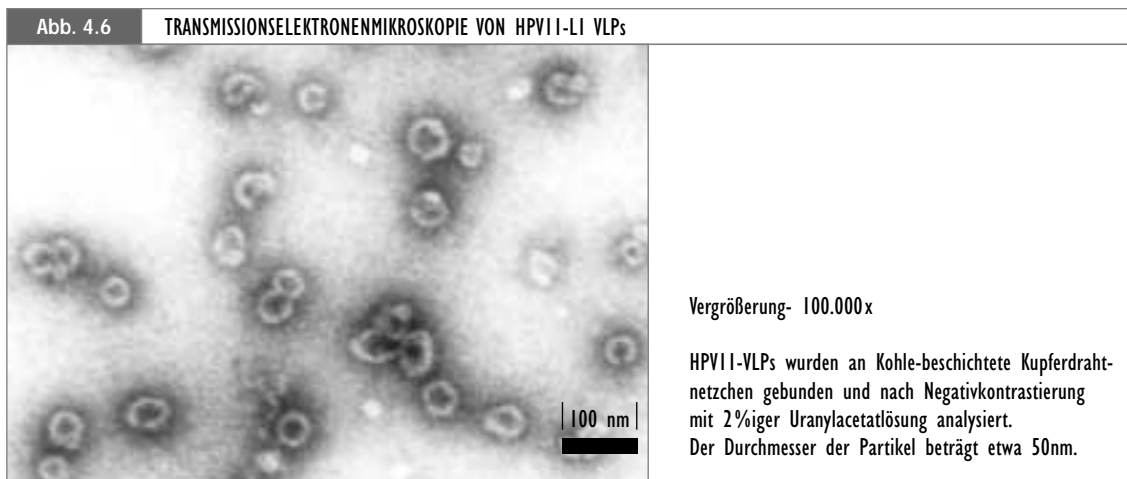


Das Volllänge-L1-Protein hat ein Molekulargewicht von 55kDa. Kleinere Fragmente, die im Immunoblot nachgewiesen wurden, bestehen aus Degradationsprodukten von L1. Die CsCl-Fraktion mit dem höchsten Anteil an HPV11-L1 entspricht einer Dichte von 1,30g/ml, was mit Angaben in der Literatur korreliert (1,28g/ml McCarthy et al; 1998; 1,32g/ml Christensen et al. 1994). In der Regel wurden je nach Stärke des HPV11-L1 Signals im Immunoblot 4-6 Fraktionen eines Gradienten zusammengefasst. Der Anteil des 55kDa-HPV11-L1 Proteins eines Fraktionspools wurde mittels Silberfärbung eines Polyacrylamid-Gels bestimmt. Für die Abschätzung der Konzen-

tration wurden definierte Mengen eines BSA-Konzentrationsstandards auf das Gel mit aufgetragen. In Abbildung 4.5 ist bei den dialysierten HPV11-VLPs ein geringer Verlust an VLPs bzw. ein höherer Anteil an Degradationsprodukten gegenüber undialysierten VLPs erkennbar. Die Konzentration an HPV11-L1 mit 55kDa beträgt in Abb. 4.5 ca. 50ng/ $\mu$ l, im Durchschnitt betrug die Konzentration des VLP-Vorrates zwischen 50ng und 100ng/ $\mu$ l.



Um sicherzustellen, dass ein überwiegender Anteil des L1 Proteins tatsächlich in Form von virus-ähnlichen Partikeln vorlag, wurden die aufgereinigten HPV11-L1 Proteine mit Hilfe der Elektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von VLPs hin überprüft (*elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden freundlicherweise von Birgit Hub, DKFZ angefertigt*). Die Ausbildung intakter virus-ähnlicher Partikel mit korrekter Größe wurde dadurch bestätigt (*siehe Abb. 4.6*).



### 4.2.3. Identifizierung von Phagen-präsentierten Peptiden, die spezifisch mit HPV11-L1-VLPs interagieren

#### 4.2.3.1. Affinitätsselektion einer zyklischen 7mer Phagen-Peptidbibliothek

Nach Bestätigung der Anwesenheit intakter HPV11-L1 VLPs konnten die Partikel zur Affinitätsselektion von Phagen verwendet werden. Das Verfahren ist in Kapitel 3.5.1 beschrieben. In Parallelansätzen wurden 20mm Petrischalen mit 1µg HPV11-VLPs und zur Kontrolle einer unspezifischen Phagenadsorption an die Schale, mit PBS-Puffer beladen.

Nach jeder Runde der Affinitätsselektion und Elution wurde die Gesamtmenge an eluierten Phagen bestimmt. Die Menge an eluierten HPV-11 spezifischen Phagen stieg erwartungsgemäß bei jeder Runde deutlich an (Tab. 4.2).

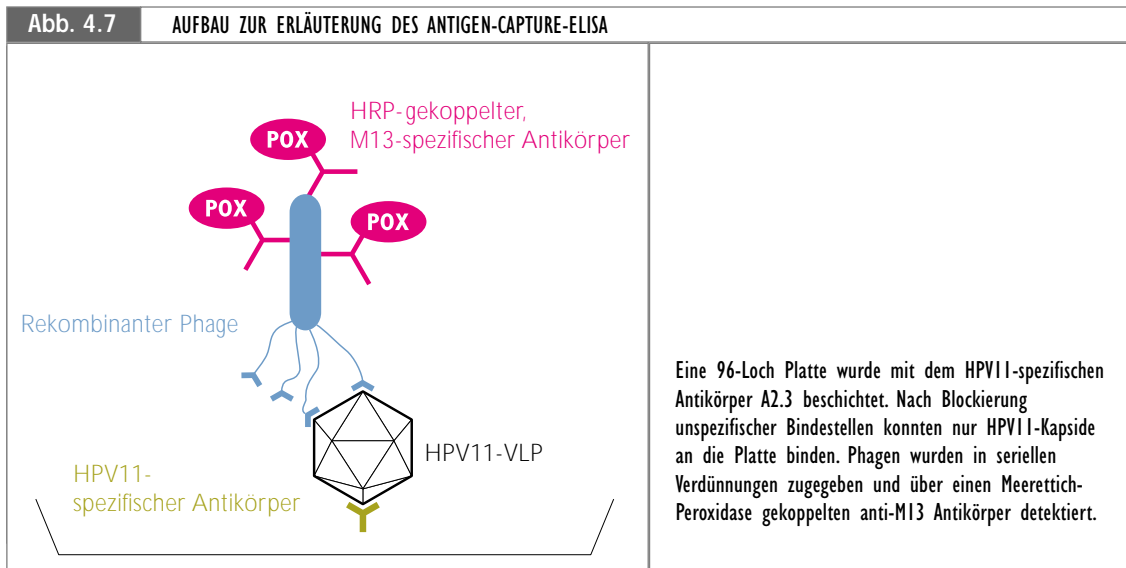
Affinitätsselektion		Ausplattierte Verdünnung des Eluates (Anzahl der Plaques)				Eluierte Phagen insgesamt
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	
1. Runde	HPV11-L1 VLPs	260	3	—	—	2,64x10 <sup>3</sup>
	PBS	6	—	—	—	60
2. Runde	HPV11-L1 VLPs	> 5000	1700	200	10	1,72x10 <sup>5</sup>
	PBS	10	2	—	—	100
3. Runde	HPV11-L1 VLPs	> 5000	> 5000	1500	150	1,5x10 <sup>6</sup>
	PBS	70	8	2	—	720

Für die Bestimmung der Phagenmenge wurde je 1µl der Eluate (1ml Volumen) seriell um jeweils eine Zehnerpotenz verdünnt und ausplattiert (Abschnitt 3.5.3). Die Phagenkonzentration wurde durch Auszählung der „plaque forming units“ [PFU]= Plaques ermittelt. Als Kontrolle wurde die Phagenbibliothek parallel dazu mit PBS inkubiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass 2,64x10<sup>3</sup> Phagen des originalen Bibliothekspools (von ursprünglich 1,3x10<sup>9</sup> unterschiedliche Peptidsequenzen) spezifisch mit den HPV11-VLPs oder aber mit Proteinen gleicher Dichte im CsCl-Gradienten, interagierten (siehe auch Abschnitt 4.2.3.2). Ungewiß bleibt dabei zunächst, ob es sich jeweils um unterschiedliche Sequenzen handelt oder ob mehrmals identische Sequenzen präsent waren. Nach Angaben des Herstellers war jede Sequenz durchschnittlich 50x im ursprünglichen Bibliothekspool enthalten.

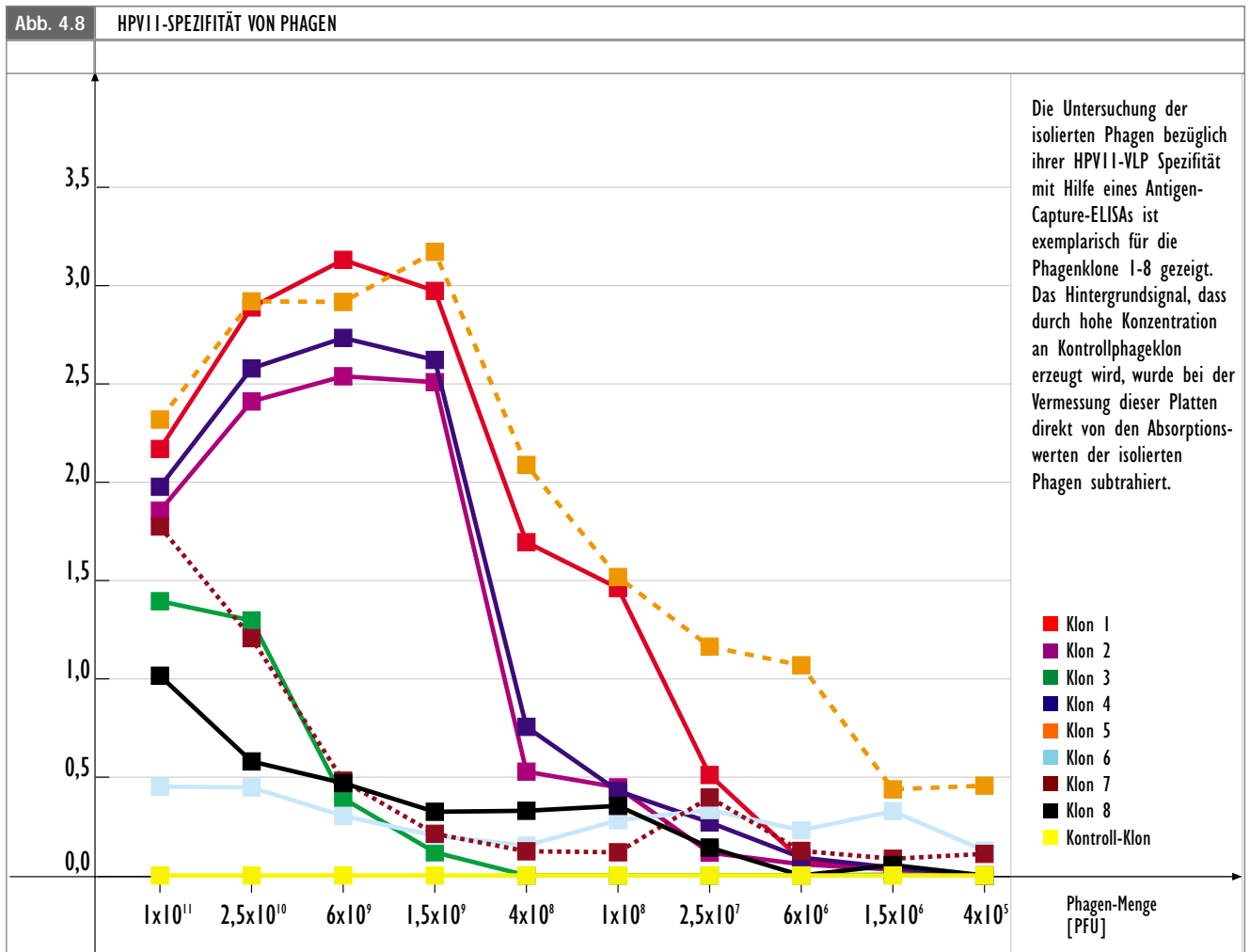
Nach der zweiten Runde der Affinitätsselektion wurden 1,72x10<sup>5</sup>, nach der dritten 1,5x10<sup>6</sup> Phagen von den HPV11-VLPs eluiert. Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 10<sup>4</sup> für Phagen mit einer HPV11-spezifischen Peptidsequenz. Von der PBS-Kontrolle wurden nach drei Runden Selektion 7x10<sup>2</sup> Phagen eluiert, eine 5000fach geringere Menge die als Hintergrund (*Background*) offenbar an das verwendete Plastikmaterial oder den Blockpuffer (3%BSA/ 0,1%Tween20) adsorbierte. Nach drei Anreicherungs- und Selektionsrunden wurden die verbliebenen Phagen durch Isolierung einzelner Plaques erhalten. Nach Amplifikation und Bestimmung des Phagentiters wurden die isolierten Phagenklone auf ihre Spezifität für HPV11-VLPs hin getestet.

#### 4.2.3.2. Überprüfung der isolierten Phagen auf HPV11-VLP Spezifität mittels Antigen-Capture-ELISA



Eine VLP-Präparation enthält auch kontaminierende Proteine, die bei gleicher Dichte wie HPV11-VLPs im CsCl-Gradienten bandieren. Um HPV-11 spezifische Phagen von solchen unterscheiden zu können, die mit diesen Verunreinigungen oder dem Plastikmaterial interagierten, wurde die HPV11-Spezifität der Phagen mittels Antigen-Capture-ELISA ermittelt. Die 96-Loch U-Bodenplatten wurden dazu mit dem HPV11-spezifischen, monoklonalen Antikörper A3.2 (*N. Christensen et al, 1991; Verdünnung 1:2000, ca.500ng/well*) beschichtet. Dadurch wurde gewährleistet, dass nach Blocken unspezifischer Bindestellen ausschließlich HPV11-VLPs an die Platte bzw. den Antikörper adsorbieren konnten. Je eine Reihe der Platte wurde mit einem der isolierten Phagen in abnehmender Konzentration beschickt, das Experiment ist in Abschnitt 3.7.2 ausführlich beschrieben. Phagen, die spezifisch mit HPV11-VLPs interagierten, wurden über einen Peroxidase-gekoppelten, für M13-Bakteriophagen spezifischen Antikörper nachgewiesen und durch Zugabe des HRP-Substrates detektiert. In Abbildung 4.8 sind 8 getestete Phagen dargestellt.

Zur weiteren Kontrolle wurde die Extinktion bei 450nm ohne Zugabe von HPV11-VLPs untersucht, d.h. die 96-Loch Platten wurden mit PBS-Puffer beschickt, geblockt und anschließend mit den Phagen in gleicher Konzentration beladen, um unspezifisch an den Blockpuffer adsorbierte Phagen evaluieren zu können. Keiner der Phagen reagierte bei diesem Ansatz stark (*nicht gezeigt*).



Ein Phagenklon wurde als HPV11-spezifisch definiert, wenn eine zum Kontrollklon vergleichbare Reaktivität im ELISA bei einer um mindestens den Faktor 100 höheren Verdünnung erhalten wurde. Der als Negativkontrolle für HPV11-VLP-Spezifität im ELISA verwendete Kontrollklon wurde aus der ursprünglichen, unselektierten Phagen-Peptidbibliothek isoliert. Die Wahrscheinlichkeit, dabei einen HPV11-spezifischen Phagen zu isolieren, wurde bei  $1,3 \times 10^9$  verschiedenen repräsentierten Peptidsequenzen als gering angesehen.

Das Diagramm 4.8 stellt das Ergebnis beispielhaft für 8 untersuchte Phagenklone dar, die auf Spezifität für HPV11-VLPs hin untersucht wurden. Hierbei wurden die Phagen 1, 2, 4 und 5 als HPV11-VLP spezifisch, die Phagen 3, 6, 7 und 8 als unspezifisch gewertet.

Von ursprünglich 70 isolierten Phagen wurden 30 als HPV11-spezifisch definiert. Die Ergebnisse für alle isolierten Phagen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. HPV11-spezifische Phagen wurden anschließend durch Sequenzierung weiter charakterisiert.

Tabelle 4.5				ZUSAMMENFASSUNG DER HPV11-VLP SPEZIFITÄT VON 70 PHAGENKLONEN, DIE NACH DREI RUNDEN AFFINITÄTSELEKTION ISOLIERT WURDEN					
Phagen-Bezeichnung	Ergebnisse der einzelnen ELISAs			HPV11-Spezifität des Phagenklons	Phagen-Bezeichnung	Ergebnisse der einzelnen ELISAs			HPV11-Spezifität des Phagenklons
Klon 1	-	+	+	Positiv	Klon 36	+	+		Positiv
Klon 2	-	+	+	Positiv	Klon 37	-	+		
Klon 3	-	-	-		Klon 38	+	+	-	Positiv
Klon 4	-	+	+	Positiv	Klon 39	-	-		
Klon 5	-	+	+	Positiv	Klon 40	-	-		
Klon 6	-	-			Klon 41	-	-		
Klon 7	+	+		Positiv	Klon 42	-	+	-	
Klon 8	+	-	+	Positiv	Klon 43	-	+	-	
Klon 9	-	+	+	Positiv	Klon 44	-	-		
Klon 10	-	-			Klon 45	-	-		
Klon 11	-	-			Klon 46	+	-	-	
Klon 12	+	+		Positiv	Klon 47	-	+	-	
Klon 13	-	+	+	Positiv	Klon 48	-	-		
Klon 14	+	+		Positiv	Klon 49	-	-		
Klon 15	+	+		Positiv	Klon 50	+	-	-	
Klon 16	-	-			Klon 51	-	+	-	
Klon 17	-	-			Klon 52	+	+	+	Positiv
Klon 18	-	-			Klon 53	+	-	+	Positiv
Klon 19	+	+		Positiv	Klon 54	-	-	-	
Klon 20				Verlust	Klon 55	+	-	+	Positiv
Klon 21	+	+		Positiv	Klon 56	+	+	+	Positiv
Klon 22	+	+		Positiv	Klon 57	-	-	-	
Klon 23	+	+		Positiv	Klon 58	-	-	-	
Klon 24	-	-			Klon 59	-	-	-	
Klon 25	+	+		Positiv	Klon 60	+	+	+	Positiv
Klon 26	+	-	+	Positiv	Klon 61	+	-	-	
Klon 27	+	+		Positiv	Klon 62	-	-	+	
Klon 28	-	+	+	Positiv	Klon 63	-	-	+	
Klon 29	-	+	+	Positiv	Klon 64	+	-	+	Positiv
Klon 30	+	+	-	Positiv	Klon 65	-	-		
Klon 31	+	+	-	Positiv	Klon 66	-	-		
Klon 32	-	-			Klon 67	-	-		
Klon 33	+	-	-		Klon 68	-	-		
Klon 34	-	-			Klon 69	+	-	-	
Klon 35	-	-			Klon 70	-	-		

Jeder Phage wurde zweimal mit dem beschriebenen ELISA getestet. Bei einem unklaren Ergebnis wurde der entsprechende Phage ein weiteres Mal getestet.

#### 4.2.3.3. Sequenzen HPV11-LI VLP spezifischer, rekombinanter Phagen

Um die für HPV11-VLPs spezifischen, rekombinanten Peptidsequenzen ermitteln zu können, wurde die im Bakteriophagen vorliegende Einzelstrang-DNA aufgereinigt und präzipitiert (*Kapitel 3.5.7*).

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Sanger (*Sanger et al, 1977*).

Aus 30 sequenzierten Phagenklonen ergaben sich schließlich 18 unterschiedliche Sequenzen.

Abb. 4.9		PEPTID- UND NUKLEOTIDSEQUENZEN VON HPV11-SPEZIFISCHEN, REKOMBINANTEN PHAGENKLONEN						
Bezeichnung des Phagenklons	Peptid-Sequenz Nukleotid-Sequenz							Vorherige Bezeichnung des Klons in Tab. 4.3
PD11-1	H cat	P cct	P cct	D gat	L ctt	Y tat	I att	1
PD11-2	S tcg	I att	Y tat	K aag	W tgg	P cct	Y tat	2, 4, 29, 31, 55 (5x)
PD11-3	F ttt	W tgg	P cct	E gag	W tgg	Y tat	N aat	5, 9 (2x)
PD11-4	Q cag	V gtg	T acg	E gag	N aat	W tgg	I att	7
PD11-5	G ggg	F ttt	L ctt	P cct	W tgg	W tgg	Y tat	8, 26, 38 (3x)
PD11-6	S tct	S tcg	Q cag	W tgg	M atg	Y tat	F ttt	12
PD11-7	Q cag	L ctg	V gtt	G ggg	D gat	L ctg	T acg	13
PD11-8	S tcg	L ctt	Y tat	T acg	M atg	L ctg	H cat	14
PD11-9	T acg	S tcg	W tgg	P cct	M atg	S tcg	H cat	15
PD11-10	V ggt	S agt	W tgg	P cct	L ctg	P ccg	W tgg	19
PD11-11	G ggt	F ttt	L ctt	P cct	D gat	W tgg	Y tat	22, 27 (2x)
PD11-12	S tcg	I att	Y tat	V gtg	W tgg	P ccg	N aat	23, 25, 36, 64 (4x)
PD11-13	V gtg	W tgg	A gcg	S tct	Q cag	M atg	F ttt	52
PD11-14	M atg	M atg	P cct	W tgg	G ggt	L ctt	F ttt	53
PD11-15	Y tat	N aat	W tgg	P cct	L ctg	P cct	Y tat	60
PD11-16	T acg	S tct	W tgg	P ccg	Y tat	P ccg	Y tat	28, 56 (2x)
PD11-17	M atg	G ggt	W tgg	L ctt	S tct	Y tat	I att	30
PD11-18	Y tat	S tcg	W tgg	P cct	I att	L ttg	H cat	21

Alle Peptide werden sowohl N-terminal, als auch C-terminal von Cystein-Resten flankiert. Die Bezeichnung der Phagen/Peptide wurde im Vgl. zu Tabelle 4.3 geändert.



Erwartungsgemäß ergab ein Vergleich aller Peptidsequenzen kein auffälliges Konsensus-Bindemotiv, da das virale Kapsid vermutlich mehr als ein exponiertes Epitop präsentiert, das sich zur Interaktion mit komplementären, spezifisch interagierenden Motiven eignet. In den HPV11-spezifischen Peptidsequenzen kommen auffallend oft die Aminosäuren Tryptophan, Prolin und Tyrosin vor. Da mit zyklischen Peptiden oftmals starke Interaktionspartner identifiziert werden, die keine Homologien zu bekannten Liganden aufweisen – solche Peptide bezeichnet man als Mimotop (*Matthews und Wells, 1993*) – sind meist keine Rückschlüsse bezüglich der Kapsidoberfläche möglich. Die Anwesenheit von Trp deutet aufgrund seiner aromatischen Seitenkette auf hydrophobe Wechselwirkungen mit dem VLP hin. Prolin zwingt das Peptid in eine starrere Struktur, dies könnte wiederum bei der chemischen Rekonstruktion der Peptide von Vorteil sein.

