

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Tim Waterboer

aus: Essen

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Multiplex-Serologie -
Simultane Analyse
von Antikörper-Antworten
gegen humane Papillomviren (HPV)
mit Protein-Arrays**

Gutachter:

Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Werner Buselmaier

Danksagung

Diese Arbeit wurde von April 2002 bis Januar 2005 am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in den Abteilungen „Genomveränderungen und Karzinogenese“ (Prof. Dr. Lutz Gissmann) und „Funktionelle Genomanalyse“ (Dr. Jörg Hoheisel) unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Gissmann und Dr. Michael Pawlita durchgeführt.

Danken möchte ich...

... Prof. Dr. Lutz Gissmann und Prof. Dr. Werner Buselmaier für die akademische Betreuung der Promotionsarbeit,

... ganz besonders herzlich Dr. Michael Pawlita für die gute Betreuung, anregende fachliche Diskussionen, unermüdliches Korrekturlesen und für's Geschichten erzählen,

... Dr. Peter Sehr für viele gute Ideen und Antworten, tatkräftige Unterstützung und seine immerwährende Gelassenheit,

... Dr. Jörg Hoheisel und Dr. Astrid Gödde für die Gelegenheit, eine Vielzahl von Experimenten in ihren Abteilungen durchführen zu können,

... Dr. Thomas Joos, Dr. Markus Templin, Dipl.-Biochem. Jochen Schwenk und Dipl.-Biochem. Oliver Pötz für den Hinweis auf Luminex-Technologie und Hilfe bei den ersten Schritten,

... allen meinen Kollegen, insbesondere Ute Koch, Monika Oppenländer, Dr. Ole Brand, Dr. Anette Jacob, Dr. Ignacio Gonzalez Bravo, Dipl.-Biol. Kristina Michael und cand. biol. Markus Schmitt für jede erdenkliche Form von Hilfe, ihren Humor und die angenehme Arbeitsatmosphäre,

... meinen Eltern Eveline und Wilfried Waterboer, auf deren Unterstützung ich jederzeit zählen konnte

und, *last but not least*,

... meiner Frau Christina Waterboer... für alles.

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	10
II.	Summary	11
1.	Einleitung	12
1.1	Infektionen und Krebs	12
1.2	Serologische Marker für infektionsbedingten Krebs	13
1.3	Papillomviren.....	14
1.4	Taxonomie von Papillomviren	14
1.5	Viraler Zyklus.....	16
1.6	Funktion der HPV-Proteine.....	16
1.7	Pathogenese einer malignen, HPV-assoziierten Erkrankung: Gebärmutterhalskrebs	18
1.8	Humorale Immunantwort gegen HPV	19
1.8.1	VLP- und GST-ELISA	19
1.8.2	Antikörper gegen HPV-Proteine.....	19
1.9	ELISA	21
1.10	Grundlagen des Multiplexing	22
1.11	Ziel der Arbeit	23
2.	Material.....	24
2.1	Chemikalien	24
2.1.1	Allgemeine Chemikalien.....	24
2.1.2	Silanisierungsreagenzien	26
2.1.3	Crosslinker und Modifizierungsreagenzien für Proteine.....	26
2.1.4	Kommerziell erhältliche Objektträger	26
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	27
2.1.5.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	27
2.1.5.2	Für Proteinexpression, -aufreinigung und SDS-PAGE	27
2.1.5.3	Für direkte Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit Cy3.....	27
2.1.5.4	Für Chip-ISA	27
2.1.5.5	Für GST capture ELISA	27
2.1.5.6	Für Multiplex-Serologie	28
2.1.5.7	Für direkte Fluoreszenz-Markierung von Antikörpern mit R-PE	28
2.2	Verbrauchsmaterial.....	28

2.3	Laborgeräte	29
2.4	Glycerinkulturen, Bakterienlysate, Expressionsvektoren	29
2.5	Serumsammlungen	29
2.6	Antikörper	30
2.7	Software	30
3	Methoden	31
3.1	Protein-Expression in <i>E.coli</i>	31
3.1.1	Animpfen der Kultur, Protein-Expression, Ernte der Bakterien	31
3.1.2	Lyse der Bakterien mittels French Press	31
3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	32
3.3	SDS-PAGE, Coomassie- und Silberfärbung, Western Blot	32
3.4	Protein Microarrays	32
3.4.1	Synthese von Glutathion-Casein/-BSA	32
3.4.2	Silanisierung von Glasoberflächen	33
3.4.3	Aktivierung von Amino-silanisierten Oberflächen mit DSC	33
3.4.4	Herstellung von PEG-Glutathion-Oberflächen	34
3.4.5	Herstellung von Glutathion-Casein/-BSA-beschichteten Objektträgern	34
3.4.6	Herstellung von Gel-beschichteten Objektträgern	34
3.4.7	Herstellung von Maus-anti-tag-Cy3 und GST-tag-Cy3	35
3.4.8	Auftragen von Proteinen auf Objektträger (Spotting)	36
3.4.9	Chip-Immunabsorptionsversuch (<i>immunosorbent assay</i> , ISA)	36
3.4.9.1	Spotten von Bakterienlysaten auf Gel-beschichtete Objektträger	36
3.4.9.2	Serum- und Sekundärantikörper-Inkubationen	37
3.4.9.3	Analyse der Protein Microarrays	37
3.4.9.4	Auswertung der Signalintensitäten mit GenePix	37
3.5	GST capture ELISA	38
3.5.1	Vorbereiten der ELISA-Platte	38
3.5.2	Serumpräinkubation, Seruminkubation, Sekundärantikörperinkubation	38
3.5.3	Substratreaktion und Quantifizierung der Farbreaktion im ELISA-Reader	39
3.6	Multiplex-Serologie	39
3.6.1	Herstellung von Glutathion-Casein-Beads	39
3.6.2	<i>In situ</i> -Affinitäts-Reinigung von Antigenen auf GC-Beads	39
3.6.3	Vorinkubation von Seren	40
3.6.4	Multiplex-Versuch	40
3.6.5	Analyse der Beads	40
3.6.6	Datenprozessierung	41

3.6.7	Herstellung von Maus-anti-tag-R-PE und Esel-anti-human-R-PE	41
3.7	Statistik	42
3.7.1	Mathematische Größen.....	42
3.7.2	Serologische Größen	44
4.	Ergebnisse	45
4.1	Chip-ISA	45
4.1.1	Oberflächenentwicklung.....	45
4.1.2	Spotting-Puffer	52
4.1.3	Spezifische Interaktionen	53
4.1.4	Unspezifische Interaktionen	57
4.1.5	Chip-ISA mit Lysat und gereinigtem Protein	58
4.1.6	Vergleich mit GST cature ELISA und Reproduzierbarkeit	61
4.2	Entwicklung von Multiplex-Serologie.....	64
4.2.1	Technische Grundlagen von Luminex-Technologie	64
4.2.2	Kopplung von Glutathion an Luminex-Beads.....	67
4.2.2.1	Herstellung von GC-Beads	67
4.2.2.2	Zusätzliche Inkubation von GC-Beads in Tris-haltigem Puffer	69
4.2.2.3	Variabilität unterschiedlicher Sorten von GC-Beads	70
4.2.3	Technologische Grundparameter.....	72
4.2.3.1	Bestimmung der MFI von ≥ 100 Beads pro Sorte	72
4.2.3.2	Die Reaktion von 3000 BpS mit Serum ermöglicht kurze Messzeiten ..	72
4.2.3.3	Unterschied zwischen Single- und Multiplex.....	73
4.2.3.4	Verschiedene Typen und Wiederverwendbarkeit von Waschplatten....	73
4.2.4	Beladung der Beads mit Antigen.....	74
4.2.4.1	Affinität der GST-Glutathion-Interaktion auf Beads.....	75
4.2.4.2	<i>In situ</i> -Affinitätsreinigung.....	76
4.2.4.3	Sättigung der Beads mit GST-Fusionsprotein	77
4.2.4.4	Lagerbarkeit Antigen-beladener Beads	80
4.2.5	Primärantikörper.....	82
4.2.5.1	Dynamischer Bereich.....	82
4.2.5.2	Spezifitätserhöhung durch Serum-Vorinkubation	83
4.2.5.2.1	Präabsorption von anti- <i>E.coli</i> -Antikörpern mit GST-Lysat	83
4.2.5.2.2	Bead-bindende Antikörper	85
4.2.5.2.3	Blockade von Bead-Bindern mit PVA oder PVP	86
4.2.5.2.4	Blockade von Bead-Bindern mit PVX	88
4.2.5.2.5	Blockade von Bead-Bindern mit CBS-K.....	91
4.2.5.2.6	Titration von CBS-K und synergistischer Effekt mit PVX.....	92

4.2.5.2.7	Unterschiedliche Typen von Beads	95
4.2.6	Sekundär-Antikörper	99
4.2.7	Streptavidin-R-Phycoerythrin	100
4.2.8	Erfolgreiche Versuche	101
4.2.8.1	Serum-Volumen-Kontrolle mittels anti-human-Ig-Beads.....	101
4.2.8.2	Lagerbarkeit der Serumverdünnung	103
4.3	Validierung von Multiplex-Serologie	105
4.3.1	Reproduzierbarkeit.....	105
4.3.2	Korrelation mit GST capture ELISA	106
4.3.3	Sensitivität.....	108
4.3.4	Typen-Spezifität	110
4.4	Seroepidemiologische Studien.....	112
4.4.1	Alters- und geschlechtsabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz gegen HPV L1-Proteine in der deutschen Normalbevölkerung	116
4.4.1.1	Prävalenz von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine	117
4.4.1.2	Typenspezifische und altersabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz	119
4.4.1.3	Geschlechtsabhängigkeit der Antikörper-Prävalenz	123
4.4.1.4	Altersabhängige Dynamik mehrfach positiver Antikörper-Reaktivitäten.....	127
4.4.2	Assoziation von Antikörpern gegen L1-Proteine von Haut-HPV-Typen mit NMSC.....	131
4.4.2.1	Prävalenz von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine	131
4.4.2.2	Geschlechtsabhängigkeit der Antikörper-Prävalenz	137
4.4.2.3	Mehrfachpositivität von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine.....	138
4.4.3	Assoziation von Antikörpern gegen E6- und E7-Proteine seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen mit Zervix-Karzinomen	139
4.4.3.1	Prävalenz von Antikörpern gegen HPV E6- und E7-Proteine.....	140
4.4.3.2	Mehrfachpositivität von Antikörpern gegen homologe E6- und E7-Proteine	144
4.4.3.3	Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen homologe E6- und E7-Proteine	146
5.	Diskussion	154
5.1	GST capture ELISA	155
5.2	Chip-ISA.....	155
5.3	Multiplex-Serologie	158
5.3.1	Entwicklung und Validierung von Multiplex-Serologie.....	159

5.3.1.1	Kopplung von Glutathion an Luminex-Beads.....	159
5.3.1.2	<i>In situ</i> -Affinitätsreinigung.....	160
5.3.1.3	Bead-bindende Antikörper	161
5.3.1.4	Validierung von Multiplex-Serologie.....	163
5.3.2	Seroepidemiologische Studien.....	164
5.3.2.1	Alters- und geschlechtsabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz gegen HPV L1-Proteine in der deutschen Normalbevölkerung...	164
5.3.2.2	Assoziation von Antikörpern gegen L1-Proteine von Haut-HPV-Typen mit NMSC	166
5.3.2.3	Assoziation von Antikörpern gegen E6- und E7-Proteine seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen mit Zervix-Karzinomen	168
5.4	Ausblick	170
6.	Eigene Publikationen	171
7.	Abkürzungen	172
8.	Literatur	175

I. Zusammenfassung

Mehr als 100 humane Papillomvirus (HPV)-Typen können den Menschen infizieren und teilweise maligne Erkrankungen auslösen. HPV-Seroepidemiologie erlaubt es, die Infektion und Krankheits-Assoziation von HPV zu untersuchen und Krebs-spezifische Antikörpermuster zu detektieren, wird jedoch durch die Vielfalt der Virustypen und -proteine und die Typspezifität der gegen sie gerichteten Antikörper erschwert.

Der bisher zur Detektion von Antikörpern genutzte GST capture ELISA ist methodisch ausgereift und gut validiert, im Hinblick auf die Zahl parallel analysierbarer Antigene jedoch beschränkt. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Antikörperscreeningsystems, das eine Hochdurchsatzanalyse von Seren auf Antikörper gegen viele *in situ*-affinitätsgereinigte Antigene in einem Reaktionsansatz erlaubt.

Zwei solche Systeme wurden entwickelt: Ein auf Protein Microarray-Technologie basiertes System (Chip-ISA), für das sich die *in situ*-Affinitätsreinigung der Antigene nicht realisieren ließ, und ein System namens Multiplex-Serologie, das auf einem Suspensions-Array von farbkodierten Polystyrolbeads beruht, die sich in einem Durchflussszytometer unterscheiden lassen. Nach Etablierung einer Methodik zur Derivatisierung dieser Beads mit Glutathion konnten die als GST-Fusionsproteine exprimierten Antigene direkt aus Bakterienlysat aufgereinigt werden. Multiplex-Serologie wurde vollständig validiert und ist gut reproduzierbar, sehr sensitiv und spezifisch. Die Methode wurde zur Analyse großer Serumzahlen adaptiert und erlaubt jetzt die Untersuchung von bis zu 1000 Seren auf Antikörper gegen bis zu 100 simultan getestete Antigene pro Tag.

Über die technische Entwicklung hinaus wurden mit Multiplex-Serologie verschiedene seroepidemiologische Studien analysiert und die Ergebnisse von dreien im Detail vorgestellt. Erstmals wurde die Seroprävalenz gegen die L1-Proteine von 13 HPV-Typen in der deutschen Normalbevölkerung untersucht und auf Alters- und geschlechtsabhängige Dynamik analysiert. In einer zweiten Studie wurde die Assoziation von Antikörpern gegen die L1-Proteine einiger sogenannter EV-HPV-Typen mit nicht melanotischem Hautkrebs untermauert. Ebenfalls zum ersten mal wurde gezeigt, dass typspezifische Antikörper gegen die E6- und E7-Proteine seltener sogenannter Hoch-Risiko-HPV-Typen existieren und mit Zervix-Karzinomen assoziiert sind.

Die Entwicklung von Multiplex-Serologie erlaubt erstmals die simultane Analyse von komplexen Antikörperantworten gegen bis zu 100 Proteine und stellt möglicherweise einen Quantensprung für (HPV-)Seroepidemiologie dar.

II. Summary

More than 100 human papillomavirus (HPV) types can infect humans and cause different proliferative, also malignant diseases. HPV seroepidemiology allows to investigate HPV infections and their disease association and permits the detection of cancer specific antibody patterns, but is complicated by the diversity of virus types and their proteins and by the type specificity of antibodies directed against them.

So far, a so-called GST capture ELISA has been used for the detection of antibodies. This method is fully developed and validated, but limited to the number of antigens that can be analyzed in a parallel fashion. Therefore, the aim of this thesis was the development of an antibody screening system allowing a high through-put analysis of sera to antibodies against many *in situ* affinity purified antigens in one reaction.

Two such systems were developed. The so-called Chip-ISA is based on protein microarray technology, but the implementation of the *in situ* purification of antigens was not feasible. A second system, called multiplex serology, is based on a suspension array consisting of color-coded polystyrene beads that can be distinguished in a flow cytometer. After establishment of a methodology for the coupling of glutathione to these beads, antigens expressed as GST fusion proteins could be purified directly from bacterial lysate. Multiplex serology was fully validated and is very reproducible, sensitive and specific. The method was adapted for the analysis of large serum numbers and now allows the investigation of up to 1000 sera to antibodies against up to 100 simultaneously tested antigens per day.

Beyond its technical development, multiplex serology was used for the analysis of several seroepidemiological studies. The results of three of them are presented in detail. For the first time, the seroprevalences against the L1 proteins of 13 HPV types in the German normal population were investigated and analyzed for their dependence on age and sex. In a second study, the association of antibodies to the L1 proteins of several so-called EV HPV types with non melanoma skin cancer was confirmed. Also for the first time it was shown that type specific antibodies to the E6 and E7 proteins of less prevalent so-called high-risk HPV types exist and that they are associated with cervical carcinomas.

The development of multiplex serology allows for the first time the simultaneous analysis of complex antibody responses to up to 100 proteins and may represent a quantum leap for (HPV) seroepidemiology.

1. Einleitung

1.1 Infektionen und Krebs

Die Proliferation von Zellen ist den unterschiedlichen Bedürfnissen des Körpers und seiner Organe angepasst und ein sehr genau regulierter Prozess. Versagt das System zur Kontrolle der Proliferation, können Zellen entstehen, die sich unkontrolliert teilen: Krebs (1).

Krebs entsteht meistens durch somatische Mutationen in Genen, die an der Wachstumsregulation beteiligt sind, den Onko- und Tumorsuppressorgenen. Onkogene gehen durch Mutation aus zellulären Protoonkogenen hervor und kodieren für Proteine, die die Einleitung des Zellzyklus' auslösen: Wachstumsfaktoren (z.B. *sis*) und Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. *erb-B2*), Komponenten der intrazellulären Signaltransduktionskaskade (z.B. *ras*-Proteine) und Transkriptionsfaktoren (z.B. *jun/fos*). Tumorsuppressproteine haben einen regulatorischen oder hemmenden Effekt auf die Zellteilung (z.B. pRb) oder sind an der DNA-Reparatur beteiligt und lösen Apoptose in irreparabel geschädigten Zellen aus (z.B. p53). Die Überexpression oder -aktivität zellulärer Onkoproteine und/oder der Verlust funktionaler Tumorsuppressorproteine sind nach heutigem Wissensstand immer Bestandteil der meist mehrstufigen Krebsentstehung (2).

Zur Krebsentstehung können aber auch Infektionen mit DNA- und RNA-Viren und sogar Bakterien beitragen.

Am besten verstanden ist dies für DNA-Tumor-Viren, die für virale Onkoproteine kodieren, die bei Infektion Krebs auslösen können. Beispiele dafür sind humane Papillomviren (HPV), die von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) offiziell als Karzinogen anerkannt wurden und u.a. mit Gebärmutterhalskrebs assoziiert sind (s.u.) oder das Epstein-Barr-Virus (EBV), dessen Kern-Antigen 2 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*, EBNA-2) mit der zellulären *Notch*-Signalkaskade interagiert und das mit mehreren menschlichen Tumoren assoziiert ist (u.a. Burkitt-Lymphom, Nasopharynx-Karzinom, Hodgkin's Disease) (3,4).

Die zu den RNA-Viren gehörenden Retroviren können im Zuge ihrer Replikation, die die Integration in die DNA der Wirtszelle einschließt, zelluläre Protoonkogene aufnehmen, die dann zu viralen Onkogenen mutieren und in infizierten Zellen Proliferation auslösen können. Darüber hinaus können Retroviren in der Nähe zellulärer Protoonkogene integrieren, die

daraufhin auf Grund der Aktivität starker viraler Promotoren überexprimiert werden. Diese Transformationsmechanismen treten v.a. in Viren auf, die Vögel (z.B. Rous-Sarkom-Virus, RSV) und Nager (z.B. Maus-Mamma-Tumor-Virus, MMTV) infizieren.

Beispiele für menschliche, Krebs-auslösende RNA-Viren sind das humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1), ein Retrovirus, das adulte T-Zell-Leukämie auslöst, und das Hepatitis C-Virus (HCV), das mit dem primären Leberzellkarzinom assoziiert ist. Der genaue Transformationsmechanismus ist in diesen Fällen jedoch nicht vollständig geklärt (5).

Beispiele für Bakterien mit onkogenem Potential sind *Helicobacter pylori* und *H.bilis*, die mit gastrointestinalen Karzinomen und Lymphomen (v.a. Magenkrebs) in Verbindung gebracht werden (6), und *Chlamydia trachomatis*, das bei der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs eine Rolle spielen könnte (7).

1.2 Serologische Marker für infektionsbedingten Krebs

Allen humanen krebserregenden oder -assoziierten Infektionserregern ist eines gemeinsam: Sie infizieren sehr viele Menschen, aber nur wenige Infizierte entwickeln Tumore. Daraus ergibt sich ein grundsätzliches Problem: Der Nachweis einer Infektion (im Fall von HPV z.B. über Detektion viraler DNA) erlaubt keinerlei Aussage über das individuelle Krebsrisiko. Bessere Marker sind nötig, um nicht in Krebs resultierende Infektionen von aus Infektionen folgenden Krebserkrankungen unterscheiden zu können. Diese Marker könnten serologischer Natur sein.

Die humorale Immunantwort gegen einzelne Proteine von Infektionserregern kann in Abhängigkeit davon variieren, ob es sich um eine reine Infektion oder um eine spezifische Krebserkrankung handelt. So werden starke IgA-Antikörperreaktionen gegen das Viruskapsid-Antigen (*viral capsid antigen*, VCA) von EBV überwiegend in Nasopharynx-Karzinom-Patienten gefunden (8), und Antikörper gegen die E6- und E7-Proteine der HPV-Typen 16 und 18 treten überwiegend in Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren auf (s.u.).

Das diagnostische bzw. prognostische Potenzial von Antikörpern als Krebsmarker ist allerdings häufig nicht endgültig geklärt. Dazu tragen im Wesentlichen zwei Phänomene bei. Zwar existieren die oben genannten Antikörpermuster, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Krebs hindeuten (der positive Vorhersagewert ist hoch), doch nicht jeder Krebspatient reagiert mit der Bildung von Antikörpern, d.h. das Fehlen von Antikörpern lässt nicht den Schluss zu, dass kein Krebs vorliegt (der negative Vorhersagewert ist niedrig). Zum anderen

trägt die Vielfalt der Virusproteine (annähernd 100 bei EBV) und -typen (über 100 bei HPV) verbunden mit der hohen Typenspezifität der Antikörper (s.u.) zu einer enormen Komplexität der potenziell notwendigen serologischen Untersuchungen bei.

1.3 Papillomviren

Papillomviren (PV) sind nicht-umhüllte Viren; das ikosaedrische Virus-Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 55 nm. PV haben ein geschlossenes, zirkuläres Genom aus Doppelstrang-DNA, das 7-8 kb umfasst. Manche PV-Typen kodieren für bis zu 10 offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF), die meisten Typen für 6 frühe (*early*, E) und 2 späte (*late*, L) Gene.

PV infizieren das Haut- und Schleimhaut-Epithel von Säugern und Vögeln und können meist benigne Tumore (Warzen, Kondylome) verursachen. Verschiedene humane Papillomviren (HPV) können jedoch auch maligne Zelltransformation auslösen und sind mit Gebärmutterhalskrebs und anderen anogenitalen Karzinomen, Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Kehlkopfes (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) und möglicherweise auch mit nicht melanotischem Hautkrebs (*non melanoma skin cancer*, NMSC) assoziiert.

1.4 Taxonomie von Papillomviren

PV bilden eine eigene, sehr große Virusfamilie (*Papillomaviridae*). Mindestens 118 verschiedene Virus-Typen, von denen fast 100 den Menschen infizieren, wurden vollständig sequenziert. Die Sequenz des am stärksten konservierten Gens (Haupt-Kapsidprotein L1) wird zur Unterscheidung verschiedener Virus-Gattungen (Genera, bis zu 60 % DNA-Sequenz-Homologie), -Arten (Spezies, 60-80 %), -Typen (80-90 %), -Subtypen (90-98 %) und -Varianten (mindestens 98 %) herangezogen (9). HPV-Typen der A-Gattung infizieren bevorzugt die Mund- und Genital-Schleimhaut, während alle bekannten Typen der B-Gattung nur Epithelzellen der Haut infizieren (Abbildung 1-1).

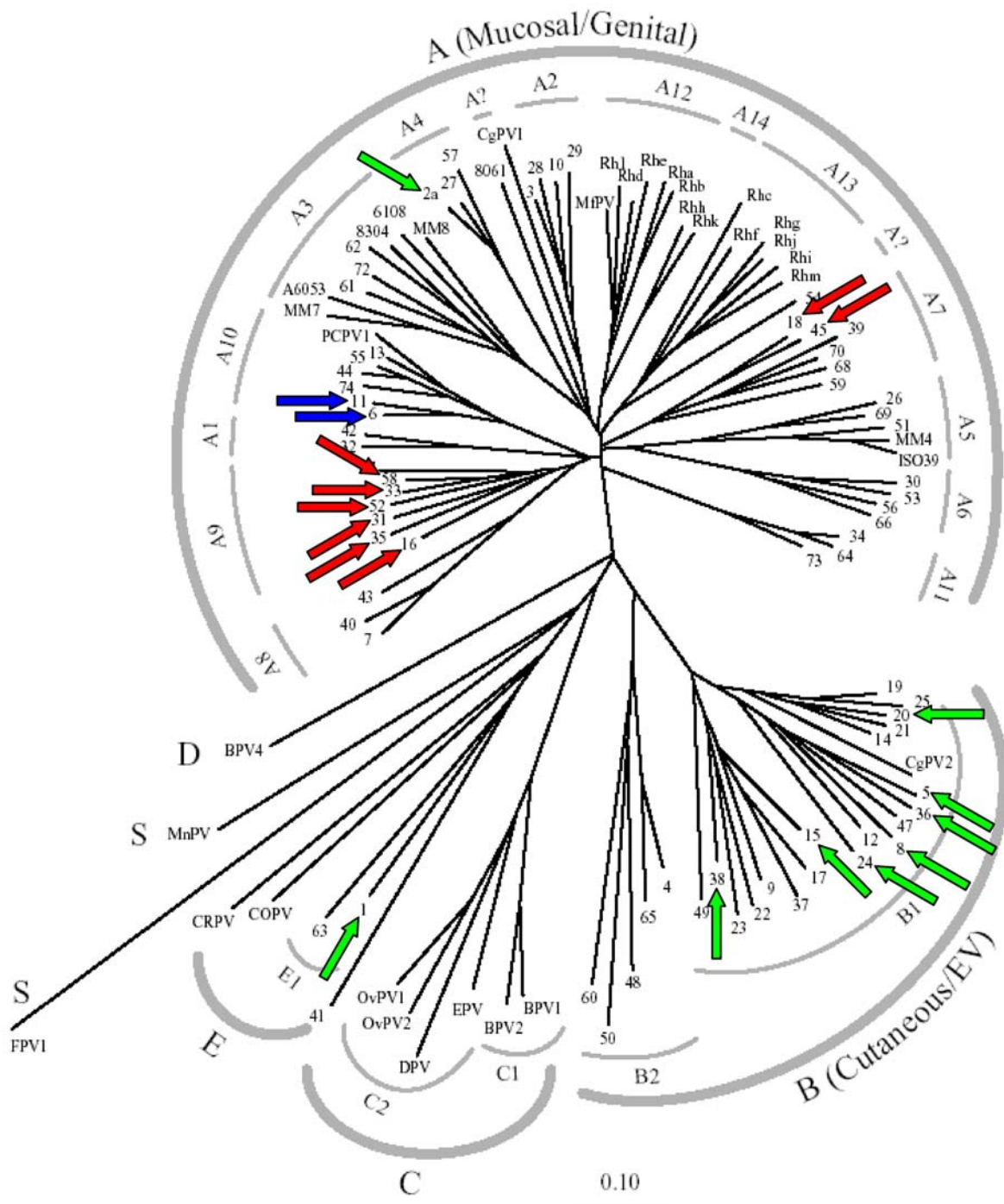


Abbildung 1-1 Phylogenetischer Baum von PV auf Grundlage von L1-Sequenzen. Die Nummern am Ende der Zweige repräsentieren humane, andere Abkürzungen tierische PV-Typen. Die grauen Halbkreise umfassen verschiedene Gattungen (breiter Strich) bzw. Arten (schmäler Strich) (Bildquelle: <http://hpv-web.laIn.gov>). In dieser Arbeit untersuchte HPV-Typen sind mit Pfeilen markiert (Hoch-Risiko-Schleimhaut-Typen rot, Niedrig-Risiko-Typen der A-Gattung blau, Haut-Typen grün). EV: Einige Typen der B1-Spezies werden mit nicht melanotischem Hautkrebs (*non melanoma skin cancer*, NMSC), v.a. in Epidermodysplasia verruciformis (EV)-Patienten, in Verbindung gebracht.