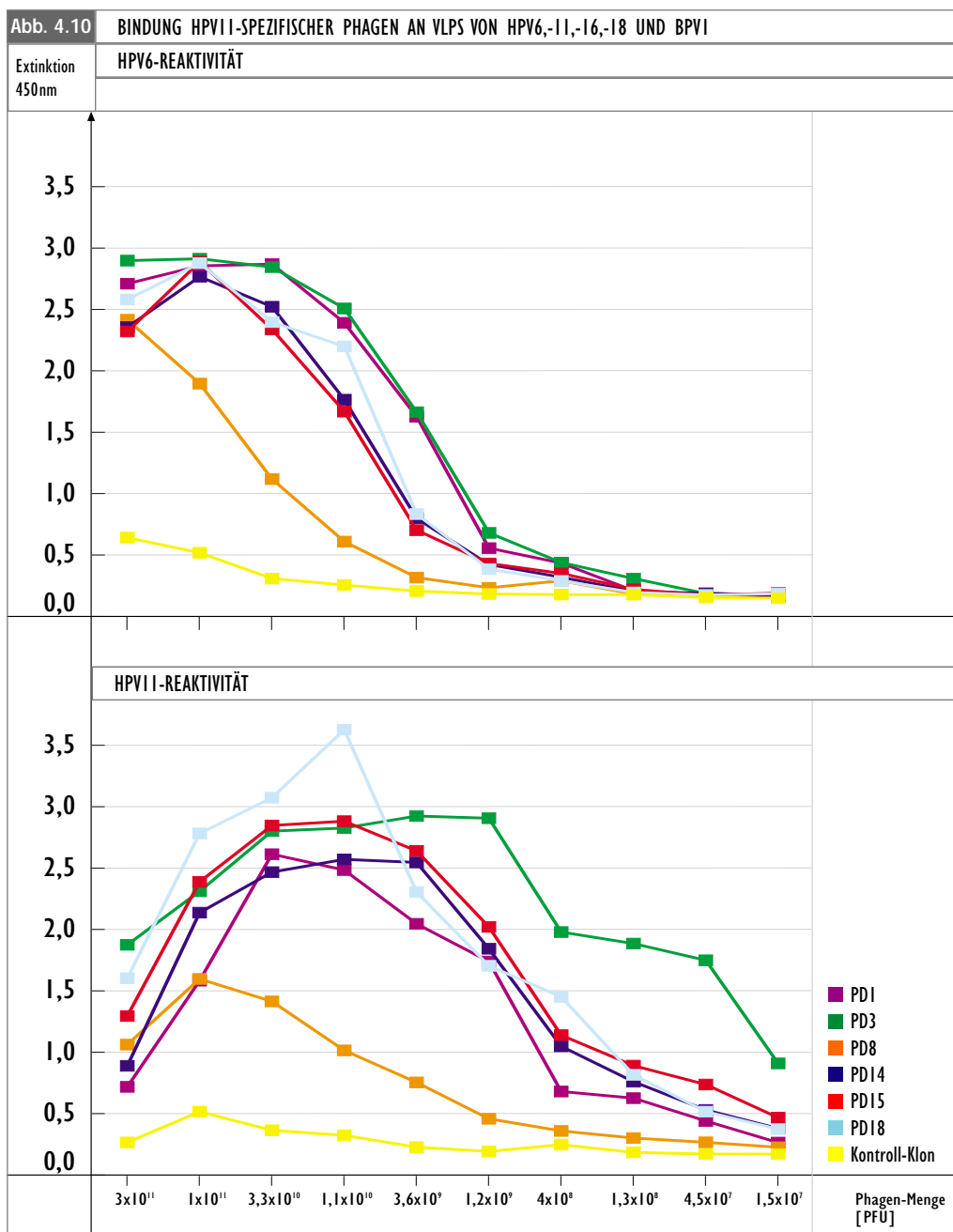
### 4.3. Charakterisierung von HPV11-spezifischen, rekombinanten Phagenklonen

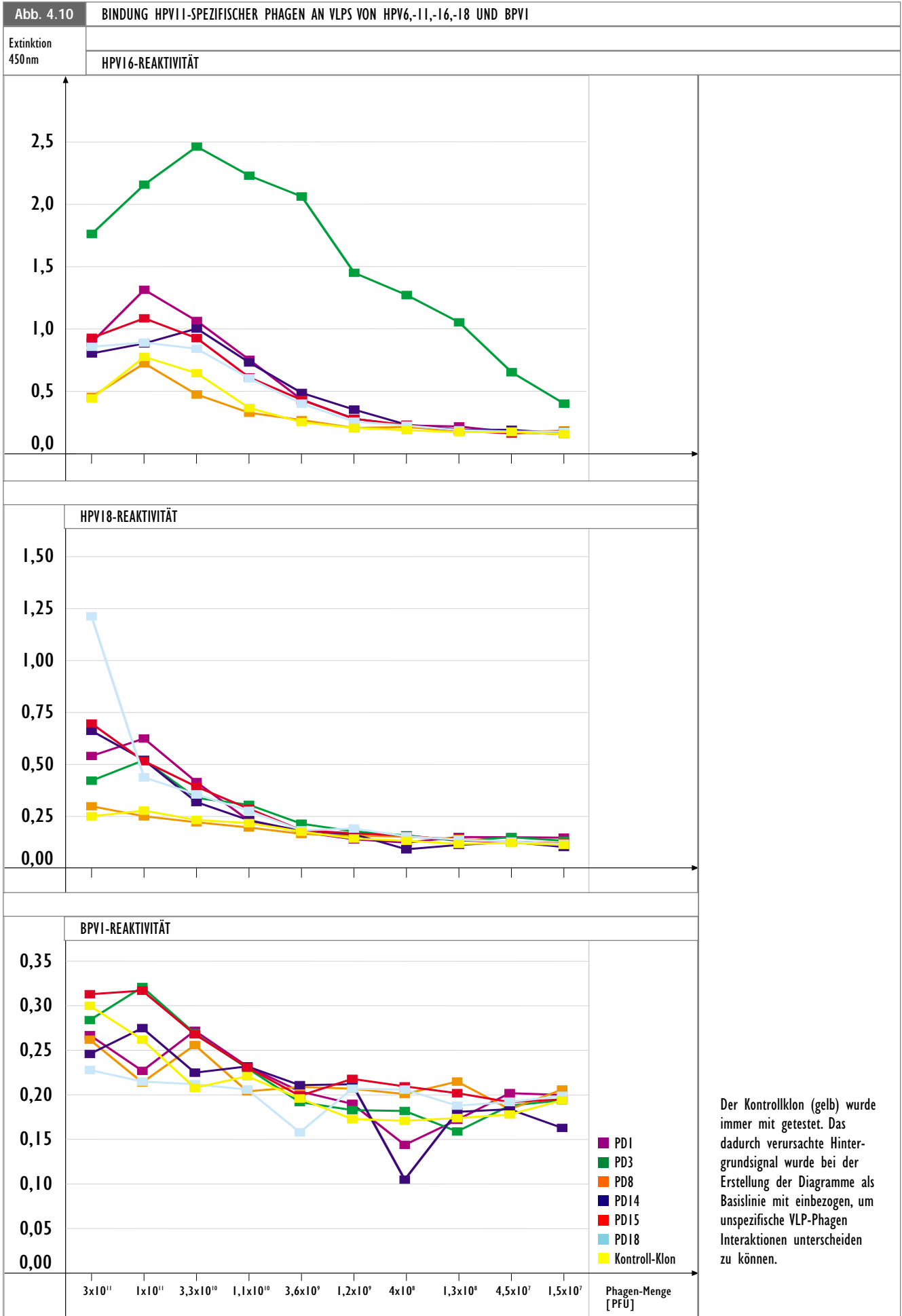
#### 4.3.1. Bindung von HPV11-spezifischen Phagenklonen an eine Auswahl verschiedener Papillomavirus-Typen

Papillomaviren zeichnen sich durch eine hohe Wirts- und Gewebespezifität aus. Ebenso sind auch die meisten neutralisierenden Antikörper gegen verschiedene Papillomaviren typenspezifisch (*Christensen et al, 1994; 1996a und b; Heino et al, 1995; Kulski et al, 1998*). Im Gegensatz dazu ergaben vorausgegangene Zellbindungstudien mit VLPs bzw. Virionen, dass unterschiedliche PV-Typen zunächst an denselben Rezeptor auf Wirtszellen binden (*Roden et al, 1994; 1995; Müller et al, 1995; Volpers et al, 1995; Qi et al, 1996*). Daher müsste das Epitop des viralen Kapsids, das für die Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle verantwortlich ist, bei verschiedenen PV-Typen strukturell homolog sein. Ein HPV11-spezifisches Peptid mit einer bindungsinhibitorischen Aktivität kann möglicherweise auch die Bindung anderer PV-Typen an Zellen blockieren und damit eine universelle inhibierende Struktur für ein anti-papillomavirales Therapeutikum liefern.

Die HPV11-spezifischen Phagenklone wurden mit virus-ähnlichen Partikeln, bestehend aus dem Hauptstrukturprotein L1 der HPV-Typen 6b, -16 und -18 sowie dem bovinen Typ BPV1 auf Kreuzreaktivität hin untersucht. Diese Auswahl repräsentiert Papillomavirus-Typen unterschiedlichen Verwandtschaftsgrades und von denen bekannt ist, dass sie Maus-Erythrozyten über einen proteinogenen Rezeptor kompetitiv vernetzen können (*agglutinieren; Roden et al, 1995*). Insbesondere für HPV6b werden kreuzreaktive Phagenklone erwartet, da die Aminosäuresequenzen des Hauptstrukturproteins L1 von HPV6b und HPV11 zu 92% identisch sind. Beide sind für das Krankheitsbild der wiederkehrenden, laryngealen Papillomatose verantwortlich. HPV16 und -18 sind häufig mit Zervixkarzinomen assoziiert und deshalb besonders gut erforscht. BPV1 wurde als Vertreter eines tierpathogenen Papillomavirus ausgewählt.

Kreuzreaktive Phagenklone wurden über einen ELISA ermittelt. Die Platten wurden dazu mit 150ng VLPs pro Loch beladen und nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit seriellen 1:3 Verdünnungen einer Phagenklon-Präparation pro Reihe inkubiert. Die fünf Papillomavirus-Typen wurden stets parallel untersucht, ein Kontroll-Phagenklon wurde immer mit einbezogen, um unspezifische und spezifische Bindungen unterscheiden zu können. Die Phagenklone PD4, -9 und -10 standen für weiterführende Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung. Abbildung 4.10 (nächste Seiten) zeigt als Beispiel das Ergebnis eines Kreuzreaktivitäts-Experimentes mit den Phagenklonen PD1, -3, -8, -13, -14 und -17.





Alle in Abb. 4.10 gezeigten Phagenklone binden an HPV6b, der Klon PD3 reagiert auch mit HPV16 kreuz. Mit HPV18 und BPV reagierte keiner der gezeigten Phagen. Für PD8 ist das Ergebnis mit HPV6b und HPV11 uneindeutig. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, wurde das Experiment mit allen Phagenklonen 3-5 mal wiederholt. In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Kreuzreaktivitätsbestimmungen aller Phagenklone zusammengefasst.

Die erhaltenen Ergebnisse erlaubten außerdem eine Abschätzung von der Affinität der rekombinanten Phagenklone bezüglich HPV11. Die Affinität ist als geschätzter Faktor in der Tabelle mit angegeben.\*

Tabelle 4.6 KREUZREAKTION VON HPV11-SPEZIFISCHEN PHAGENKLONEN UND ANDEREN PV-TYPEN						
Phagen-Klon	Papillomavirus-Typ					Relative Affinität zu HPV11
	HPV6	HPV11	HPV16	HPV18	BPV1	
PD1	+ + + + +	+ + + + +	- - - - -	- - - - -	- - - - -	200
PD2	± + - -	± - + -	± - - -	- - - -	- - - -	Negativ
PD3	+ + +	+ + +	+ + +	+ - - -	- - - -	10.000
PD5	- - - -	+ + + +	- - - -	- + + +	- - + + +	200
PD6	- - - -	± ± + ±	+ ± - - -	- - - - -	- - - - -	50 schwach
PD7	+ - + + +	+ ± + + +	+ - - - -	± + - - -	- - - -	100
PD8	+ + ± ± +	+ + + ± +	+ - - - -	+ - - - -	- - - -	100
PD11	- - - - -	+ + + + +	+ - - + +	+ + + + +	- + + + +	1.000
PD12	+ + + + -	+ + + + +	- - - - +	- - - ± -	- - - ± -	100
PD13	+ + + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	1.000
PD14	+ + + + +	+ + + + +	± - + - -	± - - ± -	- - - - -	1.000
PD15	- ± + +	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	100
PD16	- - - -	± - ± +	- - - -	- - - -	- - - -	50 schwach
PD17	± + ± +	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	200
PD18	+ + +	+ + +	- - -	- ± -	- - -	500

Untersuchung HPV11-spezifischer Phagen auf Kreuzreaktion mit L1-Kapsiden anderer Papillomavirustypen, Zusammenfassung aller Experimente.  
+ spezifische Interaktion mit jeweiligem Kapsid,  
- keine Interaktion,  
± Ergebnis uneindeutig, wobei jedes Symbol dem Ergebnis eines Experimentes entspricht.

Der Phagenklon PD2 erzeugte bei diesem Experiment kein signifikantes Signal bezüglich HPV11, er wird nachträglich als HPV11-negativ definiert. Die HPV11 bezogene, relative Affinität der Phagenklone PD6 und PD16 ist zudem mit Faktor 50 sehr niedrig, sie erzeugten dennoch ein über dem Hintergrund befindliches Signal und werden weiterhin als HPV11-spezifisch angesehen. Zehn von nunmehr 17 HPV11-spezifischen Phagenklonen binden auch spezifisch an HPV6b. PD11 bindet an alle PV-Typen außer HPV6b, PD3 bindet an HPV6 und 16, PD5 bindet an HPV18 und BPV. Erwartungsgemäß reagierten die meisten mit HPV11 isolierten Phagenklone mit HPV6. Kreuzreaktive HPV11-spezifische Phagenklone sind in Tabelle 4.7 nochmals zusammengefasst. Kein Phagenklon bindet alle untersuchten PV-Typen, d.h. sofern es eine konservierte Rezeptor-Bindungsstelle auf Kapsiden von verschiedenen Papillomavirus-Typen gibt, binden die identifizierten HPV11-spezifischen Peptide dort nicht direkt.

\* Beispiel aus Abb. 4.10:

Der Kontrollklon erzeugt bei einer Menge von  $1 \times 10^{11}$  Phagen ein Hintergrundsignal von  $E_{450nm} = 0,5$ . Ein vergleichbarer Wert wird von Phagenklon PD1 bei einer Menge von  $1 \times 10^8$  Phagen erzeugt. Die Affinität dieses Phagens ist im abgebildeten Diagramm folglich um den Faktor 1.000 höher. Der in Tab.4.6 angegebene Affinitätsfaktor von 200 für PD1 ergibt sich als Mittel aus den Abschätzungen von 3-5 unabhängigen ELISA-Experimenten.

Tabelle 4.7 ZUSAMMENFASSUNG VON KREUZREAKTIVEN, HPV11-SPEZIFISCHEN PHAGENKLONEN	
Papillomavirus-Typ	Kreuzreaktive Phagenklone
HPV6b	PD1, -3, -7, -8, -12, -13, -14, -15, -17 und PD18
HPV16	PD3 und PD11
HPV18	PD5 und PD11
BPV1	PD5 und PD11

#### 4.3.2. Interaktion von HPV11-VLPs mit Säugetier-Zellen – Beeinflussung der Rezeptorbindung durch HPV11-spezifische Phagen

Obwohl eine therapeutische Anwendung der Kapsidbindungsinhibition nur auf der Basis von kleinen Molekülen praktikabel ist, sollte als Maß für die Spezifität untersucht werden, ob die rekombinanten Phagen die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen blockieren können. Dafür wurde ein VLP-Zellbindungsassay entwickelt (*Abschnitt 3.7.4*) der eine qualitative Aussage über die inhibitorische Aktivität der HPV11-spezifischen Peptidsequenzen im Kontext des Phagenkapsids erlaubt. Der Aufbau des Experimentes deckt sich im Wesentlichen mit dem VLP-Zellbindungsexperiment, das in Abb. 4.23 illustriert ist. Eine Analyse zellassoziierter VLPs mittels Durchfluß-Zytometrie war aufgrund der hohen erforderlichen Phagenmengen nicht möglich (*vgl. Tab. 3.2*). Die Versuche wurden in 96-Loch Platten mit CV1-Zellen durchgeführt. Qi et al, konnten 1996 zeigen, dass HPV6b VLPs (*92% Identität zu HPV11*) in vitro besonders gut an CV1-Zellen binden, die sich damit besser als alle anderen in der Studie getesteten Epithelzellen für VLP-Zellbindungsstudien eignen. Zellgebundene VLPs wurden, wie beim ELISA durch die Substratumsetzung mit Hilfe der Peroxidase des Zweitantikörpers visualisiert.

##### 4.3.2.1. Eigenschaften und Nachweis biotinylierter VLPs

Die HPV11-VLPs wurden zuerst biotinyliert, so dass ein direkter Nachweis von Biotinresten an zellgebundenen VLPs möglich war. Das Biotinylierungsagens markiert die HPV11-VLPs über einen langen „Spacer“-arm mit dem Biotinrest (*Abschnitt 3.6.5*). Damit sollte eine sterische Behinderung der Bindung von VLPs an Zellen sowie eine verminderte Bindung von spezifischen Antikörpern bzw. Phagen an VLPs vermieden werden. Die erfolgreiche Biotinylierung der HPV11-VLPs wurde mittels ELISA überprüft. Abb. 4.11 zeigt den Nachweis biotinylierter und unbehandelter VLPs. Die Biotinylierung der VLPs hat keinen Einfluß auf die Detektierbarkeit durch HPV11-spezifische Antikörper. Damit ist gewährleistet, dass der neutralisierende Antikörper  $\alpha$ HPV11-F1 an biotinylierte VLPs bindet und in diesem VLP-Bindungsassay als Kontrolle für die Bindungsinhibition eingesetzt werden kann (*siehe Abschnitt 4.4.2.1*).

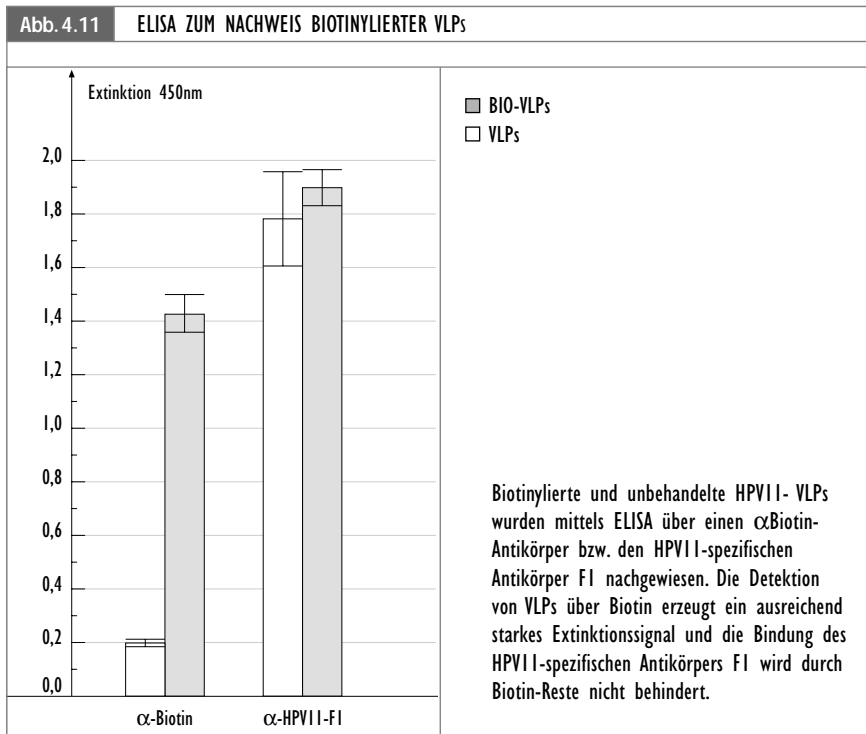
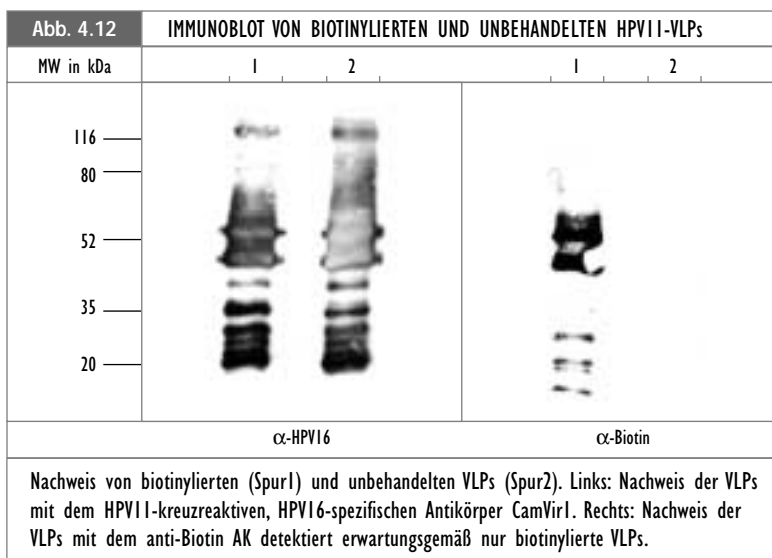
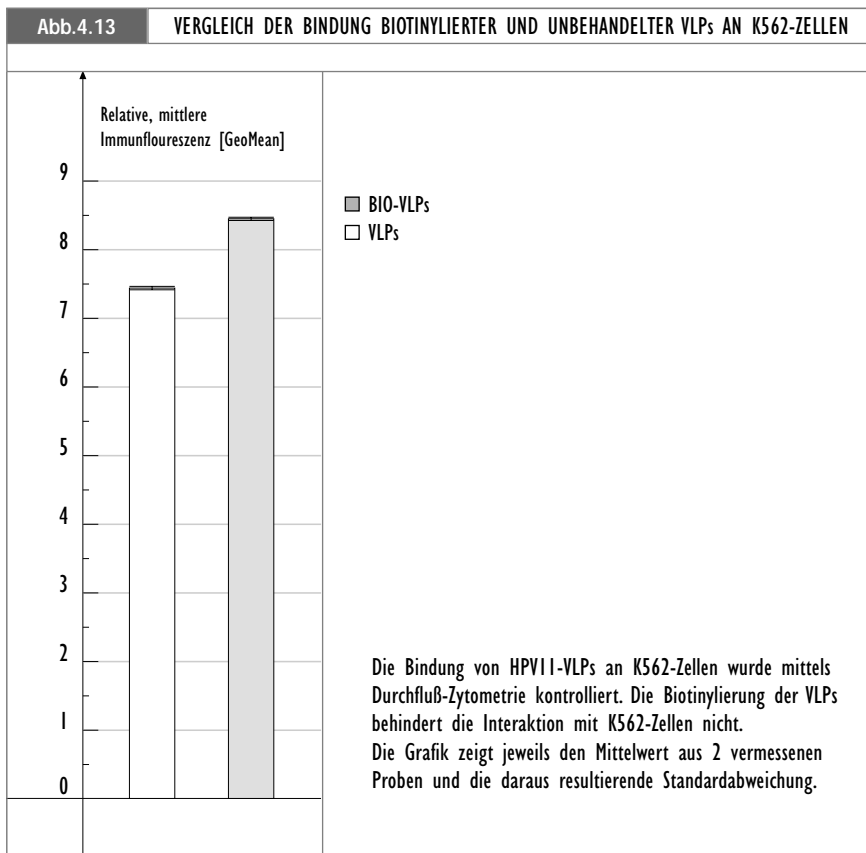


Abb. 4.12 zeigt einen Immunoblot der durchgeführt wurde um sicherzustellen, dass die nachgewiesenen Biotinreste auch tatsächlich kovalent an die VLPs gekoppelt waren.

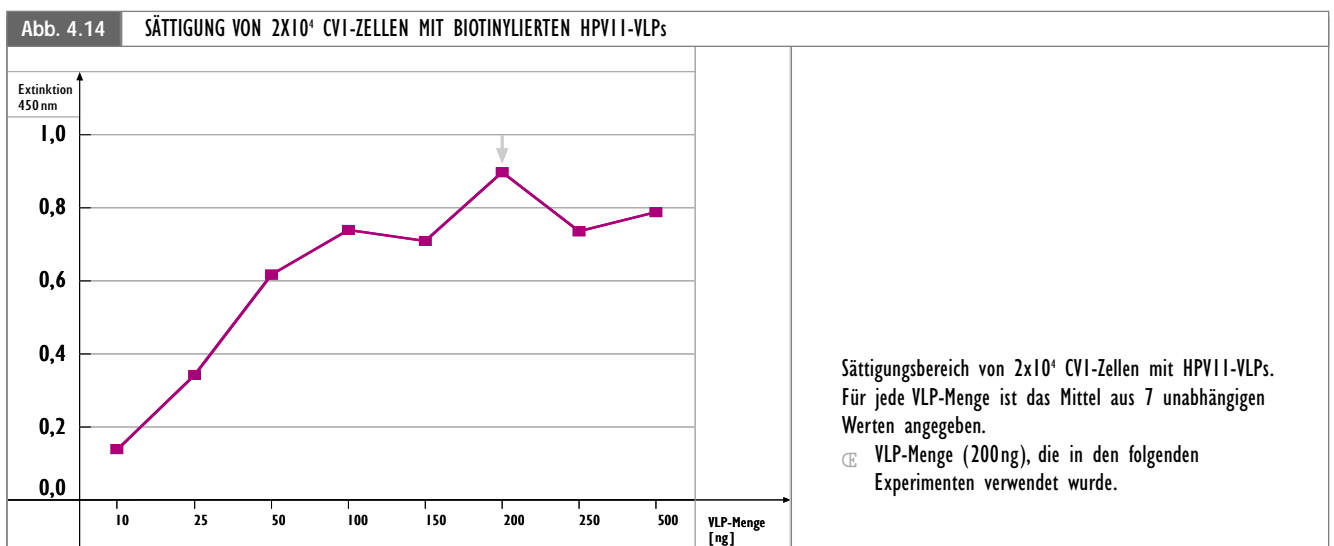


Zusätzlich wurde per Durchfluß-Zytometrie bestätigt, dass die Biotinylierung keinen Einfluß auf die Bindung der VLPs an K562 Zellen hat (Abb. 4.13).



#### 4.3.2.2. Etablierung der experimentellen Bedingungen für den CV1-Zellbindungsassay

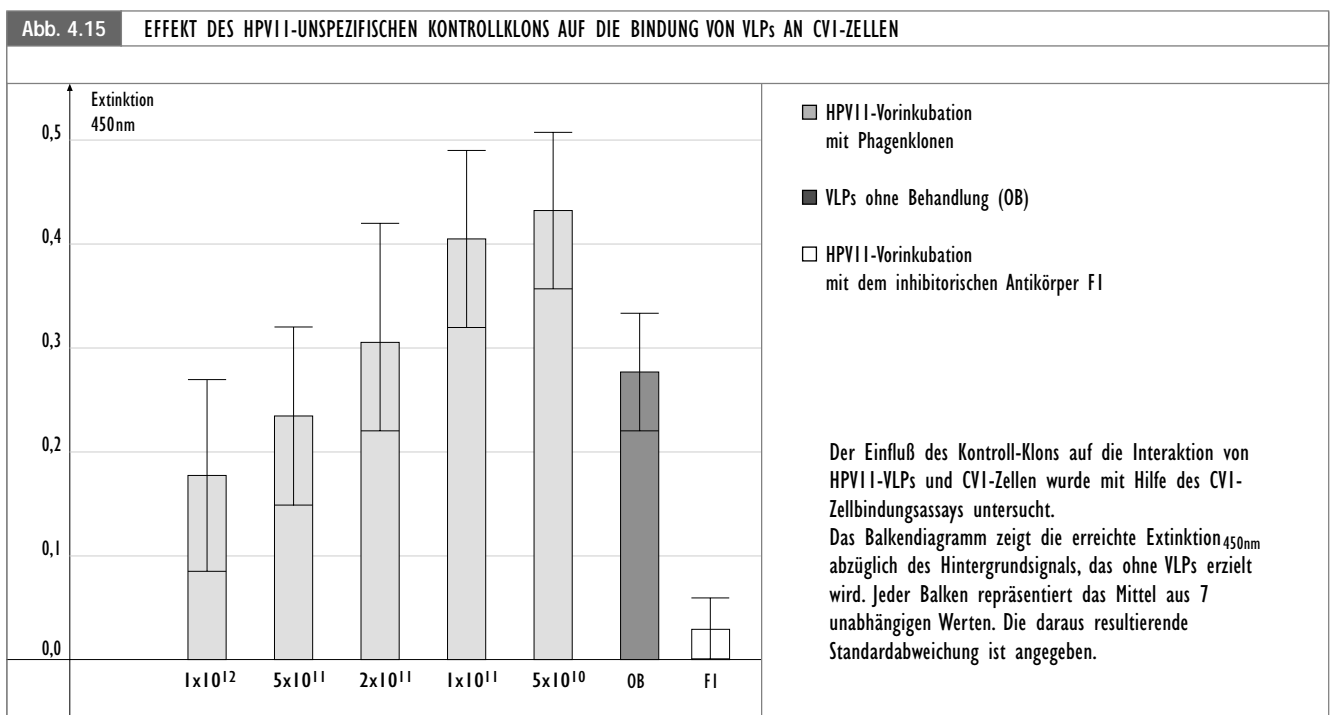
Bevor der Effekt HPV11-spezifischer Phagen auf die Bindung von VLPs an Zellen getestet wurde, sollte die minimale VLP-Konzentration ermittelt werden die gerade notwendig ist, um alle potentiellen Rezeptoren der pro Loch eingesetzten CV1-Zellen abzusättigen (Abb. 4.14). Ein Loch der Platte ist mit  $2 \times 10^4$  CV1-Zellen bewachsen bzw. konfluent.



Für die VLP-Zellbindungstudien wurden schließlich 200ng HPV11-VLPs pro  $2 \times 10^4$  CV1-Zellen verwendet. Dies entspricht  $2 \times 10^5$  VLPs pro Zelle, wobei nicht auf die Anzahl präsentierter Rezeptoren geschlossen werden kann. Bei CV1-Zellen geht man von  $1 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle aus. Diese Anzahl wurde durch den sensitiveren Vergleich von zellgebundenen und im Überstand verbliebenen  $^{35}\text{S}$ -markierten HPV6b-VLPs ermittelt (Qi et al, 1996).

#### 4.3.2.3. Untersuchung der HPV11-spezifischen Phagen auf inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen

Bevor die HPV11-spezifischen Phagenklone untersucht werden konnten, wurde der VLP-Bindungsassay mit dem (HPV11-unspezifischen-) Kontrollklon mehrmals bis zu einer Konzentration von  $1 \times 10^{12}$  Phagen pro 200ng VLPs durchgeführt.\* Es sollte ermittelt werden, ob durch Abundanz von Phagen ein unspezifischer Rückgang der VLP-Bindung an CV1-Zellen erfolgt. In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit dem Kontrollklon gezeigt. Daraus geht hervor, dass bei einer Phagenkonzentration von  $1 \times 10^{12}$  PFU ein Rückgang der VLP-Bindung von 36%, bei  $5 \times 10^{11}$  PFU ein Rückgang von 15% im Vergleich zur Bindung von unbehandelten VLPs erfolgen kann (siehe auch Abb. 4.17). Als Kontrolle für die Inhibition der VLP-Bindung an Zellen wurde der HPV11-spezifische Antikörper F1 in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Ermittlung des optimalen, inhibitorischen Antikörpers, siehe Abschnitt 4.4.2.1). Im Durchschnitt betrug der durch F1 bedingte Rückgang der VLP-Bindung an CV1-Zellen 50% (vgl. Abb. 4.16; in Abb. 4.15 beträgt die F1-bedingte Inhibition 90%).



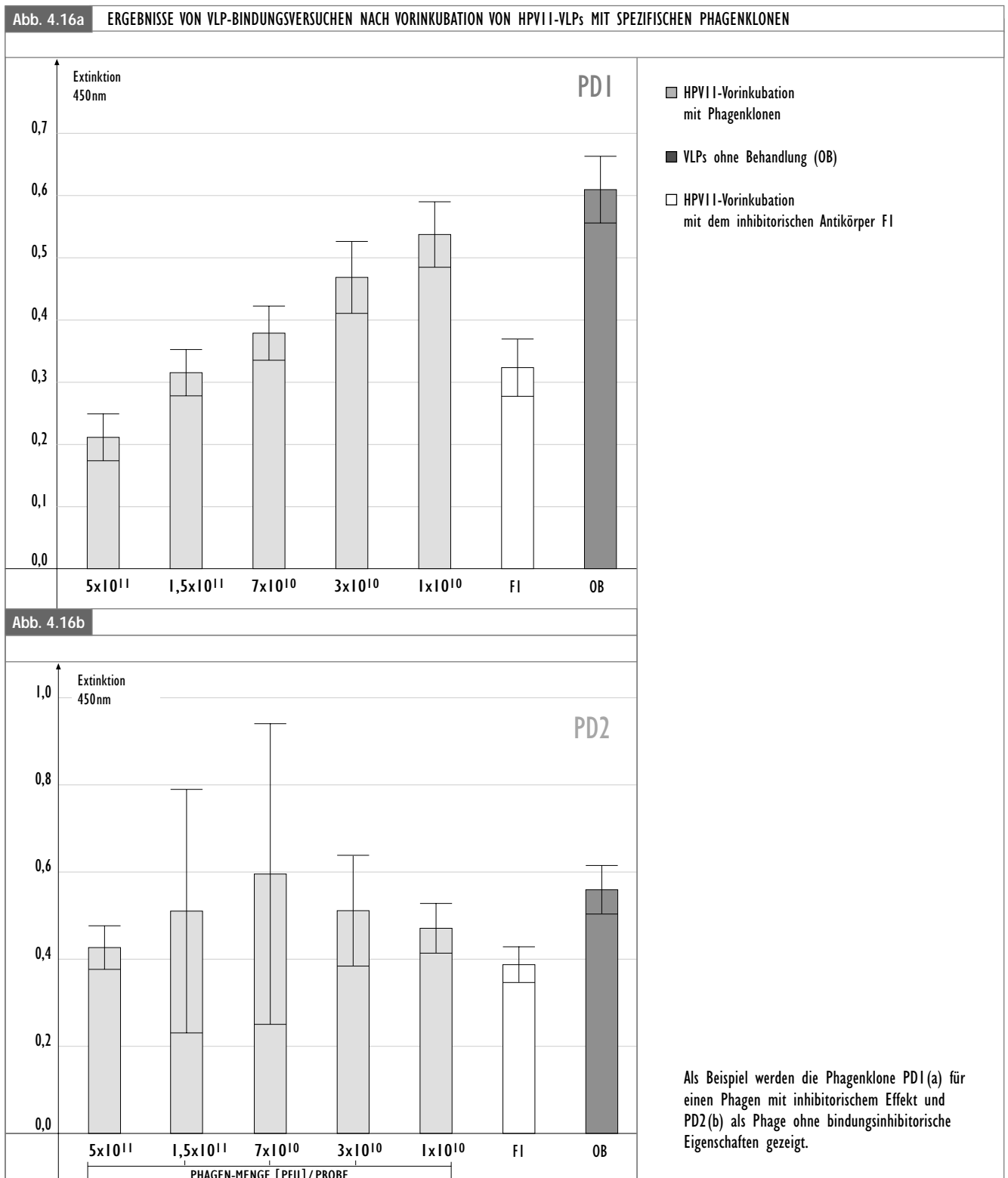
\* Molare Verhältnisse beim CV1-Assay (Abschnitt 3.7.5):

Pro VLP kann es maximal 360 identische Bindungs epitope für Peptide geben, weil das Kapsid aus 360 LI-Proteinen aufgebaut ist. 200ng entsprechen  $6 \times 10^9$  VLPs. Das ergibt maximal  $2 \times 10^{12}$  Epitope, die abzudecken sind. Phagen präsentieren das rekombinante Peptid 3-5 mal innerhalb des Hüllproteins pIII.

Bei  $5 \times 10^{11}$  Phagen entspricht dies annähernd einem molaren Verhältnis von 1:4, bei  $5 \times 10^{10}$  Phagen 2:1 (VLP-Epitope: rekombinante Hüllproteine).



Aufgrund dieser Daten wurde festgelegt, dass HPV11 spezifische Phagen, die bei einer Konzentration von  $7 \times 10^{10}$  Phagen/Probe nicht mindestens eine 40%ige Reduktion der Extinktion<sub>450nm</sub> bewirken, nicht als bindungsinhibitorisch angesehen werden.



Die Ergebnisse für alle rekombinanten, HPV11-spezifischen Phagen bei diesem VLP-Bindungsassay sind in der Tabelle 4.8 und in der Abbildung 4.17 zusammengefasst. Der Rückgang des VLP-Bindungssignals ist als Inhibition in Prozent angegeben.\*

Ein deutlicher Rückgang der VLP-Bindung an CV1-Zellen wird durch VLP-Vorinkubation mit den Phagenklonen PD1, PD3, PD11, PD13, PD14, PD15, PD17 und PD18 bewirkt. Die restlichen Phagenklone hatten bei diesem Experiment keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen. Ein Vergleich von Affinität (Tab. 4.6) und inhibitorischer Aktivität ergibt, dass Phagenklone mit einer höheren Affinität zu HPV11 die VLP-Zell-Interaktion in diesem Experiment stärker beeinflussen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Inhibition die Konsequenz einer sterischen Behinderung der VLP-Rezeptor Interaktion ist.

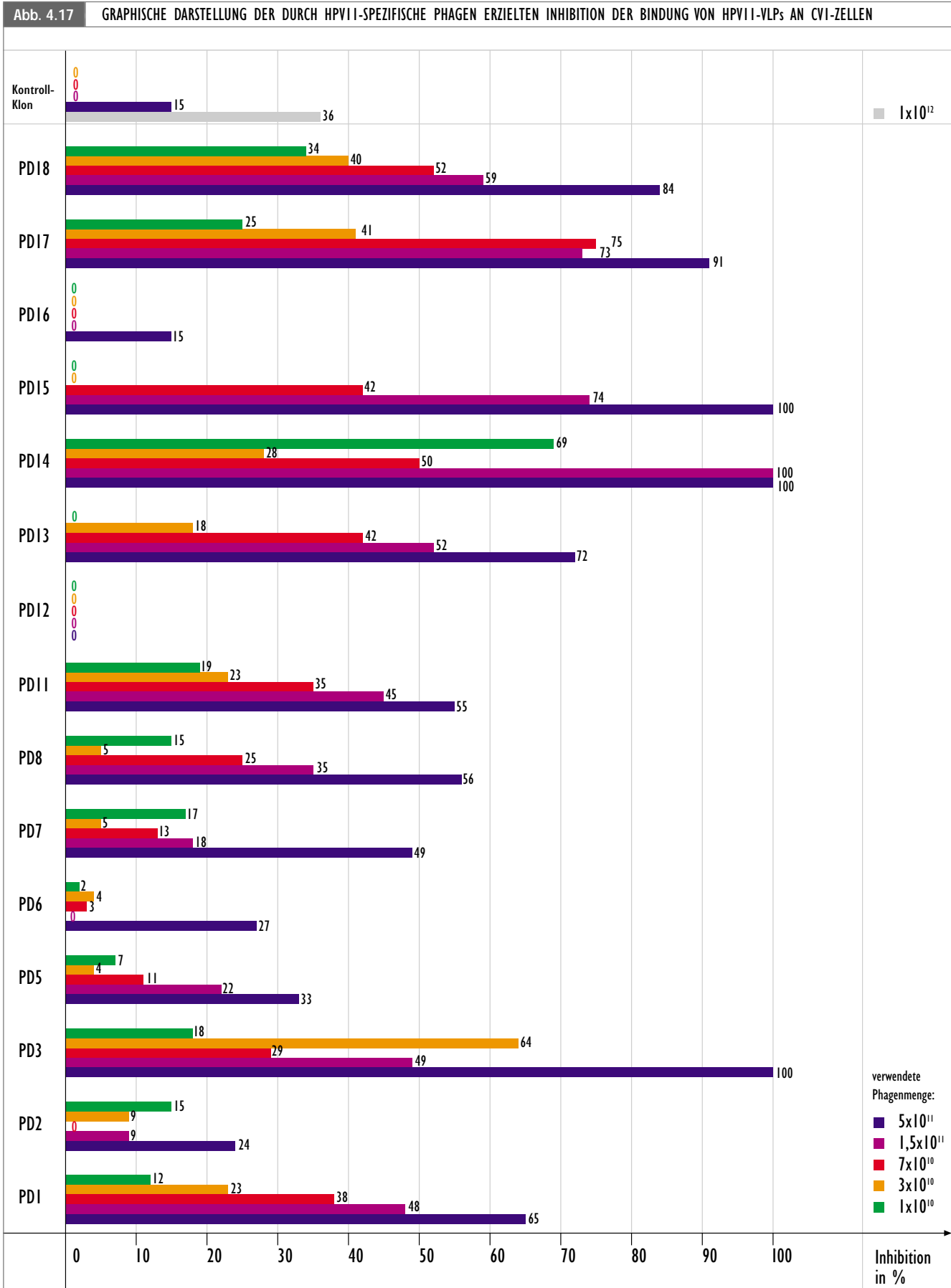
Tabelle 4.8 EINFLUSS VON HPV11-SPEZIFISCHEN PHAGEN AUF DIE BINDUNG VON HPV11-VLPs AN CV1-ZELLEN- ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTE						
Phagenklon	Phagenmenge [PFU], die mit einer Probe VLPs vorinkubiert wurde					Inhibition
	$5 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$7 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	
PD1	65%	48%	38%	23%	12%	ja
PD2	24%	9%	0%	9%	15%	nein
PD3	100%	49%	29%	64%	18%	ja
PD5	33%	22%	11%	4%	7%	ns
PD6	27%	0%	3%	4%	2%	nein
PD7	49%	18%	13%	5%	17%	ns
PD8	56%	35%	25%	5%	15%	ns
PD11	55%	45%	35%	23%	19%	ja
PD12	0%	0%	0%	0%	0%	nein
PD13	72%	52%	42%	18%	0%	ja
PD14	100%	100%	50%	28%	69%	ja
PD15	100%	74%	42%	0%	0%	ja
PD16	15%	0%	0%	0%	0%	nein
PD17	91%	73%	75%	41%	25%	ja
PD18	84%	59%	52%	40%	34%	ja

Angegeben ist der prozentuale Wert der durch Phagen erzeugten Inhibition bezogen auf die VLP-Bindung an CV-1 Zellen.  
 Ja= Der rekombinante Phage hat einen inhibitorischen Einfluß auf die VLP-Bindung.  
 Nein= Der rekombinante Phage hat keinen Einfluß auf den Rückgang der VLP-Bindung.  
 ns= nicht signifikant, die Inhibition ist zu schwach.

\* Die prozentualen Werte ergeben sich aus der Formel:  

$$X\% = \frac{\text{Mittelwert } E_{450\text{nm}} \text{ VLP+Phage} \times 100}{\text{Mittelwert } E_{450\text{nm}} \text{ VLPmax}}$$

$\chi$ =prozentualer Anteil gebundener VLPs  
 Inhibition [%] = 100% -  $\chi$ %



## 4.4. Versuche zur VLP-Bindungsinhibition mit von Phagen abgeleiteten Sequenzen

Über das Phage Display Screening wurden HPV11-spezifische Peptidsequenzen identifiziert. Mit den entsprechenden rekombinanten Phagen konnte in einigen Fällen die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen inhibiert werden. Nun sollte untersucht werden, ob auch die von Phagen abgeleiteten synthetisch hergestellten Peptide über ähnliche inhibitorische Eigenschaften verfügen. Solche Peptide können als Leitstruktur für die Entwicklung eines Medikamentes dienen. Die Herstellung der synthetischen Peptide wurde von Dritten durchgeführt (*siehe Abschnitt 2.9*).

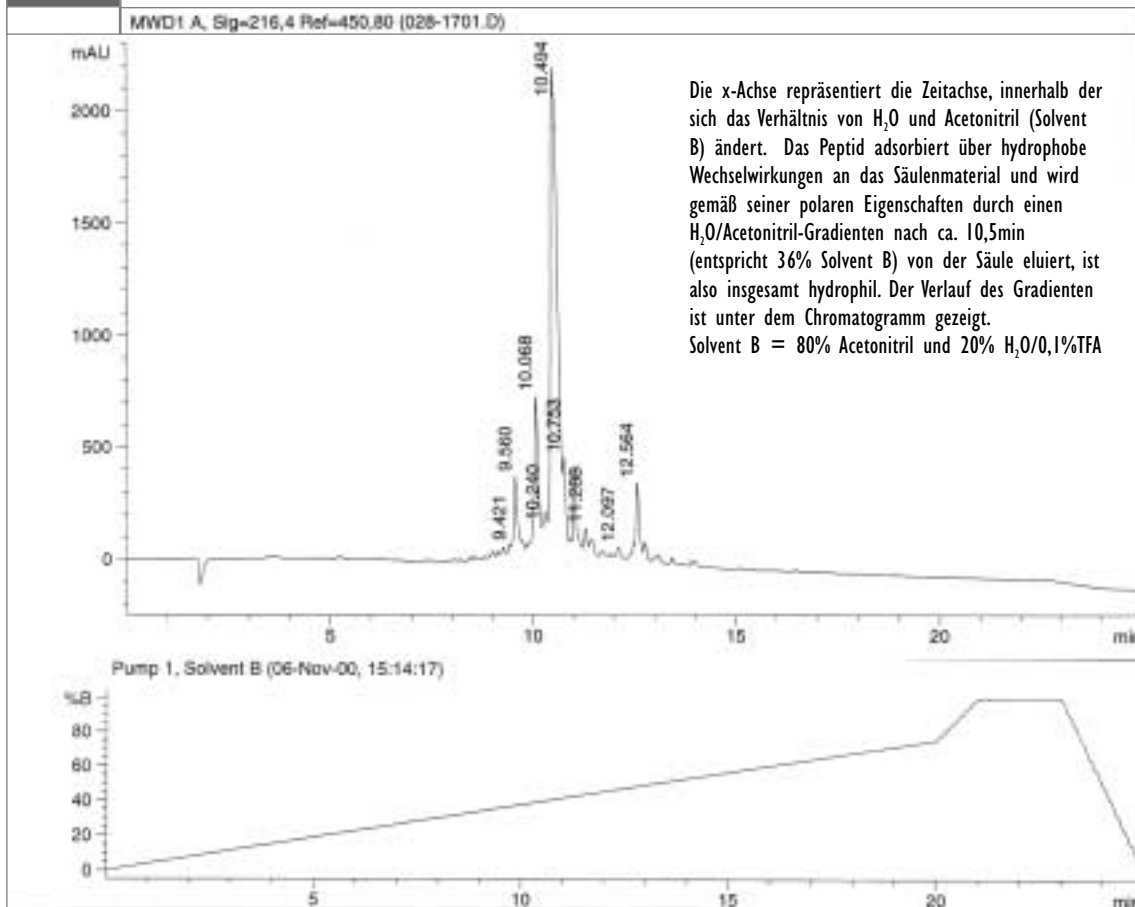
### 4.4.1. Aufreinigung und Oxidation von Cystein-flankierten Peptiden

Die erste Peptidlieferung wurde ohne Angaben zu Reinheit und oxidativem Zustand der Peptide erhalten. Darum wurden die Analyse der Peptide sowie die nachfolgende Aufreinigung und Oxidation selbst vorgenommen. HPLC und massenspektroskopische Analysen wurden in Zusammenarbeit mit der AG Ruppert, ZMBH durchgeführt. Der Verlauf einer Peptidaufreinigung und Oxidation ist nachfolgend am Beispiel des Peptids PD8 dargestellt.

#### 4.4.1.1. Analyse des Peptids PD8 per analytischer HPLC

Abbildung 4.18 zeigt das Chromatogramm einer analytischen HPLC von PD8. Alle achtzehn erhaltenen Peptide wurden auf diese Weise analysiert. Bis auf die Peptide PD2, 5, 6, 8 und 11 waren die Peptide so stark verunreinigt, dass kein klarer Peak sichtbar war („Igeloptik“ des HPLC-Graphen). Diese Peptide wurden verworfen. Eine neue Peptidsynthese wurde von den Firmen Peptide Specialty Laboratories und Pfizer übernommen. Das Molekulargewicht der verbliebenen Peptide PD2, 5, 6, 8 und 11 wurde zunächst über Massenspektroskopie ermittelt, diese wurde von A. Bosserhoff, ZMBH durchgeführt (*Abb. 4.20*). Das theoretische, durchschnittliche Molekulargewicht des Peptids PD8 wurde mit dem Software-Programm Sherpa 3.1.1. ermittelt, es beträgt 1055,3 Da. Nach Bestätigung des korrekten Molekulargewichts wurde das Peptid PD8 über eine präparative HPLC (*Abb. 4.19*) aufgereinigt.

Abb. 4.18 HPLC-CHROMATOGRAMM ZUR ANALYSE DES PEPTIDS PD8 VOR DER AUFREINIGUNG



#### 4.4.1.2. Aufreinigung von PD8 per präparativer HPLC

Die Sauberkeit der peptid-haltigen Fraktionen 35-39 wurde mittels analytischer HPLC überprüft, anschließend wurden die Fraktionen vereinigt und die Reinheit (Abb. 4.20a) sowie das Molekulargewicht (Abb. 4.20b) erneut kontrolliert. Das gesäuberte Peptid konnte schließlich oxidiert werden.