1.5 Viraler Zyklus

HPV infizieren Männer und Frauen und zeichnen sich durch ausgeprägten Wirts- und Zelltropismus aus. Haut-HPV-Typen werden durch direkten Kontakt, Schleimhaut-HPV-Typen sexuell oder über den Speichel weitergegeben. HPV replizieren im epidermalen oder mucosalen Epithel, indem sie durch Mikroläsionen in die (Schleim-)Haut eindringen und proliferationsfähige Basalzellen infizieren. Die Expression früher viraler Gene des zu diesem Zeitpunkt in geringen Kopienzahlen episomal vorliegenden Virus-Genoms führt zu Proliferation der Zellen, die sich lateral ausbreiten. Mit fortschreitender Differenzierung wandern infizierte Basalzellen in die Suprabasalschicht ein, wo das Virusgenom zu hohen Kopienzahlen repliziert und Kapsidproteine, die Produkte später viraler Gene, exprimiert werden. In den oberen Schichten der Epidermis oder Schleimhaut assemblieren Viruspartikel, die durch Abschuppung an der Oberfläche der (Schleim-)Haut abgegeben werden.

1.6 Funktion der HPV-Proteine

Trotz ihrer geringen (Genom-)Größe ist die Biologie von PV sehr komplex. Zwei kleine regulatorische Proteine (E6, E7) interagieren mit zellulären Faktoren, die Zellzyklus und Apoptose steuern, und zwingen nicht teilungsaktive Zellen in die Proliferation, da sich das Virus nur in proliferierenden Zellen vermehren kann. Zwei weitere regulatorische Proteine (E1, E2) modulieren Transkription und Replikation, zwei Strukturproteine (L1, L2) bilden das Virus-Kapsid.

Der E1 ORF kodiert für mindestens zwei Proteine, die an der Replikation der viralen DNA im Zellkern beteiligt sind. Sie können DNA binden und weisen ATPase- und Helikase-Aktivität auf. Die beiden Proteine sind in unterschiedlichen Phasen des viralen Infektionszyklus aktiv. Das eine (E1-M) kontrolliert in undifferenzierten und für die lytische Infektion nicht permissiven Epithelzellen eine begrenzte Form der viralen DNA-Replikation, nach der das Virusgenom in geringer Kopienzahl vorliegt. Das andere (E1-R) kontrolliert die produktive Replikation der viralen DNA, wenn sich infizierte, undifferenzierte Zellen zu ausdifferenzierten Epidermiszellen entwickelt haben, die den lytischen Ablauf der Infektion erlauben (2).

Der E2 ORF kodiert für mehrere Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern u.a. mit E1 interagieren und dessen Bindung an virale DNA unterstützen. In der frühen Infektionsphase reprimiert das E2-Protein die Transkription der E6- und E7-Gene (10).

E4 ist kein frühes, sondern ein spätes Genprodukt, das ausschließlich in ausdifferenzierten Keratinozyten exprimiert wird. Das E4-Protein ist mit dem Keratin-Zytoskelett kultivierter Epithelzellen assoziiert (11), seine Funktion ist jedoch ungeklärt. Der Zeitpunkt der Expression lässt auf eine Rolle dieses Proteins in der Virusproduktionsphase der Infektion schließen (12).

Die E5-Gene verschiedener HPV-Spezies sind sehr heterogen (13). E5 ist ein hydrophobes Membranprotein, das im Endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran lokalisiert ist (14). Das Protein spielt eine Rolle in der frühen Phase der Infektion, indem es mit verschiedenen Cytokin-Rezeptoren komplexiert und dadurch Zellwachstum stimuliert (15).

Das cytosolische E6-Protein interagiert mit und degradiert sowohl das pro-apoptotische Protein BAK als auch den Tumorsuppressor p53 (letzterer wird mit Hilfe der Ubiquitin-Ligase E6AP dem ubiquitinabhängigen Abbau zugeführt), was zu Apoptoseresistenz infizierter Zellen führt. Darüber hinaus erhöht E6 die Aktivität zellulärer Telomerase und verhindert die Degradation von Kinasen der SRC-Familie, was zur Proliferation beiträgt (16).

E7 befindet sich im Kern infizierter Zellen und interagiert mit und degradiert pRb, was die pRb-vermittelte Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F aufhebt. In der Folge aktiviert E2F verschiedene an der Replikation beteiligte Gene. E7 stimuliert die S-Phasen-Cycline A und E und blockiert p21WAF1 und p27KIP1, die Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, cdk) sind. Beide Mechanismen stimulieren die Proliferation.

E6 und E7 komplementieren ihre gegenseitigen Funktionen und haben synergistische Effekte. Der anti-apoptotische Effekt von E6 verhindert den durch E7 ausgelösten pro-apoptotischen Effekt der E2F-Aktivierung, während E7 den cdk-Inhibitor p16INK4A inaktiviert, der ansonsten mit dem E6-vermittelten anti-apoptotischen Effekt interferieren könnte.

L1 und L2 werden in ausdifferenzierten Keratinozyten exprimiert und bilden das Viruskapsid. Vollständige Viruspartikel enthalten zudem virale DNA, die mit zellulären Histonen assoziiert ist.

1.7 Pathogenese einer malignen, HPV-assoziierten Erkrankung: Gebärmutterhalskrebs

Die meisten HPV-Infektionen verlaufen symptomlos. Am besten verstanden ist die Infektion des Gebärmutterhalses mit Hoch-Risiko-HPV-Typen der Schleimhaut (v.a. HPV-16 und -18): Klinisch auffällige Läsionen treten nach wenigen Wochen bis mehreren Monaten auf und verschwinden in den meisten Fällen spontan. Ein geringer Prozentsatz der Infektionen persistiert und die Läsion kann schrittweise zu zervikalen intraepithelialen Neoplasien (*cervical intraepithelial neoplasias*, CIN) verschiedener Schweregrade, später *in situ*-Karzinom und schließlich invasivem Plattenepithel- oder Adenokarzinom des Gebärmutterhalses (Zervix-Karzinom) progredieren. Zwischen dem Auftreten erster klinischer Symptome und Tumorentstehung vergehen Jahre bis Jahrzehnte: CIN treten am häufigsten im Alter von 25 bis 35 Jahren auf, Zervix-Karzinome mit 55 bis 65 Jahren (12).

Der molekulare Mechanismus, der zur Transformation führt, ist häufig begleitet von einer Integration der zunächst episomalen HPV-DNA in die zelluläre DNA während des Persistenzstadiums des Virus in undifferenzierten Epithelzellen. Die Häufigkeit der Integration und gleichzeitig der Verlust episomaler Virus-DNA nehmen beim Übergang HPV-induzierter Läsionen zum Zervix-Karzinom zu (17). Während die Integration auf Seite der Wirtszell-DNA zufällig erfolgt, ist das in Tumorzellen gefundene Integrat bevorzugt in der Region der E1 und E2 ORFs geöffnet, und die E4 und E5 ORFs sind häufig deletiert (16). E5 ist daher an späten Ereignissen der HPV-induzierten Karzinogenese wahrscheinlich nicht beteiligt (16). Zerstört die Ringöffnung den E2 ORF, führt die Deletion des E2-Repressors zur konstitutiven Überexpression von E6 und E7.

Die stabile onkogene Transformation wird als zufälliges und auch aus Sicht des Virus „ungewolltes“ Ereignis verstanden, hat aber gravierende Konsequenzen. Der E6-vermittelte Mangel an p53 führt zur Akkumulation von Mutationen, da die Zellen in die S-Phase des Teilungszyklus eintreten, bevor Reparatursysteme diese Schäden beseitigen konnten. Dadurch erhöht E6 die chromosomale Instabilität. Über die Rb-Degradation hinaus induziert E7 die Amplifikation von Zentriolen und damit Aneuploidie, was ebenfalls zur Tumorgenese beiträgt.

Die entscheidende Rolle von E6 und E7 in der Krebsentstehung ist die Immortalisierung der Zellen. Weitere genetische Veränderungen in zellulären Genen lösen letztlich die vollständige maligne Transformation aus (18).

1.8 Humorale Immunantwort gegen HPV

HPV-Infektionen lösen sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunreaktion aus. Auf letztere wird hier nicht eingegangen. HPV-Serologie ist auf Grund der Vielfalt an Virustypen und -proteinen und wegen der Typenspezifität der gebildeten Antikörper sehr komplex.

1.8.1 VLP- und GST-ELISA

HPV lassen sich nicht in Zellkultur vermehren (abgesehen von sogenannten Raft-Kulturen) (19). Dies macht nicht nur Untersuchungen des Zellzyklus schwierig, sondern auch die Herstellung von Virionen. Die Immunantwort gegen L1-Proteine wurde daher zunächst mit Hilfe Virus-ähnlicher Partikel (*virus-like particles*, VLP) untersucht. HPV-Kapside bestehen aus 72 Kapsomeren, die Pentamere des Haupt-Kapsidproteins L1 sind und ein Neben-Kapsidprotein L2 im Zentrum tragen können (20). VLPs assemblieren spontan aus in Insektenzellen (21) oder Hefe (22) exprimierten L1-Proteinen und sind Virionen morphologisch ähnlich. VLP-basierte ELISA erfordern allerdings äußerst aufwändige Herstellungs- und Reinigungsprozeduren (23).

Wesentlich einfacher ist dagegen die Klonierung und bakterielle Expression von L1-Proteinen mit N-terminal fusionierter Glutathion S-Transferase (GST). In *E. coli* exprimiertes GST-L1 von HPV-11 und -16 bildet spontan Kapsomere, die *in vitro* zu VLPs assemblieren (24-26). GST-L1-Fusionsproteine bzw. -Kapsomere reagieren mit Konformations-spezifischen Antikörpern und induzieren neutralisierende Antikörper, was darauf hindeutet, dass sie konformationelle und immunogene Epitope von Virionen aufweisen (27,28). Sehr *et al.* haben darüber hinaus gezeigt, dass GST-L1-basierte ELISA mit VLP-ELISAs vergleichbar sind (23).

Die Immunantwort gegen frühe Virus-Proteine lässt sich mit in verschiedenen Expressionssystemen hergestellten rekombinanten Proteinen untersuchen. Auch für diese bieten GST-basierte ELISA allerdings deutliche Vorteile (s.u.).

1.8.2 Antikörper gegen HPV-Proteine

Die meisten HPV-Infektionen werden wahrscheinlich durch zelluläre immunologische Intervention geklärt (29). *Follow up*-Studien haben gezeigt, dass in ca. 70 % von einstmals HPV DNA-positiven Frauen nach 12 Monaten keine HPV-DNA mehr detektierbar ist (30-32).

Antikörper gegen das dem Immunsystem exponierte L1-Protein überdauern dagegen und sind daher nicht nur Marker für akute, sondern auch für zurückliegende, geklärte Infektionen und auch in gesunden Männern und Frauen detektierbar (23). Sie schützen wahrscheinlich vor erneuter Infektion mit demselben Virus-Typ (33).

Die Immunantwort gegen L1-Proteine wurde zunächst gegen HPV-16 untersucht (34) und später auf weitere Typen (HPV-1, -6b, -11, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -58 und -59) erweitert (35-37). Kinder unter 13 Jahren, Jungfrauen und monogame Frauen zeigen nur selten Antikörper gegen L1-Proteine von Hoch-Risiko-HPV-Typen (38-45). Antikörper gegen HPV-16 L1 werden häufiger in HPV-16 DNA-positiven CIN-Patienten gefunden als in DNA-Negativen (46) und sind mit Zervix-Karzinomen assoziiert (47,48).

Antikörper gegen E6- und E7-Proteine treten fast ausschließlich in Patienten mit malignen Erkrankungen auf. Die E6- und E7-Proteine der mit Zervix-Karzinomen assoziierten HPV-Typen 16 und 18 werden in malignen Läsionen konstitutiv exprimiert, was zur Produktion spezifischer Antikörper gegen diese Proteine führt. Nach chirurgischer Behandlung des Tumors verschwinden E6- und E7-Antikörper in den meisten Fällen (49,50). In ungefähr jeder zweiten Zervix-Karzinom-Patientin sind Antikörper gegen HPV-16 E6 oder E7 detektierbar, d.h. diese Antikörper können als Krebsmarker verwendet werden (51-59). Ähnliches gilt für E6/E7-Antikörper in Patienten mit HNSCC (60).

Die Immunantwort gegen verschiedene HPV-Typen ist unterschiedlich gut untersucht. So ist z.B. die Assoziation von Antikörpern gegen E6- und E7-Proteine der häufigen Hoch-Risiko-HPV-Typen 16 und 18 mit Zervix-Karzinomen bereits beschrieben worden, entsprechende Untersuchungen für die 13 selteneren Hoch-Risiko-HPV-Typen konnten bisher auf Grund der technischen Komplexität nicht durchgeführt werden. Ähnliches gilt für Antikörper-Reaktivitäten gegen andere als die E6-, E7- und L1-Proteine: Über Antikörper gegen E1-, E2- und E4-Proteine ist wenig bekannt. Antikörper gegen HPV-16 E2 könnten (genau wie E6- und E7-Antikörper) als Marker für Zervixkarzinome (48,61,62) oder für Frauen mit genitalen Läsionen verwendet werden, die auf eine systemische Interferon α -2b-Behandlung ansprechen (63). Antikörper gegen HPV-18 E2 scheinen mit zervikalen Adenokarzinomen assoziiert zu sein (48,64). Antikörper gegen HPV-16 E4 sind Typ-spezifisch (65) und könnten Marker für Virusreplikation in Erwachsenen sein (59).

1.9 ELISA

Enzym-gekoppelte Immunabsorptionsverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) zur Detektion und Quantifizierung von Antikörpern oder Antigenen wurden bereits vor über 30 Jahren entwickelt (66). Dazu wird ein Bindungspartner an eine feste Phase (meist eine 96-Loch-Platte aus Kunststoff) adsorbiert, während der andere Bindungspartner in einer komplexen Lösung (z.B. Serum) zugegeben und mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten, spezifischen Sekundär-Antikörpers und einer Farbreaktion detektiert wird.

Konventionelle *antibody-capture*-ELISA, bei denen Antigen vorgelegt wird, um Antikörper zu detektieren, haben zwei entscheidende Nachteile. Erstens muss das Antigen in aufgereinigter Form vorliegen, um spezifische Reaktionen detektieren zu können, und zweitens kann das Protein durch direktes Adsorbieren an die hydrophobe Kunststoff-Oberfläche denaturiert werden, was zum Verlust konformationeller Epitope und zur Exposition neuer, unspezifischer Epitope führen kann.

Werden statt globulärer Proteine kurze Peptide als Antigen verwendet, ist der Nachweis von Antikörpern auf lineare Epitope beschränkt, zumal u.U. mehrere Peptide pro Antigen getestet werden müssen. Denaturierung des Antigens lässt sich mit Hilfe von *capture*- oder *sandwich*-ELISA vermeiden, bei denen das Antigen über einen spezifischen Antikörper immobilisiert wird, der an die Platte adsorbiert wurde. Dennoch ist auch hier die Aufreinigung zumindest einer Komponente (des *capture*-Antikörpers) notwendig.

Die biochemische Reinigung von Proteinen ist äußerst aufwändig, und selbst die Affinitäts-vermittelte Reinigung von rekombinanten Fusions-Proteinen ist häufig nur unter denaturierenden Bedingungen möglich, was eine Renaturierung des aufgereinigten Proteins nötig macht. Hinzu kommt, dass viele überexprimierte Proteine schlecht oder gar nicht löslich sind.

Der von Dr. Peter Sehr (DKFZ, Heidelberg) entwickelte GST capture ELISA ermöglicht es, diese Nachteile zu vermeiden und Proteine mit nativer Konformation ohne Vorreinigung als Antigene für ELISA zu verwenden (67). Dazu wird ein Glutathion-haltiges *capture*-Protein an die Platte adsorbiert. HPV-Proteine werden als Fusionsproteine mit N-terminaler GST in *E.coli* exprimiert, was die Löslichkeit der Proteine deutlich erhöht. Die Bakterien werden lysiert und das Lysat in die Glutathion-beschichteten Platten gegeben. Auf Grund der Interaktion von GST mit Glutathion werden die GST-Fusionsproteine direkt aus dem Lysat

aufgereinigt, was nur bei nativer Konformation (zumindest des GST-Anteils der Fusionsproteine) möglich ist.

Der GST capture ELISA ist sehr sensitiv und spezifisch und kann mit jedem GST-Fusionsprotein als Antigen eingesetzt werden. Sein einziger Nachteil ist die Beschränkung auf ein Antigen pro Loch. Die Analyse von Seren auf Antikörper gegen 6 Antigene erlaubt die Untersuchung von 8 Seren pro 96-Loch-Platte (Doppelwerte). Ein geübter Experimentator kann 16 Platten pro Tag prozessieren, was bei einer seroepidemiologischen Studie mit 1000 Seren in 8 Arbeitstagen resultiert. Darüber hinaus wird mit steigender Anzahl von Antigenen mehr Serum verbraucht, und der Normalisierungsaufwand für Tag-zu-Tag-Variationen ist erheblich. Die Untersuchung von 750 Seren auf 27 Antigene, wie in dieser Arbeit beschrieben, ist mit GST capture ELISA praktisch unmöglich.

1.10 Grundlagen des Multiplexing

Der Begriff „Multiplex“ wird (im technologischen Sinn) seit Ende der 80er Jahre im Zusammenhang mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) benutzt, wobei mit Multiplex-PCR die gleichzeitige Amplifikation mindestens zweier DNAs (mit unterschiedlichen Primerpaaren) in einer Reaktion bezeichnet wird. Heute werden mit Multiplexing im Wesentlichen Testverfahren (*assays*) verbunden, die die gleichzeitige Untersuchung der Reaktionen einer Probe (*sample*) mit mehreren Bindungspartnern (*targets*) erlauben. Am weitesten verbreitet sind DNA-Microarrays, die ihren Ursprung im auf Zellulose- oder Nylonmembranen basierten *Southern Blot* haben, der bereits in den 70er Jahren entwickelt wurde (68). *Arrays*, d.h. eine regelmäßige, zweidimensionale Anordnung von auf einer Oberfläche fixierten Targets, sind spätestens seit der Entwicklung des 96-Loch-*Dot Blots* in den 80er Jahren Realität (69).

Seit Mitte der 90er Jahre werden anstelle von Membranen zunehmend Objektträger aus Kunststoff oder Glas als feste Phase für DNA-Arrays verwendet. Diese Materialien saugen aufgetragene Flüssigkeiten nicht auf und ermöglichen die Fixierung von DNA aus einem geringeren Volumen auf einer kleineren Fläche. Übliche Samplevolumina liegen heute im Pico- bis Nanoliter-Bereich, die als kleiner Tropfen (*spot*) mit klar umrissenen Konturen aufgebracht werden, während sie bei den porösen Membranen um einige Zehnerpotenzen höher liegen. Mit dem Wechsel der Oberflächen gelang der Umstieg von Macro- auf Microarrays (Spotdurchmesser größer bzw. kleiner als 500 µm). Einhergehend mit der Miniaturisierung und der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Markieren der DNA-Sonden ist es inzwischen möglich, mehrere zehntausend DNAs parallel auf einer Fläche von

wenigen Quadratzentimetern zu immobilisieren, was auch die benötigte Menge an Proben- und Targetmaterial minimiert.

Die für die Herstellung von DNA-Microarrays verwendete Technik wird seit Ende der 90er Jahre auch zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. In den letzten Jahren wurden verschiedene Peptid-, Protein- und Antikörper-Microarrays erfolgreich entwickelt (70-72), es wurde jedoch auch immer deutlicher, dass Protein Microarrays enge Grenzen gesetzt sind. Diese sind im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass Proteine, im Gegensatz zu DNA, die unabhängig von ihrer Sequenz chemisch uniform ist, individuelle Eigenschaften besitzen (z.B. Hydrophobizität, isoelektrischer Punkt, Löslichkeit), die eine parallele Analyse der Bindungsreaktionen mehrerer tausend Proteine unter identischen äußerlichen Bedingungen massiv erschweren (73). Hinzu kommt, dass Arrays auf Glasobjektträgern zwar die simultane Analyse mehrerer zehntausend Targets erlauben (hohe Dichte), auf Grund ihrer schlechten Handhabbarkeit für die Untersuchung vieler Samples aber nur bedingt geeignet sind (niedriger Durchsatz). Seit ca. 5 Jahren sind neben den planaren auch sogenannte Suspensions-Arrays erhältlich, die auf (meist Polystyrol-) Kügelchen (*beads*) beruhen, die sich durch ihre Größe oder Farbe voneinander unterscheiden. Diese Beads dienen als feste Phase für Bindungsassays und lassen sich in einem Durchflusszytometer identifizieren. Im Gegensatz zu planaren Arrays erlauben Suspensions-Arrays nur die Verwendung weniger Targets (niedrige Dichte), weil die Anzahl verfügbarer Bead-Populationen gering ist (maximal 100), dafür lassen sich mit Suspensions-Arrays Samples in hoher Stückzahl analysieren (hoher Durchsatz) (74).

1.11 Ziel der Arbeit

Um den Haupt-Nachteil des GST capture ELISA (die Beschränkung auf wenige Antigene) zu umgehen, ohne seinen Haupt-Vorteil (die *in situ*-Affinitätsreinigung) einzubüßen, war es Ziel dieser Arbeit, ein Antikörperscreeningsystem für komplexe Antikörperantworten zu entwickeln, das gleichzeitig einen hohen Durchsatz zu analysierender Seren erlaubt und in einem Reaktionsansatz die simultane Analyse von Antikörper-Reaktivitäten gegen mehrere Antigene sowie die *in situ*-Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterienlysaten ermöglicht.

Am Beispiel von Hoch-Risiko-Schleimhaut-HPV-Typen und Antikörperantworten gegen E6-, E7- und L1-Proteine wurde ein derartiges System auf Grundlage eines Suspensions-Arrays erfolgreich entwickelt und zur Durchführung seroepidemiologischer Studien eingesetzt.

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) mindestens in p.A.-Qualität bezogen.