Abb. 4.19. CHROMATOGRAMM DER PRÄPARATIVEN HPLC VON PD8

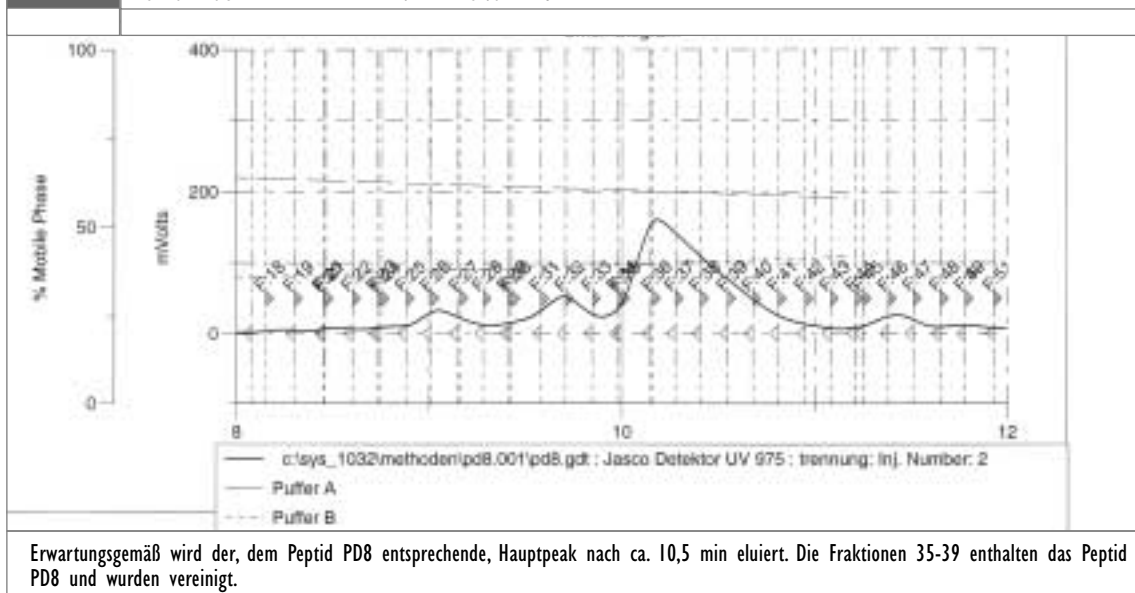


Abb. 4.20a ANALYTISCHE HPLC BESTÄTIGT REINHEIT VON PD8 NACH DER PRÄPARATIVEN HPLC

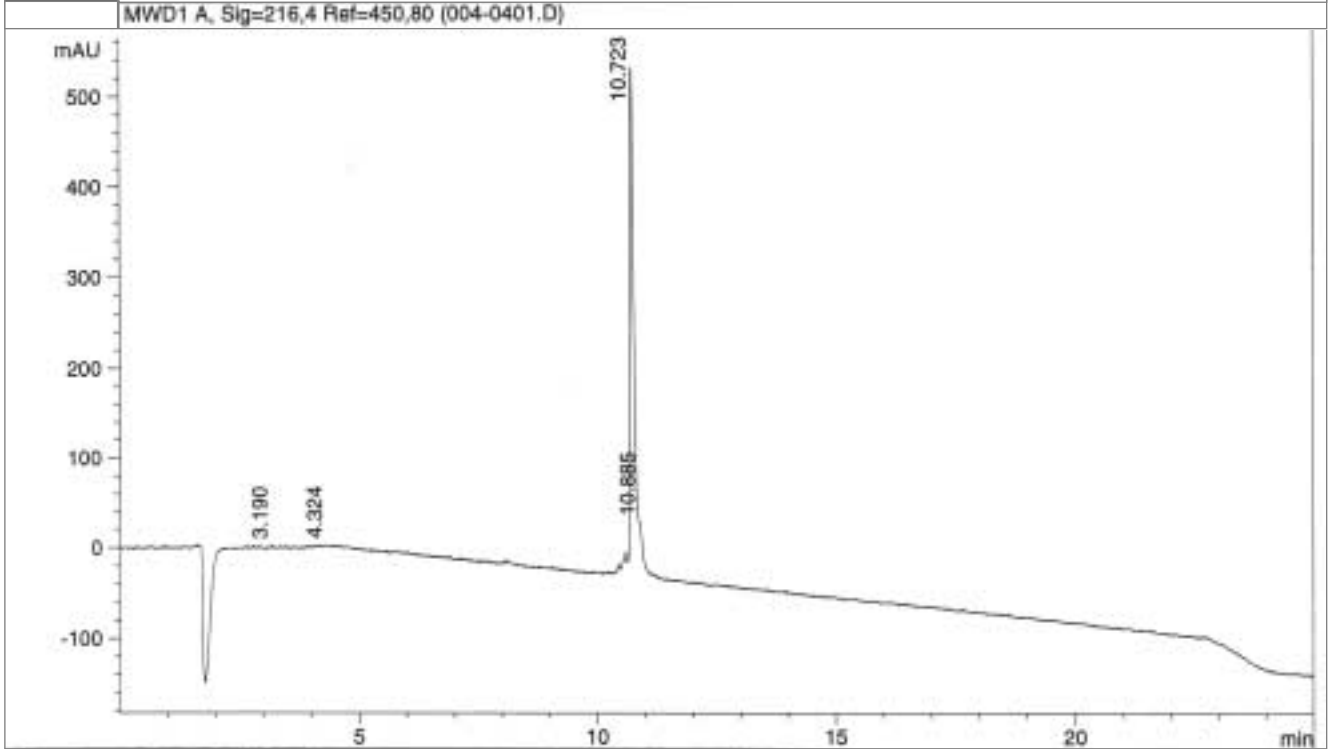
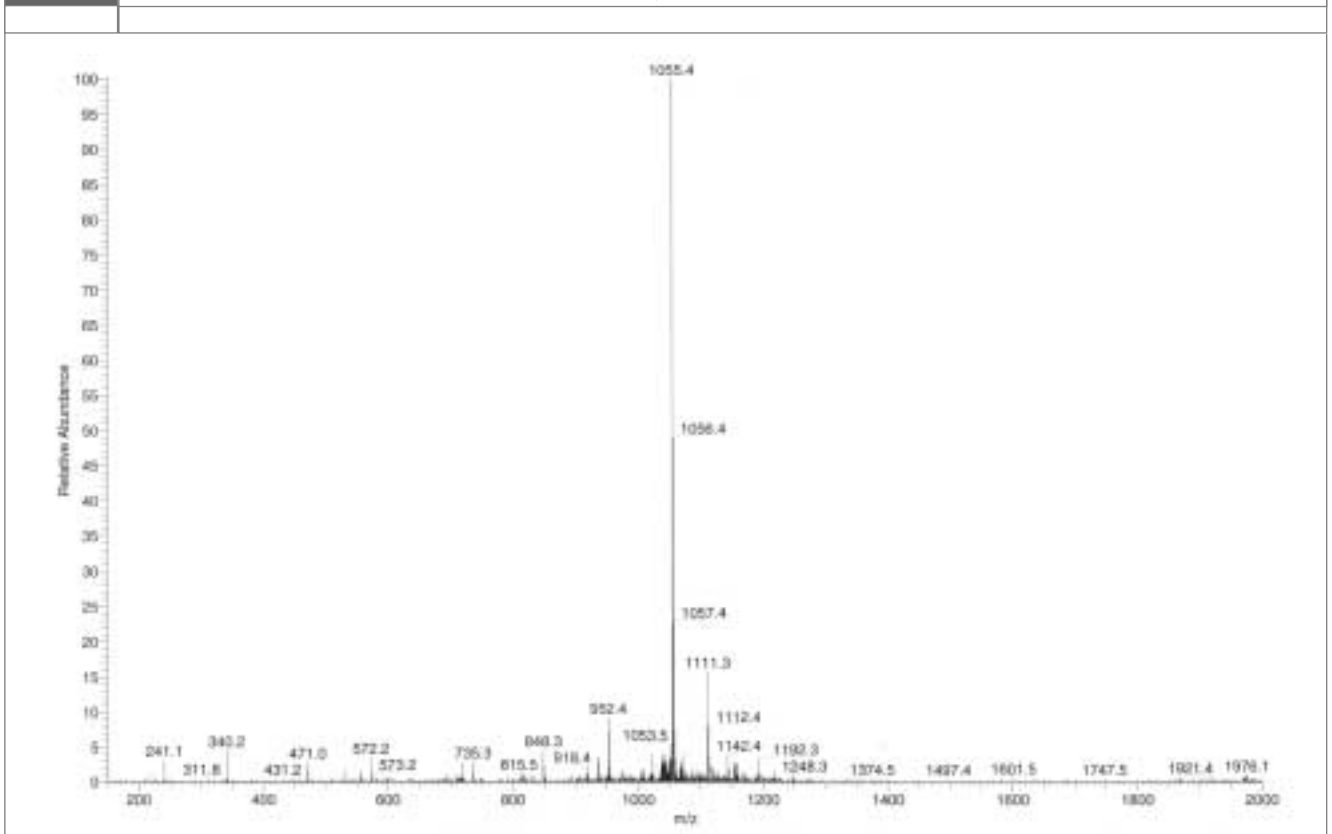


Abb. 4.20b MASSENSPEKTROGRAMM BESTÄTIGT THEORETISCHE MASSE VON 1055,3 DA

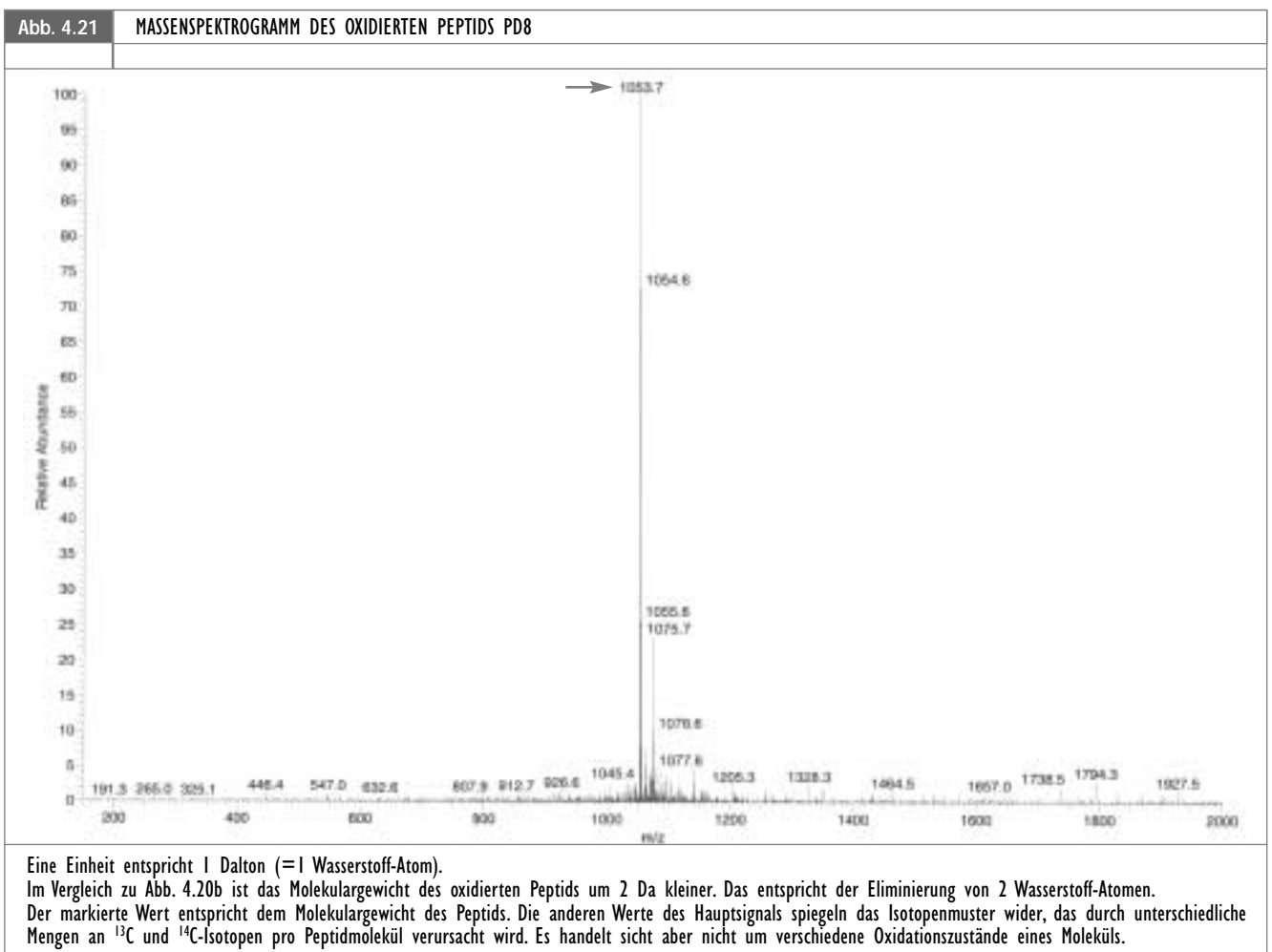


#### 4.4.1.3. Oxidation von PD8

Die Oxidation von PD8 wurde in großem Volumen durchgeführt, um die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zu begünstigen. Der pH wurde mit der flüchtigen Base Ammoniak auf pH 8.5 eingestellt. Durch Begasung der Peptidlösung wurde die Oxidation eingeleitet. Die Oxidation verläuft gemäß der allgemeinen Summenformel:



Der Verlauf der Oxidation (*Abschnitt 3.8.2*) wurde durch Kontrolle des pHs verfolgt und war nach zweistündiger Sauerstoff-Zufuhr abgeschlossen. Das Molekulargewicht des oxidierten Peptids wurde über Massenspektroskopie nachgewiesen, dann wurde die Peptid-Lösung lyophilisiert (*Abb. 4.21*).

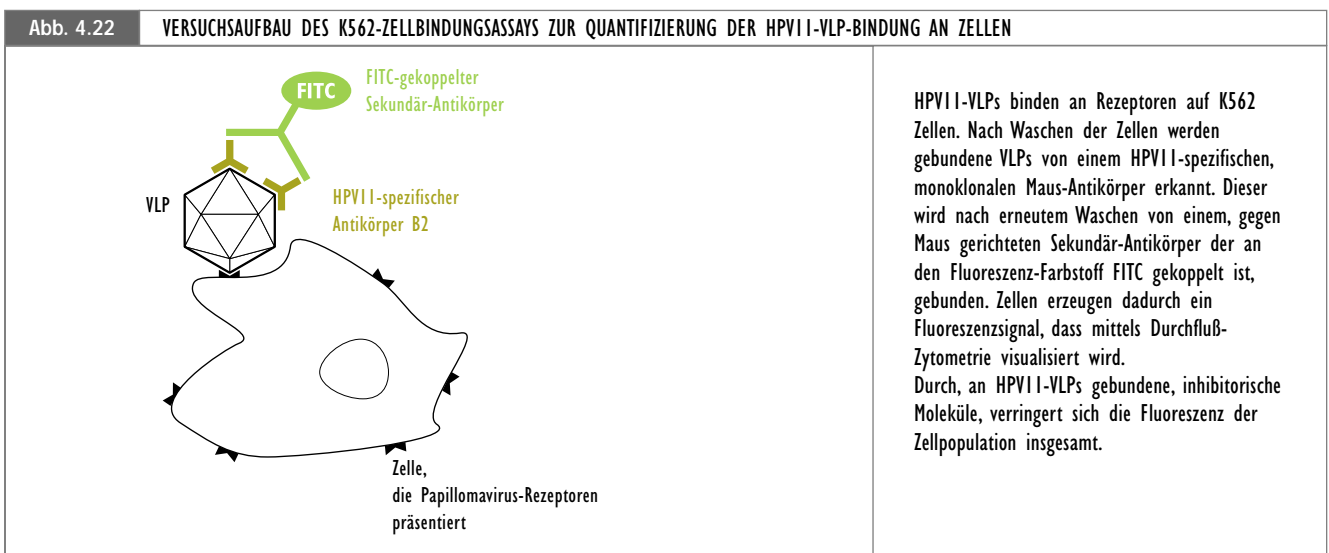


Die Masse hat sich um 2 Dalton von 1055,3 auf 1053,3 Da verringert. Dies entspricht der Eliminierung von Wasserstoff-Atomen der Sulfhydrylgruppen unter Ausbildung der Disulfidbrücke. Für die folgenden Experimente wurden die Peptide mit einer Konzentration von 1mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ , bei unpolaren Peptiden durch Zugabe von 10-20% Acetonitril gelöst.

#### 4.4.2. Interaktion von HPV11-VLPs mit Säugetier-Zellen – Beeinflussung der Rezeptorinteraktion durch HPV11-spezifische, synthetische Peptide

Die HPV11-spezifischen, synthetischen Peptide sollten nun auf die Fähigkeit hin untersucht werden, die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen zu inhibieren. Dazu wurde ein Experiment entwickelt, das die Analyse zellgebundener VLPs per Durchfluß-Zytometrie erlaubt (Abb. 4.22).

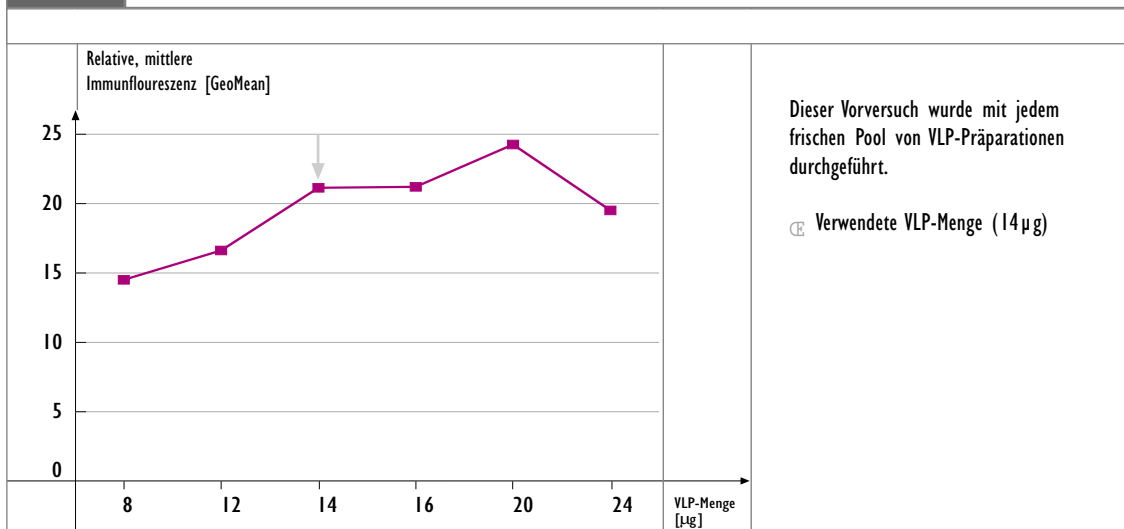
Papillomavirus-Partikel binden *in vitro* an eine Vielzahl von verschiedenen Zellen. Für die Bindungsexperimente wurde die Zelllinie K562 ausgewählt. Die Handhabung der Färbe- und Waschschrte in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen konnte leichter durchgeführt werden, weil es sich bei K562 Zellen um Suspensionszellen handelt (Abschnitt 3.7.4).



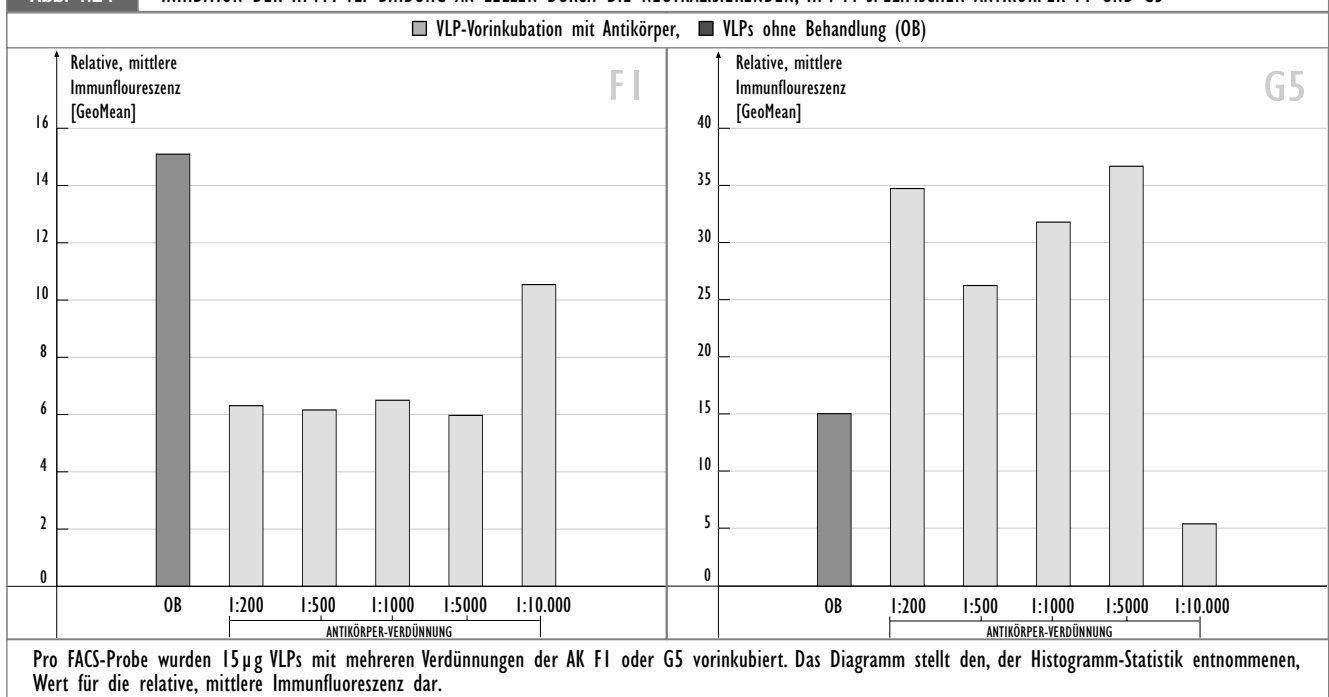
##### 4.4.2.1. Etablierung der experimentellen Bedingungen für den K562-Zellbindungsassay

Jede Probe, die mittels Durchfluß-Zytometrie vermessen wurde, erforderte ein Minimum an  $3 \times 10^5$  Zellen. Um den Effekt inhibierender Peptide zu visualisieren, sollte die Menge an HPV11-VLPs ermittelt werden, die gerade notwendig ist, um eine Sättigung zellulärer Rezeptoren zu erreichen. Für die Detektion von HPV-11 VLPs, die an K562-Zellen gebunden hatten, wurde der HPV11-spezifische, monoklonale Antikörper B2 (*N.Christensen et al, 1991*) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Abschnitt 3.7.4). Der Durchschnittswert für die relative, mittlere Immunfluoreszenz (*der in dem Diagramm dargestellte Wert entspricht der relativen, mittleren Immunfluoreszenz (Geo-Mean), die aus der Histogramm-Statistik hervorging; Erläuterung in Abschnitt 4.3.2.2*) erreicht bei 14-16  $\mu\text{g}$  HPV11-VLPs pro  $3 \times 10^5$  K562-Zellen das Maximum. Daher wurden für die folgenden Experimente 15  $\mu\text{g}$  HPV11-VLPs pro FACS-Probe eingesetzt (Abb. 4.23).



Abb. 4.23 ERMITTLUNG DES SÄTTIGUNGSBEREICHS VON  $3 \times 10^5$  K562-ZELLEN MIT HPV11-VLPs

Um eine Positivkontrolle für die Inhibition der Bindung von VLPs an Zellen zu ermitteln, wurden drei HPV11-spezifische neutralisierende, monoklonale Antikörper (*F1*, *G5* und *H3*; *N.Christensen et al, 1991*) auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Die Inhibition der VLP-Bindung konnte mit den Antikörpern *F1* und *G5* erzielt werden. Die optimale Verdünnung von *F1* betrug dabei 1:200 bis 1:500, mit *G5* wurde die maximale Inhibition bei einer Verdünnung von 1:5000 bis 1:10000 erzielt (*Abb. 4.24*). Die Verwendung des Antikörpers *F1* erzielte in mehreren Experimenten die konstanteren Inhibitionswerte, so dass *F1* schließlich als Positivkontrolle für die Inhibition genutzt wurde. Vorinkubation von HPV11-VLPs mit dem Antikörper *H3* verstärkte die Bindung von VLPs an Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:2000, d.h. die relative, mittlere Immunfluoreszenz erhöhte sich deutlich. Möglicherweise erfolgt die Bindung der VLPs an die Zellen hierbei nicht direkt, sondern über einen zell-präsentierten Fc-Rezeptor und den VLP-assoziierten Antikörper *H3* als Verbindungsglied.

Abb. 4.24 INHIBITION DER HPV11-VLP-BINDUNG AN ZELLEN DURCH DIE NEUTRALISIERENDEN, HPV-11-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER *F1* UND *G5*

Eine Untersuchung zur Lokalisierung der HPV11-Kapsidepitope die von den spezifischen Antikörpern B2, F1, G5 und H3 gebunden werden, ergab dass die Antikörper B2, F1 und G5 alle an der gleichen Stelle an das HPV11-Kapsid binden (*Ludmerer et al, 1996*). Der Antikörper H3 bindet dagegen an ein anderes Epitop. Als Antikörper für die Detektion zellgebundener VLPs wurde hier B2 gegenüber H3 vorgezogen, weil H3 ohne HPV11-VLPs eine sehr hohe Hintergrundfluoreszenz der Zellpopulation erzeugt. Es stellte sich die Frage, ob die Antikörper F1 und G5 die VLP-Bindung an Zellen oder die Bindung des Detektionsantikörpers B2 blockieren. Die Visualisierung zellgebundener VLPs erfolgte mit einem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper, der gegen Maus gerichtet ist. Folglich würden auch die monoklonalen Antikörper F1 bzw. G5 mit dem Sekundär-Antikörper reagieren, wenn sie mit B2 um Bindestellen des HPV11-Kapsids kompetitieren würden, anstatt die Bindung der HPV11-VLPs an Zellen zu inhibieren. Es muß sich daher um eine echte Bindungsinhibition handeln. Damit ist die Verwendung des Antikörpers F1 als Inhibitionskontrolle zulässig.

#### 4.4.2.2. Untersuchung der, von Phagen abgeleiteten HPV11-spezifischen Peptide, auf inhibitorische Eigenschaften bezüglich der Bindung von VLPs an Zellen

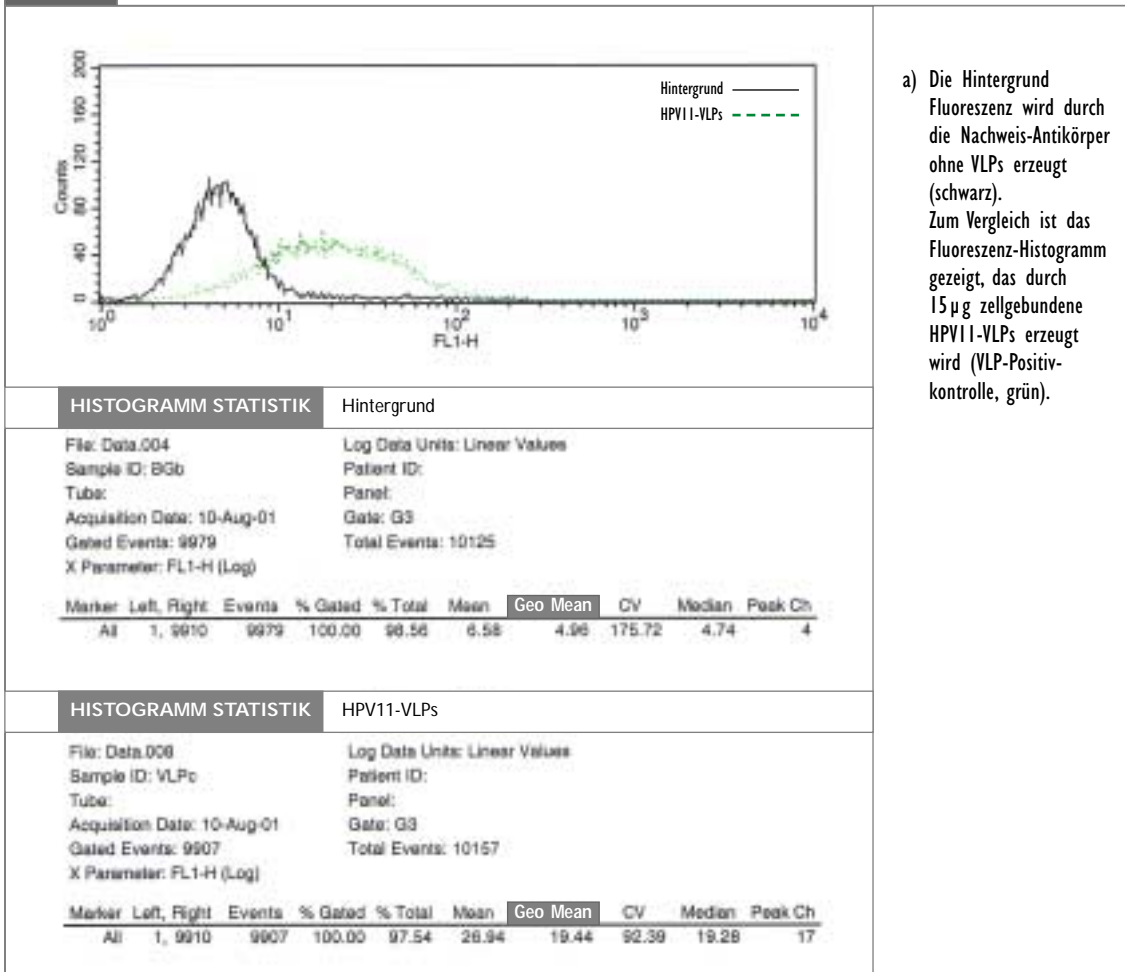
HPV11-spezifische Peptide wurden in 10, 100 und 1000fach molaren Überschuß (*entspricht 360, 3600 u. 36000 Peptidmolekülen pro HPV11-VLP*) bezüglich maximal möglicher Bindungsepitope (*siehe Abschnitt 3.7.5 zur Molaritätskalkulation*) mit den VLPs vorinkubiert und nach Durchführung der Immunfärbung am Zytometer untersucht (*Abschnitt 3.7.4*). Bei allen Messungen wurden dreifach identische Proben vermessen. Dabei wurden stets folgende Kontrollen einbezogen (*siehe Abb. 4.25*):

- a) K562-Zellen wurden nur mit den beiden Antikörpern inkubiert. Die erzeugte Hintergrundfluoreszenz wurde grundsätzlich von den Meßdaten der HPV11-VLP vermittelten Immunfluoreszenz subtrahiert (*in Abb. 4.26 und 4.27*).
- b) 15 µg HPV11-VLPs erzeugten die maximal mögliche Immunfluoreszenz durch Bindung an K562-Zellen (*Bindungssignal = 100%*). Dieser Wert dient als Referenz und wird in den Balkendiagrammen als OB = HPV11-VLPs ohne Vorbehandlung bezeichnet.
- c) die Inhibition der VLP-Bindung wurde durch Partikelvorinkubation mit dem HPV11-spezifischen Antikörper F1 demonstriert.

In Abb. 4.25 sind beispielhaft Histogramme gezeigt, die aus der Auswertung der Vermessung des Peptids PD10 sowie den aufgeführten Kontrollen hervorgehen. Das Peptid PD10 inhibiert die Bindung von HPV11-VLPs an K562 Zellen nicht.

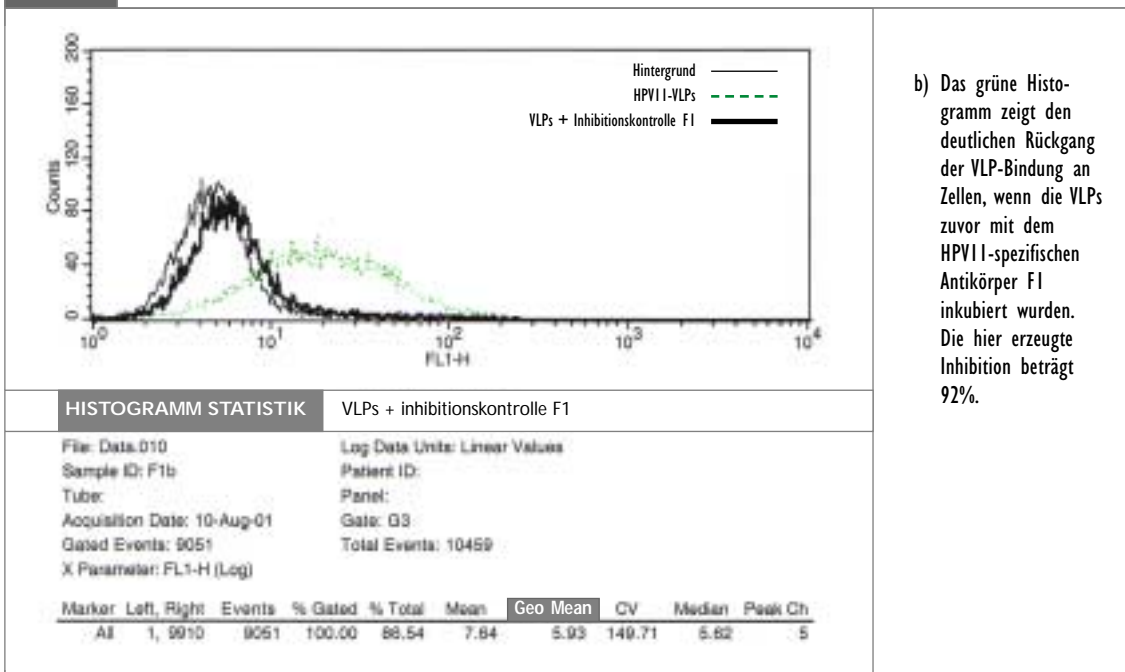
Jedes Peptid wurde dreimal in 100-molarem Überschuß mit den HPV11-VLPs vorinkubiert und so vermessen. Der grau unterlegte GeoMean in der Histogramm-Statistik gibt den Wert für die relative, mittlere Immunfluoreszenz bei logarithmischer Skalierung an. Daten der Histogramm-Statistiken für alle HPV11-spezifischen Peptide sind in Abb. 4.26 als Balken-Diagramme darstellt.

Abb. 4.25a ÜBERLAGERUNG DER FLOURESZENZ-HISTOGRAMME „HINTERGRUNDFLUORESZENZ“ UND „HPV11-VLP-POSITIVKONTROLLE“



a) Die Hintergrund Fluoreszenz wird durch die Nachweis-Antikörper ohne VLPs erzeugt (schwarz). Zum Vergleich ist das Fluoreszenz-Histogramm gezeigt, das durch 15 µg zellgebundene HPV11-VLPs erzeugt wird (VLP-Positivkontrolle, grün).

Abb. 4.25b ÜBERLAGERUNG DER FLOURESZENZ-HISTOGRAMME AUS ABB. 4.25A UND DER INHIBITIONSKONTROLLE



b) Das grüne Histogramm zeigt den deutlichen Rückgang der VLP-Bindung an Zellen, wenn die VLPs zuvor mit dem HPV11-spezifischen Antikörper F1 inkubiert wurden. Die hier erzeugte Inhibition beträgt 92%.

Abb. 4.25c ÜBERLAGERUNG DER KONTROLL-HISTOGRAMME UND HPV11-VLPs DIE ZUVOR MIT PD10 BEHANDELT WURDEN

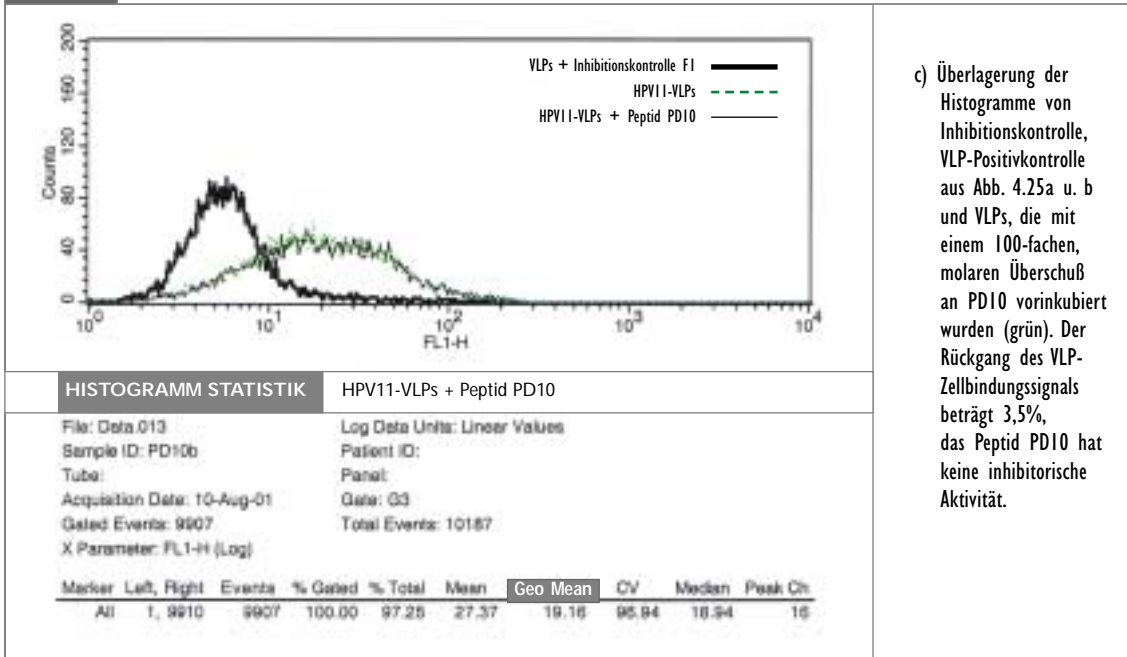
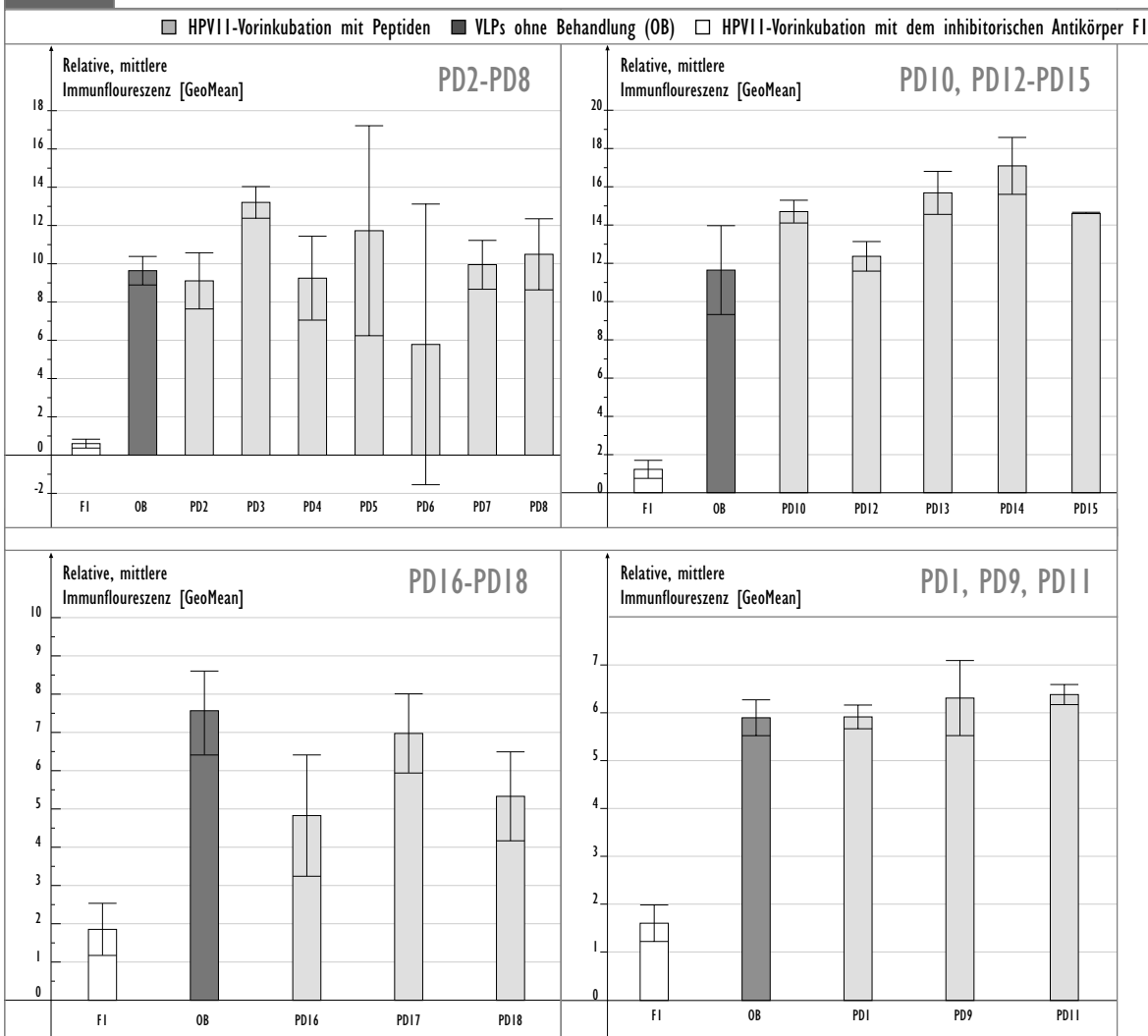


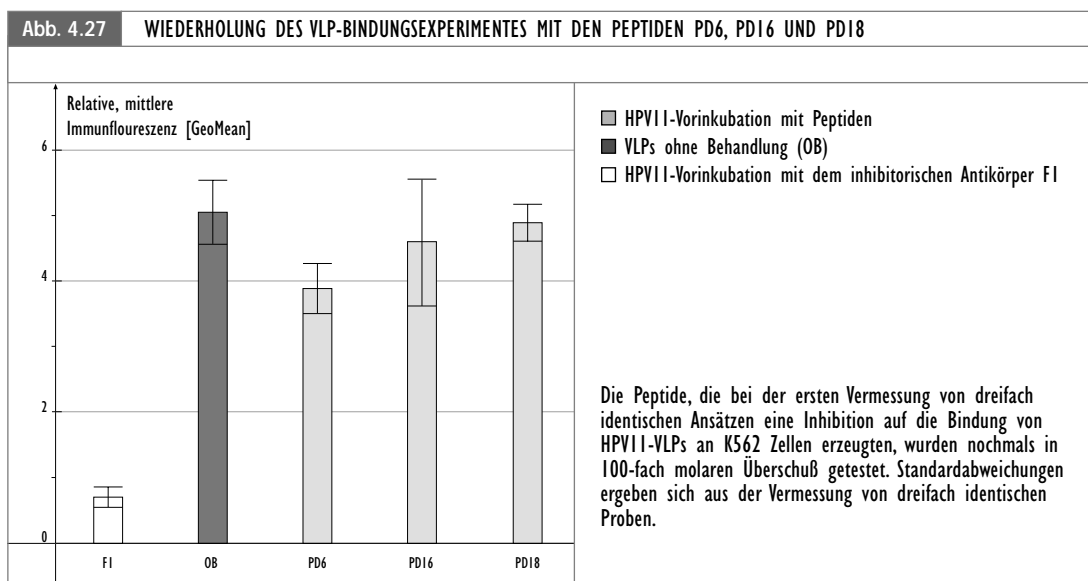
Abb. 4.26 TEST HPV11-SPEZIFISCHER PEPTIDE BEZÜGLICH BINDUNGSINHIBITORISCHER EIGENSCHAFTEN- ZUSAMMENFASSUNG ALLER EXPERIMENTE



Jedes Peptid wurde in 100-fach molarem Überschuß mit den HPV11-VLPs vorinkubiert. Standardabweichungen ergeben sich aus der Vermessung von dreifach identischen Proben.

Bei Vorinkubation der HPV11-VLPs mit den Peptiden PD6, -16 und -18 scheint ein Rückgang der VLP-Bindung erfolgt zu sein. Diese Peptide wurden daher nochmals untersucht (Abb. 4.27).

Obwohl der korrespondierende Phage des Peptids PD6 in Abschnitt 4.3.2.3. keinen inhibitorischen Einfluß auf die Bindung von VLPs an Zellen hatte, ist der Rückgang der VLP-Bindung an Zellen mit dem Peptid PD6 reproduzierbar. Die Inhibition durch Vorinkubation der HPV11-VLPs mit dem Peptid PD6 beträgt in der Wiederholung des Experimentes 23%. Mit den Peptiden PD16 und PD18 wurde bei der Wiederholung des Versuchs keine Inhibition mehr erreicht.



Weil offenbar keine andere Peptidsequenz signifikante inhibitorische Eigenschaften zeigte, sollte untersucht werden ob die synthetischen Peptide überhaupt an die HPV11-VLPs binden. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurden die Virus-Partikel mit den einzelnen Peptiden in 100-molarem Überschuß inkubiert. Peptid-assoziierte sowie unbehandelte VLPs wurden dann in 96-Loch Platten geladen, geblockt und anschließend mit den korrespondierenden Phagen inkubiert. Gebundene Phagen wurden über den M13 Phagen-spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Wenn Peptide an Bindungssepitope auf dem HPV11-Kapsid binden, können weniger Phagen an die peptid-inkubierten VLPs binden. Das Nachweissignal für gebundene Phagen wäre daher im Vergleich zur Bindung an unbehandelte VLPs niedriger. Dies war bei keinem der 18 Peptide reproduzierbar zu beobachten (*nicht gezeigt*). Wahrscheinlich konnten die korrespondierenden Phagen die entsprechenden Peptide von der Kapsidoberfläche verdrängen. Sie haben gegenüber den Peptiden, die als einzelne Moleküle vorkommen, eine höhere Avidität zu VLPs, da sie die rekombinanten Peptide 3-5 mal pro Phagenpartikel präsentieren (*siehe Diskussion, Abschnitt 5.6*). An HPV11-Partikel gebundene Peptide sollten daher zunächst auf anderem Wege, z.B. durch „Surface Plasmon Resonance“ nachgewiesen werden, bevor sie als nicht-bindungsinhibitorisch klassifiziert werden können.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um Random-Peptidbibliotheken nach Peptidsequenzen zu durchsuchen, die spezifisch mit Epitopen des Papillomavirus-Kapsids interagieren. Ziel war die Identifizierung von Peptiden, welche die Kapsidbindung mit dem Wirtzell-Rezeptor inhibieren können. Ein bindungsinhibitorisches Peptid kann insbesondere bei der Therapie von HPV11-bedingten Infektionen zur Anwendung kommen.

### 5.1. Das Haupt-Kapsidprotein L1 von Papillomaviren ist für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening ungeeignet

Das Haupt-Kapsidprotein L1 von HPV16 wurde als Zielprotein für die Selektion von L1-spezifischen Peptiden aus einer Random-Peptidbibliothek im Hefe-Two-Hybrid-System eingesetzt. HPV16-L1 wurde zunächst verwendet, da dieser Papillomavirus-Typ aufgrund seines häufigen Vorkommens in Zervix-Karzinomen besonders gut erforscht ist. Anschließend war ein analoges Screening von HPV11-L1 geplant. Da kein einziges Peptid mit HPV16-L1-Spezifität isoliert wurde, mußte zunächst geklärt werden, ob die Identifizierung von spezifischen Peptiden mit dem durchgeführten experimentellen Ansatz prinzipiell überhaupt möglich war. Die verwendete Random-Peptidbibliothek besteht aus einer Sammlung von ca.  $10^7$  verschiedenen Peptidsequenzen, mit einer Länge von 16 Aminosäuren. Diese Peptide sind mit der Transaktivierungsdomäne des Hefe-GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Die beschriebene Random-Peptidbibliothek wurde hergestellt und erstmals erfolgreich eingesetzt, um das Bindemotiv in Interaktionspartnern des Tumorsuppressorproteins pRB näher zu charakterisieren (*Yang et al, 1995*). Dort wurden die Fusions-Plasmide pGBT9-pRB und pGAD.GH-Peptid-Bibl., die für die beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors codieren, mittels Kotransformation in eine Hefezelle eingeschleust. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Plasmide zunächst in Hefen unterschiedlichen Paarungstyps gebracht.

Die Vereinigung der Plasmide in einer (*diploiden*) Hefezelle erfolgte hier durch pheromon-induzierte Hefepaarung. Bei dem Hefe-Two-Hybrid-Screening ist das Wachstum von Hefeklonen nur möglich, wenn Fusionsproteine und Peptide der Bibliothek miteinander interagieren. Nur dann können die beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors die Transkription von Reportergenen aktivieren, die für das Wachstum auf Selektionsnährböden erforderlich sind.

Dass das verwendete System mit Erfolg durchgeführt werden konnte, wurde von Kollegen mit einem anderen Zielprotein als HPV16-L1 gezeigt (*T. Trost; Dr. M. Tommasino, DKFZ*). Unabhängig von der Zielsetzung dieser Arbeit konnte dabei mit dem frühen HPV16-Onkoprotein E7 sechs verschiedene Peptide aus der beschriebenen Peptidbibliothek isoliert werden. Die Interaktion mit E7 konnte durch Test der Peptide nach deren Isolierung, mit Fragmenten des E7-Proteins im N-terminalen Bereich von E7 lokalisiert werden. Man kann daher davon ausgehen, dass die Isolierung von Peptiden mit diesem Ansatz auch in unserem Labor prinzipiell erfolgreich verläuft, sofern sich das Zielprotein für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening eignet. Der Mißerfolg im Falle von HPV16-L1

muß daher in dem L1-Protein selbst begründet sein, zumal andere HPV16-L1-Screenings mittels Hefe-Two-Hybrid-System auch mit anderen Peptidbibliotheken ergebnislos blieben (*Dr. M. Müller; Dr. J. Zhou, persönl. Mitteilung*) und bis heute keine Veröffentlichungen mit einem vergleichbaren Ansatz vorliegen.

Von einigen Protein-Arten ist bekannt, dass sie für die Anwendung im Hefe-Two-Hybrid-System nicht geeignet sind (*Übersicht in: Fields & Sternglanz, 1994; Allen et al, 1995; Frederickson et al, 1998*).

**a) Transmembranproteine:** Die Interaktion der Fusionsproteine findet im Zellkern der Hefe statt. Daher können z.B. viele Rezeptoren nicht mit diesem System untersucht werden, weil sie oftmals Signalsequenzen enthalten, die mit der Kernlokalisierung interferieren. Das Haupt-Kapsidprotein L1 ist zum Import in den Nukleus geeignet. Dort erfolgt nämlich im Infektionszyklus des Papillomavirus die Zusammenlagerung des Kapsids sowie die Verpackung des viralen Genoms.

**b) Post-translational modifizierte Proteine:** Viele post-translationalen Modifikationen werden in Hefe-Zellen nicht katalysiert. So z.B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen. Auch Proteine, deren Funktion von intramolekularen Disulfidbrücken abhängig ist, sind ungeeignet weil im Zellkern kein oxidatives Milieu herrscht. Für das Haupt-Kapsidprotein L1 wurden N-Glykosylierungen beschrieben, deren Funktion für das Virus bisher unklar ist (*Zhou et al, 1993*).

Das Scheitern des HPV16-L1-Screenings könnte also durch das Fehlen der N-Glykosylierungen bedingt sein. In neueren Veröffentlichungen finden diese Glykosylierungen allerdings keinerlei Erwähnung bzw. Bestätigung.