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Aceton wasserfrei	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösungen (Rotiphoese Gel 37.5, 29 und 19 zu 1)	Carl Roth
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Bacto-Agar	DIFCO Becton Dickinson (Sparks, MD, USA)
Bacto-Hefeextrakt	GIBCO Life Technologies (Paisley, Schottland)
Bacto-Trypton	DIFCO Becton Dickinson
Betain Monohydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bis-(3-aminopropyl)-polyethylenglycol (Bis-Amino-PEG)	Aldrich Chem. Co. (Milw., WI, USA)
Bradford-Reagenz (Roti-Quant)	Carl Roth
Bromphenolblau	Merck
Casein (Best.-Nr. C-5890)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Roche
Coomassie-Lösung (GelCode BlueStain Reagent)	Pierce (Rockford, IL, USA)
FluoroLink Cy3 Dye (Cy3-Kopplungsreagenz)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
1,2-Dichlorethan	Fluka (Deisenhofen)
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	Fluka
N,N-Dimethylformamid (DMF)	SdS (Frankreich)
Dimethylsulfoxid absolut über Molekularsieb (DMSO)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
Essigsäure wasserfrei (Eisessig)	Merck
Ethanol absolut	Riedel-de Haën (Seelze)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu (Gaiberg)
Glutathion	Sigma-Aldrich
Glutathion-Sepharose	Amersham Pharmacia
Glycerin wasserfrei	Carl Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Latex-Beads	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)	Serva (Heidelberg)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Mid-Range Protein MW Marker	Promega (Madison, WI, USA)
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat wasserfrei (NaAc)	thomas Chemikalien (Heidelberg)
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Gerbu
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Polyvinylalkohol mit einem mittleren Molekulargewicht von 30-70 kD (PVA)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Polyvinylpyrrolidon mit einem mittleren Molekulargewicht von 360 kD (PVP)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Precision Plus Protein TM All Blue Standard Marker	BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Proteaseinhibitor Complete, EDTA-frei	Roche
R-Phycoerythrin (PE)	Chromaprobe (Aptos, CA, USA)
Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i> , BSA)	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure (H_2SO_4)	AppliChem (Darmstadt)
Stickstoff	DKFZ

Streptavidin-Poly-Peroxidase	Sanquin (Amsterdam, Niederlande)
Streptavidin-R-Phycoerythrin (Strep-PE)	Molecular Probes (Eugene, OR, USA), Dianova (Hamburg)
Superchemiclock (CBS-K)	Chemicon (Temecula, CA, USA)
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Toluol wasserfrei	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton® X-100	Sigma-Aldrich
Tween®-20	Gerbu
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck

2.1.2 Silanisierungsreagenzien

3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Fluka
2 % Diethyldichlorsilan (DEDCS) in Octamethylcyclotetrasiloxan (Repel-Silan)	Amersham Pharmacia
3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTMS)	Fluka
3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MPTMS, Binde-Silan)	Amersham Pharmacia

2.1.3 Crosslinker und Modifizierungsreagenzien für Proteine

Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)	Fluka
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Pierce
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Pierce
<i>m</i> -Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid (MBS)	ICN (Eschwege)
Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC)	Pierce
Sulfosuccinimidyl-4-(<i>p</i> -maleimidophenyl)butyrat (SSMPB)	Pierce

2.1.4 Kommerziell erhältliche Objektträger

unbehandelte Glas-Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Aldehyde Slides	Tele-Chem International (Sunnyvale, CA, USA)
Schott Slide A, Aminosilane Coated Substrate	Schott (Duryea, PA, USA)

FAST™ slides	Schleicher & Schuell (Einbeck)
HydroGel™ Coated Slides	Perkin Elmer (Darmstadt)
Permanox® Cell Culture Slide	Nalge Nunc International (Naperville, IL, USA)
Polystyrene Cell Culture Slide	Nalge Nunc International
QMT epoxy slides	Quantifoil Micro Tools (Jena)

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS	124 mM NaCl, 22 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBST	PBS, 0.05 % Tween-20

2.1.5.2 Für Proteinexpression, -aufreinigung und SDS-PAGE

Garcea-Puffer	40 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA
Glutathion-Elutionspuffer	20 mM Glutathion, 200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0.5 % Bacto-Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1.5 % Bacto-Agar, pH 7.5
1x SDS-Probenpuffer	40 mM Tris, 2.5 % Glycerin, 0.5 % SDS, 1.25 % 2-Mercapto- ethanol, 0.625 % Bromphenolblau, pH 6.8

2.1.5.3 Für direkte Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit Cy3

Cy3-Kopplungspuffer	0.1 M Natrium-Carbonat, pH 9.3
Cy3-Lagerungspuffer	PBS, 0.1 % Natrium-Azid

2.1.5.4 Für Chip-ISA

Spotting-Puffer	PBS, 2 M Betain
Blockpuffer	PBST, 1 mg/ml Casein
Waschpuffer	PBST

2.1.5.5 Für GST capture ELISA

Casein-Blockpuffer	PBST, 0.2 % Casein
--------------------	--------------------

Coating-Puffer	50 mM Natrium-Carbonat, pH 9.6
GST-Blockpuffer	Casein-Blockpuffer, 0.25 mg/ml GST-tag-Lysat
Substratpuffer	100 mM Natrium-Acetat, pH 6.0

2.1.5.6 Für Multiplex-Serologie

Aktivierungspuffer	0.1 M Natriumphosphat, pH 6.2
Blockpuffer	PBS, 1 mg/ml Casein
Kopplungspuffer	50 mM MES, pH 5.0
Lagerungspuffer	Blockpuffer, 0.05 % Natrium-Azid
GST-Blockpuffer	Blockpuffer, 2 mg/ml GST-tag-Lysat
PVX-Blockpuffer	GST-Blockpuffer, 0.5 % PVA, 0.8 % PVP
Waschpuffer	PBST

2.1.5.7 Für direkte Fluoreszenz-Markierung von Antikörpern mit R-PE

Austausch-Puffer	50 mM MES, 2 mM EDTA, pH 6.0
Dialyse-Puffer	50 mM Natrium-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7.0
Lagerungspuffer	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Natrium-Azid, pH 8.2

2.2 Verbrauchsmaterial

Abgesehen von laborüblichem Verbrauchsmaterial wie z.B. Pipettenspitzen, Handschuhen, Eppendorf- und Falcon-Gefäßen wurden folgende Spezialgeräte benutzt:

96-Lochplatten (Polysorp)	
(für GST capture ELISA)	Nunc (Wiesbaden)
384-Lochplatten (für Chip-ISA)	Nunc
Development Microspheres	Luminex Corp.
Fühlerlehrenband	Pfeiffer Werkzeug (Mannheim)
MultiAnalyte Microspheres	Luminex Corp. (Austin, TX, USA)
MultiScreen-BV Filtrationsplatten (Waschplatten)	Millipore (Eschborn)
PD10-Säulen	Amersham Pharmacia
SeroMap Microspheres	Luminex Corp.
Vakuum-Absaug-Einrichtung für Waschplatten	Millipore

2.3 Laborgeräte

Abgesehen von laborüblichen Kleingeräten wie z.B. Tischzentrifugen, Vortexern, Wasserbädern und Schüttlern wurden folgende Spezialgeräte benutzt:

8-Kanal Waschbrett (für GST capture ELISA)	Nunc
Array Booster	Advantix (Brunnthal)
Buchbinderklammern	DKFZ
Exsikkatoren	Carl Roth
Hochdruckhomogenisator (French Press)	Avestin (Ottawa, Kanada)
Multiskan® Plus MKII (ELISA-Reader)	Titertek (Huntsville, AL, USA)
Luminex 100 (Analyzer)	Luminex Corp.
Luminex SD (Puffer-Reservoir)	Luminex Corp.
Luminex XYP (xy-Rastertisch für Waschplatten)	Luminex Corp.
ScanArray 3000 oder 5000 (Fluoreszenzscanner)	Perkin Elmer
SMP3 und SMP10B Pins	Tele-Chem International
SDDC-2 Micro-Arrayer (Spotter)	EuroGenTec (Brüssel, Belgien)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex (Berlin)

2.4 Glycerinkulturen, Bakterienlysate, Expressionsvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren für HPV-Proteine wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Dr. Peter Sehr oder Dipl.-Biol. Kristina Michael kloniert und die entsprechenden Proteine erstmals in *E.coli* exprimiert. Ausgehend von Glycerinkulturen wurden 16 der in dieser Arbeit verwendeten Proteine selbst exprimiert und ggf. aufgereinigt. Die verwendeten pGEX-Vektoren (Amersham) sind IPTG-induzierbare Expressionsvektoren, die rekombinante Proteine als Doppelfusionsproteine mit N-terminaler GST und einem C-terminalen Peptid, bestehend aus elf Aminosäuren des großen T-Antigens des *simian virus 40* (SV40), exprimieren.

2.5 Serumsammlungen

Zervix-Karzinom-Fall/Kontroll-Studie

(Seren aus Chennai, Indien)

Franceschi 2003 ([75](#))

Zervix-Karzinom-Fall/Kontroll-Studie

(Seren aus Algier, Algerien)

Hammouda 2005 ([76](#))

Zervix-Karzinom-Fall/Kontroll-Studie (Seren aus Dänemark)	Visser (nicht publiziert)
Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik (VERA)	Anders 1990 (<u>77</u>)
HPV-16 L1/E7 cVLP-Vakzinierungsstudie	MediGene AG (Martinsried)
HPV-16 und -18 E6/E7-Positivmixe	Mischung verschiedener stark reaktiver Seren (Dr. Peter Sehr, DKFZ)
Blutspenderplasmen	Universitätsklinikum Heidelberg
Kinderseren aus der virologischen Diagnostik	Universität Homburg
Seren von hospitalisierten Kindern	Mund 1997 (<u>38</u>)
Pilot-/Fall-Kontroll-Studie zu NMSC	Abeni (Rom, Italien)

2.6 Antikörper

Biotin-markierter Ziege-anti-human IgA+IgG+IgM (H+L)	Dianova
Biotin-markierter Esel-anti-human IgG+IgM (H+L)	Dianova
Cy3-markierter Ziege-anti-human IgA+IgG+IgM (H+L)	Dianova
Peroxidase-markierter Ziege-anti-Kaninchen	Dianova
Peroxidase-markierter Ziege-anti-Maus	Dianova
Esel-anti-human IgG+IgM (H+L)	Dianova
Kaninchen-anti-GST	Sigma-Aldrich (Saint Louis, MS, USA)
Maus-Serum	Chemicon
Esel-Serum	Dianova
Ziege-Serum	Dianova
Maus- α -human Ig-Biotin-Mix	Sanquin (biotinyliert von Dr. Peter Sehr, DKFZ)
Maus-anti-tag aus KT3-Zellen	MacArthur 1984 (<u>78</u>)

2.7 Software

Microsoft Windows 2000/XP	Microsoft Corp., Unterschleißheim
Microsoft Office 2000/2003	Microsoft Corp.
Luminex 100 IS 2.2 SP1 Software	Luminex Corp.
GenePixTM Pro 4.1	Axon Instruments (Union City, USA)
SigmaPlot 8.0	SPSS (Chicago, IL, USA)
Kappa-Rechner	www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm

3 Methoden

3.1 Protein-Expression in *E.coli*

Wenn nicht anders erwähnt, wurden HPV E6- und E7-Proteine im proteasedefizienten *E.coli*-Stamm BL21 (Amersham Pharmacia) und HPV L1-Proteine in *E.coli* BL21 Rosetta (Merck) exprimiert. Diese BL21-Subspezies enthält ein zusätzliches Plasmid, das für sechs in *E.coli* selten gebrauchte tRNAs codiert und zur Selektion ein Chloramphenicol-Resistenzgen trägt. Große Proteine, in denen statistisch häufiger in *E.coli* selten gebrauchte Codons vorkommen, werden in BL21 Rosetta häufig besser exprimiert. Die Expression von viralen Proteinen in *E.coli* BL21 erfolgte in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, die Expression von Proteinen in BL21 Rosetta in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Chloramphenicol.

3.1.1 Animpfen der Kultur, Protein-Expression, Ernte der Bakterien

Morgens wurden 5 ml Medium aus einer vorhandenen Glycerinkultur angeimpft und über Tag bei 37 °C unter Schütteln (ca. 150 rpm) inkubiert. Die dicht bewachsene 5 ml-Vorkultur wurde abends in 200 ml Medium überführt, das bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde je 1 l Medium mit 100 ml der 200 ml-Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 250 µM IPTG induziert. Die Expression erfolgte in der Regel unter Schütteln für 6 h bei RT. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min bei 4 °C, 5000 rpm in einem SLA-3000 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml PBS (HPV E6- und E7-Proteine) oder Garcea-Puffer (HPV L1-Proteine) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.2 Lyse der Bakterien mittels French Press

Nach dem Auftauen der Bakteriensuspension bei RT wurden 2 mM DTT als Reduktionsmittel und 500 µl Complete-Proteaseinhibitor (eine halbe Tablette gelöst in Wasser) zugegeben, um Degradation der Proteine zu vermeiden. Die Bakteriensuspension wurde von diesem Zeitpunkt an auf Eis gehalten. Der Aufschluss der Bakterien wurde mittels Hochdruckhomogenisator (*French Press*) durchgeführt. Die French Press wurde zuvor über Nacht bei 4 °C vorgekühlt und während des Gebrauchs von außen mit Eis gekühlt. Jede Bakteriensuspension wurde drei mal aufgeschlossen. HPV L1-Fusionsproteine wurden nach

der Lyse mit 2 mM ATP und 5 mM MgCl_2 für 1 h auf einer Wippe inkubiert. ATP und MgCl_2 dienen als Kofaktoren für Chaperone und unterstützen deren Ablösung von den Proteinen (26). Anschließend wurden die löslichen Proteine durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C, 14000 rpm in einem SA-600 Rotor) von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen getrennt. Nach Proteinmengenbestimmung (Bradford-Test) wurden gleiche Volumina des geklärten Lysats und wasserfreien Glycerins gemischt und bei -20 °C gelagert.

3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden mittels Glutathion-Sepharose aus bakteriellen Lysaten aufgereinigt. Dazu wurden 400 μl Glutathion-Sepharose-Beads mit 15 ml PBS gewaschen, 1 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und in 400 μl PBS resuspendiert. Die Beads wurden mit 10 ml frisch hergestelltem Lysat gemischt und für 1 h bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden sie erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Glutathion-Sepharose wurde in 1.5 ml PBS resuspendiert und drei mal durch Zentrifugieren und leichtes Vortexen mit je 1.5 ml PBS gewaschen. Zur Elution der gebundenen GST-Fusionsproteine wurden die Beads mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer versetzt und 30 min bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Beads wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration des eluierten Proteins bestimmt (Bradford-Test). Aufgereinigte Proteine wurden in 25 μl -Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.3 SDS-PAGE, Coomassie- und Silberfärbung, Western Blot

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), Coomassie- und Silberfärbungen von Polyacrylamid (PAA)-Gelen und Maus-anti-tag/Ziege-anti-Maus-Peroxidase- bzw. Kaninchen-anti-GST/Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase-Western Blots (WB) wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt (79).

3.4 Protein Microarrays

3.4.1 Synthese von Glutathion-Casein/-BSA

Casein wurde in einer Konzentration von 0.2 mM bei 37 °C in PBS gelöst. NEM wurde in wasserfreiem DMSO vorgelöst und zu einer finalen Konzentration von 0.4 mM zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde mit final 4.36 mM SSMPB versetzt und 30 min bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde für 5 min mit

6000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Jeweils 2.5 ml Überstand wurden auf eine mit PBS äquilibrierte PD10-Säule gegeben und mit 3 ml PBS eluiert. Das aktivierte Casein wurde für eine Stunde bei RT mit final 20 mM Glutathion umgesetzt, und freies Glutathion wurde wie beschrieben mit Hilfe einer PD10-Säule abgetrennt. Gereinigtes Glutathion-Casein wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung von Glutathion-BSA wurde analog verfahren. Das in dieser Arbeit verwendete Glutathion-Casein bzw. -BSA wurde von Dr. Peter Sehr zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Silanisierung von Glasoberflächen

Unbehandelte Glas-Objektträger wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO), absolutem Ethanol und Wasser gründlich gewaschen. Zum Einführen von Hydroxy-Gruppen in die Glasoberfläche wurden sie anschließend für eine Stunde bei RT in 10 % NaOH, gefolgt von weiteren 15 min im Ultraschallbad, angeätzt. Nach erneutem Waschen mit Wasser und Ethanol wurden die Objektträger für eine Stunde bei RT in die Silanisierungslösung gegeben. Diese enthielt in Eisessig oder Ethanol, Toluol oder Aceton mit 20 mM Essigsäure zur Amino-Silanisierung 5 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), zur Epoxy-Silanisierung 5 % 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTMS) oder zur Binde-Silanisierung 5 % 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan (MPTMS, Binde-Silan). Die Repel-Silanisierung von Objektträgern fand in 2 % Diethyldichlorsilan (DEDCS, Repel-Silan) in Octamethylcyclotetrasiloxan statt. Nach der ersten Inkubation in Silanisierungslösung wurden die Objektträger in der gleichen Lösung noch zusätzliche 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach zwei Waschschritten in Ethanol und einem in Wasser wurden die Objektträger mit Stickstoff getrocknet und für 20 min bei 110 °C gebacken. Die fertig silanisierten Glas-Objektträger wurden in einem Exsikkator unter Stickstoff-Athmosphäre bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.3 Aktivierung von Amino-silanisierten Oberflächen mit DSC

Die Amino-silanisierten Objektträger wurden kurz vor der Verwendung mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC) aktiviert. Dazu wurden sie für zwei Stunden in einer Lösung aus 220 mg DSC und 0.5 ml N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) in 14.5 ml getrocknetem Aceton aktiviert. Nach der Aktivierung wurden die Objektträger zweimal mit wasserfreiem Aceton und zweimal mit 1,2-Dichlorethan gewaschen. Die Objektträger wurden mit Stickstoff getrocknet und anschließend direkt für das Auftragen von Proteinen verwendet.

3.4.4 Herstellung von PEG-Glutathion-Oberflächen

Mit APTES silanisierte und DSC aktivierte Glas-Objektträger wurden gründlich mit N,N-Dimethylformamid (DMF) gewaschen (3 mal 5 min) und in einer Lösung von 10 mg/ml Bis-(3-aminopropyl)-polyethylenglycol (Bis-Amino-PEG) in DMF bei RT über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Glas-Objektträger in DMF, Wasser und Ethanol gewaschen (jeweils 2 mal 5 min). Nach dem Trocknen mit Stickstoff wurden die Objektträger mit *m*-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid (MBS) aktiviert und mit Glutathion gekoppelt. Dazu wurde das MBS in DMF vorgelöst und PEG-beschichtete Objektträger für drei Stunden mit 20 mM MBS in 10 % DIPEA in wasserfreiem DMF aktiviert. Danach wurde die Oberfläche zweimal mit DMF und zweimal mit Ethanol gewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden direkt im Anschluss für 3 Stunden bei RT mit 20 mM Glutathion in PBS umgesetzt. Freies Glutathion wurde mit Ethanol und Wasser abgewaschen. Die fertigen PEG-Glutathion-Objektträger wurden in einem Exsikkator unter Stickstoff-Atmosphäre bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.5 Herstellung von Glutathion-Casein/-BSA-beschichteten Objektträgern

Zur Herstellung von vollständig mit Glutathion-Casein bedeckten Objektträgern wurden DSC-aktivierte Amino-, Epoxy-, Aldehyd-, Polystyrol-, und Permanox®- Objektträger für zwei Stunden bei RT mit 0.2 mg/ml Glutathion-Casein in PBS inkubiert. Fast™ (Membran)-, HydroGel™ (Gel)- oder selbst Gel-beschichtete Objektträger wurden über Nacht inkubiert. Nach der Kopplung wurde freies Glutathion-Casein mit Ethanol und Wasser abgewaschen (PBS mit 0.05 % Tween-20 für Membran- oder Gel-beschichtete Objektträger). Die Glutathion-Casein beschichteten Objektträger wurden in einem Exsikkator unter Stickstoff-Atmosphäre bei 4 °C aufbewahrt. Zur Herstellung von vollständig mit Glutathion-BSA bedeckten Objektträgern wurde analog verfahren.

3.4.6 Herstellung von Gel-beschichteten Objektträgern

Um Glutathion-Casein durch Eingießen in ein Gel auf Objektträgern immobilisieren zu können, wurde eine Methode entwickelt, Gel-beschichtete Objektträger selbst herzustellen. Dazu wurden Objektträger mit Repel- bzw. Binde-Silan behandelt. Als Spacer wurde 13 mm breites Fühlerlehrenband aus Edelstahl mit einer Dicke von 30 µm verwendet. Zwei der Metallstreifen wurden rechts und links zwischen je einen mit Repel- und mit Binde-Silan

behandelten Objektträger gelegt und die Objektträger wurden vertikal leicht versetzt (Abbildung 3-1). Die Objektträger und die Spacer wurden durch Buchbinderklammern zusammengehalten. Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösungen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen und unterschiedlichen finalen Konzentrationen wurden mit unterschiedlichen Mengen Glutathion-Casein oder -BSA und 375 mM Tris pH 8.8 gemischt, mit 0.05 % Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 0.05 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) aktiviert und zwischen die Objektträger gegossen. Ein Auslaufen des Gels wurde durch die starken Kapillarkräfte zwischen den Glas-Objektträgern verhindert. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der mit Repel-Silan behandelte Glas-Objektträger entfernt und der Gel-beschichtete Objektträger bei 4 °C gelagert.

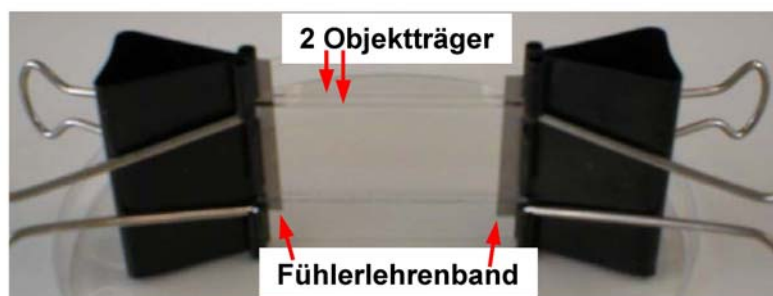


Abbildung 3-1 Herstellung von Gel-beschichteten Objektträgern (siehe Text).

3.4.7 Herstellung von Maus-anti-tag-Cy3 und GST-tag-Cy3

Zur Fluoreszenz-Markierung von Proteinen mit Cy3 wurde ein kommerziell erhältlicher NHS-Ester des Farbstoffs verwendet, der mit primären Aminen des Proteins reagiert (Abbildung 3-2, Reaktion analog zu Abbildung 4-3 unten). 1 mg Protein wurde bei 4 °C unter mehrfachem Pufferwechsel für 24 h gegen einen 1000-fachen Überschuss von Cy3-Kopplungspuffer dialysiert. Dies war insbesondere im Fall des Antikörpers wichtig, der zuvor in Azid-haltigem, d.h. primäre Amine enthaltenden Puffer gelagert worden war. 1 mg des Proteins in 1 ml Cy3-Kopplungspuffer wurde zum Farbstoff gegeben, gemischt und 30 min bei RT inkubiert, wobei alle 10 min erneut gemischt wurde. Markiertes Protein wurde von freiem Farbstoff auf einer mit PBS äquilibrierten PD10-Säule getrennt und mit Cy3-Lagerungspuffer eluiert. Das Verhältnis von Cy3- zu Protein-Molekülen nach der Kopplung wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von Cy3 ($150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 552 nm) für Maus-anti-tag-Cy3 auf 5.7 und für GST-tag-Cy3 auf 2.4 bestimmt.

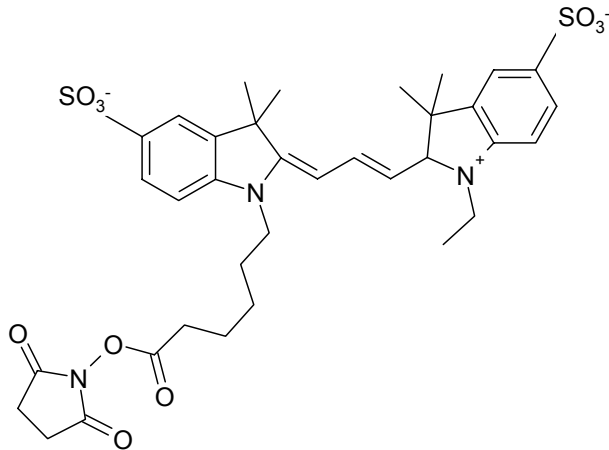


Abbildung 3-2 Strukturformel des verwendeten Cy3-NHS-Esters (siehe Text).

3.4.8 Auftragen von Proteinen auf Objektträger (Spotting)

Zum Aufbringen von Proteinen auf Objektträger wurde ein spezieller Roboter (*Spotter*) verwendet. Die Proteine wurden hierzu in 384-Loch Mikrotiterplatten verteilt. Aus diesen Platten wurden die Proteine mit speziellen eingeschlitzten Nadeln (*Pins*) aufgenommen (SMP3 oder SMP10B) und auf Objektträger abgegeben. Die SMP3-Pins geben ca. 0.7 nl und die SMP10B-Pins ca. 5.2 nl als kleine Tropfen (*Spots*) mit einem Durchmesser von ca. 100 μm (SMP3) bzw. 360 μm (SMP10B) auf der Oberfläche ab. Der Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt der abgegebenen Spots wurde auf 170 μm für die SMP3-Pins und auf 600 μm für die SMP10B-Pins eingestellt. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden mit SMP10B-Pins generiert. Die Luftfeuchtigkeit im Spotter wurde bei ca. 50 % und die Temperatur bei ca. 25 °C konstant gehalten.

3.4.9 Chip-Immunabsorptionsversuch (*immunosorbent assay, ISA*)

Die Untersuchung von Humanseren auf Antikörper mittels Chip-ISA wurde mit kommerziell erhältlichen Gel-beschichteten Objektträgern durchgeführt.

3.4.9.1 Spotten von Bakterienlysaten auf Gel-beschichtete Objektträger

Vor der Benutzung wurden die Objektträger mit Wasser vorgequollen. Dazu wurden sie 6 mal kurz in Wasser geschwenkt, 3 mal 10 Minuten unter Schütteln in Wasser inkubiert, 6 mal kurz in Wasser geschwenkt und 2 min bei 800 rpm zentrifugiert. Dazu wurden sie hochkant

in einen Plastikkorb mit 20 Schlitz für Objektträger gestellt, der auf einer Plattenschaukel in einer Heraeus Minifuge mit entsprechendem Rotor zentrifugierbar ist. Danach wurden die Objektträger 20 min bei 37 °C getrocknet und 5 min bei RT inkubiert. Die Bakterienlysate wurden auf 1 mg/ml in Spotting-Puffer verdünnt, in 384-Loch Platten überführt und auf die Objektträger gespottet. Nach dem Spotten wurden die Objektträger für 2 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurden die Objektträger 1 h bei RT in Blockpuffer geblockt und für 10 min in PBST gewaschen.

3.4.9.2 Serum- und Sekundärantikörper-Inkubationen

Seren wurden zunächst in PBST mit 1 mg/ml Casein und 1 mg/ml GST-tag-Lysat verdünnt und für 1 h bei RT vorinkubiert. Danach wurde das Serum in unterschiedlichen Inkubationskammern für 1 h bei RT mit dem gespotteten Objektträger inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Objektträger kurz mit PBST abgespült und 2 mal 10 min mit PBST gewaschen. Danach wurde der Objektträger für 1 h bei RT mit Cy3-markiertem Ziege-anti-human-Sekundär-Antikörper (1:500 in PBST mit 1 mg/ml Casein) inkubiert, 2 mal 10 min mit PBST gewaschen und 2 min bei 800 rpm zentrifugiert.

3.4.9.3 Analyse der Protein Microarrays

Protein Microarrays wurden mit einem Fluoreszenzscanner, einem konfokalen Lasermikroskop mit xyz-Rastertisch für Objektträger, analysiert. Das Cy3-Signal der entsprechend markierten Proteine wurde bei 543 nm Wellenlänge angeregt und bei einem Emissionsmaximum von 570 nm auf der Microarray-Fläche analysiert. Die Laserintensität und die Signalverstärkung des Photomultipliers wurden zuvor auf den jeweiligen Microarray angepasst. Die Bilder wurden jeweils mit einer Auflösung von 10×10 µm pro Pixel aufgenommen und anschließend im 16 bit-Graustufen-.tif-Format gespeichert, so dass die Skala der Signalintensitäten von 0 bis 65536 (2^{16}) relativen Fluoreszenz-Einheiten (*relative fluorescence units*, RFU) reicht.

3.4.9.4 Auswertung der Signalintensitäten mit GenePix

Die Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte mit der GenePix™ Software. Das aufgenommene Bild für die Cy3-Signale wurde dazu zunächst in das Programm geladen. Für die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde ein Raster über die Microarrays gelegt, dessen Punkte automatisch und auch manuell an die jeweiligen Spots angepasst wurden. Nach dem Anpassen dieses Rasters wurden die Signalintensitäten eines jeden Spots von

der Software ausgewertet und in einer Tabelle wiedergegeben. Neben den Signalintensitäten wurden unter anderem auch die Werte der Hintergrund-Signalintensitäten in der Ergebnistabelle ausgegeben. Zusätzlich wurde der Signalintensität eine Falschfarbe zugeordnet und das Bild im .bmp-Format gespeichert, so dass eine visuelle Auswertung möglich war. Übersättigte Bereiche, deren Signalintensitäten über dem Maximalwert liegen, wurden dabei als weißes Signal dargestellt. Eine Quantifizierung übersättigter Bereiche ist nur bei geringerer Laserintensität und/oder geringerer Signalverstärkung des Photomultipliers möglich.

3.5 GST capture ELISA

3.5.1 Vorbereiten der ELISA-Platte

Um ELISA-Platten mit Glutathion-Casein zu beschichten, wurden die 96-Loch-Platten pro Loch mit 2 µg/ml Glutathion-Casein in 100 µl Coating Puffer befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Coating Puffer ausgeschüttet und die Platte auf einem Papierhandtuchstapel ausgeklopft. Anschließend wurde die Platte mit 180 µl Casein-Blockpuffer pro Loch beschickt und für 1 h bei 37 °C geblockt. Danach wurde der Casein-Blockpuffer ausgeschüttet und ausgeklopft und pro Loch 100 µl verdünnte Antigenlösung (0.25 mg/ml Bakterienlysate in Casein-Blockpuffer) zupipettiert. Die Platten wurden für 1 h bei RT inkubiert, die Antigenlösung ausgeschüttet und ausgeklopft und die Platte mit PBST gewaschen. Dies geschah mit Hilfe eines 8-Kanal-Waschkamms und durch Eintauchen in eine mit PBST gefüllte Glaswanne. Nach erneutem Ausklopfen war die Platte bereit für die Seruminkubation.

3.5.2 Serumpräinkubation, Seruminkubation, Sekundärantikörperinkubation

Seren wurden in GST-Blockpuffer verdünnt und für 1 h bei RT vorinkubiert. Danach wurden pro Loch 100 µl der vorinkubierten Seren in die ELISA-Platte übertragen und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde das Serum ausgeschüttet und ausgeklopft, die Platte wurde gewaschen (s.o.) und ausgeklopft, und pro Loch wurden 100 µl Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (1:10000 in Casein-Blockpuffer) zugegeben. Es wurde für 1 h bei RT inkubiert.

3.5.3 Substratreaktion und Quantifizierung der Farbreaktion im ELISA-Reader

Der Sekundärantikörper wurde ausgeschüttet und ausgeklopft, die Platte wurde gewaschen (s.o.) und ausgeklopft, und pro Loch wurden 100 µl Substratpuffer mit 0.1 mg/ml TMB und 0.006 % H₂O₂ zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 8 Minuten durch die Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Loch gestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen

3.6 Multiplex-Serologie

3.6.1 Herstellung von Glutathion-Casein-Beads

1.25 x 10⁷ Beads wurden zunächst zwei mal mit 400 µl Aktivierungspuffer gewaschen. Waschen der Beads erfolgte durch Zentrifugation für 2 min bei 13200 rpm, Abnehmen des Überstandes, Hinzufügen des Puffers, Sonifizieren für 1 min im Ultraschallbad und Resuspendieren mit einem Vortexer. Anschließend wurde das Beadpellet im gleichen Volumen Aktivierungspuffer resuspendiert. Beide Crosslinker wurden eingewogen und frische Lösungen zu 50 mg/ml angesetzt. EDC wurde in Aktivierungspuffer angesetzt, NHS in wasserfreiem DMSO. Von beiden Lösungen wurden 50 µl zu den Beads gegeben. Die Suspension wurde für 20 min bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Die aktivierten Beads wurden zwei mal wie oben mit 1 ml Kopplungspuffer gewaschen und in 1 ml einer Lösung von 250 µg/ml GC in Kopplungspuffer resuspendiert. Die Kopplung fand unter Schütteln für 2 h bei RT statt. Nach dem Koppeln wurden die Beads in 1 ml Waschpuffer mit 50 mM Tris inkubiert. Danach wurden die Beads zwei mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Beads wurden in Lagerungspuffer bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Typische Ausbeuten waren 70 % für MultiAnalyte- und 60 % für SeroMap-Beads. Mit dieser Menge Beads können mindestens 2500 Seren untersucht werden.

3.6.2 *In situ*-Affinitäts-Reinigung von Antigenen auf GC-Beads

Bakterienlysate wurden auf 1 mg in 1 ml Blockpuffer verdünnt. Für jedes Antigen wurden 3000 Beads pro Serum direkt im verdünnten Bakterienlysate für 1 h bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler beladen. Bis zu 3 Millionen Beads für die Analyse von 1000 Seren wurden in 1 ml Lysatverdünnung mit Antigen beladen. Danach wurden die Beads drei mal mit 1 ml Blockpuffer gewaschen.

3.6.3 Vorinkubation von Seren

Der Serumvorinkubationspuffer enthielt PBS, 1 mg/ml Casein, 2 mg/ml Lysat von GST-tag exprimierenden Bakterien, 0.5 % Polyvinylalkohol, 0.8 % Polyvinylpyrrolidon und 2.5 % CBS-K. Seren wurden in einer Verdünnung von 1 zu 50 für 1 h bei RT auf einem Schüttler vorinkubiert.

3.6.4 Multiplex-Versuch

Zunächst wurde eine Beadmischung hergestellt, indem verschiedene Beadsorten beladen mit unterschiedlichen Antigenen gemischt wurden. Je 50 µl vorinkubiertes Serum und Beadmix wurden in 96-Loch Filterplatten gemischt und für 1 h bei RT im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert (finale Serumverdünnung 1 zu 100). Danach wurden die Platten bzw. Beads dreimal mit Blockpuffer auf einer Vakuum-Absaugstation gewaschen. Biotinylierter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer wurde hinzugegeben und der Ansatz erneut wie oben inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Beads für 30 min mit Detektionskonjugat (Streptavidin-R-Phycoerythrin 1:1000 in Blockpuffer) inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und die Platte mit Blockpuffer gefüllt. Während der Messung im Luminex-Gerät wurde neben der Autofluoreszenz die Reporter-Fluoreszenz der Beads einzeln gemessen und die Median Fluoreszenz-Intensität (MFI) von mindestens 100 Beads jeder Sorte bestimmt.

3.6.5 Analyse der Beads

Die Beadsuspension wird im Analyzer in einer Mikrokapillare vereinzelt und in einer Durchfluss-Küvette mit einer Flussrate von 1 µl/Sekunde analysiert. Dabei regt der rote (Klassifizierungs-)Laser die Beads bei einer Wellenlänge von 635 nm an, was die Identifizierung der Beadsorte ermöglicht, während der grüne (Reporter-)Laser die Beads bei einer Wellenlänge von 532 nm anregt. Eine Photodiode detektiert die Reporter-Fluoreszenz der Beads bei 565 - 585 nm, was die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-Farbstoffe (z.B. Cy3, PE, Alexa® 532) erlaubt. Die Hintergrund-Fluoreszenz der Lösung bei 575 nm wird automatisch von der Reporter-Fluoreszenz der Beads abgezogen. Das erlaubt die Analyse von Beads in einer Lösung mit überschüssigem, nicht gebundenem Strep-PE. Ein Analog/Digital-Wandler speichert die Signalintensität anschließend im 15 bit-Format, so dass die Skala der Signalintensitäten von 0 bis 32768 (2^{15}) relative Einheiten als Median Fluoreszenz-Intensität (*median fluorescence intensity*, MFI) reicht.

3.6.6 Datenprozessierung

Zusätzlich zu den zu analysierenden Antigenen wurde grundsätzlich GST als Antigen verwendet, um aus Rohdaten, sogenannten „Brutto“-Werten, durch Subtraktion des GST-Wertes Hintergrund-korrigierte „Netto“-Werte errechnen zu können. Selten auftretende negative Netto-Werte wurden auf 0 (Null) gesetzt, wenn sie nicht < -100 MFI waren, ansonsten wurde das betreffende Serum von der Analyse ausgeschlossen. Zur Kontrolle, ob Serum in das analysierte Loch der Waschplatte pipettiert worden war, wurde die durchschnittliche Reaktivität des Serums gegen alle verwendeten Antigene errechnet. War diese nicht größer als die durchschnittliche Autofluoreszenz der verwendeten Beadsorten, wurde das Serum nachgetestet.

3.6.7 Herstellung von Maus-anti-tag-R-PE und Esel-anti-human-R-PE

Für die Quantifizierung gebundener Antigene auf GC-Beads wurde der C-terminale SV40-tag der Doppelfusionsproteine benutzt. Ein gegen diesen tag gerichteter monoklonaler Antikörper (78) sowie ein zur Detektion humaner Antikörper eingesetzter Sekundärantikörper wurden in Anlehnung an ein unter <http://www.drmmr.com/abcon/PE.html> erhältliches Protokoll direkt mit R-Phycoerythrin Fluoreszenz-markiert. R-PE ist ein Protein mit 25 Fluoreszenz-aktiven Gruppen und einem Molekulargewicht von ca. 240 kD. 10 mg R-PE wurden als 60 % Ammoniumsulfat-Lösung erworben. Nach Zentrifugation (5 min bei 13200 rpm) wurde der Überstand verworfen und der Farbstoff in 1 ml PBS aufgenommen (10 mg/ml). Das Protein wurde bei 4 °C unter mehrfachem Pufferwechsel für 24 h gegen einen 1000-fachen Überschuss von Dialyse-Puffer dialysiert und umgepuffert. Um Thiol-reaktives PE zu synthetisieren, wurde eine Stocklösung von 10 mg/ml Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) in wasserfreiem DMSO hergestellt. 11 µl der Lösung wurden zu der PE-Lösung gegeben und der Ansatz für 1 h bei RT im Dunkeln auf einem Überkopfschüttler inkubiert (Reaktion analog zu Abbildung 4-3 unten). Maleimid-markiertes PE und freier Crosslinker wurden auf einer mit Austausch-Puffer äquilibrierten PD10-Säule voneinander getrennt. Dazu wurden bei der Elution mit Austausch-Puffer Fraktionen gesammelt, die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt und die Fraktionen mit den höchsten Protein-Konzentrationen vereinigt. Das Thiol-reaktive PE wurde bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert. Um Disulfidbrücken in den zu koppelnden Antikörpern zu freien Thiolen zu reduzieren, wurden zunächst je 1 mg Antikörper auf einer PD10-Säule in PBS umgepuffert, mit 20 mM DTT versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Reduzierte Antikörper und freies DTT wurden auf einer mit Austauschpuffer äquilibrierten PD10-Säule voneinander getrennt (s.o.). Um Reoxidation der Thiole zu Disulfidbrücken zu

vermeiden, wurde je 1 mg der reduzierten Antikörper direkt im Anschluss mit 3.2 mg SMCC-gekoppeltem PE versetzt (ca. 2-facher molarer Überschuss). Die Reaktion fand bei RT für 1 h im Dunkeln auf einem Überkopfschüttler statt. Danach wurden unreaktierte Thiole in den Antikörpern mit NEM abgesättigt (Reaktion analog zu Abbildung 4-3 oben). Dazu wurde eine 10 mg/ml Stocklösung von NEM in wasserfreiem DMSO hergestellt und jeweils 1 mg Antikörper mit 34 µg NEM versetzt. Die Reaktion fand bei RT für 20 min im Dunkeln auf einem Überkopfschüttler statt. PE-markierte Antikörper und freies PE wurden von nicht-markiertem Antikörper auf einer mit Lagerungspuffer äquilibrierten PD10-Säule voneinander getrennt (s.o.). PE-markierte Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

3.7 Statistik

Entgegen in Deutschland üblichem Gebrauch werden Dezimalbrüche in dieser Arbeit mit Punkten anstelle von Kommata getrennt. Dies dient der leichteren Lesbarkeit von Aufzählungen (z.B. 7.5, 10.0, 12.2 und 15.4 %).

3.7.1 Mathematische Größen

In der vorliegenden Arbeit werden häufig drei statistische Größen zur quantitativen Analyse von Experimenten herangezogen, das Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten R (auch R^2 -Wert oder Bestimmtheitsmaß genannt), die Steigung der Korrelationsgeraden (die auch Trendlinie oder Ausgleichsgerade genannt wird) und der Variationskoeffizient (auch relative Standardabweichung genannt).

Will man die Übereinstimmung zweier zusammenhängender Datensätze prüfen (z.B. die Messwerte derselben Patientenproben in zwei unabhängigen Experimenten), kann man den einen Datensatz auf der Ordinate (y-Achse) und den anderen auf der Abszisse (x-Achse) eines xy-Diagramms gegeneinander auftragen (Abbildung 3-3). Besteht zwischen den zwei Datensätzen eine lineare Abhängigkeit, lässt sich diese durch eine Korrelationsgerade darstellen. Dabei wird die Gerade so durch die Datenpunkte gelegt, dass der mittlere quadratische Abstand der einzelnen Punkte von der Geraden minimiert wird. Der R^2 -Wert ist ein dimensionsloser Index mit dem Wertebereich $0 \leq R^2 \leq 1$ und ein Maß dafür, wie stark die lineare Abhängigkeit der zwei Datensätze voneinander ist. Praktisch bedeutet dies, dass der R^2 -Wert Aussagen über individuelle Abweichungen im Vergleich zweier Datensätze zulässt.

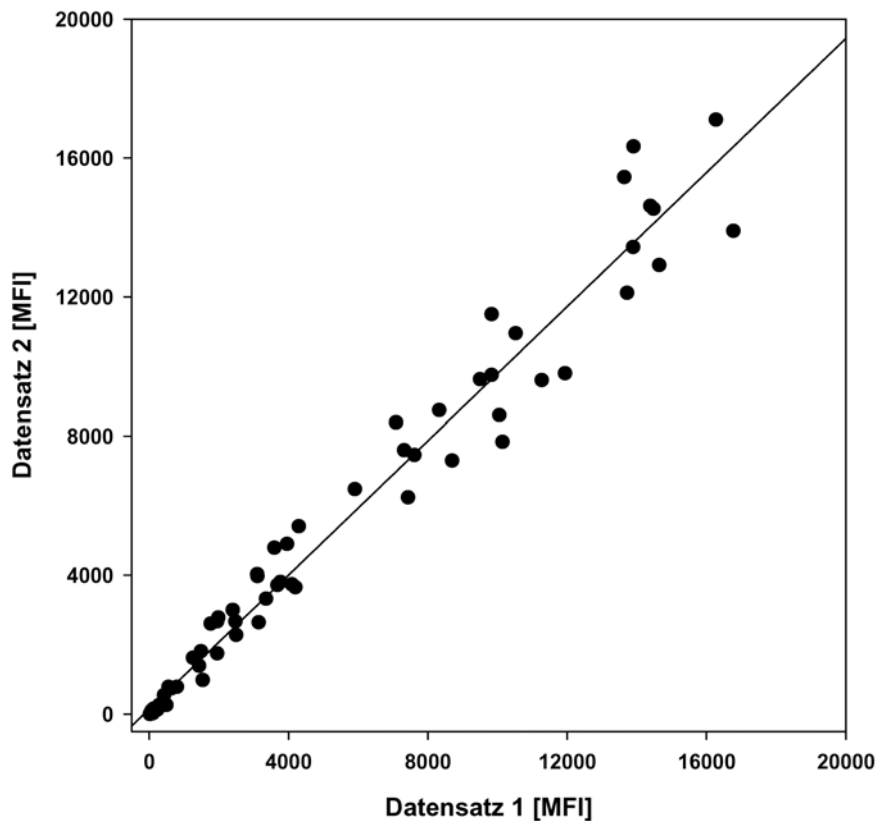


Abbildung 3-3 xy-Diagramm zur Bestimmung der linearen Abhängigkeit zweier Datensätze. Die Korrelationsgerade folgt der Gleichung $y=0.97 \cdot x+145$. Der R^2 -Wert ist 0.97. Median Fluoreszenz-Intensitäten (*median fluorescence intensity*, MFI) sind Mess-Einheiten von Multiplex-Serologie.

Die Korrelationsgerade selber lässt sich durch eine Gleichung des Typs $y=m \cdot x+b$ beschreiben, wobei m die Steigung der Geraden beschreibt und b den y-Achsenabschnitt, also den Punkt auf der y-Achse, den die Gerade schneidet. Die Steigung der Geraden ist ein Maß dafür, wie stark die absoluten Messwerte der zwei Datensätze voneinander abweichen. Eine Steigung von 1, die in einem xy-Diagramm mit gleich langen Achsen einem Winkel der Korrelationsgeraden von 45° entspricht, bedeutet, dass die absoluten Messwerte in beiden Datensätzen gleich groß sind, während eine Steigung von 1.5 eine Erhöhung der absoluten Messwerte um 50 % in dem auf der y-Achse aufgetragenen Datensatz bedeutet. Praktisch bedeutet dies, dass die Steigung der Korrelationsgeraden Aussagen über systematische Abweichungen im Vergleich zweier Datensätze zulässt.

Der Variationskoeffizient (*coefficient of variation*, CV) gibt die Standardabweichung mehrerer Messwerte in Abhängigkeit von ihrem Mittelwert in Prozent wieder. Damit ist er - im

Gegensatz zur Standardabweichung - ein von den Absolutwerten unabhängiges Maß für die Schwankungen von Messwerten. Er errechnet sich einfach als $100 \times \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert der Messwerte}$. Im allgemeinen werden Variationskoeffizienten von $< 15 \%$ als akzeptabel, von $< 10 \%$ als gut und von $< 5 \%$ als sehr gut erachtet.

Statistische Tests, die in dieser Arbeit nur einmal verwendet werden, werden im entsprechenden Kapitel näher erläutert.

3.7.2 Serologische Größen

Obwohl die Antikörper-Reaktivität eines Serums gegen ein gegebenes Antigen quantifiziert werden kann, ist für verschiedene Analysen eine rein qualitative Aussage über die Reaktion notwendig. Dazu muss ein Grenzwert (*cut-off*) definiert werden, der die Klassifizierung des Serums als (Antikörper-)„positiv“ oder „negativ“ erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurden Cut-Offs - wenn nicht anders erwähnt - anhand einer Kontrollgruppe von ca. 50 Individuen bestimmt, in der nur wenige positive Reaktionen erwartet wurden. Dafür wurde in einem iterativen Verfahren für jedes Antigen der Mittelwert der Antikörper-Reaktivitäten der Kontrollgruppe plus drei Standardabweichungen (unter Ausschluss positiver Abweichungen) errechnet.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zur Detektion humaner Antikörper gegen HPV-Proteine zu entwickeln, das in einem Reaktionsansatz die parallele Analyse von Antikörper-Reaktivitäten gegen mehrere Antigene gleichzeitig ermöglicht.

Dazu wurde zunächst ein System auf der Grundlage von Protein Microarray-Technologie entwickelt, der *chip-based immunosorbent assay* (Chip-ISA). Noch in der Entwicklungsphase des Chip-ISA wurde eine zweite für die parallele Analyse von Antikörper-Reaktivitäten geeignete Technologie namens Luminex identifiziert. Auf der Grundlage dieser Technologie wurde zeitweilig parallel zur Entwicklung des Chip-ISA ein System etabliert, das Multiplex-Serologie genannt wurde. Da sich Multiplex-Serologie als sehr viel besser für die Durchführung seroepidemiologischer Studien geeignet erwies als der Chip-ISA, wurde dessen Weiterentwicklung nach ca. einem Jahr eingestellt.

Demzufolge gliedert sich der Ergebnisteil dieser Arbeit in vier wesentliche Kapitel:

- Entwicklung des Chip-ISA
- Entwicklung von Multiplex-Serologie
- Validierung von Multiplex-Serologie
- Seroepidemiologische Studien

4.1 Chip-ISA

Der Name Chip-ISA leitet sich vom *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ab. Da das System allerdings nicht mit Enzym-gekoppelten, sondern mit Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpern arbeitet, wird der Begriff *chip-based immunosorbent assay* (Chip-ISA) verwendet.

Um den sinnvollen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu sprengen, wird die Entwicklung des Chip-ISA hier nicht in vollem Umfang dargestellt. Stattdessen werden die zentralen Entwicklungsschritte sowie Möglichkeiten und Nachteile der Technologie dargestellt.

4.1.1 Oberflächenentwicklung

Protein Microarray-Technologie basiert auf der Benutzung eines speziellen Roboters (*spotter*). Dabei werden mit Hilfe von geschlitzten Nadeln (*pins*) Proteine aus einer

384-Lochplatte entnommen und als kleine Tropfen (*spots*) auf Objektträger aufgetragen (Abbildung 4-1).

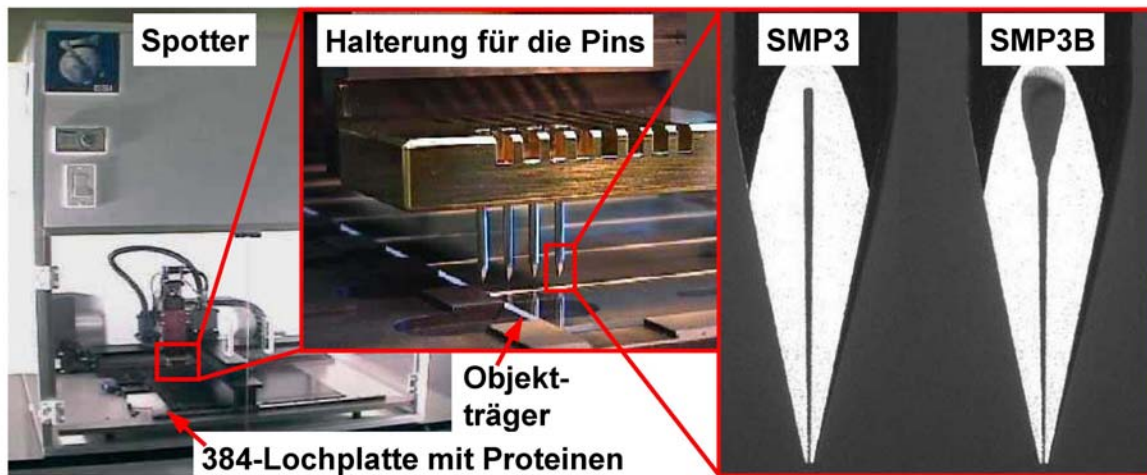


Abbildung 4-1 Herstellung von Protein Microarrays (Erläuterungen siehe Text). SMP3-Pins geben ca. 0.7 nl als Spot mit einem Durchmesser von ca. 100 µm auf der Oberfläche ab. Das „B“ hinter der Bezeichnung der Pins steht für ein größeres Reservoir.

Um den zentralen Vorteil des GST capture ELISA, die *in situ*-Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen, auf ein Protein Microarray-basiertes System übertragen zu können, mussten Oberflächen für Objektträger entwickelt werden, die funktionales Glutathion enthalten, um GST-Fusionsproteine aus gespotteten Bakterienlysaten aufzureinigen.

Der chemischen Zusammensetzung und makroskopischen Struktur der für Protein Microarrays verwendeten Objektträger wird größte Bedeutung zugemessen (80,81). Grundsätzlich lassen sich zwei Arten von Objektträger-Oberflächen unterscheiden: chemisch modifizierte Glas- oder Plastik-Oberflächen, deren Eigenschaften sich aus ihrer mikroskopischen chemischen Struktur ableiten, und Membran- oder Gel-beschichtete Objektträger, deren Eigenschaften denen ihrer makroskopischen Beschichtung entsprechen. Einige dieser Objektträger sind kommerziell erhältlich, andere Oberflächen wurden selbst entwickelt.

Funktionelle Amino-, Epoxy- oder Aldehyd-Gruppen lassen sich durch Silanisierung in eine Glasoberfläche einführen, nachdem das Glas zuvor mit NaOH angeätzt wurde, um freie Hydroxy-Gruppen in der Oberfläche zu erzeugen. Danach sind die durch die Silanisierung eingeführten chemischen Gruppen entweder spontan oder nach Aktivierung mit einem

chemischen Kopplungsreagenz (*crosslinker*) in der Lage, kovalente Bindungen mit anderen chemischen Gruppen zu knüpfen. Epoxy (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan, GPTMS)-silanierte Objektträger reagieren spontan mit allen Nukleophilen, Aldehyd-silanierte Objektträger reagieren spontan unter Bildung von Schiff-Basen mit Amino-Gruppen und Amino (3-Aminopropyltriethoxysilan, APTES)-silanierte Objektträger reagieren nach Aktivierung mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC) mit anderen Amino-Gruppen (Abbildung 4-2).