Eine andere Erklärung dafür, dass das HPV16-L1-Screening fehlschlug, liegt möglicherweise in der Funktion von L1 begründet. Dieses Protein ist grundsätzlich zum „Self-Assembly“ befähigt, so dass sich L1 als Hauptstrukturprotein des Viruskapsids im Zellkern zu Kapsomeren (*L1-Pentamere*) und dann zu Viruskapsiden (*72 Kapsomere*) zusammen lagert. Die Ausbildung des Kapsids erfolgt auch in Abwesenheit des zweiten Kapsidproteins L2 (*siehe Abschnitt 1.5; Zhou et al, 1991; Kirnbauer et al, 1992*). Man kann davon ausgehen, dass das GAL4-L1-Fusionsprotein aus zwei funktionellen Domänen, nämlich GAL4-DB und HPV16-L1 besteht (*Fields & Sternglanz, 1994*). Es ist also möglich, dass die Kapsomer/Kapsidbildung oder zumindest eine Kapsomer-ähnliche Aggregation auch dann erfolgt, wenn die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors N-terminal an L1 fusioniert ist. Möglicherweise bildet das L1-GAL4-DB Fusionsprotein multimere, kapsomer-ähnliche Komplexe aus, an die Peptide der Bibliothek durchaus spezifisch binden können. Die Aktivierung der Transkription bleibt aber aus, weil die mit dem Peptid verbundenen Transaktivierungsdomänen aus sterischen Gründen nicht ausreichend nahe an die Kontrollregion des Reportergens gelangen können.

Das HPV16-L1-Protein sollte daher in drei etwa gleich große Fragmente aufgeteilt werden. Diese Fragmente sollten dann einzeln mit der vorhandenen Peptidbibliothek nach spezifisch interagierenden Peptiden durchsucht werden.

Bekannte, lineare Antigen determinanten kommen nämlich über die gesamte L1-Proteinsequenz verteilt vor (Zhou et al, 1992; Heino et al, 1995; Kulski et al, 1998). Zuerst wurde das N-terminale Fragment untersucht, welches die ersten 193 Aminosäuren des L1-Proteins beinhaltet. Dabei wurden  $6 \times 10^6$  diploide Hefezellen erhalten. Damit war zwar nicht die gesamte Bibliothek abgedeckt, zunächst sollten die erhaltenen Peptide aber stichprobenartig auf spezifische Interaktion mit dem L1-Fragment geprüft werden. Alle isolierten Peptidklone interagierten auch bei diesem Ansatz mit der DNA-Bindedomäne, unabhängig vom fusionierten L1-Fragment, waren also falsch-positiv. Nun stellt sich die Frage, ob auch das N-terminale Fragment 1-193 von L1 die Information für die Ausbildung von Kapsomeren beinhaltet. Im Jahre 2000 wurde erstmals die Kristallstruktur von sogenannten „kleinen“ HPV16-L1-VLPs veröffentlicht (solche Kapside sind aus nur 12 statt 72 Kapsomeren aufgebaut). Mit dieser Struktur konnte zumindest die Organisation eines Kapsomers sowie interkapsomere Kontakte aufgeklärt werden.

Daraus geht hervor, dass die Aminosäuren 20-382 von L1- $\beta$ -Faltblatt Strukturen ausbilden, die dem „Kern“ eines L1-Monomers entsprechen. Die Interaktion von L1-Monomeren unter Ausbildung von Kapsomeren wird durch Schleifen und  $\alpha$ -Helices vermittelt, die sich im C-terminalen Bereich des L1-Monomers befinden. Der N-terminale Bereich des L1-Proteins ist innerhalb verschiedener Papillomavirus-Typen stark konserviert. Die C-terminalen 30 Aminosäuren von L1 sind hingegen variabler und innerhalb eines Kapsomers in Schleifen organisiert, die vom Kapsomer austreten. Dort vermutet man auch die Rezeptorbindestelle (Chen et al, 2000). Aufgrund dieser Untersuchung ist es wahrscheinlich, dass das untersuchte N-terminale L1-Fragment (AS 1-197) zu kurz war um die korrekte Proteinfaltung anzunehmen und dadurch für ein Hefe-Two-Hybrid-Screening ungeeignet ist. Deshalb wurden die Untersuchungen des L1-Proteins mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems an dieser Stelle abgebrochen. Aufgrund dessen wurde auch auf eine Untersuchung des HPV11-L1-Proteins mit dieser Methode verzichtet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Haupt-Kapsidprotein L1 von Papillomaviren für die Anwendung im Hefe-Two-Hybrid-System ungeeignet ist. Das komplette Protein bildet wahrscheinlich Multimere, welche die Reportergen-Aktivierung sterisch behindern. Fragmente von L1 nehmen hingegen möglicherweise nicht die korrekte L1-Proteinfaltung ein und bieten daher keine Alternative zur Untersuchung des Gesamtproteins.

## 5.2. Voraussetzungen für die Selektion von HPV11-spezifischen Peptiden aus phagen-präsentierten Peptidbibliotheken

Peptidbibliotheken, die von Phagen-Hüllproteinen präsentiert werden, eignen sich gut für die Identifizierung von Peptiden mit spezifischen Bindungs-Eigenschaften. Durch die Eingliederung der „chemischen“ Bibliothek in ein biologisches System ist die Identifizierung relevanter Sequenzen schnell und gezielt zu erreichen. Mit solchen Peptidbibliotheken wurden bereits komplette Organe erfolgreich nach spezifisch interagierenden Peptiden durchsucht (Pasqualini et al, 1996). In dieser Arbeit wurden virus-ähnliche Partikel (VLPs) des humanen Papillomavirus Typ 11 verwendet, um



eine phagen-präsentierte Peptidbibliothek auf spezifisch kapsid-bindende Peptide zu selektionieren. Es wurden vor allem inhibitorische Peptide gesucht, welche die Infektion einer Zelle durch Interaktion des Virus mit einem, bisher noch nicht sicher definierten, Wirtzell-Rezeptor blockieren können. Einige Arbeiten mit einer vergleichbaren Zielsetzung existieren, z.B. für HIV und den murinen Coronavirus (*Ferrer et al, 1999; Yu et al, 2000*). Dabei handelt es sich allerdings um Viren mit einer Lipidhülle. Die Rezeptor-Interaktion solcher Viren erfolgt über Glykoproteine, die sich in der Lipidmembran befinden. Diese Proteine können isoliert werden und daher separat für eine Peptid-Selektion eingesetzt werden. Bei Papillomaviren hingegen erfolgt die initiale Rezeptor-Interaktion über ein bisher nicht identifiziertes Epitop auf dem Proteinkapsid, eine Lipidhülle existiert hier nicht. Ein Virus-Partikel präsentiert daher eine Vielzahl an Epitopen. Von VLPs, die aus dem Papillomavirus-Hauptkapsidprotein L1 aufgebaut sind, ist bekannt dass alle bisher identifizierten neutralisierenden Antikörper an diskontinuierliche Epitope (*Konformations-epitope*) des Kapsids binden (*Christensen et al, 1996 a und b; White et al, 1999*).

Um das komplexe HPV11-Kapsid zu untersuchen, wurde eine Bibliothek von zyklischen Peptiden mit 7 variablen Aminosäure-Resten und flankierenden Cystein-Resten, die eine Disulfidbrücke ausbilden, ausgewählt (*constrained peptides, New England Biolabs*). Mit linearen Peptidbibliotheken werden fast nie Mimotope von Antikörpern identifiziert, die an diskontinuierliche Epitope eines Proteins binden. Zyklische Peptide eignen sich dafür besser (*Übersicht in: Clackson & Wells, 1994*), durch die zyklische Struktur der Peptide wird die Anzahl möglicher Konformationen gesenkt, die das Peptid einnehmen kann (*Buritt et al, 1996*). Damit ist oftmals die Erhöhung der Affinität und Selektivität des Peptids verbunden (*O'Neil et al, 1992*). Es ist auch wahrscheinlicher, dass chemisch synthetisierte Peptide die gleiche Konformation wie das korrespondierende Peptid ausbilden können, das sich im Kontext des Phagen-Hüllproteins pIII befindet.

HPV11-VLPs, die nur aus dem Hauptstrukturprotein L1 bestehen, wurden bewußt für die Selektion verwendet. Das Kapsidprotein L2 ist für die Ausbildung virus-ähnlicher Partikel nicht erforderlich (*Zhou et al, 1991; Kirnbauer et al, 1992; Hagensee et al, 1993*). Es zeigte sich, dass L1-VLPs und L1/L2-VLPs um die Bindung an Zellen kompetitieren und dass die Bindung an Zellen durch L1-spezifische Antikörper inhibiert wird (*Roden et al, 1994; Müller et al, 1995; Volpers et al, 1995*). Es erschien daher sinnvoll, die einfachste für die Rezeptorinteraktion nötige Kapsidstruktur für eine Peptid-Selektion einzusetzen. 1998 wurde erstmals ein neutralisierender Antikörper beschrieben, der gegen L2 gerichtet ist und darüber hinaus mit dem Papillomavirus-Typ HPV6b kreuzreagiert (*Kawana et al, 1998*). 2001 wurde dann gezeigt, dass L2 bei der Infektion eine wichtigere Rolle spielt als zuvor bekannt. Tatsächlich scheinen die auf der Oberfläche des Virus-Kapsids präsentierten AS-Reste 108-111 im N-terminalen Bereich von L2 bei der Internalisierung des Virus eine wichtige Rolle zu spielen, nachdem das Viruskapsid über ein L1-Epitop an den Primär-Rezeptor gebunden hat. Mutationen dieser L2-AS-Reste führen zu deutlich verminderter Infektionsrate mit sogenannten HPV-Pseudovirionen (*Kawana et al, 2001*). Daher wäre die Verwendung von L1/L2 Partikeln umfassender gewesen, dies war zum Zeitpunkt der Peptidselektion aber unbekannt.

### 5.3. Die identifizierten HPV11-spezifischen Peptidsequenzen sind sehr unterschiedlich

HPV11 L1-VLPs wurden als Zielprotein für die Peptidselektion aus einer phagen-präsentierten Bibliothek eingesetzt. Drei Runden der Selektion und Anreicherung von HPV11-spezifischen Phagen wurden durchgeführt. Gemäß des Handbuchs (*NEB #3120*) würden zusätzliche Runden Phagen mit der höchsten Affinität anreichern, so dass nach 5-6 Runden eine Konsensus-Bindesequenz für besonders affine Phagen vorliegt. Es ist unklar, ob ein Peptid das an das Rezeptor-Bindungssepitop des Kapsids bindet, auch die höchste Affinität besitzen würde. Es sollten also möglichst mehrere Peptide identifiziert werden, die an verschiedene Epitope des PV-Kapsids binden, da es sich bei einem virus-ähnlichen Partikel um eine komplexe Struktur mit vielen Bindungs- bzw. Neutralisierungsepitopen handelt. Je mehr Selektionsrunden durchgeführt werden, um so höher ist auch die Gefahr einige spezifische Phagen zu verlieren bzw. unspezifische Phagen anzureichern. Manche der zahlreichen, unterschiedlichen Peptidsequenzen ermöglichen dem Phagenklon ein besseres Wachstum, andere Sequenzen bedeuten einen Nachteil für den entsprechenden Phagenklon (*natürliche Selektion; Burritt et al, 1996*).

Die Komplexität der Bibliothek beträgt laut Hersteller  $1,3 \times 10^9$  unterschiedliche Peptidsequenzen. Bei der Affinitätsselektion wurden die HPV11-L1-VLPs mit insgesamt  $2 \times 10^{11}$  Phagen inkubiert, d.h. jede Sequenz war statistisch 100fach vorhanden. Nach der ersten Peptidselektion wurden insgesamt  $2,64 \times 10^8$  Phagen von den HPV11-VLPs eluiert (*siehe Tab. 4.4*). Wie viele verschiedene Peptide davon HPV11-spezifisch waren, kann nicht genauer bestimmt werden. Diese Phagen wurden in Bakterien vermehrt und erneut selektioniert. Nach 3 Selektionsrunden wurden von den HPV11-VLPs  $1,5 \times 10^6$  Phagen eluiert, dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 500 für HPV11-spezifische Phagen (*Tab. 4.4*). Von einer unbehandelten Kontrollplatte wurde nach 3 Selektionen nur 720 Phagen eluiert. Als Maß für die Spezifität wurde also eine 5.000fach höhere Menge von HPV11-VLPs gegenüber dem Hintergrund eluiert.

70 Phagen aus der HPV11-VLP Selektion wurden isoliert. Nach Bestätigung der HPV11-Spezifität mittels ELISA, verblieben bei 35 HPV11-spezifischen Phagen schließlich 18 verschiedene Peptidsequenzen. Sechs dieser Sequenzen kamen innerhalb der isolierten Phagen mehrmals vor. Die Peptidsequenzen sind in *Abb. 4.9* dargestellt. In *Abb. 5.1* sind die gleichen Sequenzen nochmals im Vergleich präsentiert.

Abb. 5.1		MULTIPLE ANORDNUNG ALLER IDENTIFIZIERTER HPV11-SPEZIFISCHEN PEPTIDSEQUENZEN GEMÄSS MÖGLICHER HOMOLOGIEEN																					
Bezeichnung des Peptids	Peptid-Sequenz																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
PHD 11-1	~	~	~	~	~	~	~	~	~	H	P	P	D	L	Y	I	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-8	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	S	L	Y	T	M	L	H	~	~	~
PHD 11-11	~	~	~	G	F	L	P	D	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-5	~	~	~	G	F	L	P	W	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-3	~	~	~	~	F	W	P	E	W	Y	N	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-12	~	S	I	Y	V	W	P	N	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-2	~	S	I	Y	K	W	P	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-10	~	~	~	V	S	W	P	L	P	W	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-15	~	~	~	Y	N	W	P	L	P	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-16	~	~	~	T	S	W	P	Y	P	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-18	~	~	~	Y	S	W	P	I	L	H	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-9	~	~	~	T	S	W	P	M	S	H	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-4	Q	V	T	E	N	W	I	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-6	~	~	S	S	Q	W	M	Y	F	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-14	~	~	M	M	P	W	G	L	F	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-17	~	~	~	M	G	W	L	S	Y	I	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-13	~	~	~	~	V	W	A	S	Q	M	F	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-7	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~

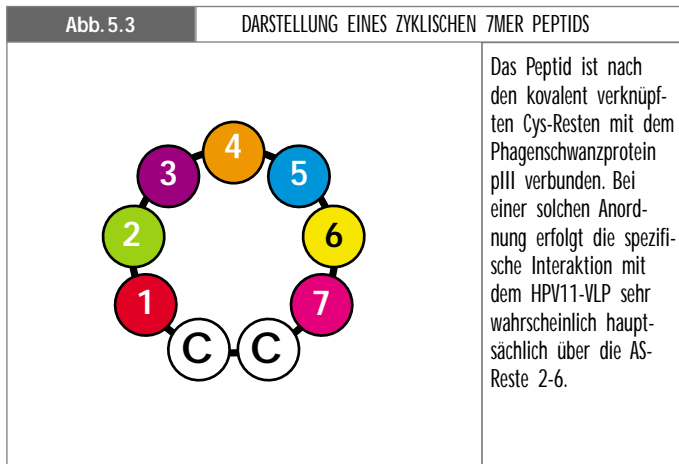
Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „Pile up“, GCG-Package HUSAR erstellt.

Eine Konsensus-Bindesequenz die in mehreren Peptiden vorkommt, ist nicht zu abzuleiten. Einige Peptidsequenzen ähneln sich und binden vermutlich an das gleiche Epitop auf dem HPV11-Kapsid, sie sind in Abb. 5.2 zusammengefasst. Von allen Peptiden wurden Datenbank-Suchen durchgeführt (*PrettyPlot, GCG-Package; HUSAR-DKFZ*). Es wurden keine Homologien zu möglichen Rezeptoren ermittelt. Dies war bei zyklischen Peptiden allerdings auch nicht zu erwarten. Mittels Phage-display wurden bereits zahlreiche Bindungsmotive von Rezeptor-Liganden Interaktionen aufgeklärt (*Wojnar et al, 2001; Zozulya et al, 1999*). Im Vergleich zu linearen Peptiden wurden mit zyklischen Peptiden oftmals keine Sequenzhomologien zu bekannten Liganden ermittelt (*McConell et al, 1994*).

Abb. 5.2		VERGLEICH HPV11-SPEZIFISCHER PEPTIDE MIT HOMOLOGEN SEQUENZEN									
Bezeichnung des Peptids	Peptid-Sequenz										
	PHD 11-2	S	I	Y	K	W	P	Y	~	~	~
PHD 11-12	S	I	Y	V	W	P	N	~	~	~	
PHD 11-5	G	F	L	P	W	W	Y	~	~	~	
PHD 11-11	G	F	L	P	D	W	Y	~	~	~	
PHD 11-10	V	S	W	P	L	P	W	~	~	~	
PHD 11-9	T	S	W	P	M	S	H	~	~	~	
PHD 11-16	T	S	W	P	Y	P	Y	~	~	~	
PHD 11-18	Y	S	W	P	I	L	H	~	~	~	
PHD 11-15	Y	N	W	P	L	P	Y	~	~	~	

Die Sequenzhomologien lassen vermuten, dass diese Peptidgruppen jeweils das gleiche Epitop des HPV11-Kapsids binden. Die dunkel unterlegten AS sind nicht identisch, haben aber alle polare funktionelle Gruppen.

Auffallend häufig kommen die unpolaren Aminosäuren Prolin und Tryptophan sowie die polare Aminosäure Tyrosin vor. Pro und Trp befinden sich meistens in mitten der zirkulären Sequenz, was auf hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Viruskapsid hindeutet. Die polare Aminosäure Tyrosin ist dagegen meist endständig orientiert. Es ist vorstellbar, dass endständige AS in zyklischen Peptiden für eine Interaktion weniger relevant sind (Abb. 5.3).



Vermutlich liegt das häufige Vorkommen der Trp- und Pro-Reste in der Konstruktion der Random-Peptidbibliothek und dem Wachstumsvorteil von rekombinanten Phagen mit bestimmten Peptidsequenzen begründet. Bei der Generierung von Zufallssequenzen kommt es leicht zur Bildung einer ausgerichteten Bibliothek, weil manche Peptidsequenzen in sich instabil sind oder den Vermehrungszyklus des Phagenklons beeinträchtigen, während andere Sequenzen das Wachstum begünstigen können. Beispielsweise kommen Cystein- und Arginin-Reste wesentlich seltener in Phagenbibliotheken vor, da diese offenbar mit dem enzymatisch katalysierten Sekretion des Hüllproteins pIII in die Membranhülle des Phagen interferieren (*Übersicht in: Rodi & Makowski, 1999*). Diese Vermutung wird durch die von Ferrer et al. publizierten Peptid-Sequenzen verdeutlicht, die an das HIV-Glykoprotein gp120 binden. Dort wurde dem Pro-Trp-Motiv eine zentrale Rolle bei der Inhibition der gp120-CD4-Interaktion nachgewiesen (*Ferrer et al, 1999*). Eine Homologie zwischen gp120 und HPV11-VLPs existiert nicht.

Folgende Möglichkeit ist vorstellbar: Tryptophan und Prolin besitzen im Kontext von phagenpräsentierten Peptidbibliotheken herausragende Bindungseigenschaften. Die Tendenz zur Selektion von Trp-reichen Sequenzen bedeutet dabei nicht, dass es sich um Bindungsartefakte handelt (*S.C. Harrison, pers. Mitteilung*).

#### 5.4. Einige HPV11-spezifischen Peptide reagieren im Phagenkontext mit anderen Papillomavirus-Typen kreuz

Aufgrund vorausgegangener Arbeiten binden verschiedene Papillomavirus-Typen anscheinend denselben Zell-Rezeptor (*Abschnitt 1.8 und 4.3.1; Roden et al, 1994, 1995; Müller et al, 1995; Volpers et al, 1995; Qi et al, 1996*). Daher müßte das entsprechende L1-Epitop des Papillomavirus-Kapsids, das mit dem Rezeptor interagiert bei verschiedenen Papillomavirus-Typen strukturell konserviert sein. Die HPV11-spezifischen, rekombinanten Phagenklone wurden mit Papillomavirus L1-VLPs der Typen HPV6b, HPV16, HPV18 und BPV1 auf Kreuzreaktionen untersucht. HPV6b und HPV11 haben den höchsten Verwandtschaftsgrad, der prozentuale Anteil der L1-Homologie der beiden Typen beträgt 92,4%. Diese Typen sind für die Erkrankung der laryngealen Papillomatose sowie für wiederkehrende Genitalwarzen verantwortlich.

Da diese Arbeit auf die Identifizierung eines Therapeutikums gegen diese Infektionen abzielte, ist die Kreuzreaktivität eines inhibitorischen Peptides mit HPV6b von besonderem Interesse. HPV16 und HPV18 wurden gewählt, weil diese PV-Typen oft mit Zervix-Karzinomen assoziiert sind und deshalb intensiv erforscht werden, die Sequenzhomologie der L1-Proteine zu HPV11 beträgt 69% für HPV16 bzw. 62,7% für HPV18. Eine Interaktion von Peptiden mit BPV1, dem einzigen tierpathogenen Vertreter der Auswahl, würde die universelle Natur eines Inhibitors der Papillomavirus-Bindung unterstreichen (*L1-Homologie zu HPV11 beträgt 48,3%; die Sequenzhomologien zu HPV11-L1 wurden mit dem Programm Bestfit aus dem GCG-Package, HUSAR ermittelt*).

In Tabelle 4.6 und 4.7 sind die kreuzreaktiven Phagenklone zusammengefasst. Die Peptidsequenzen sind in Abb. 5.4 im Vergleich dargestellt. Die meisten HPV11-spezifischen Phagen konnten gemäß den Erwartungen auch an HPV6b binden. Die Vielfalt der Sequenzen deutet darauf hin, dass dabei mehrere unterschiedliche Epitope des HPV6b bzw. HPV11-Kapsids gebunden werden. Für die Klone PD12, -15 und -18 ist ein gemeinsames Bindemotiv erkennbar, sie binden vermutlich an das gleiche Epitop des Virus-Kapsids. Das gilt auch für die Phagenklone PD3 und PD11, die als einzige an HPV16 binden können (*Abb. 5.4*). Die einzigen Peptide die an HPV18 und an BPV (*geringste Homologie zu HPV11-L1*) binden, sind fast identisch (*Abb. 5.4*). Da PD11 im Gegensatz zu PD5 auch mit HPV16 kreuzreagiert, vermittelt der Asparaginsäure-Rest in PD11 offenbar die Spezifität zu HPV16. PD11 bindet als einziger Phagenklon an mehrere PV-Typen, nicht aber an HPV6. Von den Phagenklonen, die mit HPV6b kreuzreagieren, bindet außer PD3 keiner an andere PV-Typen. Um die Spezifität der isolierten Peptidsequenzen zu untermauern, wäre es interessant die Bindung der HPV11-spezifischen Phagenklone an einen kutanen Papillomavirus-Typ mit geringer Homologie zu HPV11-L1 und einem strukturell, aber nicht artverwandten Virus-Kapsid z.B des Polyomavirus SV40 zu untersuchen.

Abb. 5.4		ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH VON PEPTIDSEQUENZEN, DIE MIT ANDEREN PAPILLOMAVIRUS-TYPEN KREUZREAGIEREN KONNTEN														
Bezeichnung des Peptids	Peptid-Sequenz															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
PHD 11-1	~	H	P	P	D	L	Y	I	~	~	~	~	~	~	~	HPV6-kreuzreaktiv
PHD 11-8	~	~	~	~	S	L	Y	T	M	L	H	~	~	~	~	
PHD 11-15	~	~	~	~	~	~	Y	N	W	P	L	P	Y	~	~	
PHD 11-18	~	~	~	~	~	~	Y	S	W	P	I	L	H	~	~	
PHD 11-12	~	~	~	~	S	I	Y	V	W	P	N	~	~	~	~	
PHD 11-3	~	~	~	~	~	~	~	~	F	W	P	E	W	Y	N	
PHD 11-14	~	~	~	~	~	M	M	P	W	G	L	F	~	~	~	
PHD 11-17	~	~	~	~	~	~	M	G	W	L	S	Y	I	~	~	
PHD 11-13	~	~	~	~	~	~	~	V	W	A	S	Q	M	F	~	
PHD 11-7	Q	L	V	G	D	L	T	~	~	~	~	~	~	~	~	
PHD 11-11	G	F	L	P	D	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	HPV16-kreuzreaktiv
PHD 11-3	~	F	W	P	E	W	Y	N	~	~	~	~	~	~	~	
PHD 11-11	G	F	L	P	D	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	HPV18/BPV1-kreuzreaktiv
PHD 11-5	G	F	L	P	W	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~	

Erkennbare Konsensus-Bindemotive finden sich in Peptiden die mit HPV16 bzw. mit HPV18 und BPV1 kreuzreagieren.  
 E=Glutaminsäure, D=Asparaginsäure: Diese AS haben sehr ähnliche funktionelle Gruppen und daher in den Peptiden wahrscheinlich vergleichbare Bindungseigenschaften.