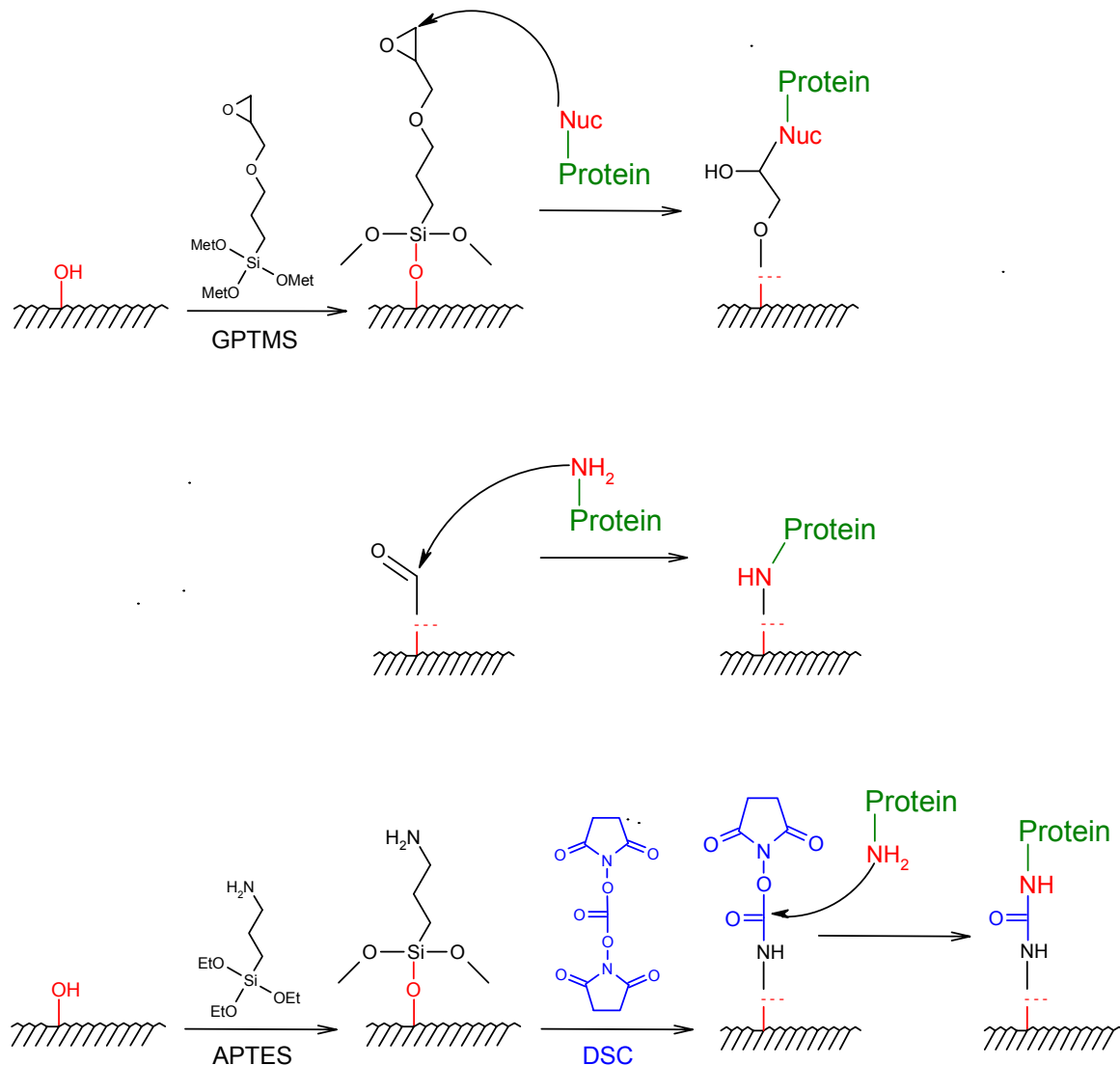


Abbildung 4-2 Silanisierung von Objektträgern und Bindung von Proteinen. Reaktionsmechanismen für Epoxy-silanierte Objektträger (oben), Aldehyd-silanierte Objektträger (Mitte) und Amino-silanierte Objektträger (unten). Aldehyd-funktionalisierte Objektträger wurden kommerziell erworben und nicht selber hergestellt.

Die Synthese von Glutathion-funktionalisierten Oberflächen ist kompliziert. Das Tripeptid Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) muss über die Thiol-Gruppe seines zentralen Cysteins an andere Moleküle gekoppelt werden, da die einzige andere für spezifische Kopplungs-Chemie zugängliche Gruppe, die terminale Amino-Gruppe, an der Interaktion mit GST beteiligt ist (82). Darüber hinaus kann Glutathion auf Grund seines geringen Molekulargewichts nur indirekt auf Oberflächen immobilisiert werden. Eine Möglichkeit ist, es an ein größeres Trägermolekül zu koppeln, das durch Physicosorption an Oberflächen binden kann. Eine andere Möglichkeit ist die kovalente Kopplung von Glutathion an Oberflächen mit Hilfe eines Abstandhalters (*spacer*). In jedem Fall muss das Glutathion über einen möglichst langen Crosslinker an das Trägermolekül oder den Spacer gekoppelt werden, da sonst sterische Hinderungen bei der Interaktion von GST und Glutathion zu erwarten sind.

Um die Produktion von mehrschichtigen Oberflächen zu erleichtern, wurde Glutathion-Casein in Lösung synthetisiert. Dazu wurden mit Hilfe des heterobifunktionellen Crosslinkers Sulfo-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)-butyrat (SSMPB) die Amino-Gruppen der Lysine von Casein mit den Thiol-Gruppen der Cysteine mehrerer Glutathion-Moleküle gekoppelt. Zuvor wurde der Cystein-Rest von Casein mit N-Ethylmaleimid (NEM) geblockt, um eine falsche Orientierung des Crosslinkers an dieser Position zu verhindern (Abbildung 4-3).

Das resultierende chemische Fusionsprotein Glutathion-Casein lässt sich an Oberflächen adsorbieren oder über die Amino-Termini einzelner Glutathion-Reste kovalent auf chemisch modifizierte Objektträger koppeln, wodurch diese Glutathion-Reste nicht mehr mit GST interagieren können. Da jedoch jedes Glutathion-Casein-Molekül bis zu elf Glutathion-Reste trägt, verbleiben auf der dem Objektträger abgewandten Seite des globulären Proteins funktionale Glutathion-Reste. Für die Synthese von Glutathion-Rinderserumalbumin (BSA) wurde analog verfahren.

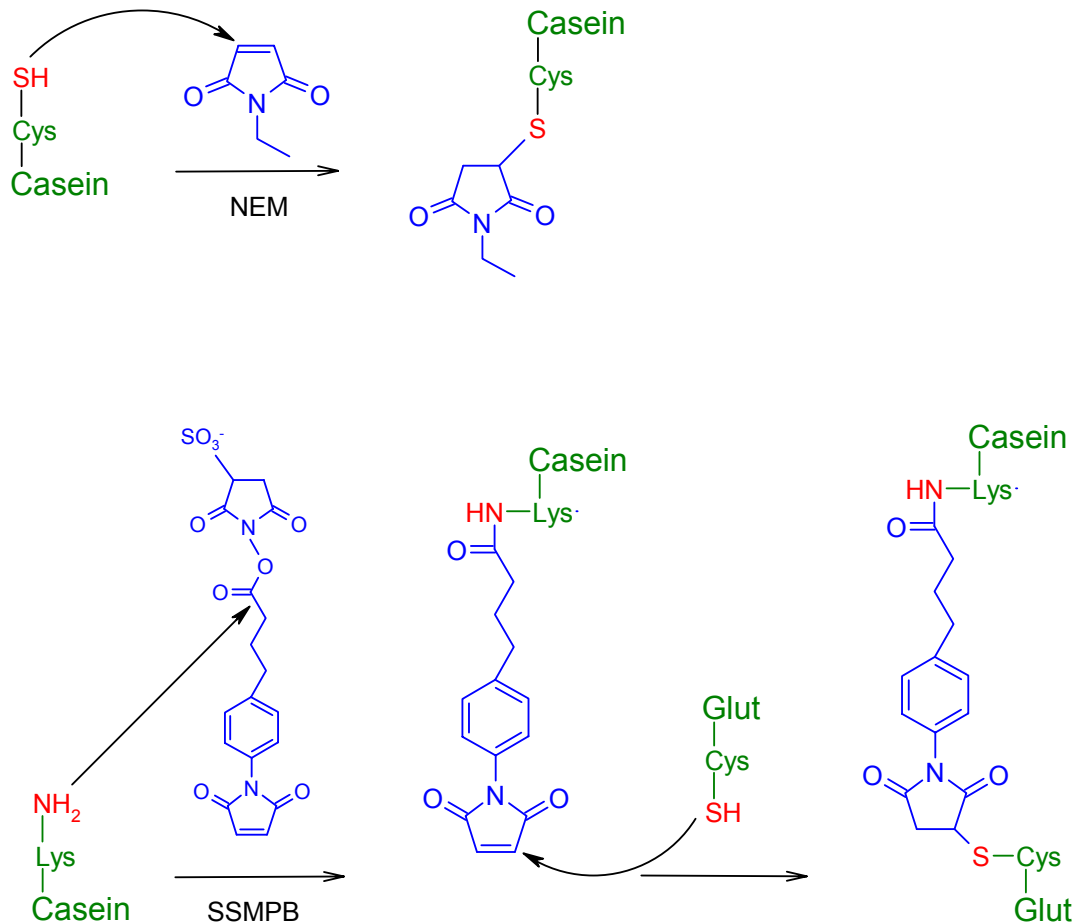


Abbildung 4-3 Synthese von Glutathion-Casein. Oben: Blocken des Cystein-Restes von Casein mit N-Ethylmaleimid (NEM). Unten: Sulfo-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)-butyrat (SSMPB)-vermittelte Bindung von Glutathion an Casein.

Objektträger mit kovalent gekoppeltem Glutathion wurden mit verschiedenen Spacern hergestellt: mit vorsynthetisiertem Glutathion-Casein/-BSA und Bis-(3-aminopropyl)-polyethylenglycol (Bis-Amino-PEG), einem beidseitig terminal Amino-modifizierten PEG mit einem mittleren Molekulargewicht von 600 kD. Zur Herstellung von Glutathion-funktionalisierten PEG-Oberflächen wurden DSC-aktivierte Amino-silanisierte Objektträger zunächst mit Bis-Amino-PEG gekoppelt, mit *m*-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid (MBS) erneut aktiviert und zuletzt mit Glutathion funktionalisiert (Abbildung 4-4).

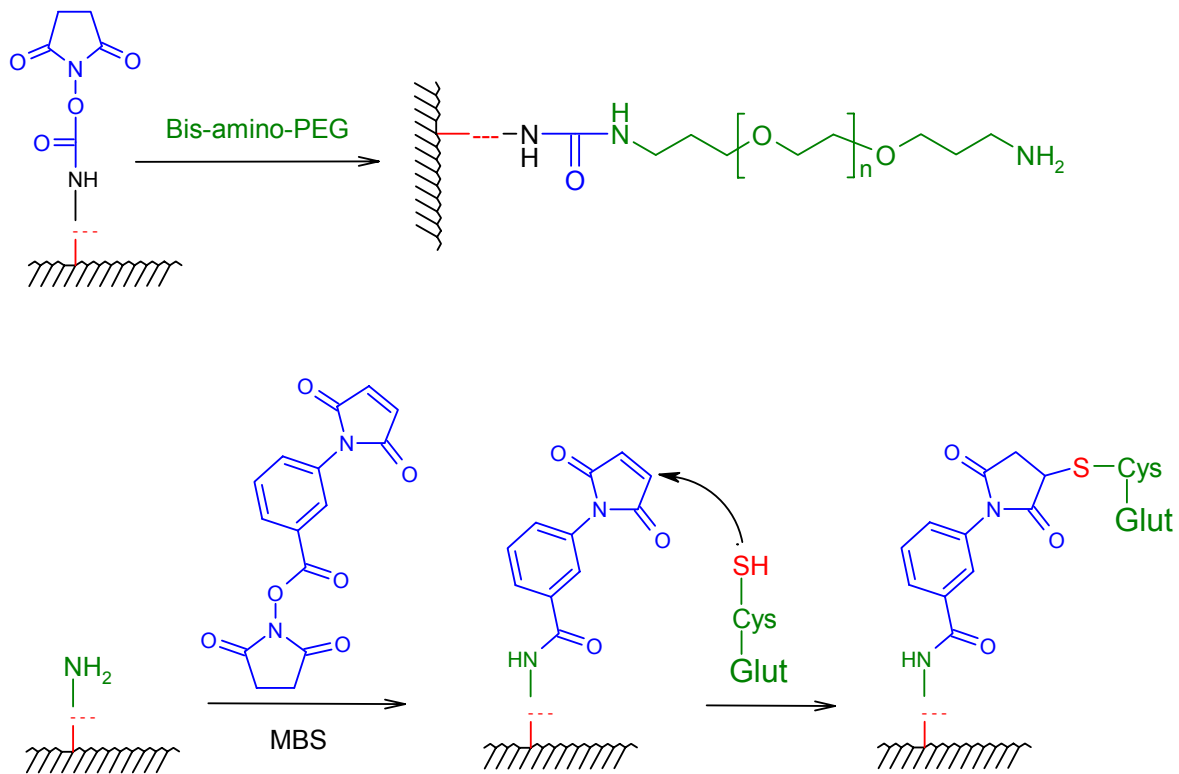


Abbildung 4-4 Synthese von Glutathion-PEG-Oberflächen. Oben: Kopplung von DSC-aktivierten Amino-silanisierten Objektträgern mit Bis-Amino-PEG ($n \approx 34$). Unten: Anschließende Aktivierung mit *m*-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid (MBS) und Kopplung mit Glutathion.

Als Trägermolekül für Adsorptionsversuche wurden Casein und BSA verwendet. Um die Immobilisierung von Glutathion-Casein/-BSA auf Gel-beschichteten Objektträgern zu optimieren, wurde in Anlehnung an publizierte Verfahren ([80,83](#)) eine Methode entwickelt, die das Gießen von Polyacrylamid-Gelen auf Objektträger ermöglicht. Dies erlaubte es, das Glutathion-Casein/-BSA nicht nur nachträglich durch Diffusion in die Gele zu immobilisieren, sondern es bei der Produktion der Gele mit einzugießen. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Objektträger und entwickelten Oberflächen.

Tabelle 4-1 Verwendete Objektträger und entwickelte Oberflächen

Objektträger-Material	selbst silanisiert mit oder kommerziell erhältlich als	chem. Modifikation oder makroskop. Beschichtung	Bindungstyp	Bindung von
Glas	APTES ¹	Amino	kovalent	Glut.-Casein
	APTES	Amino	kovalent	Glut.-BSA
	APTES	Amino	kovalent	Glut.-PEG
	GPTMS ²	Epoxy	kovalent	Glut.-Casein
	GPTMS	Epoxy	kovalent	Glut.-BSA
	Schott Slide A	Amino	kovalent	Glut.-Casein
	QMT Epoxy Slides ³	Epoxy	kovalent	Glut.-Casein
	Tele-Chem Aldehyde Slides	Aldehyd	kovalent	Glut.-Casein
Polystyrol	Nunc Polystyrene Slide	keine (Polystyrol)	Adsorption	Glut.-Casein
Polyolefin ⁴	Nunc Permanox® Slide	nicht bekannt	Adsorption	Glut.-Casein
Glas	S&S FAST™ Slides ⁵	Nitrocellulose-Membran	Adsorption	Glut.-Casein
	PE HydroGel™ Slide ⁶	Polyacrylamid-Gel ⁷	Adsorption	Glut.-Casein
	MPTMS ⁸	Polyacrylamid-Gel	Adsorption	Glut.-Casein
	MPTMS	Polyacrylamid-Gel	Adsorption	Glut.-BSA

¹ Aminopropyltriethoxysilan² Glycidoxypropyltrimethoxysilan³ QMT: Quantifoil Micro-Tools⁴ Das Material der Permanox®-Objektträger gehört laut Hersteller zur Polyolefin-Familie.⁵ S&S: Schleicher & Schuell⁶ PE: Perkin Elmer⁷ Polyacrylamid mit nicht bekannten Zusätzen⁸ Methacryloxypropyltriethoxysilan

Zusätzlich wurden folgende Parameter untersucht bzw. optimiert:

- Silanisierung von Objektträgern
 - Deposition von Silanisierungsreagenzien aus unterschiedlichen Lösungsmitteln (Ethanol, Toluol, Aceton, Eisessig in unterschiedlichen Konzentrationen und Mischungsverhältnissen)
 - Backen von silanisierten Objektträgern (Dauer, Temperatur)
 - Lagerbarkeit silanisierter Objektträger
- selbst gegossene Gel-beschichtete Objektträger
 - Polyacrylamid-Konzentration im Gel (7.5, 10, 12, 15 %)
 - Acrylamid/Bisacrylamid-Mischungsverhältnis (37.5 zu 1, 29 zu 1, 19 zu 1)
 - Glutathion-Casein/-BSA-Konzentration im Gel (bis 0.5 %)
 - Auswaschbarkeit von eingegossenen Proteinen

4.1.2 Spotting-Puffer

Glutathion und Glutathion-Casein/-BSA lassen sich trocknen und rehydrieren, ohne die Fähigkeit zur Bindung an GST zu verlieren. Die *in situ*-Affinitätsreinigung von gespotteten GST-Fusionsproteinen auf Glutathion-haltigen Oberflächen unter Ausnutzung der Enzym-Substrat-Reaktion von GST und Glutathion ist allerdings nur in einer wasserhaltigen Umgebung möglich. Hinzu kommt, dass die gespotteten Antigene selbst nach erfolgter *in situ*-Affinitätsreinigung nicht trocknen und damit möglicherweise denaturieren dürfen, da viele humane Antikörper gegen Epitope gerichtet sind, die nur in nativer Konformation des Proteins vorliegen.

Eine wasserhaltige Umgebung auf Objektträgern lässt sich im Wesentlichen durch den verwendeten Spotting-Puffer herstellen. Wird das Bakterienlysats lediglich in wässriger Lösung (z.B. PBS) gespottet, verdunsten die vom Pin abgegebenen ca. 0.7 oder 5.2 nl pro Spot bei Raumtemperatur in wenigen Sekunden. Dies lässt sich durch den Zusatz von inerten, viskosen Chemikalien wie Glycerin verhindern, die in sehr hohen Konzentrationen die Oberflächenspannung des Tropfens so stark erhöhen und den Dampfdruck der Lösung so stark verringern können, dass fast gar keine Verdunstung mehr stattfindet (84). Verschiedene Substanzen (Glycerin, PEG, Betain) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in unterschiedlichen Puffern ausgetestet. PBS mit einem Zusatz von 2 M Betain ([Carboxymethyl]trimethylammonium, $(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$) als Spotting Puffer zeigte die besten Ergebnisse.

Darüber hinaus lässt sich eine wasserhaltige Umgebung auch durch die Oberfläche des Objektträgers schaffen. Die Verwendung von Bis-Amino-PEG als Spacer erzeugt eine stark hydrophile, mit Glutathion funktionalisierbare Matrix, die im Gegensatz zu den anderen Spacern in der Lage ist, Wasser zu speichern und nach Äquilibration eine gelartige Konsistenz zu erhalten (85). Gleiches gilt auch für kommerziell erhältliche Membran- und käuflich erworbene und selbst hergestellte Gel-beschichtete Objektträger. HydroGel™-Objektträger sind nach Angaben des Herstellers im trockenen Zustand mit einem 5 µm und nach Äquilibration 30 µm dicken Polyacrylamid-Gel beschichtet.

Zusätzlich wurden folgende Parameter untersucht bzw. optimiert:

- Pins
 - Typ (SMP3, SMP10B) bzw. abgegebenes Volumen (0.7 bzw. 5.2 nl pro Spot)
 - Annäherungsgeschwindigkeit an die und
 - Verweildauer auf der Oberfläche verschiedener Objektträger
- Auswertung am Fluoreszenzscanner
 - Einfluss unterschiedlicher Laser-/Photomultiplier-Einstellungen auf die Vergleichbarkeit von Ergebnissen
 - Einfluss des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs auf die Ergebnisse (Cy3, Cy5, GFP)
 - Einfluss der Autofluoreszenz von Polyacrylamid-Gelen auf Objektträgern auf die Ergebnisse

4.1.3 Spezifische Interaktionen

Im Wesentlichen unabhängig von der verwendeten Oberfläche konnten verschiedene spezifische Protein-Protein-Interaktionen mit Protein Microarrays generiert werden. Abbildung 4-5 zeigt mehrere Beispiele dafür. In Panel A wurde eine Verdünnungsreihe von gereinigtem GST-tag auf einen (Gel-beschichteten) HydroGel™-Objektträger gespottet. Der Objektträger wurde geblockt und nach einer Inkubation, die eine Immobilisierung des gespotteten Proteins durch Diffusion in das Gel bewirkt, gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Danach wurde der Objektträger in Blockpuffer inkubiert, der 160 µg/ml gereinigten Cy3-markierten Maus-anti-tag-Antikörper und 1 mg/ml Bakterien-wt-Lysat als unspezifischen Kompetitor enthielt. Nach erneutem Inkubieren und Waschen wurden gebundene Antikörper in einem Fluoreszenzscanner für Objektträger detektiert. Der Fluoreszenz-markierte Antikörper band ausschließlich an die das Antigen enthaltenden Spots, wobei das Signal direkt von der Konzentration an vorhandenem Antigen abhing.

In Panel B wurde der Versuch umgekehrt. Gespottet wurde gereinigter Maus-anti-tag-Antikörper, und der Objektträger wurde in einer Lösung inkubiert, die 160 µg/ml GST-tag-Cy3 enthielt. Auch in diesem Fall wurde eine spezifische Interaktion von Antigen und Antikörper detektiert, selbst wenn die Konzentrationsabhängigkeit des Signals nicht so gut erkennbar ist wie im umgekehrten Fall. In Panel C wurde Glutathion-Casein gespottet und GST-tag-Cy3 aus Lösung gebunden. Das Signal ist insgesamt schwächer als bei den Antikörper-Antigen-Interaktionen, scheint aber bereits bei einer geringen Glutathion-Casein-Konzentration in Sättigung zu sein. Dieser Versuch beweist, dass auch eine spezifische Glutathion-GST-Interaktion auf Protein Microarrays möglich ist. Der umgekehrte Fall (Spotten von GST-tag

und Binden von Glutathion-Casein-Cy3 aus Lösung) wurde nicht durchgeführt, weil die Synthese von Glutathion-Casein-Cy3 aus kopplungstechnischen Gründen äußerst schwierig ist. Man kann schlussfolgern, dass spezifische Protein-Protein-Interaktionen auf Protein Microarrays möglich sind, wenn der eine Bindungspartner gespottet wurde und sich der andere Partner in einer Lösung befindet, in der der Objektträger inkubiert wird.

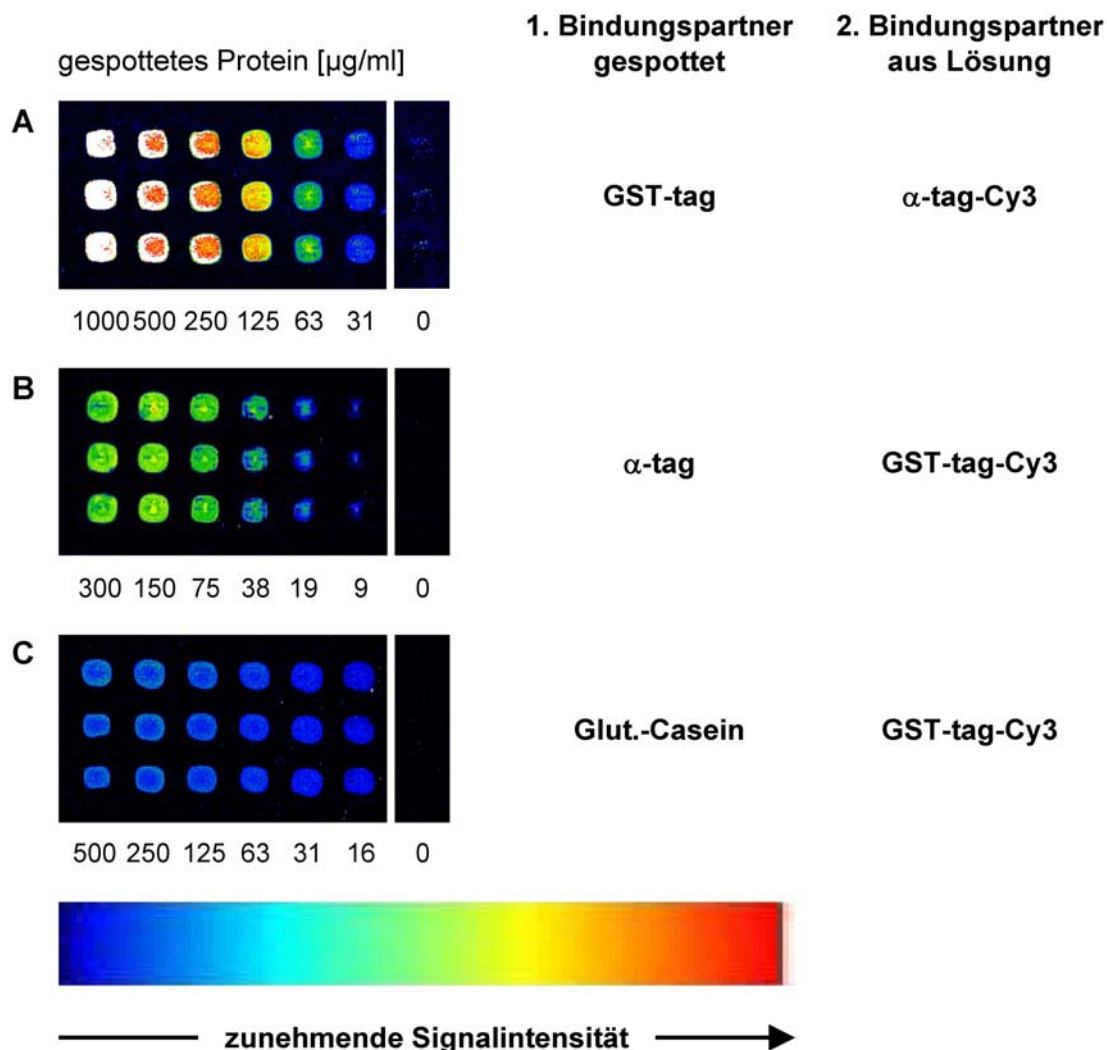


Abbildung 4-5 Spezifische Protein-Protein-Interaktionen auf Protein Microarrays (Erläuterungen siehe Text). Die drei Spots übereinander sind jeweils Replikate. Die Zuordnung von Falschfarben zu den Signalintensitäten erlaubt eine visuelle Auswertung.

Diese Aussage lässt sich auch auf komplexe serologische Assays übertragen. Objektträger mit verschiedenen Oberflächen wurden mit einer Verdünnungsreihe von vorgereinigtem HPV-18 E7 gespottet, inkubiert, geblockt und gewaschen. Danach wurden sie mit einem

Serum inkubiert, dass stark gegen HPV-18 E7 reagiert (HPV-18 E6/E7-Positivmix in einer Verdünnung von 1 zu 800). Die Objektträger wurden erneut gewaschen, bevor gebundene Antikörper mit Cy3-markiertem Esel-anti-human-Sekundär-Antikörper detektiert wurden (Abbildung 4-6).

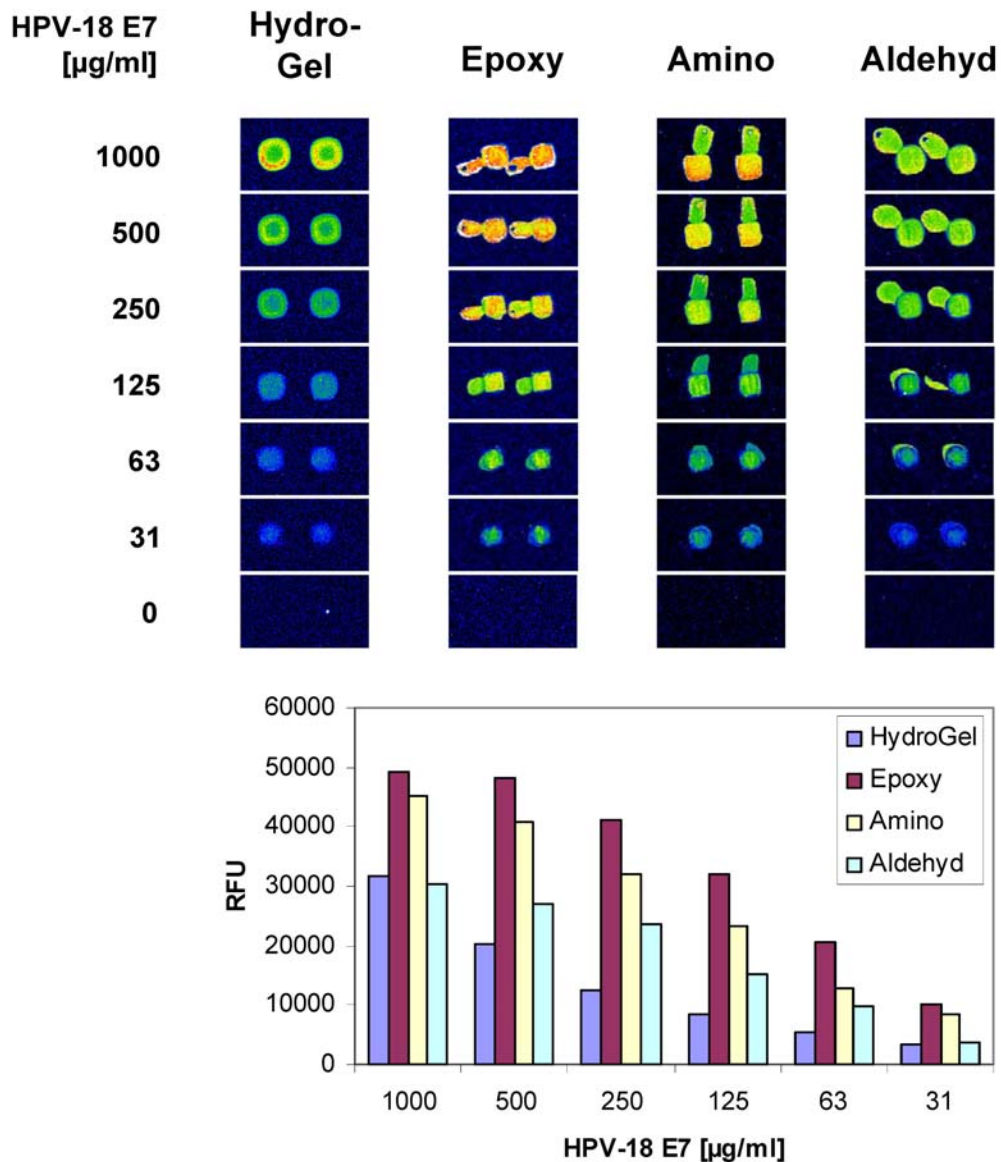


Abbildung 4-6 Verschiedene Oberflächen für Protein Microarrays (siehe Text). Oben: Falschfarbendarstellung der Signalintensitäten. Die zwei Spots in einem Feld sind Replikate. Das teilweise eher eckige als runde Erscheinungsbild der Spots entspricht dem Querschnitt der Pinspitze und ist Folge der hohen Viskosität der gespotteten Lösung. Unten: Darstellung der quantitativen Auswertung der Signalintensitäten in relativen Fluoreszenz-Einheiten (*relative fluorescence units*, RFU) für Antigen-enthaltende Spots.

Für alle Objektträger zeigt sich ein konzentrationsabhängiges Ergebnis, wobei Epoxy- und Amino-Oberflächen die höchsten Signale zeigten, während Gel- und Aldehyd-Objektträger wesentlich schwächere Signale zeigten. Des weiteren ist zu sehen, dass die Spots auf den chemisch modifizierten Objektträgern verschmiert sind. Dies passiert beim Eintauchen der bespotteten Objektträger in den Blockpuffer, wobei die Richtung der verschmierten Spots (*flags*) davon abhängt, ob der Objektträger mit der kurzen oder der langen Seite voran in den Blockpuffer eingetaucht wurde. Das Verschmieren der Spots stellt in mehrfacher Hinsicht ein Problem dar. Erstens können je nach Blockmethode die Flags so lang werden, dass sie benachbarte Spots überlagern (was sich durch größere Abstände der Spots verhindern lässt). Zweitens werden die Ergebnisse verfälscht, weil die Hintergrund-Korrektur der Software, die die Signalintensitäten ausliest, nicht mehr stimmt (Abbildung 4-7).

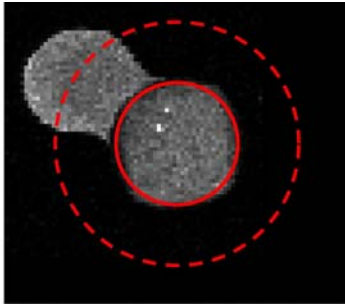


Abbildung 4-7 Quantitative Auswertung von Signalintensitäten mit GenePix™-Software. Von der durchschnittlichen Signalintensität des inneren Kreises wird die durchschnittliche Signalintensität des äußeren Rings als Hintergrund abgezogen.

Vor allem aber geht den Spots auf unkontrollierbare Weise unterschiedlich viel aufgespottetes Protein verloren, so dass sie in ihrer Reaktivität nicht mehr vergleichbar sind. Dieses Problem tritt bei Nukleinsäure- oder Antikörper-Arrays nicht auf, weil die Objektträger nach dem Spotten getrocknet oder sogar gebacken werden. Keines der getesteten Protokolle zum Blocken der Objektträger war in der Lage, das Verschmieren der Spots zuverlässig und für mehr als nur wenige Objektträger gleichzeitig zu verhindern. Im weiteren Verlauf der Versuche wurden deshalb überwiegend Gel-beschichtete Objektträger eingesetzt, weil diese den Vorteil bieten, dass aufgespottetes Protein in das Geld diffundieren kann und die Proteinspots daher bei späterem Eintauchen der Objektträger in den Blockpuffer nicht verschmieren.

Zusätzlich wurden folgende Parameter untersucht bzw. optimiert:

- Inkubation der gespotteten Proteine auf den Objektträgern (Dauer, Temperatur, Luftfeuchtigkeit)
- Blocken der Objektträger vor oder nach dem Aufspotten von Proteinen
- Blockpuffer und -methoden
 - Objektträger langsam in mit Blockpuffer gefülltes Gefäß schieben
 - Blockpuffer langsam in ein Gefäß gießen, in das zuvor Objektträger geschoben worden waren
 - Objektträger unter Ausnutzung der Oberflächenspannung mit der Oberseite nach unten auf Blockpuffer legen
- Waschen der Objektträger
 - Dauer, Temperatur, Schüttler, Salzgehalt des Puffers
 - Detergenzien: Tween-20, Triton X-100, N-Lauroylsarcosin, SDS in unterschiedlichen Konzentrationen
- Inkubation mit Serum oder Sekundär-Antikörper
 - Inkubationsbedingungen (Dauer, Temperatur, Schüttler)
 - in unterschiedlichen Gefäßen: Prähybridisierungs-Kammer (benötigtes Volumen 2 ml), Versandgefäß für 5 Objektträger (15 ml), Hybridisierungs-Kammer (5 µl pro cm² unter Deckglas), Array Booster (10 µl pro cm²)

Beim Array Booster handelt es sich um ein Gerät, das nach Angaben des Herstellers die Diffusion von Biomolekülen mit Hilfe von Oberflächen-Akustik-Wellen (*surface acoustic waves*, SAW) beschleunigt und für Nukleinsäure-Hybridisierungen die Signalthöhe steigert.

4.1.4 Unspezifische Interaktionen

Eines der Hauptziele der entwickelten Protein Microarrays konnte nicht realisiert werden, die *in situ*-Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen aus gespottetem Lysat auf Glutathionhaltigen Oberflächen. Unabhängig von der Methode, mit der Glutathion auf Objektträgern immobilisiert wurde, war es nicht möglich, GST-Fusionsproteine enthaltendes Bakterienlysate auf diese Objektträger zu spotten und die Nicht-GST-Fusionsproteine selektiv abzuwaschen. Zur Demonstration dieses Effektes wird ein Beispiel mit DSC-aktivierten Amino-silanisierten Objektträgern gezeigt, die mit Casein oder Glutathion-Casein beschichtet worden waren (Abbildung 4-8). Auf die Objektträger wurde eine Verdünnungsreihe von GST-tag-Cy3 gespottet, inkubiert und gewaschen. Auch ohne Quantifizierung des Ergebnisses ist deutlich erkennbar, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Oberflächen gibt. Dabei scheint das Problem nicht darin zu liegen, dass es nicht zu einer spezifischen Bindung

zwischen Glutathion und GST kommt, sondern dass es unmöglich ist, gespottetes (Bakterien-)Protein von einem Objektträger wieder abzuwaschen. Es wurden intensive Anstrengungen unternommen, diesem Problem durch die Synthese unterschiedlicher Oberflächen zu begegnen. Leider ergab sich das gleiche Bild für alle getesteten Objektträger und entwickelten Oberflächen.

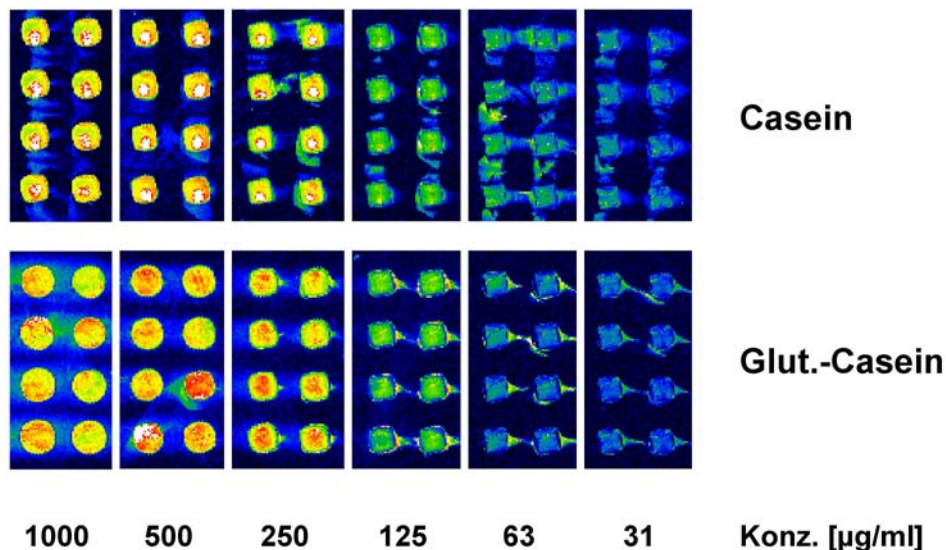


Abbildung 4-8 Unspezifische Reaktionen auf Protein Microarrays. DSC-aktivierte Amino-silanisierte Objektträger wurden mit Casein oder Glutathion-Casein beschichtet. Auf die Objektträger wurde eine Verdünnungsreihe von GST-tag-Cy3 gespottet, inkubiert und gewaschen. Die acht Spots in einem Feld sind Replikate.

4.1.5 Chip-ISA mit Lysat und gereinigtem Protein

Die Notwendigkeit, in Bakterien überexprimierte GST-Fusionsproteine zu reinigen, ergibt sich aus der Tatsache, dass Human-Seren Antikörper gegen *E.coli*-Proteine enthalten. Kontamination des Antigens mit Bakterienproteinen resultiert daher in scheinbar unspezifischem Binden von Antikörpern an alle Antigene, da im letzten Schritt des Tests gebundene humane Antikörper unabhängig von ihrer Spezifität detektiert werden. Auf der anderen Seite lassen sich GST-Fusionsproteine auf Glutathion-vermittelte Weise aus Bakterienlysaten nie so vollständig aufreinigen, dass eine Kontamination mit Bakterienproteinen absolut auszuschließen wäre. Daher müssen die Seren mit Lysat von Bakterien vorinkubiert werden, die GST-tag exprimieren. Durch diese Präinkubation werden vorhandene, gegen Bakterienproteine und ggf. GST gerichtete Antikörper präabsorbiert, so

dass sie bei der späteren Inkubation von Seren mit Antigenen nicht mehr an noch vorhandene Bakterienproteine binden können.

Da eine *in situ*-Affinitätsreinigung von Bakterienlysaten auf Glutathion-funktionalisierten Oberflächen nicht möglich war und eine grundsätzliche Vorreinigung aller als Antigene verwendeten Proteine aus arbeitsökonomischen Gründen nicht in Frage kam, wurde untersucht, welchen Effekt die Verwendung von nicht aufgereinigten Lysaten auf einen Chip-ISA hat. Dazu wurden die E7-Proteine von HPV-6b, -16, -18 und -38 sowie GST-tag exprimiert und ein Teil des Lysats aufgereinigt. Die Lysate und aufgereinigten Proteine wurden auf Gel-beschichtete Objektträger gespottet und drei verschiedene Seren mit bekannter Reaktivität getestet: ein stark gegen HPV-16 E7 reaktives Serum, ein stark gegen HPV-18 E7 reaktives Serum und ein Antikörper-negatives Serum. Die Seren wurden einmal mit und einmal ohne Vorinkubation in GST-tag-Lysat getestet. Abbildung 4-9 zeigt das Ergebnis für das stark gegen HPV-16 E7 reaktive Serum.

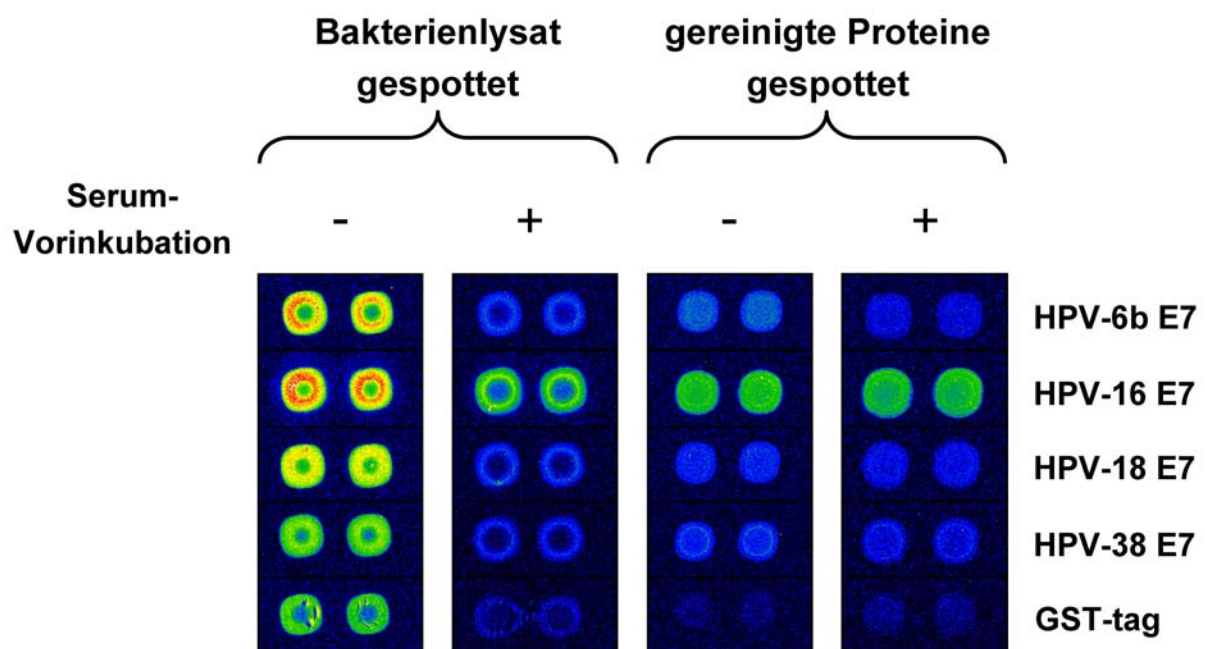


Abbildung 4-9 Chip-ISA mit einem stark gegen HPV-16 E7 reaktiven Serum (HPV-16 E6/E7-Positivmix in einer Verdünnung von 1 zu 800) (Erläuterungen siehe Text). Ring- statt Punkt-förmige Spots („doughnut rings“), wie in den zwei linken Panels zu sehen, treten häufig auf, wenn sehr viskose Flüssigkeiten gespottet werden.

Ohne Reinigung der Lysate und ohne Vorinkubation (Panel ganz links) reagiert das Serum mit allen Antigenen, da alle Spots unabhängig vom überexprimierten Protein Bakterienproteine enthalten und nicht zwischen einer HPV-16 E7-spezifischen antiviralen und der antibakteriellen humoralen Immunantwort unterschieden werden kann. Wird das Serum vorinkubiert und Lysat als Antigen verwendet (zweites Panel von links), ist die Reaktivität gegen HPV-16 E7 spezifisch detektierbar. Dieses Ergebnis entspricht denen, die unabhängig von der Serumvorinkubation mit gereinigten Proteinen als Antigen erzielt wurden (erstes und zweites Panel von rechts).

Abbildung 4-10 zeigt das Ergebnis für ein stark gegen HPV-18 E7 reaktives Serum.

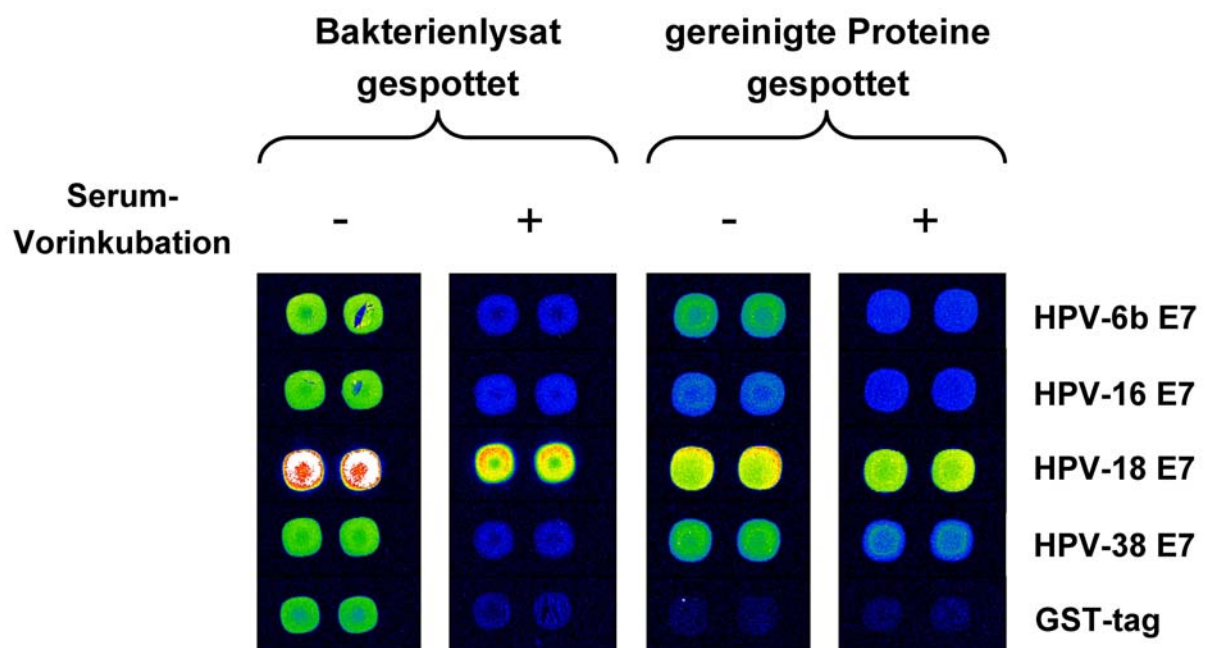


Abbildung 4-10 Chip-ISA mit einem stark gegen HPV-18 E7 reaktiven Serum (HPV-18 E6/E7-Positivmix in einer Verdünnung von 1 zu 800) (Erläuterung siehe Text).

Wie für das stark gegen HPV-16 E7 reaktive Serum ist auch hier der Effekt der Serumvorinkubation deutlich zu sehen (erstes und zweites Panel von links). Ohne Serumvorinkubation ist selbst für die aufgereinigten Proteine eine Reaktivität gegen HPV-6b E7 und HPV-38 E7 zu sehen (zweites Panel von rechts), was auf eine Kontamination der gereinigten Proteine mit Bakterienprotein schließen lässt. Bei der selbst nach Serumvorinkubation und mit gereinigtem Protein vorhandenen Reaktivität gegen HPV-38 E7 (Panel ganz rechts) handelt es sich vermutlich um echte Kreuzreaktivität.

Abbildung 4-11 zeigt die Ergebnisse für ein Antikörper-negatives Serum.

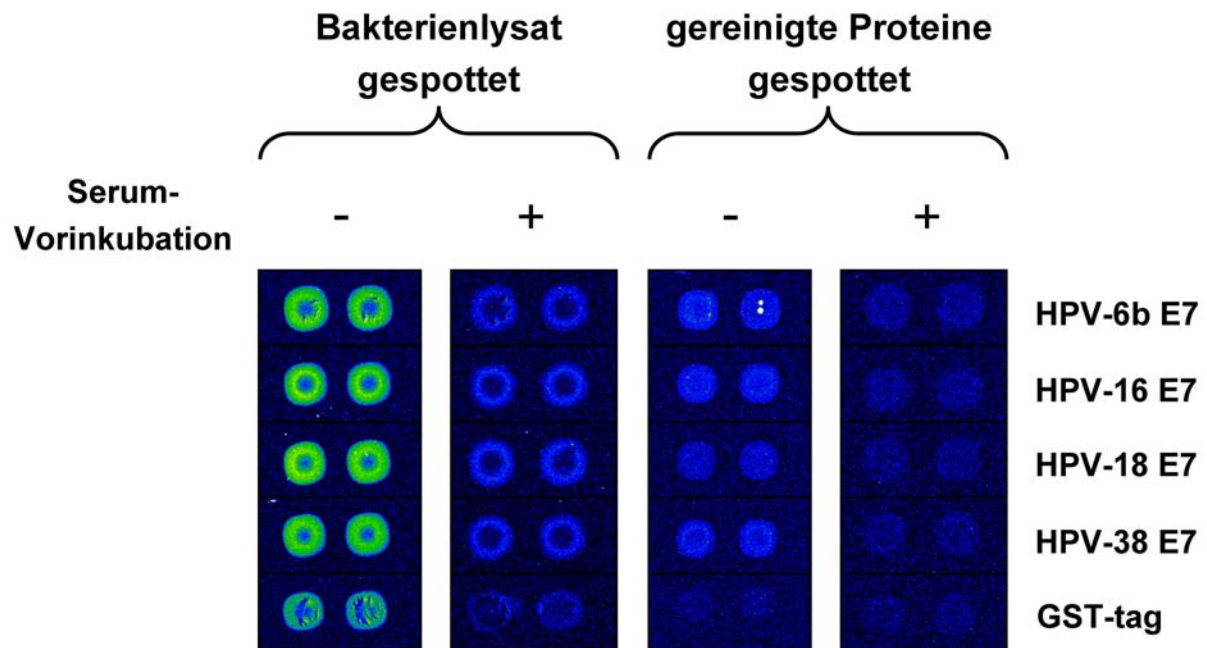


Abbildung 4-11 Chip-ISA mit einem Antikörper-negativen Serum (Blutspender-Plasma 25 in einer Verdünnung von 1 zu 200) (siehe Text).

Selbst die Reaktivität des HPV E7-Antikörper-negativen Serums gegen gereinigte Proteine lässt sich durch Serumvorinkubation noch minimieren (Panel ganz rechts).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass keine Aufreinigung der Lysatproteine notwendig ist, wenn die zu testenden Seren mit Bakterienlysat vorinkubiert werden.

Zusätzlich wurden folgende Parameter untersucht bzw. optimiert:

- Serumtitration
- Sekundär-Antikörpertitration
- Standardisierung verschiedener Objektträger mit einer Präparation von humanem IgG bekannter Konzentration

4.1.6 Vergleich mit GST capture ELISA und Reproduzierbarkeit

Unter Verwendung von nicht aufgereinigten Bakterienlysaten als Antigen-Quelle wurde eine kleine serologische Studie durchgeführt. Dazu wurden 16 bekannt HPV E7-Antikörper-positive Seren aus einer Zervix-Karzinom-Fall/Kontroll-Studie (Visser 18, 38, 46, 56, 115,

141, 144, 152, 156, 161, 167, 175, 180, 202, 227, 239) und 8 bekannt HPV E7-Antikörper-negative Seren (Blutspender-Plasmen 21-22, 25-30) in einer Verdünnung von 1 zu 200 sowohl per GST capture ELISA als auch mittels Chip-ISA auf Reaktivität gegen die E7-Proteine von HPV-6b, -16, -18 und -38 getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Während die Ergebnisse des GST capture ELISA weitgehend mit vorhandenen Daten korrelierten ($R^2 = 0.92$), wurden für den Vergleich von GST capture ELISA und Chip-ISA nur für zwei der vier Antigene akzeptable Korrelationen gefunden ($R^2 = 0.78$ für HPV-6b E7, 0.79 für HPV-16 E7, 0.02 für HPV-18 E7 und 0.23 für HPV-38 E7).