Keiner der Phagenklone kann an alle untersuchten Papillomavirus-Typen binden. Sofern das Rezeptor-Interaktionsepitop tatsächlich konserviert ist, bindet kein identifiziertes Peptid dort direkt. Das heißt nicht zwangsläufig, dass keines der Peptide eine inhibitorische Aktivität bezüglich der Bindung an den Primär-Rezeptor haben kann. Die Situation ist vergleichbar mit der Tatsache, dass typenspezifische, neutralisierende Antikörper existieren. Beispielweise der HPV11-spezifische, monoklonale Antikörper F1 (*Christensen et al, 1991*), der die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen blockiert (*gezeigt in Abschnitt 4.3.2 und 4.4.2.1*). Dieser Antikörper reagiert selbst mit dem nah verwandten Typ HPV6b nicht kreuz (*Christensen et al, 1994, Ludmerer et al, 1996*). Dies gilt auch im umgekehrten Falle für HPV6b-spezifische, monoklonale Antikörper. McClements et al. bestimmten kritische Aminosäure-Reste als Voraussetzung für die Bindung von HPV6-spezifischen Antikörpern. Die wichtigsten Aminosäuren befinden sich an Positionen, wo sich die Sequenzen von HPV6 und HPV-11-L1 unterscheiden. Eine Bindung an HPV11 ist nur durch Austausch der entsprechenden Aminosäure-Reste möglich (*McClements et al, 2001*). Auch für andere bindungsinhibitorisch neutralisierende, monoklonale Antikörper die typenspezifisch sind, sind relevante Aminosäuren in Bereichen lokalisiert, die besonders gering konserviert sind (*Roden et al, 1996; White et al, 1999*). Immunodominante Epitope werden also durch typspezifisch definierte Kapsid-epitope repräsentiert. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass diese Determinanten auch bei der Peptid-Selektion mittels Phage-Display eine entscheidende Rolle spielen. Für die Papillomavirus-Forschung ist es interessant, inwieweit Rezeptor-Interaktionsepitope mit immunodominanten Epitopen überlappen. Das betont die Bedeutung eines bindungsinhibitorischen Peptids, da es bei der Aufklärung kritischer Aminosäure-Reste des HPV-11 Kapsids helfen kann.

## 5.5. Die Bindung von VLPs an Zellen kann durch einige der HPV11-spezifischen Phagenklone reduziert werden

Zunächst sollte die inhibitorische Aktivität der isolierten Phagenklone auf die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen direkt untersucht werden. Dazu wurde ein VLP-Zellbindungsassay entwickelt (*Abschnitt 4.3.2*), der in kleinem Volumen bzw. mit einer möglichst geringen Zellzahl durchgeführt werden konnte, da eine Analyse per Durchflußzytometrie zu großen Mengen an Phagen erforderte (*vgl. Abschnitt 3.7.3; Tab. 3.2*). Gegenüber der Analyse von zellgebundenen VLPs per Durchflußzytometrie, die mit den HPV11-spezifischen Peptiden durchgeführt wurde (*Abschnitt 4.4.2.9. und 5.6.*), ist dieser Ansatz jedoch weniger sensitiv. Vorversuche ergaben, dass 200ng HPV11-VLPs nötig waren, um  $2 \times 10^4$  CV1-Zellen mit VLPs zu sättigen. Das entspricht einer Anzahl von  $2 \times 10^5$  VLPs pro CV1-Zelle. Qi et al. bestimmten die Anzahl von Papillomavirus-Rezeptoren auf  $1 \times 10^4$  pro CV1-Zelle. Das entspricht einem Zehntel der hier benötigten Menge. Um die Anzahl von Rezeptoren pro Zelle zu ermitteln, müssen gebundene und im Überstand verbliebene VLPs über einen Scatchard-Plot miteinander in Bezug gesetzt werden (*Volpers et al, 1995; Qi et al, 1996*). Gebundene und im Überstand verbliebene VLPs sind über die hier zur Anwendung gekommene ELISA-Farbreaktion nicht quantitativ abschätzbar. Hinzu kommt, dass die VLPs nach Bindung an

die Zelle prinzipiell internalisiert werden können und das Ausmaß der Internalisierung nicht abgeschätzt werden kann.

Nach Etablierung der Reaktionsbedingungen wurde festgelegt, ab welcher Phagenkonzentration von einer Inhibition der Bindung von VLPs an Zellen gesprochen werden konnte. In Abschnitt 4.3.2.3 sind Vorversuche mit einem HPV11-unspezifischen Kontroll-Phagenklon gezeigt. Eine Hintergrund-Inhibition von ca. 15% wurde bisweilen bei Kontrollklon-Mengen von  $5 \times 10^{11}$  PFU pro Meßprobe beobachtet. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde kein inhibitorischer Effekt mehr beobachtet. Außerdem ist dieser Signlrückgang im Vergleich zu dem, durch HPV11-spezifische Phagen bedingten Rückgang des Bindungssignals, deutlich geringer (vgl. Abb.4.17). Vermutlich stören die hohen Phagenkonzentrationen die Interaktion von HPV11-VLPs und Zellen, ohne dass der Kontrollklon eine Bindung eingeht. Aufgrund dieser Daten wurde festgelegt, dass HPV11-spezifische Phagenklone als inhibitorisch aktiv definiert werden, wenn der Rückgang des VLP-Bindungssignals bei  $7 \times 10^{10}$  PFU pro Probe mindestens 40% betrug.

Nur ein Teil der HPV11-spezifischen Phagenklone übt einen inhibitorischen Effekt auf die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen aus (Tab. 4.8). Die Sequenzen der Klone, die einen deutlichen, reproduzierbar inhibitorischen Effekt auf die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen ausübten, sind in Abb. 5.5 im Vergleich gezeigt.

Abb. 5.5		VERGLEICH DER PEPTIDSEQUENZEN, DIE IM KONTEXT DER PHAGENKLONE DIE BINDUNG VON HPV11-VLPs AN ZELLEN BEHINDERN KONNTEN.													
Bezeichnung des Peptids															
	1							14							
PHD 11-11	G	F	L	P	D	W	Y	~	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-3	~	F	W	P	E	W	Y	N	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-15	~	~	~	~	~	~	Y	N	W	P	L	P	Y	~	~
PHD 11-18	~	~	~	~	~	~	Y	S	W	P	I	L	H	~	~
PHD 11-1	~	H	P	P	D	L	Y	I	~	~	~	~	~	~	~
PHD 11-14	~	~	~	~	~	M	M	P	W	G	L	F	~	~	~
PHD 11-17	~	~	~	~	~	~	M	G	W	L	S	Y	I	~	~
PHD 11-13	~	~	~	~	~	~	~	V	W	A	S	Q	M	F	~

Nur für PD3 und PD11, sowie PD15 und PD18 sind mögliche gemeinsame Bindemotive erkennbar (siehe auch Abb. 5.2 und 5.3)

Zumindest auf der Basis der primären Aminosäure-Sequenzen recht unterschiedliche Peptidsequenzen zeigten inhibitorische Aktivität. Wie aufgrund der Kreuzreaktivitätsergebnisse bereits vermutet, deutet dies daraufhin, dass das Rezeptor-Bindeepitop des HPV11-Kapsids nicht direkt gebunden wird. In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse der CV1-Zellbindungsexperimente sowie der, mittels ELISA, abgeschätzten Affinität der Phagenklone aus den Tabellen 4.6 und 4.8 nochmals zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass tendenziell diejenigen Phagenklone stärker an HPV11 binden, welche die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen besser blockieren. Aufgrund dieser Daten ist es vorstellbar, dass die phagen-bedingte Inhibition durch sterische Blockierung der VLP-Bindung an Zellen erfolgt ist. Eine qualitative Aussage über die inhibitorische Aktivität der identifizierten HPV11-spezifischen Peptide kann daher nur mit den synthetisierten Peptiden direkt getroffen werden.

Tabelle 5.1 VERGLEICH VON BINDUNGSINHIBITION & AFFINITÄT ZU HPV11-VLPs		
Bezeichnung des Phagenklons	Affinität aus Tabelle 4.6	Inhibition aus Tabelle 4.8
PD11-1	200	Ja
PD11-2	0	Nein
PD11-3	10.000	Ja
PD11-5	200	ns
PD11-6	50	Nein
PD11-7	100	ns
PD11-8	100	ns
PD11-11	1.000	Ja
PD11-12	100	Nein
PD11-13	1.000	Ja
PD11-14	1.000	Ja
PD11-15	100	Ja
PD11-16	50	Nein
PD11-17	200	Ja
PD11-18	500	Ja

Zusammenfassung der in Tab. 4.6 und 4.8 dargestellten Ergebnisse bezüglich der Affinität HPV11-spezifischer, rekombinanter Phagenklone zu HPV11, sowie Tendenzen zur VLP-Bindungsinhibition. ns= nicht signifikant

Der Affinitätsfaktor wurde durch Ermittlung der Nachweisgrenze HPV11-spezifischer Phagenklone per ELISA bestimmt. Hierbei fällt auf, dass der Klon PD2 nicht mehr als HPV11-spezifisch gewertet werden konnte. Die entsprechende Sequenz wurde jedoch besonders häufig identifiziert (*Abb. 4.9*). Durch nochmalige Sequenzierung wurde kontrolliert, ob der für weitere Versuche genutzte Phagenklon die richtige Sequenz enthielt. Da die Sequenz bestätigt wurde, könnte es sich möglicherweise um einen Artefakt handeln. Die rekombinante Peptidsequenz hat dem Phagenklon eventuell einen Selektionsvorteil erbracht, ist aber eigentlich HPV11-unspezifisch.

## 5.6. Die HPV11-spezifischen Peptide haben keinen Einfluß auf die Bindung von HPV11-VLPs an K562-Zellen

Schließlich sollte die Bindung von HPV11-VLPs an K562-Zellen nach Inkubation mit den HPV-11 spezifischen Peptiden untersucht werden. Die Peptide wurden im Auftrag synthetisiert und zyklisiert. Ein inhibitorisches Peptid ist ein kleines Molekül, das als Strukturvorlage für ein Therapeutikum genutzt werden kann. Zur Analyse der HPV11-spezifischen Peptide wurde ein HPV11-VLP-Zellbindungsassay entwickelt, der die VLP-Zell-Interaktion mittels Durchfluß-Zytometrie demonstriert. Bei dieser Meßmethode wird jede einzelne Zelle gemessen, so dass eine quantitative Aussage über die erzielte Inhibition der HPV11-VLP-Bindung durch spezifische Peptide bzw. Antikörper möglich ist. Im Gegensatz zu den Phagen konnten die Peptide in hohem molaren Überschuß mit der pro Meßprobe benötigten Menge an HPV11-VLPs inkubiert werden. Bei  $3 \times 10^5$  K562-Zellen pro Probe wurden  $15 \mu\text{g}$  HPV11-VLPs benötigt, um eine konstante Immunfluoreszenz der Zellen im VLP-Sättigungsbereich zu erzeugen. Das entspricht  $1,5 \times 10^6$  VLPs pro Zelle. Der hohe Überschuß an VLPs bezogen auf die mögliche Anzahl zellulärer Rezeptoren (*diese bewegt sich im Bereich von  $1-2 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle, Volpers et al, 1995; Qi et al, 1996*) ist auch durch die Verwendung



von VLPs erklärbar, die nur aus dem Hauptkapsid-Protein L1 bestehen. Papillomavirus-VLPs, die aus beiden Kapsidproteinen (*L1 und L2*) aufgebaut sind, binden noch besser an Zellen (*Roden et al, 1995; 1996*).

Zunächst wurde der Neutralisierungsmechanismus der HPV-11 spezifischen, monoklonalen Antikörper F1, G5 und H3 untersucht (*N. Christensen, 1990*). F1 und G5 konnten die Bindung der HPV11-VLPs an Zellen inhibieren. Beide Antikörper binden an das gleiche Epitop des HPV11-Kapsids (*Ludmerer et al, 1996*). Der Antikörper F1 wurde schließlich als Kontrolle der Inhibition verwendet, da gegenüber G5 die konstanteren Werte erzielt wurden. Im Durchschnitt betrug die mit dem Antikörper F1 erzielte Inhibition zwischen 60% und 90%. Während F1 bei einer Verdünnung von 1:200 die beste Inhibition erzielte, wurde ein vergleichbarer Effekt mit dem Antikörper G5 erst bei einer Verdünnung von 1:10.000 erreicht. Entweder ist die Affinität von G5 für das HPV11-Kapsid epitop höher oder der AK liegt höher konzentriert vor.

Nun wurden die synthetischen, HPV11-spezifischen Peptide einzeln in 100fach molarem Überschuß, bezogen auf die theoretische Anzahl von Epitopen pro HPV11-Kapsid (*Abschnitt 3.7.5*), mit HPV11-VLPs inkubiert. Die Behandlung der VLPs mit dem Antikörper F1 wurde stets in das selbe Experiment mit einbezogen. Von den Peptiden konnte nur mit PD6 eine Inhibition der VLP-Bindung an K562-Zellen erzielt werden. Der in Abb. 4.26 gezeigte Mittelwert für PD6 zeigt allerdings eine extrem hohe Standardabweichung, so dass eine Wiederholung des Experimentes erforderlich war. Mit PD16 und PD18 wurde zunächst ein schwacher Rückgang der Fluoreszenzintensität erzielt. Das Experiment wurde daher auch mit diesen Peptiden wiederholt. Durch Inkubation der HPV11-VLPs mit PD6, konnte dann ein 23%iger Rückgang der Immunfluoreszenz gegenüber unbehandelter Zellen erzielt werden (*Abb. 4.27*). PD16 und PD18 waren bei der Wiederholung inaktiv. Im Kontext des Phagens ist PD6 nicht der aussichtsreichste Kandidat für ein bindungsinhibitorisches Peptid. Der rekombinante Phagenklon hat im Vergleich zu anderen Phagen eine relativ niedrige Affinität zu HPV11 und konnte die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen nicht behindern. Interessanterweise reagierte dieser Phagenklon neben PD16 als einziger Klon mit keinem anderen Papillomavirus-Typ als HPV11. Bezogen auf die typenspezifischen Antikörper gegen Papillomaviren ist es möglich, dass PD6 tatsächlich das für die Rezeptorbindung verantwortliche HPV11-Kapsid epitop erkennt (*vgl. Abschnitt 5.4*). Die inhibitorische Aktivität von PD6 sollte daher mit den in Abschnitt 5.7 vorgeschlagenen experimentellen Schritten weiter charakterisiert werden. Auf-grund zeitlicher Limitationen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Peptide weiter zu charakterisieren.

Unklar bleibt, ob die Peptide tatsächlich alle an die HPV11-VLPs binden können. Bevor die identifizierten HPV11-spezifischen Peptide als negativ hinsichtlich der Inhibition der VLP-Bindung klassifiziert werden, sollte die Interaktion von HPV11-VLPs und den Peptiden bewiesen werden. Eventuell spielt bei der Peptid-VLP-Interaktion die Art des Reaktionspuffers eine Rolle. Während HPV11-VLPs für die ursprüngliche Peptidselektion über Phage Display undialysiert in PBS-Puffer verdünnt wurden, mußten sie für die Zellbindungsassays dialysiert werden. Dazu wurde der für Papillomavirus-VLPs empfohlene HS-Puffer verwendet. Die Salzkonzentrationen der beiden Puffer sind etwa gleich hoch (*vgl. 2.11*), jedoch sollte die Analyse der Peptide mittels Durchfluß-

Zytometrie in PBS wiederholt werden.

Möglicherweise ist die Affinität der monovalent vorliegenden Peptide zu gering. Die HPV11-spezifischen Peptidsequenzen werden innerhalb der rekombinanten Phagenklone 3 bis 5-mal pro Phagenpartikel präsentiert. Der Phagenklon kann deshalb multivalent mit dem HPV11-Kapsid interagieren. Wird ein spezifisches Bindemotiv mehrmals von einem Molekül präsentiert, kann es zu sogenannten Aviditätseffekten kommen. Dieser Begriff wurde durch die Bindungskoopertivität von Antikörpern geprägt. IgM-Antikörper besitzen z.B. 10 identische Antigenbindungsstellen, sind also multivalent. Die Affinität einer einzelnen Bindungsstelle ist eher niedrig, präsentiert das Antigen jedoch viele identische Epitope, wie es bei HPV-Kapsiden der Fall ist, kann die Avidität sehr hoch sein. Die Interaktion einer Antigenbindungsstelle und einem Antigenepitop erhöht die Affinität der zweiten Bindestelle für das zweite Epitop usw. (*Janeway & Travers, 1997*).

Die scheinbare Affinität kann durch die Avidität von Phagen bis zu 1000fach erhöht werden (*Clackson & Wells, 1994*).

## 5.7. Weitere experimentelle Möglichkeiten für die Untersuchung der HPV11-spezifischen Peptide hinsichtlich neutralisierender Eigenschaften

a) Die Bindungsspezifität der Peptidsequenzen wird möglicherweise durch benachbarte Sequenzen innerhalb des Phagenhüllproteins pIII positiv beeinflusst (*Venkatesh et al, 2000*). Aus diesem Grund wäre zunächst eine Untersuchung von monovalenten, HPV11-spezifischen pIII-Phagenhüll-Proteinen sinnvoll. Die Bindung einzelner pIII-Proteine an HPV11-VLPs wird nicht durch Avidität begünstigt. Dazu sollten die entsprechenden DNA-Sequenzen mittels PCR aus dem Phagen genom amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die Produktion von großen Mengen der rekombinanten Protein ist so leicht möglich. Der Nachweis monovalent gebundener pIII-Proteine an HPV11-VLPs kann zunächst mit dem, für Phagenpartikel, etablierten ELISA durch einen pIII spezifischen Antikörper erbracht werden. Bei erfolgreicher monovalenter Bindung könnten die entsprechenden Peptide z.B. durch „soft randomization“ optimiert werden. Dazu ist die Konstruktion einer Randothek erforderlich. Ein Mutagenese-Oligonukleotid das aus einer Mischung von 80% Basen besteht, welche für die bekannten Aminosäuren codieren sowie je 7% der anderen drei Basen, generiert beispielsweise eine Peptidbibliothek in der jeder Aminosäure-Rest mit einer Häufigkeit von 40% mutiert ist. Dabei entstehen auch Peptide, in welchen nur eine oder wenige Aminosäuren verändert sind (*Fairbrother et al, 1998*). Diese neue Peptidbibliothek müßte für die Selektion optimierter HPV11-spezifischer Peptide wieder in einen Phagen-Kontext gebracht werden. Dazu eignen sich sogenannte Phagemid-Vektoren, diese erlauben die Selektion von monovalent präsentierten Peptiden.

b) Roden et al. beschrieben 1995 ein einfaches Experiment, das Moleküle mit bindungsinhibitorischen Eigenschaften identifiziert. Papillomavirus-Kapside können Maus-Erythrozyten durch Bindung der präsentierten Rezeptoren miteinander vernetzen. Die Zugabe von bindungsinhibitori-

schen Antikörpern verhindert diese Vernetzung. Durch das Absetzen der Erythrozyten in 96-Loch U-Bodenplatten wird die Inhibition der Rezeptorbindung mit bloßem Auge sichtbar (Roden *et al*, 1995). Zumindest dieser Test sollte mit den vorhandenen HPV11-spezifischen Peptiden durchgeführt werden.

c) Nicht alle HPV-spezifischen Antikörper die gegen L1-Epitope des Virus-Kapsids gerichtet sind, neutralisieren die Virus-Infektion durch Inhibition der Rezeptorbindung. Eine weitere Gruppe von neutralisierenden Antikörpern erlaubt die Bindung des Virus an die Wirtszelle. Als Neutralisierungsmechanismus wird hierbei die Behinderung der Kapsid-Dissoziation durch den Antikörper vermutet (Roden *et al*, 1996; Booy *et al*, 1998). Es ist möglich, dass sich innerhalb der identifizierten HPV11-spezifischen Peptide eine oder mehrere Sequenzen befinden, die eine vergleichbare Aktivität besitzen. Einfache Zellbindungsexperimente mit HPV11-Kapsiden können Peptide mit einem solchen Neutralisierungsmechanismus allerdings nicht identifizieren. Dazu ist die Herstellung von HPV11-Pseudovirionen erforderlich. Für HPV16 existieren solche Systeme bereits. Dort sind Reporter-gen-tragende Plasmide von annähernd gleicher Größe des Papillomavirus-Genoms in HPV-Kapside verpackt (Roden *et al*, 1996). Die Ausbildung von Pseudovirionen erfolgt durch Ex-pression der HPV11-Kapsidproteine in Anwesenheit dieser Zielpasmide innerhalb einer Zelle. Beeinhaltet das „als Genom“ verpackte Plasmid z.B. ein GFP-Reporter-gen, kann die Infektion einer Zelle simuliert und dokumentiert werden (Rossi *et al*, 2000). Neutralisierende Antikörper und Peptide können dadurch umfassender charakterisiert werden.

Zumindest die durch das Peptid PD6 erzielte Inhibition der HPV11-VLP-Bindung an Zellen sollte mit den vorgeschlagenen experimentellen Ansätzen weiter charakterisiert werden. Wenn die inhibitorische Aktivität von PD6 dabei bestätigt werden kann, sollte diese Peptidsequenz zur Erhöhung des inhibitorischen Effektes optimiert werden.

## 6. Zusammenfassung

Humanpathogene Papillomaviren (HPV) werden üblicherweise als high-risk- oder low-risk-Typen klassifiziert. Infektionen mit high-risk-Typen können zur Ausbildung von Tumoren führen. Obwohl low-risk-HPV-Typen nur sehr selten mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden, stellen solche Infektionen, insbesondere mit HPV6 und HPV11 oft eine hohe, bisweilen lebensbedrohende Belastung für die betroffenen Patienten dar. Diese beiden HPV-Typen sind mit der Entstehung von multiplen Papillomen im Genital- und Respirationstrakt assoziiert. Nach chirurgischer Entfernung kommt es häufig zu Rezidiven, möglicherweise aufgrund der Freisetzung infektiöser Virionen bei der Operation. Eine Infektion wird durch Interaktion des Virus mit einem Wirtzell-Rezeptor initiiert. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Peptiden, die eine Bindung von HPV-Virionen an Wirtszellen verhindern. Solche Peptide können im Gegensatz zu Antikörpern als Strukturvorlage für die Entwicklung eines kostengünstigen Therapeutikums dienen.

Mit Hilfe des zunächst verwendeten Hefe-Two-Hybrid-Systems konnten keine spezifischen Peptide isoliert werden, da das Papillomavirus-Hauptstruktur-Protein-L1 als Zielprotein in diesem System offenbar nicht geeignet ist.

Deshalb wurde alternativ eine, durch den Bakteriophagen M13 präsentierte, Peptidbibliothek auf Sequenzen hin selektioniert, die spezifisch mit HPV11 Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) interagieren. Achtzehn verschiedene HPV11-spezifische Peptidsequenzen wurden identifiziert und zunächst im Kontext der rekombinanten Phagen genauer charakterisiert. Einige Phagenklone kreuzreagierten mit VLPs anderer Papillomavirus-Typen. Die meisten HPV11-spezifischen Peptidsequenzen reagierten mit dem nahe verwandten HPV-Typ 6b. Eine der Peptidsequenzen (PD11) vermittelt die Bindung an die Typen HPV16, HPV18 und BPV1 aber nicht an HPV6. Es ist möglich, dass ein konserviertes Rezeptor-Erkennungsmotiv auf Papillomavirus-Kapsiden existiert, da Virionen verschiedener PV-Typen um zellpräsentierte Rezeptoren konkurrieren. Sofern also ein solches konserviertes Motiv existiert, bindet dort keine der identifizierten Peptidsequenzen direkt. Von achtzehn rekombinanten Phagenklonen mit unterschiedlicher Peptidsequenz konnten acht die Bindung von HPV11-VLPs an CV1-Zellen inhibieren. Dabei waren vor allem solche Phagenklone inhibitorisch aktiv, die eine vergleichsweise hohe Affinität zu HPV11-VLPs aufwiesen.

Anschließend wurden die, aufgrund der Sequenz der rekombinanten Phagen hergestellten, synthetischen Peptide untersucht. Keine der im Phagenkontext aktiven Peptidsequenzen hatte jedoch hierbei einen inhibitorischen Einfluss auf die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen. Ein schwacher aber signifikanter Rückgang der Bindung von HPV11-VLPs wurde nur mit dem Peptid PD6 erzielt, das im Kontext der Phagen allerdings inaktiv ist. Für die Entwicklung eines inhibitorischen Therapeutikums ist eine weitere Optimierung dieser Peptidsequenz erforderlich, da die Bindung von HPV11-VLPs an Zellen bisher nur um 23% reduziert wird.

## A. Literaturverzeichnis

### A

---

**Allen JB**, Walberg MW, Edwards MC und Elledge SJ. Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *TIBS* 20: 511-516, 1995.

**Arroyo M**, Bagchi S und Raychaudhuri. Association of human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-Phase specific E2F-cyclin A complex. *Mol. Cell Biol.* 13: 6537-3546.

### B

---

**Baker TS**, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C und Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstructions. *Biophys J.* 60: 1445-1456, 1991.

**Belnap DM**, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, Brown JC, Kreider JW, Christensen ND und Baker TS. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *JMB* 259: 249-263, 1996.

**Bernard BA**, Bailly C, Lenoir M-C, Darmon M, Thierry F und Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (*HPV18*) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* 63: 4317-4324, 1989.

**Booy FP**, Roden RBS, Greenstone HL, Schiller JT und Trus BL. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13A resolution. *JMB* 281: 95-106, 1998.

**Bouvard V**, Storey A, Pim D und Banks L. Charakterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 13: 5451-5459, 1994.

**Breitbart F**, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT und Lowy DR. Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (*CRPV*) can protect against experimental CRPV-infection. *J. Virol.* 69: 3959-3963, 1995.