Die Studie wurde daher unter Einschluss der L1- und E6-Proteine von HPV-16 und -18 für je 8 HPV E6- und L1-Antikörper-positive (Visser 46, 56, 152, 161, 167, 180, 202, 227) und -negative Seren (Blutspender-Plasmen s.o.) wiederholt. Dabei ergab sich nur für eines von acht Antigenen eine akzeptable Korrelation ($R^2 = 0.92$ für HPV-6b E7, 0.39 für HPV-16 L1, 0.37 für HPV-16 E6, 0.64 für HPV-16 E7, 0.01 für HPV-18 L1, 0.00 für HPV-18 E6, 0.04 für HPV-18 E7 und 0.00 für HPV-38 E7). Das Gesamtbild für alle verwendeten Antigene der Wiederholung zeigt deutlich, dass sehr viele im GST capture ELISA Antikörper-positive Seren im Chip-ISA kaum reagierten (Abbildung 4-12).

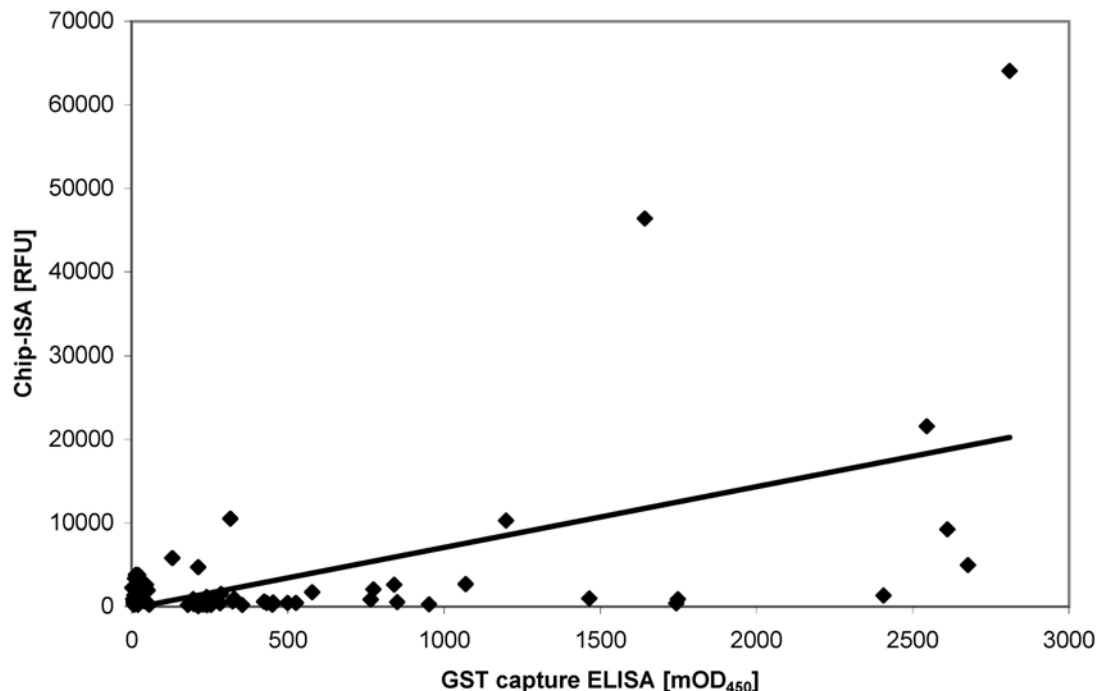


Abbildung 4-12 Gesamtkorrelation Chip-ISA und GST capture ELISA für 16 Seren und 8 Antigene (Erläuterungen siehe Text). Der R^2 -Wert der Korrelationsgeraden ist 0.30.

Das gilt sogar für einige stark Antikörper-positive Seren. Man muss daraus schlussfolgern, dass der entwickelte Chip-ISA sehr wenig sensitiv ist. Darüber hinaus wurde anhand der insgesamt 16 doppelt getesteten Seren und der 4 doppelt getesteten Antigene eine Reproduzierbarkeits-Analyse durchgeführt. Dabei ergaben sich nur für zwei der vier Antigene akzeptable Korrelationen ($R^2 = 0.68$ für HPV-6b E7, 0.95 für HPV-16 E7, 0.14 für HPV-18 E7 und 0.25 für HPV-38 E7). Zusätzlich zu seiner geringen Sensitivität ist der Chip-ISA also auch schlecht reproduzierbar.

Zusätzlich wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Benutzung eines Piezo-Spotters, der Antigene kontaktfrei auf Oberflächen aufträgt
- Spotten von Antigenen auf gespottetes Glutathion-Casein

4.2 Entwicklung von Multiplex-Serologie

Parallel zum Chip-ISA wurde auf der Grundlage von Luminex-Technologie die Multiplex-Serologie entwickelt. Dieses System zur simultanen Detektion humaner Antikörper gegen HPV-Proteine erwies sich als für seroepidemiologische Studien sehr geeignet. Aus Platzgründen werden nur die wesentlichen Schritte der ca. 1.5 Jahre dauernden Entwicklung und Validierung dieser Technologie in vollem Umfang dargestellt.

4.2.1 Technische Grundlagen von Luminex-Technologie

Luminex-Technologie (xMAP™) basiert auf Polystyrol-Kügelchen (*Beads*) mit einem Durchmesser von 5.6 µm. Die Beads sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen gefüllt, so dass 100 distinkte Beadsorten zur Verfügung stehen, die sich durch ihre interne Fluoreszenz unterscheiden. Das Luminex-Analysegerät (*analyzer*) entspricht weitgehend einem Durchflusszytometer mit zwei Lasern (Abbildung 4-13).

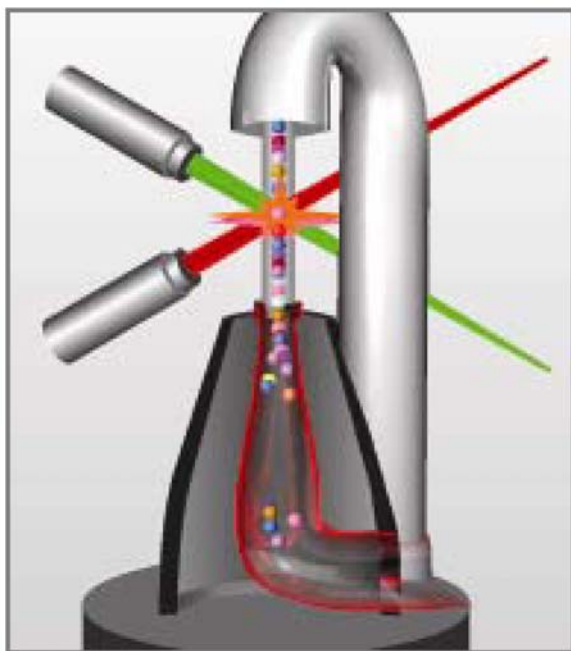


Abbildung 4-13 Schematische Darstellung der Bead-Analyse. Eine Mischung verschiedener Beadsorten (durch unterschiedliche Farben wiedergegeben) ist vom Analyzer mit Hilfe einer Hohlkammer aus einem Loch einer 96-Lochplatte (nicht dargestellt) aufgesogen worden. Aufgesogene Beads werden in einer Mikrokapillare vereinzelt und in einer Durchflussküvette mit Hilfe von zwei Lasern analysiert (Bildquelle: www.luminexcorp.com).

Der rote (Klassifizierungs-)Laser regt die beiden internen Fluoreszenz-Farbstoffe der Beads bei 635 nm an. Die Emissionsmaxima der beiden Farbstoffe werden einzeln detektiert und erlauben die Identifizierung der Beadsorte. Der grüne (Reporter-)Laser regt die Beads bei einer Wellenlänge von 532 nm an und erlaubt die Quantifizierung der Reporter-Fluoreszenz, die z.B. über gebundene Fluoreszenz-markierte Antikörper mit den Beads assoziiert ist.

Die 100 unterschiedlichen Beadsorten fallen in einer xy-Darstellung der beiden Fluoreszenz-Farbstoffe in 100 distinkte Regionen (Abbildung 4-14). Da sich die Eigenfluoreszenzen der Beads stufenweise voneinander unterscheiden, ergeben die 100 Regionen eine regelmäßige Anordnung (*array*). Reaktionen mit den Beads finden in Suspension statt und erlauben so die parallele Analyse (*multiplexing*) von maximal 100 unterschiedlichen Parametern in einem Gefäß. Dies ist relativ wenig im Vergleich zu planaren Microarrays auf Objektträgern oder Membranen, die simultan bis zu mehrere 10000 unterschiedliche Reaktionen erlauben (*high density*). Luminex-Technologie wird daher auch als Suspensions-Array mit niedriger Dichte (*low density suspension array*) bezeichnet.

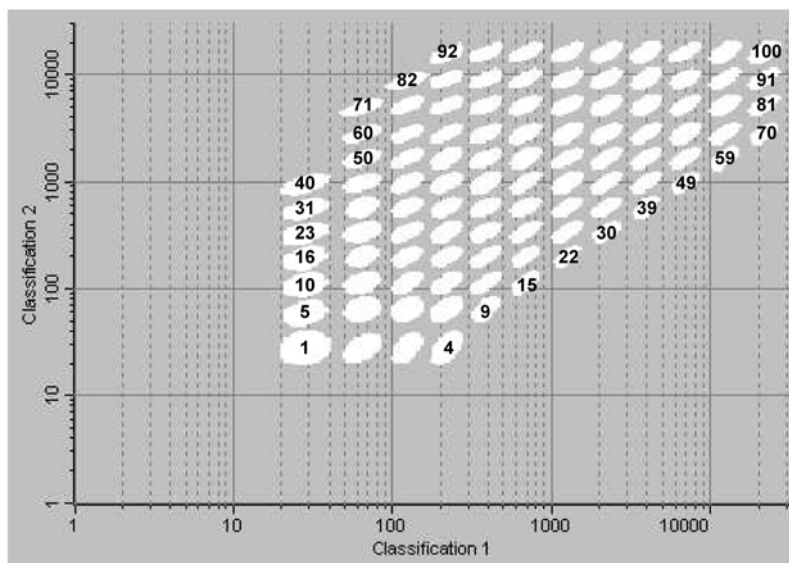


Abbildung 4-14 Bead-Array. xy-Darstellung der beiden Fluoreszenz-Farbstoffe (hier als *Classification 1* und *2* bezeichnet) von 100 Beadsorten. Von einzelnen Beadsorten belegte Regionen sind in weiß dargestellt. Schwarze Zahlen entsprechen den Nummern der unterschiedlichen Beadsorten (Bildschirmausdruck der Luminex-Software).

Die Beadsuspension wird so lange vermessen, bis von jeder Beadsorte mindestens 100 einzelne Beads analysiert werden konnten. Als quantitatives Ergebnis für Bindungsreaktionen auf jeder Beadsorte wird der Median der Reporter-Fluoreszenz-Intensitäten (*median fluorescence intensity, MFI*) der ≥ 100 Einzelbeads errechnet.

Luminex-Technologie konnte hier erfolgreich als Plattform zur simultanen Detektion humaner Antikörper gegen unterschiedliche HPV-Proteine entwickelt werden. Dabei fand der Transfer von GST capture ELISA auf Luminex-Technologie im Wesentlichen über einen Austausch der festen Phase statt: Für jedes Antigen wurde ein Loch einer ELISA-Platte durch eine Luminex-Beadsorte ersetzt (Abbildung 4-15).

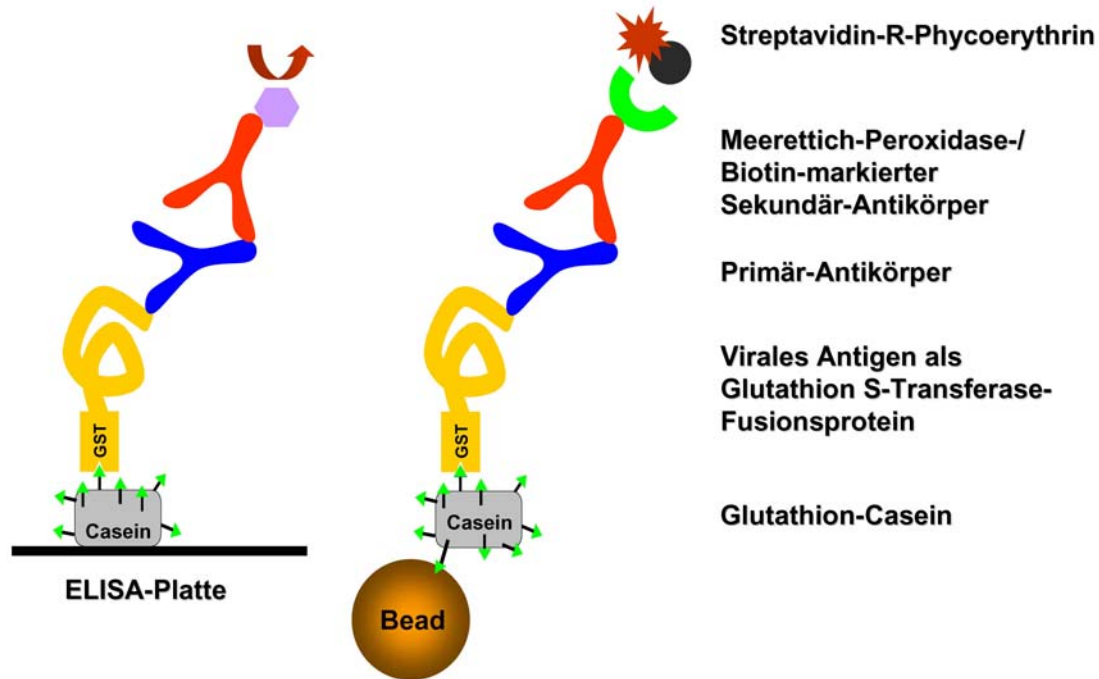


Abbildung 4-15 Schematischer Vergleich von GST capture ELISA (links) und Multiplex-Serologie (rechts). Glutathion-Reste sind als grüne Pfeilspitzen dargestellt. Glutathion-Casein bindet durch Physicosorption an ELISA-Platten und wird kovalent an Luminex-Beads gekoppelt.

Durch kovalentes Koppeln von Glutathion-Casein an die Beads konnte die *in situ*-Affinitätsreinigung etabliert werden. Glutathion-Casein-Beads werden direkt in Bakterienlysat mit GST-Fusionsproteinen beladen und ungebundenes Bakterien-Protein wird durch Waschen entfernt.

Für Multiplex-Serologie werden Glutathion-Casein-Beads unterschiedlicher Sorten mit verschiedenen Antigenen beladen. Die unterschiedlichen Beadsorten werden separat gewaschen und dann zu einer Beadmischung kombiniert. In den Löchern einer 96-Lochplatte mit Filterboden (Waschplatte) wird die Beadmischung mit Serumverdünnung inkubiert. Ungebundene Serumproteine werden entfernt, indem von unten Vakuum an die Waschplatte

angelegt wird, während die Beads oberhalb des Filters verbleiben. Nach Waschen der Beads durch Zugeben und Absaugen von Waschpuffer werden gebundene Antikörper durch biotinylierten Sekundär-Antikörper und - nach einem weiteren Waschschrift - Streptavidin-R-Phycoerythrin (Strep-PE) detektiert. Ein spezieller xy-Rastertisch, die Luminex XY-Plattform, nimmt die Waschplatte auf und positioniert die 96 Löcher sukzessiv unter die Hohnadel. Die Beadsuspensionen in den Löchern werden nach und nach im Analyzer vermessen.

Die technischen Parameter werden hier „von unten nach oben“ (Abbildung 4-15) beschrieben und diskutiert, beginnend mit der Kopplung von Glutathion an die Beads. Da sich viele der optimierten Parameter gegenseitig beeinflussen, waren frühe Experimente teilweise noch mit Problemen behaftet, die später ausgeräumt werden konnten. Diese initialen Experimente wurden unter optimierten Bedingungen nur wiederholt, wenn ihre Aussagekraft wesentlich eingeschränkt war. Bei einzelnen Experimenten wird daher auf den Zeitpunkt ihrer Entstehung hingewiesen.

4.2.2 Kopplung von Glutathion an Luminex-Beads

Die in Kapitel 4.1.1 angestellten grundsätzlichen Überlegungen zur Kopplung von Glutathion an Oberflächen gelten auch für die Glutathion-Derivatisierung von Luminex-Beads. In Anlehnung an ein Standard-Protokoll von Luminex zur Kopplung von Antikörpern an Beads wurde eine Methode entwickelt, vorsynthetisiertes Glutathion-Casein an die Beads zu koppeln. Dafür musste eine Carbodiimid-basierte Kopplungs-Chemie eingesetzt werden, da die Beads freie Carboxy (COOH)-Gruppen tragen.

4.2.2.1 Herstellung von GC-Beads

Glutathion-Casein (GC)-Beads wurden hergestellt, indem die terminale Amino-Gruppe einzelner Glutathion-Reste des GC an die Carboxy-Gruppen der Beads gekoppelt wurden. Die Carboxy-Gruppen reagieren mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) zu einem Amino-reaktiven Intermediat, einer O-Acyl-Isoharnstoff-Verbindung, die in wässriger Lösung instabil ist und durch N-Hydroxysuccinimid (NHS) stabilisiert werden muss (86). Das Intermediat reagiert mit den primären Aminen der Glutathion-Reste des GC zu einer stabilen Amid-Bindung (Abbildung 4-16).

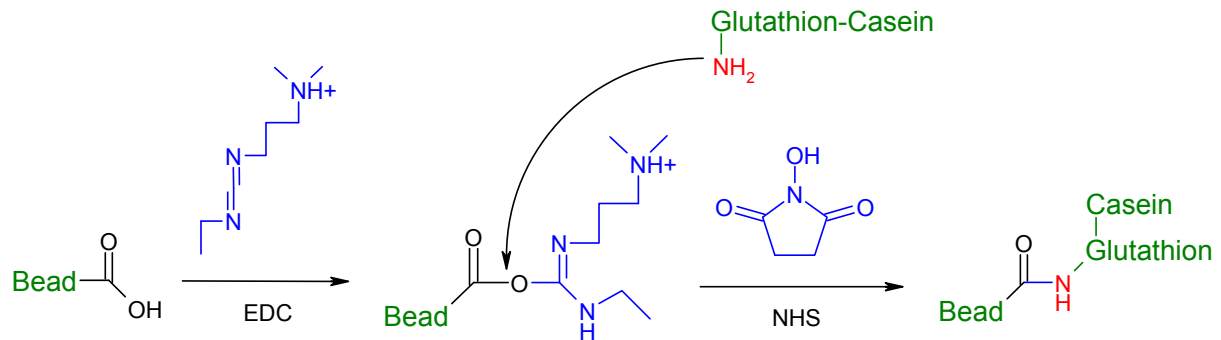


Abbildung 4-16 Kopplung von Glutathion-Casein an Beads. Links: Aktivierung der Carboxy-Gruppen der Beads mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Mitte: Amino-reaktives Intermediat. Rechts: Stabile Amid-Bindung zwischen Bead und Protein.

Nach der Kopplung agiert mindestens einer der Glutathion-Reste des GC als kovalente Brücke zwischen Casein und dem Bead. Da die chemische Aktivierung auf den Beads stattfindet, sind die nicht reagierenden Glutathione auf der dem Bead abgewandten Seite des GC nicht betroffen und noch in der Lage, GST zu binden.

Die Entstehung von Bead-Dimeren durch Bindung desselben GC-Moleküls ist möglich, auf Grund der geringen Bead-Konzentration in der Kopplungsreaktion aber selten. Kovalent verknüpfte oder aggregierte Beads werden auf Grund ihres geringen räumlichen Abstands voneinander identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen.

Die wesentlichen Parameter, die zur Herstellung von GC-Beads und zur Optimierung von Kopplungseffizienz und Ausbeute untersucht wurden, waren:

- GC-Konzentration (bis 500 µg/ml getestet, 250 µg/ml führen zu Sättigung)
- Konzentrationen der Crosslinker (EDC, NHS) (bis 100 mg/ml getestet, 50 mg/ml führen zu maximaler Kopplungseffizienz)
- Reaktionsvolumen und eingesetzte Beadzahl (bis zu 1.25×10^7 Beads lassen sich in 1.5 ml Reaktionsvolumen koppeln)
- Salzgehalt und pH-Wert der verwendeten Puffer (50 mM MES, pH 5.0 verdoppelt die Kopplungsrate gegenüber PBS, pH 7.4)
- Reaktionsbedingungen (Inkubationszeiten, Temperatur)

Die optimierten Bedingungen sind im Methoden-Teil (Kapitel 3.6.1) wiedergegeben.

4.2.2.2 Zusätzliche Inkubation von GC-Beads in Tris-haltigem Puffer

Eine wesentliche Verbesserung der Kopplung gegenüber dem Standard-Protokoll von Luminex wurde durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt erreicht. Dabei wurden die Beads nach der Kopplung mit GC in Tris-haltigem Puffer inkubiert, um die aktivierten, aber nicht mit GC abreagierten Carboxy-Gruppen auf der Beadoberfläche mit den primären Aminen des Tris abzusättigen. Dies verhindert eine spätere unspezifische, kovalente Bindung von anderen Proteinen an die Beads.

Je eine Beadsorte wurde mit Casein oder Glutathion-Casein beschichtet (mit oder ohne zusätzlichen Inkubationsschritt in Tris-Puffer). Diese vier Beadsorten sowie „nackte“, d.h. nicht mit Protein gekoppelte (Carboxy-)Beads, wurden auf die Fähigkeit untersucht, GST-Fusionsproteine zu binden (Abbildung 4-17).

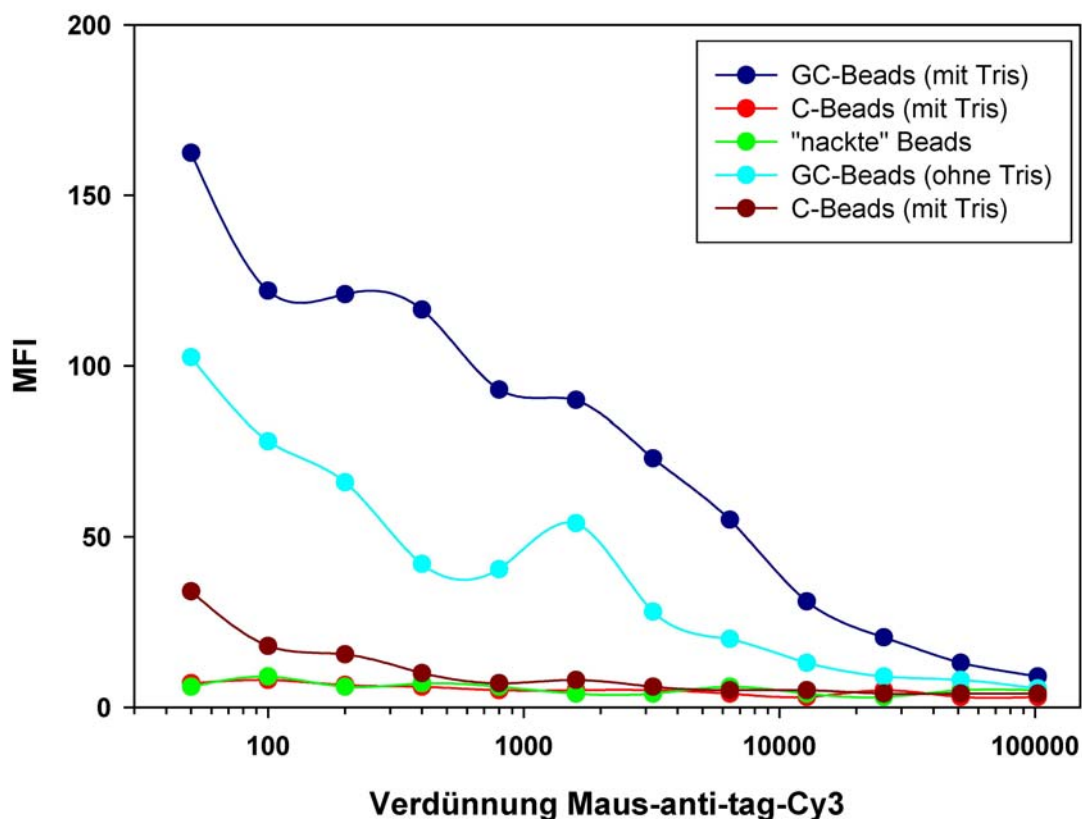


Abbildung 4-17 Effekt der zusätzlichen Inkubation von Beads in Tris-haltigem Puffer nach Kopplung mit GC. Beads wurden in HPV-18 E7-Lysat inkubiert und gebundenes Antigen wurde mit einer Verdünnungsreihe von Maus-anti-tag-Cy3 detektiert. Die sehr niedrigen MFI-Werte in diesem frühen Experiment rühren von der Verwendung von Cy3 als Fluoreszenz-Farbstoff her, das wesentlich schwächere Signale als PE verursacht.

Auf Casein-beschichteten Beads, die nicht zusätzlich in Tris-Puffer inkubiert worden waren (braune Kurve), konnte der Detektions-Antikörper in hohen Konzentrationen (Verdünnung ≤ 1 zu 400) gebundenes Antigen nachweisen. Die zusätzlich in Tris-Puffer inkubierten Beads (rote Kurve) banden dagegen nur so wenig Antigen wie „nackte“ Beads (grüne Kurve).

Wahrscheinlich war auf Tris-inkubierten GC-Beads (dunkelblaue Kurve) mehr Antigen nachweisbar als auf nicht Tris-inkubierten GC-Beads (hellblaue Kurve), weil diese neben GST-Fusionsprotein auch andere Lysat-Proteine banden.

4.2.2.3 Variabilität unterschiedlicher Sorten von GC-Beads

Unterschiedliche Kopplungseffizienzen von GC an Beads waren initial eines der Hauptprobleme von Multiplex-Serologie. Üblicherweise wurden 4 Beadsorten pro Charge parallel mit GC gekoppelt. Anfänglich waren einzelne Beadsorten einer Charge nach der Kopplung mit GC in der Lage, bis zu doppelt so viel Antigen zu binden wie andere Beadsorten derselben Charge. Die mittlere Bindefähigkeit zweier Chargen konnte um den Faktor 3 variieren.