**Breitbart F** und Coursaget P. Human papillomavirus vaccines. *Sem. Canc. Biol.* 9: 431-445, 1999.

**Burkhardt A**, DiMaio D und Schlegel R. Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.* 6 : 2381-2385, 1987.

**Burritt JB**, Bond CW, Doss KW und Jesaitis AJ. Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal. Biochem.* 238: 1-13, 1996.

## C

**Castellanos MR**, Hayes RL und Maiman MA. Synthetic peptides induce a cytotoxic response against human papillomavirus type 18. *Gynecol. Oncol.* 82: 77-83, 2001.

**Chen XS**, Garcea RL, Goldberg I, Casini G und Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 Protein of human papillomavirus 16. *Molecular cell* 5: 557-567, 2000.

**Cheng WF**, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M und Wu TC. Tumor-specific immunity and angiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* 108: 669-678, 2001.

**Chiang C-M**, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, und Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomavirus origins. *PNAS USA* 89: 5799-5803, 1992.

**Christensen ND**, Kreider JW, Cladel NM, Patrick SD und Welsh PA. Monoclonal antibody-mediated neutralization of infectious human papillomavirus type 11. *J Virol* 64: 5678-5681, 1990.

**Christensen ND**, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson AB und Kreider JW. Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* 205: 329-335, 1994.

**Christensen ND**, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf G; Reed CA, Cladel NM und Galloway DA. Surface conformational and linear epitopes on HPV16 and HPV18 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* 223: 174-184, 1996a.

**Christensen ND**, Reed C, Cladel NM, Hall K und Leiserowitz GS. Monoclonal antibodies to HPV6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV11 in addition to type-specific epitopes on HPV6. *Virology* 224: 477-486, 1996b.

**Christensen ND**, Reed CA, Cladel NM, Han R und Kreider JW. Immunization with virus-like particles induces longterm protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* 70: 960-965, 1996c.

**Clackson T** und Wells JA. In vitro selection from protein and peptide libraries. *Tibtech* 12/5: 173-184, 1994.

**Cohen BD**, Lowy DR und Schiller JT. The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol Cell Biol* 13: 6462-6468, 1993.

**Cripe TP**, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F Schmid PG, Dürst M, Gissmann L, Roman A und Turek LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promotor by a keratinocyte-dependent enhancer and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6: 3745-3753, 1987.

**Crum CP**, Barber S, Symbula M, Snyder K Saleh AM und Roche JK. Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* 178: 238-246, 1990.

**Crusius K**, Auvinen E und Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 15: 1437-1444, 1997.

**Cullen AP**, Reid R, Campion M und Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* 65: 606-612, 1991.

## D

---

**Del Vecchio AM**, Romanczuk H, Howley PM und Baker CC. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.* 66: 5949-5958, 1992.

**Doorbar J**, Campell D, Grand RJA und Gallimore PH. Identification of the human papillomavirus-1a E4 gene products. *EMBO J.* : 355-362, 1986.

**Dürst M**, Kleinheinz A, Hotz M und Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* 66: 1515-1522, 1985.

**Dupuy C**, Buzoni-Gatel D, Touze A, Bout D und Coursaget P. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (*HPV-16*) virus-like particles or with the HPV16-L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J. Virol.* 73: 9063-9071, 1999.

**Dyson N**, Howley PM, Münger K und Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937, 1989.

## E

---

**Evander M**, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K und McMillan NAJ. Identification of the  $\alpha 6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 71: 2449-2456, 1997.

## F

---

**Fairbrother WJ**, Christinger HW, Cochran AG, Fuh G, Keenan CJ, Quan C, Shriver SK, Tom JYK, Wells JA und Cunningham BC. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 37: 17754-17764, 1998.

**Ferrer M** und Harrison SC. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1 gp120 identified from phage display libraries. *J. Virol.* 73: 5795-5802, 1999.

**Fields S** und Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *TIG* 10: 286-292, 1994.

**Fligge C**, Giroglou T, Streeck RE und Sapp M. Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology* 283: 353-357, 2001.

**Frederickson RM**. Macromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr. Opin. Biotech.* 9: 90-96, 1998.

**Frattini MG** und Laimins LA. Binding of human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. PNAS 91: 12398-12402, 1994.

**Funk JO**, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B und Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PNCA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV16 E7 oncoprotein. Genes Dev. 11: 2090-2100, 1997.

## G

---

**Gassen HG** und Schrimpf G. Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, 2.Auflage S.3, 2000.

**Gietz R.D.** and Schiestl R.H. Transforming yeast with DNA. Methods Mol. Cell. Biol. 5:255-269, 1995.

**Giroglou T**, Florin L, Schäfer F, Streeck RE und Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. J. Virol. 75: 1565-1570, 2001.

**Gissmann L**, Pfister H und zur Hausen H. Human papilloma viruses (*HPV*): characterization of four different isolates. Virology 76: 569-580, 1977.

**Greenstone HL**, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn MLH, Kirnbauer R, Roden RBS, Lowy DR und Kast WM. Chimeric papillomavirus like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. PNAS 95: 1800-1805, 1998.

**Guillou L**, Sahli R, Chaubert P, Monnier P, Cuttat JF und Costa J. Squamous cell carcinoma of the lung in a nonsmoking, nonirradiated patient with juvenile laryngotracheal papillomatosis. Evidence of human papillomavirus-11 DNA in both carcinoma and papillomas. Am. J. Surg. Pathol. 15: 891-898, 1991.

## H

---

**HagenseeME**, Yaegashi n und Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1-protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. J.Virol. 67: 315-322, 1993.

**Heino P**, Skyldberg B, Lehtinen M, Rantala I, Hagmar B, Kreider JW, Kirnbauer R und Dillner J. Human papillomavirus type 16 capsids expose multiple type-restricted and type-common antigenic epitopes. J. Gen. Virol. 76: 1141-1153, 1995.

## I

---

**Ito Y** und Evans CA. Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papillomavirus and from extracts of papillomas of domestic and cottontail rabbits. J. Exp. Med. 114: 485-500, 1961.



**J**

---

**Janeway CA** und Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, 2.Auflage, 1997.

**James P**, Halladay J und Craig EA. Genomic libraries and host strains designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 425-436, 1996.

**Jones DL**, Alani RM und Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip-1 mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11: 2101-2111, 1997.

**Joyce JG**, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU und Keller PM. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *JBC* 274: 5810-5822, 1999.

**Juan H**, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL und Schlegel R. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J. Virol.* 75: 7848-7853, 2001.

**K**

---

**Kawana K**, Matsumoto K, Yoshikawa H, Taketani Y, Kawana T, Yoshiike K und Kanda T. A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* 245: 353-359, 1998.

**Kawana Y**, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K und Kanda T. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J. Virol.* 75: 2331-2336, 2001.

**Kirnbauer R**, Booy F, Cheng N, Lowy DR und Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *PNAS, USA* 83: 12180-12184, 1992.

**Kirnbauer R**, Taub J, Greenstone H, Roden R, Dürst M, Gissmann L., Lowy DR und schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* 67: 6929-6939, 1993.

**Klingelutz AJ**, Foster SA und McDougall. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380: 79-82, 1996.

**Kulski JK**, Sadleir JW, Kelsall SR, Cicchini MS, Shellam G, Peng SW, Qi YM, Galloway DA, Zhou J und Frazer IC. Type specific and genotype cross reactive b epitopes of the L1 Protein of HPV16 defined by a panel of monoclonal antibodies. *Virology* 243: 275-282, 1998.

**L**

---

**Leder C**, Kleinschmidt JA, Wieth C und Müller M. Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J. Virol.* 75: 9201-9209, 2001

**Li M**, Beard P, Estes PA, Lyon MK und Garcea RL. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* 72: 2160-2167, 1998.

**Liu WJ**, Gissmann L, Sun XY, Kanjanahaluethai A, Müller M, Doorbar J und Zhou J. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* 227: 474-483, 1997.

**Ludmerer SW**, Benincasa D und Mark III GE. Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11. *J. Virol.* 70: 4791-4794, 1996.

**M**

---

**Martin**, Vass C, Schiller JT, Lowy DR und Velu JT. The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 59: 21-32, 1989.

**Masterson PJ**, Stanley MA, Lewis AP und Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the polymerase DNA alpha primase p68. *J. Virol.* 72: 7404-7419, 1998.

**Matthews DJ** und Wells JA. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* 260: 1113-1117, 1993.

**McCarthy MP**, White W;Palmer-Hill F, Koenig S and Suzich J. Quantitative Disassembly and Reassembly of human papillomavirus Type 11 viruslike particles in vitro. *J. Virol.* 72/1: 32-41, 1998.

**McClements WL**, Wang XM, Ling JC, Skulsky DM, Christensen ND, Jansen KU und Ludmerer SW. A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1. *Virology* 289: 262-268, 2001.

**McConnell SJ**, Kendall ML, Reilly TM und Hoess RH. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* 151: 115-118, 1994.

**McLean CS**, Churcher MJ, Meinke J, Smith GL, Higgins G, Stanley M und Minson AC. Production and characterization of a monoclonal antibody to human papillomavirus 16 using recombinant vaccinia virus. *J. Clin. Pathol.* 43: 488-492, 1990.

**McMillan NAJ**, Payne E, Frazer IH und Evander M. Expression of the  $\alpha 6$ -Integrin confers papillomavirus binding upon receptor negative B-cells. *Virology* 261: 271-279, 1999.

**Meyers C**, Frattini MG, Hudson JB und Laimins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* 257: 971-973, 1992.

**Modrow S** und Falke D. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, 1. Korrigierter Nachdruck, 1998.

**Mohr IJ**, Clark R, Sun S, Androphy EJ, ManPherson P und Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250: 1694-1699, 1990.

**Müller M**, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY; Frazer IH, Jenson AB, Alonso A, Zentgraf H und Zhou J. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J.Virol.* 69: 948-954, 1995.

**Müller M**, Zhou J, Reed TD, Rittmüller C, Burger A, Gabelsberger J, Braspenning J und Gissmann L. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* 234: 93-111, 1997.

## N

---

**Nasiell K**, Roger B und Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet. Gyneocol.* 67: 665-669, 1986.

## O

---

**Oda H**, Kumar S und Howley PM. Regulation of the Src family tyrosine kinase BLK through E6AP-mediated ubiquitination. *PNAS USA* 96: 9557-9562, 1999.

**O' Neil KT**, Hoess RH, Jackson SA, Ramachandran N, Mousa SA und DeGrado WF. Identification of novel peptide antagonists for gpIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Protein* 14: 509-515.

**Osen W**, Peiler T, Öhlschläger P, Caldeira S, Faath S, Michel N, Müller M, Tommasino M, Jochmus I und Gissmann L. A DNA-Vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (*HPV16*) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19: 4276-86, 2001.

## P

---

**Paintsil J**, Müller M, Picken M, Gissmann L und Zhou J. Calcium is required in reassembly of bovine papillomavirus in vitro. *J. Gen. Virol.* 79: 1133-1141, 1998.

**Park P**, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR und Mohr IJ. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *PNAS* 91: 8700-8704, 1994.

**Pasqualini R** und Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380: 364-366, 1996.

**Peng SW**, Frazer ICH, Fernando GJ und Zhou J. Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virology* 240: 147-157, 1998.

**Pfister H** und zur Hausen H. Seroepidemiological studies of human papillomavirus (*HPV-1*) infections. *Int. J. Cancer* 21:161-165, 1978.

**Pfister H.** Human papillomaviruses and skin cancer. *Sem. Cancer Biol.* 3: 263-271, 1992.

**Ponten J,** Adami HO, Friberg LG, Gustafsson L, Miller AB, Parkin M, Sparen P, Trichopoulos D. HPV and cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 63: 317, 1995.

---

**Q**

**Qi YM,** Peng SW, Hengst K, Evander M, Park DS, Zhou J und Frazer ICH. Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology* 216: 35-46, 1996.

---

**R**

**Ressing ME,** Offringa R, Toes RE, Ossendorp F, de Jong JH, Brandt RM, Kast WM und Melief CJ. Immunotherapy of cancer by peptide-based vaccines for the induction of tumor-specific T cell immunity. *Immunotechnology* 2: 241-251, 1996.

**Roberts S,** Ashmole I, Johnson GD. Kreider JW und Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 197: 176-187, 1993.

**Roden RBS,** Kirnbauer R, Jenson AN, Lowy DR und Schiller JT. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J. Virol.* 68: 7260-7266, 1994.

**Roden RBS Hubbert NL,** Kirnbauer R, Breitburd F, Lowy DR und Schiller JT. Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J. Virol.* 69: 5147-5151, 1995.

**Roden RBS, Hubbert NL,** Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR und Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J. Virol.* 70: 3298-3301, 1996.

**Roden RBS,** Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR und Schiller JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* 70: 5875-5883, 1996.

**Roden RBS,** Yutzy IV WH, Fallon R, Inglis S, Lowy DR und Schiller JT. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 270: 254-257, 2000.

**Rodi DJ** und Makowski L. Phage-display technology- finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotech.* 10: 87-93, 1999.

**Romanczuk H** und Howley PM. Disruption of either the E1 or E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *PNAS USA* 89: 3159-3163, 1992.

**Rose RC**, Bonnez W, Reichman RC und Garcea RL. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus-like particles. *J. Virol.* 67: 1936-1944, 1993.

**Rose RC**, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C und Garcea RL. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J. Virol.* 72: 6151-6154, 1998.

**Rossi JL**, Gissmann L, Jansen K und Müller M. Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Gene Ther.* 11: 1165-1176, 2000.

**Rudolf MP**, Fausch SC, Da Silva DM und Kast WM. Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J. Immunol.* 166: 5917-24, 2001.

## S

---

**Sanger F**, Nicklen S und Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 74: 5463-5467, 1977.

**Sapp M**, Volpers C, Müller M und Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76: 2407-2412, 1995.

**Sapp M**, Fligge C, Petzak I, Harris JR und Streeck RE. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J. Virol.* 72: 6186-6189, 1998.

**Schäfer K**, Müller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H, Benner A, Gissmann L und Jochmus I. Immune response to human papillomavirus 16L1/E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int. J. Cancer* 81: 881-888, 1999.

**Scheffner M**, Werness BA, Huibregste JM, Levine AJ und Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136, 1990.

**Schwarz E**, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbruck B, Stremlau A und zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314: 111-114, 1985.

**Shah KV** und Howley PM. Papillomaviruses in: *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

Shi W, Liu J Huang Y und Qiao L. Papillomavirus pseudovirus: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses. *J. Virol.* 75: 10139-10148, 2001.

**Shope R**. Infectious papillomatosis of rabbits. *J. Exp. Med.* 58: 607-624, 1933.

**Sibbet G**, Romero-Graillet C, Meneguzzi G und Campo MS.  $\alpha 6$ -Integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J. Gen. Virol.* 81: 2327-2334, 2000.

**Smahel M**, Sima P, Ludvikova V und Vonka V. Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* 281: 231-238, 2001.

**Stauffer Y**, Raj K, Masternak K und Beard P. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *JMB* 283: 529-536, 1998.

**Steinberg BM**, Topp WC, Schneider PS und Abramson AL. Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. *N. Engl. J. Med.* 308: 1261-1264, 1983.

**Stoler MH**. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int. J. Gynecol. Path.* 19: 16-28, 2000.

**Stubenrauch F** und Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Sem. Cancer Biol.* 9: 379-386, 1999.

**Sundberg PJ**. In : Hofschneider PH und Munk K : *Viruses in human tumors*, S.Karger, Basel 1987.

**Suzich JA**, Ghim S, Palmer-Hill FJ, White WI, Tomura JK, Bell JA, Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *PNAS* 92: 11553-11557, 1995.

---

**T**

**Thomas M** und Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV18 E6. *Oncogene* 10: 2943-54, 1998.

**Thomas M** und Banks L. Human papillomavirus (*HPV*) interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J. Gen. Virol.* 80: 1513-1517, 1999.

**Touze A**, und Coursaget P. in vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *NAR* 26: 1317-1323, 1998.

**Trus BL**, Roden RBS, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT und Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4: 413-420, 1997.

**Tyring SK**. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis and host immune response. *J. AM. Acad. Dermatol.* 43: S18-S26, 2000.

---

**U**

**Unckell F**, Streeck R und Sapp M. Generation and neutralization of Pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* 71: 2934-2939, 1997.

**V**

---

**Van Driel WJ**, Rensing ME, Kenter GG, Brandt RM, Krul EJ, van Rossum AB, Schuurin E, Offringa R, Bauknecht T, Tamm-Hermelink A, van Dam PA, Fleuren GJ, Kast WM, Melief CJ und Trimbos JB. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur. J. Cancer* 35: 946-952, 1999.

**Van Regenmortel MHV**. Perspectives on binominal names of virus species. *Arch. Virol.* 146:1637-1640, 2001.

**Venkatesh N**, Im SH, Balass M, Fuchs S und Katchalski-Katzir E. Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by a phage-library-derived cyclic peptide. *PNAS* 97: 761-766, 2000.

**Volpers C**, Unckell F, Schirmacher P, Streeck RE und Sapp M. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J. Virol.* 69: 3258-3264, 1995.

**W**

---

**Walboomers JM**, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ und Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. pathol.* 189: 19-19, 1999.

**Werness BA**, Levine AJ, und Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79, 1990.

**White WI**, Wilson SD, Bonneze W, Rose RC, Koenig S und Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 72: 959-964, 1998.

**White WI**, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim SJ, Hewitt LA, Goldman DM, Burke SJ, Jenson AB, König S und Suzich JA. Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* 73: 4882-4889, 1999.

**Wojnar P**, Lechner M, Merschak P und Redl B. Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display. *JBC* 276: 20206-20212, 2001.

**Y**

---

**Yang M**, Zining W und Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *NAR* 23/7: 1152-1156, 1995.

**Yoon CS**, Kim KD Park SN und Cheong SW.  $\alpha 6$ -Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 668-673, 2001.

**Yu MWN**, Scott JK, Fournier A und Talbot PJ. Charakterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides. *Virology* 271: 182-196, 2000.

**Yuan H**, Estes PA, Chen Y, Newsome, Olcese VA, Garcea RL und Schlegel R. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* 78: 7848-7853, 2001.

## Z

---

**Zhao KN**, Sun XY, Frazer IH und Zhou J. DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* 243: 482-491, 1998.

**Zhou J**, Sun XY, Stenzel DJ und Frazer ICH. Expression of vaccinia recombinant HPV16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-Like particles. *Virology* 185: 251-257, 1991.

**Zhou J**, Sun XY, Davies H, Crawford L, Park D und Frazer ICH. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* 189: 592-599, 1992.

**Zhou J**, Sun XY und Frazer IH. Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 194: 210-218, 1993.

**Zhou J**, Stenzel DJ, Sun XY und Frazer IH. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J. Gen. Virol.* 74: 763-769, 1993.

**Zhou J**, Sun XY, Louis K und Frazer IH. Interaction of HPV16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* 68:619–625, 1994.

**Zhou J**, Gissmann L, Zentgraf HW, Müller H, Picken M und Müller M. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* 214: 167-176, 1995.

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

**Zerfass-Thome K**, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW und Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13: 2323-2330, 1996.

**Zozulya S**, Lioubin M, Hill RJ Abram C und Gishizky ML. Mapping signal transduction pathways by phage display. *Nat. Biotechnol.* 17: 1193-1198, 1999.

**zur Hausen H**. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78: 1-30, 1977.

**zur Hausen H**. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Nat. Canc. Inst.* 92: 690-698, 2000.



## B. Abkürzungen

### A

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ADE	Adenin
$\alpha$ -...	anti-... (Alpha)
AK	Antikörper
amp	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
ATV	Angewandte Tumorstudiologie

### B

BG	background ( <i>Hintergrund</i> )
bibl.	Bibliothek
bidest	bidestilliert
BP	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BPV	bovine papillomavirus ( <i>rinderpathogenes Papillomavirus</i> )
BSA	bovine serum albumin ( <i>Rinder-Serumalbumin</i> )
bzw.	beziehungsweise

### C

°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ci	Curie
CIA	Chloroform/ Isoamylalkohol
CIP	calf intestine alkaline phosphatase ( <i>Alkalische Phosphatase</i> )
cm	Zentimeter
CRPV	cottontail rabbit papillomavirus
CsCl	Cäsiumchlorid
Cys	Cystein

### D

Da	Dalton
DB	DNA-Bindedomäne
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	desoxyribonucleotide acid
ds	doppelsträngig
D-MEM	Dulbeccos modified eagle medium
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat

ddGTP	Didesoxyguanidintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
dNTP	Desoxyribonukleotid

**E**

E	Extinktion
ECL	enhanced chemoluminescence
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EV	Epidermiodysplasia verruciformis
E7	early protein 7

**F**

FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

**G**

g	Gramm
GFP	green fluorescent protein

**H**

h	Stunde
- HALT	-Histidin, -Adenin – Leucin, -Tryptophan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high performance liquid chromatography
HPV	humanpathogenes Papillomavirus
HRP	horseradish peroxidase ( <i>Meerrettich-Peroxidase</i> )
HS	Hepes-saline
HSIL	high grade squamous intraepithelial lesion
H <sub>2</sub> O	Wasser

**I**

Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

**K**

kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz	konzentriert
kV	Kilovolt

**L**

l	Liter
-L	-Leucin
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LCR	long control region
LEU	Leucin
LiAc	Lithium-Acetat
LSIL	low grade squamous intraepithelial lesion
-LT	-Leucin, -Tryptophan
L2	late protein 2

**M**

M	molar
mA	Milliampere
mAb	monoclonal antibody ( <i>monoklonaler Antikörper</i> )
$\mu$ F	Mikro-Farad
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
mm	Millimeter
min	Minute
MOI	multiplicity of infection

**N**

n	Nano
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant

**O**

OB	ohne Behandlung
OD	Optische Dichte
ori	origin of replication

**P**

PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PFU	plaque forming unit
Ph.D.	Phage Display
pg	Picogramm
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRO	Prolin
PV	Papillomavirus

**R**

RMPI	Roosevelt park memorial institute
RNA	ribonucleotide acid
rpm	rounds per minute
RRP	recurrent respiratory papillomatosis
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur

**S**

s.	siehe
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt

**T**

-T	- Tryptophan
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Tri-Fluoroesigsäure
TMB	Tetramethylbenzidin
TRP	Tryptophan

**U**

U	unit ( <i>Enzymeinheiten</i> )
ÜN	Überstand
ÜS	über Nacht
URR	upstream regulating region
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett

**V**

V	Volt
v.a.	vor allem
VLP	virus-like particle
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht

**W**

W	Watt
wt	Wildtyp

**X**

X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktopyranosid
-------	---

**Z**

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

## C. Englische Fachbegriffe

### A

Annealing	Anlagerung
Antigen-Capture	„Einfangen“ des Antigens
Assay	Experimenteller Ansatz

### B

Background	Hintergrund; unspezifisches Signal, das von Meßwerten abgezogen wird
Bait	Bezeichnung für das Zielprotein, das für die Selektion von spezifischen Peptiden aus einer Bibliothek eingesetzt wird

### C

constrained peptide	gezwungen, die Oxidation von Cysteinen zwingt das Peptid in eine zirkuläre Form
---------------------	---

### E

Enhancer	Verstärker
----------	------------

### H

High grade squamous intraepithelial region	hochgradige intraepitheliale Schleimhaut-Läsion ( <i>zytologische Vorstufe von Gebärmutterhalskrebs</i> )
High-risk-Typ	Papillomavirus-Typ, der oft mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist

### L

Low grade squamous intraepithelial region	niedriggradige intraepitheliale Schleimhaut-Läsion ( <i>zytologische Vorstufe von Gebärmutterhalskrebs</i> )
Low-risk-Typ	Papillomavirus-Typ, der nur äußerst selten in Tumoren detektiert wird

### M

Mating	Paarung
Multiplicity of infection	Anzahl von infektiösen Virionen pro Zelle

### P

Phage display library	phagen-präsentierte Bibliothek
Plaque Forming unit	Ein Hemmhof, der bei der Lyse von Bakterien durch einen Phagenklon in einem Bakterienrasen entsteht
Pool	Sammlung

**R**

Random	Zufall, Hier: Ausbildung von Peptiden mit zufälliger Sequenz
--------	--

**S**

Screening	Durchsuchen einer komplexen Anzahl unterschiedlicher Moleküle, hier Peptide, nach spezifisch mit einem Zielprotein ( <i>HPV11-L1</i> ) interagierenden Molekülen
Self-Assembly	Spezifische Zusammenlagerung von Proteinen, die von der primären Proteinsequenz vorgegeben ist, hier: Ausbildung der viralen Kapsidhülle
Spacer	Platzhalter

**T**

Template	DNA bzw. RNA-Matrize
Two-Hybrid-System	System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Die untersuchten Proteine werden zunächst an zwei verschiedene funktionelle Domänen eines Transkriptionsfaktors fusioniert. Dadurch werden zwei Hybrid-Proteine gebildet. Die Interaktion der untersuchten Proteine vermittelt die Funktionalität der beiden Domänen des Transkriptionsfaktors, die Transkription zu aktivieren.

**U**

upstream regulating region ( <i>URR</i> ) ( <i>alternativ: Long Control Region</i> )	Region des Papillomavirus-Genoms, in der sich regulatorische Sequenzen für Replikation und Transkription befinden
---	---