Der Hauptgrund für diese Variabilität ist wahrscheinlich die empfindliche Kopplungsreaktion: Das Amino-reaktive Intermediat ist sehr instabil und dissoziiert sehr schnell in wässrigen Lösungen. Erfahrung sowie Geschwindigkeit und Präzision der experimentellen Ausführung sind entscheidend für homogene und maximale Kopplungseffizienzen. Abbildung 4-18 zeigt ein Beispiel für gute, aber noch nicht optimale Bedingungen (ca. 4 Monate vor Erreichen des Plateaus der Lernkurve).

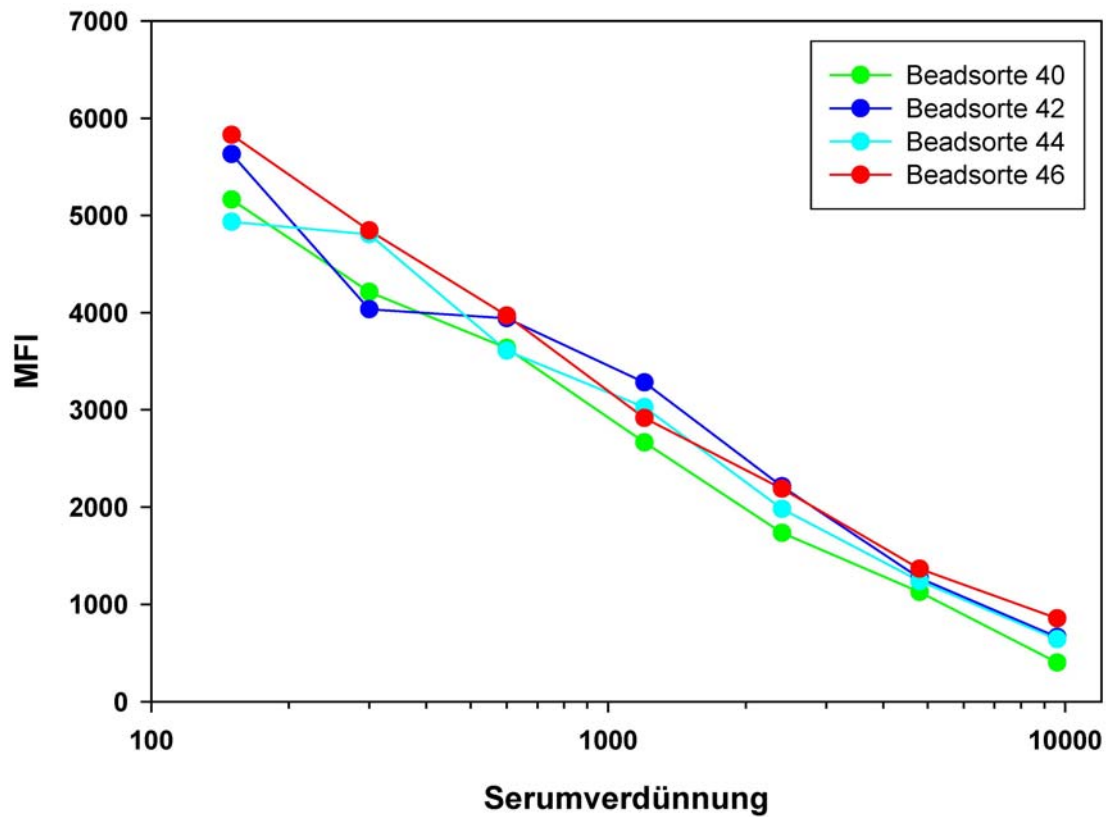


Abbildung 4-18 Antigenbindungs-Kapazität unterschiedlicher Sorten von GC-Beads. Vier Sorten GC-Beads einer Kopplungs-Charge wurden separat mit HPV-18 E7-Lysat beladen, gewaschen, gemischt und mit einer Verdünnungsreihe eines stark gegen HPV-18 E7 reaktiven Serums (HPV-18 E6/E7-Positivmix) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit direkt PE-markiertem Ziege-anti-human-Sekundär-Antikörper detektiert.

Für alle verwendeten Beadsorten wurde eine lineare Abhängigkeit des Signals vom Logarithmus der Serumkonzentration beobachtet. Die Signale der verschiedenen Beadsorten waren für alle Serumkonzentrationen ähnlich stark ($CV \approx 10\%$). Inzwischen, mit optimierten Kopplungsbedingungen und nach Kopplung von Beads in weit über 100 Einzelansätzen, liegt der CV für die Antigen-Bindefähigkeit mehrerer mit GC gekoppelter Beadsorten und -chargen bei ca. 5 %.

4.2.3 Technologische Grundparameter

4.2.3.1 Bestimmung der Median Reporter-Fluoreszenz von ≥ 100 Beads pro Sorte

Während der Vermessung der Beadmischung werden so lange Beads analysiert, bis von jeder Sorte mindestens 100 einzelne Beads gefunden worden sind. Bei der kontinuierlichen Messung mehrerer Löcher hintereinander ist ein Verschleppen von Beads möglich, da ein geringes Totvolumen mit Beadsuspension aus dem letzten Loch zusammen mit der Beadsuspension aus dem nächsten Loch vermessen wird. Normalerweise entstammten nicht mehr als 2, in seltenen Fällen bis zu 10 von 100 Beads dem vorigen Loch. Diese Verschleppung stellt jedoch bei Verwendung des Medians anstelle des arithmetischen Mittels für die Berechnung der Durchschnitts-Reporter-Fluoreszenz der ≥ 100 analysierten Einzelbeads kein Problem dar. Der Median wird - im Gegensatz zum arithmetischen Mittel - nur sehr wenig von verschleppten Beads beeinflusst, selbst wenn Beads mit hoher Signalstärke (z.B. aus einer Positivkontrolle) in Messungen von Antikörper-negativen Seren (z.B. einer Negativkontrolle) verschleppt werden oder umgekehrt.

Die Analyse von mindestens 100 Einzelbeads pro Sorte ermöglicht stabile und sehr gut reproduzierbare Ergebnisse mit Korrelationskoeffizienten von > 0.95 (siehe Kapitel 4.3.1). Diese werden bei Analyse von mindestens 50 Beads pro Sorte wesentlich schlechter (< 0.90) und bei Analyse von mindestens 200 Beads pro Sorte nicht besser. Das Standard-Protokoll für Multiplex-Serologie sieht deshalb die Analyse von mindestens 100 Einzelbeads pro Sorte vor.

4.2.3.2 Die Reaktion von 3000 Beads pro Sorte mit Serum ermöglicht kurze Messzeiten

Von jeder Sorte werden pro Serum 3000 Beads mit Antigen beladen und als Beadmischung auf die Waschplatte verteilt, auch wenn nur 100 der 3000 Beads pro Sorte (BpS) analysiert werden. Die Verwendung von weniger oder mehr BpS pro Serum ändert nichts am Messergebnis, beeinflusst aber die Messzeit. Die Analyse eines Lochs dauert bei 500 BpS ca. 60 Sekunden, bei 1000 BpS ca. 45 Sekunden, bei 2000 BpS ca. 25 Sekunden und bei 3000 BpS ca. 15 Sekunden. Eine Erhöhung auf 4000 BpS kann die Messzeit nur noch um 2-3 weitere Sekunden verkürzen, weil die Mindestzeit für eine Messung auf Grund mechanischer Vorgänge ca. 8 Sekunden beträgt.

Die Messzeit für eine voll belegte 96-Lochplatte beträgt für 3000 BpS ca. 25 Minuten und für 2000 BpS ca. 40 Minuten. Seroepidemiologische Studien mit ca. 1000 Seren lassen sich unter Verwendung von 2000 BpS noch an einem Tag messen, während größere Studien an zwei Tagen gemessen oder mit 3000 BpS durchgeführt werden müssen. Die Verwendung von 2000, 2500 oder 3000 BpS pro Serum für Multiplex-Serologie erlaubt also das Minimieren von Kosten oder Messzeit.

Andere Parameter als die Beadkonzentration stehen zur Erhöhung der Messgeschwindigkeit aus technischen Gründen nicht zur Verfügung, da die Flussrate im Analyzer nicht beschleunigt werden kann und das Minimalvolumen an Beadsuspension pro Loch mit 100 µl bereits Teil des Multiplex-Serologie Standard-Protokolls ist.

4.2.3.3 Unterschied zwischen Single- und Multiplex

Um zu untersuchen, ob das Multiplexing, also die simultane Verwendung mehrerer Beadsorten beladen mit unterschiedlichen Antigenen, einen Unterschied gegenüber Singleplex-Experimenten macht, in denen nur eine Beadsorte präsent ist, wurden mehrere Seren gegen unterschiedliche Antigene sowohl im Single- als auch im Multiplex untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Der Korrelationskoeffizient (R^2) für die lineare Trendlinie war in derartigen Versuchen immer > 0.95 und die Steigung der Ausgleichsgeraden 1.00 ± 0.05 , was zeigt, dass es weder zu einer individuellen noch einer systematischen Abschwächung des Signals durch andere, im selben Reaktionsansatz präsente Beadsorten bzw. Antigene kommt.

Dies lässt sich damit erklären, dass die Zahl der Beads, die in der Lage sind, einen für ein bestimmtes Antigen spezifischen Antikörper zu binden, immer gleich ist (z.B. 3000 pro Loch), unabhängig davon, wie viele andere Beadsorten noch in der Beadmischung vertreten sind, und gilt, solange die Konzentrationen von Sekundär-Antikörper und Detektionskonjugat nicht limitierend sind. Multiplex-Serologie wurde erfolgreich mit bis zu 27 unterschiedlichen Beadsorten in einem Ansatz durchgeführt.

4.2.3.4 Verschiedene Typen und Wiederverwendbarkeit von Waschplatten

Waschplatten für verschiedene Anwendungen sind kommerziell erhältlich. Eine besondere Anforderung für Multiplex-Serologie ist, dass sich die Platten mindestens 10 mal durch Zugeben und Absaugen von Waschpuffer auf der Vakuum-Absaugstation waschen lassen. Um Waschplatten aus Kostengründen (12 bis 18 € pro Platte) für mehrere Versuche

wiederverwenden zu können, müssen die Beads sich außerdem durch wiederholtes Befüllen der Löcher mit und Ausschütten von Wasser aus den Löchern ausspülen lassen.

Die getesteten sechs verschiedenen Plattentypen von zwei Herstellern unterschieden sich in Merkmalen wie Membranmaterial (Polyvinylidenfluorid, Polypropylen, Nylon, Polyethersulfon), Porengröße (0.2 bis 1.2 μm) und technischem Aufbau (Einzel- oder Doppelmembran) und wurden auf Eigenschaften wie Homogenität (96 mal das gleiche Ergebnis auf einer Platte, gleiche Ergebnisse für mehrere Platten), Wiederverwendbarkeit für mehrere Versuche mit gleichen und unterschiedlichen Beadsorten und Beständigkeit der Membran gegen vielfaches Waschen auf der Vakuum-Absaugstation untersucht.

Dabei stellte sich insbesondere der letzte Parameter als kritisch heraus. Drei der Plattentypen ließen sich nicht mindestens 10 mal waschen, ohne dass die Membranen verstopften (Pall PN5020, PNS5030, PN5039). Einer der drei verbliebenen Plattentypen zeigte im Homogenitätstest für die 96 Löcher einer Platte einen CV von ca. 7 % (Millipore MABVN12), während die beiden anderen Typen CV < 5 % aufwiesen (Pall PNS5042, Millipore MSBVN12). Diese zwei Plattentypen sind für Multiplex-Serologie geeignet, die Millipore-Platten erlauben das Absaugen des Überstandes auf Grund einer Porengröße von 1.2 statt 0.2 μm aber ca. 10 Sekunden pro Waschvorgang schneller.

Dieser am besten für Multiplex-Serologie geeignete Plattentyp lässt sich allerdings (wie alle anderen Typen auch) nicht für mehrere Versuche wiederverwenden, v.a. weil sich die Beads mit vertretbarem Aufwand nicht restlos aus den Löchern auswaschen lassen.

4.2.4 Beladung der Beads mit Antigen

Initial wurden GC-gekoppelte Beads und mit anti-GST-Antikörper gekoppelte Beads verglichen. GC-Beads banden jedoch ungefähr doppelt so viel Antigen wie anti-GST-Beads. Des weiteren steht die Spezifität der Glutathion-GST-Interaktion außer Frage, während man für den polyklonalen anti-GST-Antikörper zumindest ein gewisses Maß an Kreuzreaktion mit anderen Proteinen nicht ausschließen kann. Auf Versuche mit monoklonalem anti-GST-Antikörper wurde verzichtet, nachdem die guten Eigenschaften der GC-Beads erkannt worden waren. Für alle späteren Versuche wurden GC-Beads verwendet. In 1.5 ml Lysatverdünnung lassen sich bis zu 5×10^6 Beads ohne detektierbare Abnahme an Antigen beladen.

4.2.4.1 Affinität der GST-Glutathion-Interaktion auf Beads

Die Bindung von Antigenen an GC-Beads wird über die Interaktion der GST-Domäne des Fusionsproteins und ihrem Substrat Glutathion auf den Beads vermittelt. Diese Interaktion ist stark genug, um einen Austausch von Antigenen verschieden beladener Beadsorten in der Beadmischung zu verhindern. Wurden Antigen-beladene und nicht Antigen-beladene GC-Beads verschiedener Sorten gemischt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und gebundenes Antigen mit Maus-anti-tag-PE detektiert, wiesen die Antigen-beladenen GC-Beads starke Signale mit mehr als 5000 MFI auf, während die nicht mit Antigen beladenen GC-Beads mit weniger als 25 MFI weiterhin nur Autofluoreszenz-Signale zeigten.

Dieser Ausschluss eines Austauschs von Antigenen auf verschiedenen Beadsorten geht Hand in Hand mit der hohen Affinität der GST-Glutathion-Interaktion, deren Dissoziationskonstante (K_d) experimentell bestimmt wurde (Abbildung 4-19).

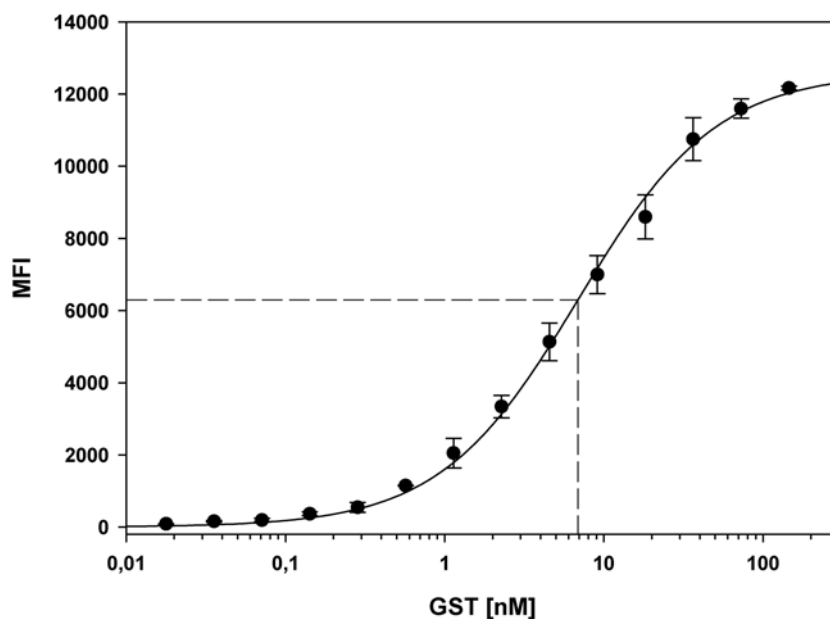


Abbildung 4-19 Bestimmung der Dissoziationskonstante der GST-Glutathion-Interaktion. GC-Beads wurden mit einer Verdünnungsreihe von gereinigtem GST-tag beladen und gebundenes Protein wurde mit Maus-anti-tag-PE quantifiziert. Die Datenpunkte sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Kurve wurde mit SigmaPlot an die Datenpunkte angepasst. Gestrichelte Linien zeigen das halb-maximale Signal und die dazu führende GST-tag-Konzentration.

Aus dem Massenwirkungsgesetz für diese Interaktion ($K_d = ([\text{GST}] \times [\text{Glutathion}]) / [\text{GST-Glutathion}]$) lässt sich schließen, dass bei der GST-Konzentration, die in halbmaximalem Signal resultiert ($[\text{GST}]_{1/2}$), die eine Hälfte des Glutathions an GST gebunden hat und die andere Hälfte ungebunden ist, also $[\text{Glutathion}] = [\text{GST-Glutathion}]$. Damit ist $K_d = [\text{GST}]_{1/2}$. Die GST-Konzentration bei halbmaximalem Signal entspricht einer Dissoziationskonstante von 6.9×10^{-9} M. Diese Affinität entspricht der vieler Antikörper-Antigen-Interaktionen (87).

4.2.4.2 *In situ*-Affinitätsreinigung

Um zu demonstrieren, wie GST-Fusionsproteine aus Bakterienlysaten auf GC-Beads aufgereinigt werden, wurden die Proteine im Lysat und nach Bindung an GC-Beads analysiert (Abbildung 4-20).

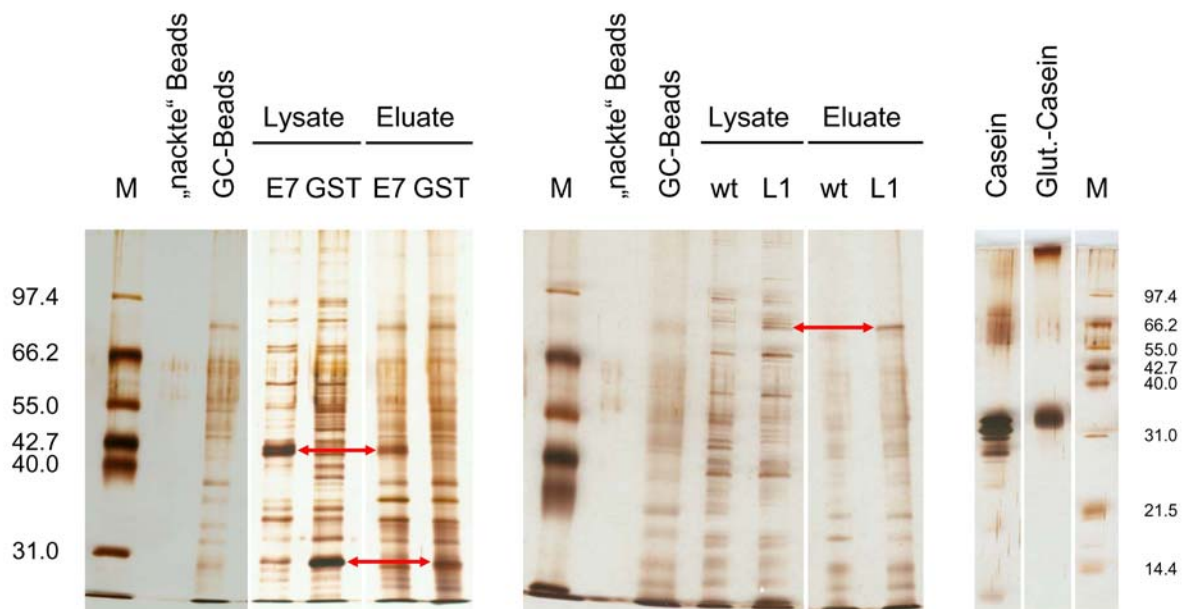


Abbildung 4-20 Reinigung von GST-Fusionsproteinen auf GC-Beads. Silberfärbung von Lysatproteinen und Bead-Eluaten nach SDS-PAGE: Jeweils 20000 „nackte“ und nicht mit Antigen beladene GC-Beads wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand aufgetragen. Lysate = 200 ng HPV-16 E7-, L1-, GST-tag- und wt-Bakterienlysate. Eluate = durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer eluierte Proteine nach *in situ*-Affinitätsreinigung der Lysate auf 20000 GC-Beads. Von Casein und Glutathion-Casein wurden jeweils 400 ng aufgetragen. M = 100 nl Mid-Range Marker (Angaben in kD ganz rechts bzw. links).

Die Banden der überexprimierten HPV-16 E7- und GST-Proteine sind in den Bakterienlysaten deutlich sichtbar und auch in Eluaten von mit HPV-16 E7 und GST beladenen Beads sind diese Banden die stärksten. Besonders eindrucksvoll ist der Aufreinigungseffekt für HPV-16 L1, das auf Grund seiner Größe schlecht exprimiert wird, so dass die L1-Bande im Bakterienlysate nur im direkten Vergleich mit Wildtyp (wt)-Lysat zu erkennen ist. Auf eluierten Beads ist die HPV-16 L1-Bande jedoch deutlich sichtbar.

Zusätzlich zu den Banden der GST-Fusionsproteine sind in den Eluaten viele distinkte Banden zu sehen, die nicht aus dem Bakterienlysate stammen, wie gut am Beispiel der zwei starken Banden knapp unterhalb von 40.0 kD zu erkennen ist. Diese Banden zeigen sich überraschenderweise auch in Eluaten von nicht mit Antigen beladenen GC-Beads, nicht aber in Eluaten von „nackten“ Beads (bei der schwachen Doppelbande zwischen 55.0 und 66.2 kD handelt es sich wahrscheinlich um eine Protein-Kontamination des SDS-Probenpuffers, da sie in allen Spuren zu sehen ist). GC ist das einzige in den Kopplungsprozess involvierte Protein und kovalent an die Beads gebunden, d.h. es sollte sich durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer nicht von den Beads lösen lassen.

Um das zu kontrollieren, wurden Casein und GC analysiert. Das Casein ist ein gereinigter Proteinextrakt aus Rinder-Milch mit nicht näher definiertem Molekulargewicht und lässt mindestens vier distinkte Banden erkennen. GC erscheint in Form einer einzigen breiten Bande mit etwas höherem Molekulargewicht als die beiden stärksten Casein-Banden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass GC-Präparationen immer aus verschiedenen GC-Spezies mit unterschiedlich vielen Glutathion-Resten bestehen.

Beide Proteine sind offenbar nicht für die Banden im Eluat der GC-Beads verantwortlich, deren Ursprung damit ungeklärt bleibt. Vergleicht man jedoch das Eluat von mit wt beladenen Beads mit dem Eluat von nicht Antigen-beladenen GC-Beads, lässt sich erkennen, dass keine wt-Proteine im Silbergel sichtbar an die Beads binden.

4.2.4.3 Sättigung der Beads mit GST-Fusionsprotein

Da Proteine mit hohem Molekulargewicht in *E.coli* schlechter exprimiert werden als kleinere Proteine, enthalten Lysate unter Umständen stark unterschiedliche Mengen des überexprimierten Proteins (Abbildung 4-20, Vergleich von HPV-16 E7 und L1). Dieser Effekt lässt sich mittels *in situ*-Affinitätsreinigung partiell kompensieren (Abbildung 4-21).

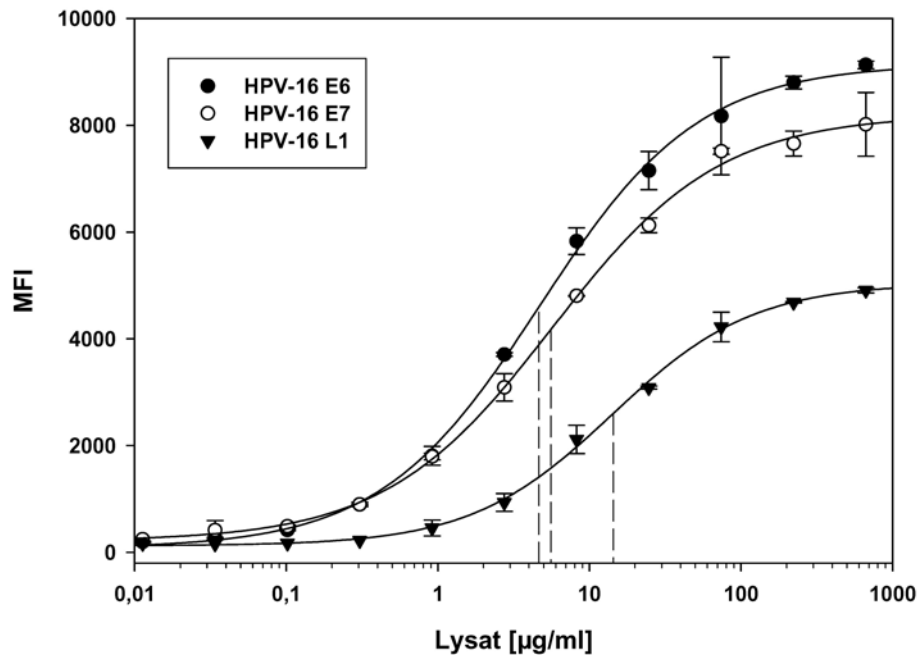


Abbildung 4-21 Sättigung von GC-Beads mit Lysatprotein. GC-Beads wurden mit Verdünnungsreihen von HPV-16 E6- (48.8 kD), E7- (38.6 kD) und L1- (82.7 kD) GST-Fusionsproteinen beladen. Gebundenes Antigen wurde mit Maus-anti-tag-PE detektiert. Die Datenpunkte sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Kurven wurden mit SigmaPlot an die Datenpunkte angepasst. Gestrichelte Linien zeigen die zu halb-maximalen Signalen führenden Lysat-Konzentrationen.

Bei 1 mg/ml Lysat-Konzentration (Standard für Multiplex-Serologie) hatten alle GST-Fusionsproteine Sättigung auf den GC-Beads erreicht, wobei die Plateaus für HPV-16 E6 und E7 ungefähr doppelt so hoch waren wie das für das L1-Protein. Die Lysatprotein-Konzentrationen, die in halbmaximalem Signal resultierten, waren 4.7 µg/ml für HPV-16 E6, 5.7 µg/ml für HPV-16 E7 und 14.2 µg/ml für HPV-16 L1. Der in etwa dreifache Unterschied zeigt, dass das HPV-16 L1-Lysat etwa dreimal weniger Fusionsprotein mit voller Länge enthält als die HPV-16 E6- und E7-Lysate. Das halb so hohe Plateau für das HPV-16 L1-Fusionsprotein lässt sich auf zwei mögliche Weisen erklären. Zum einen könnte das höhere Molekulargewicht in einer niedrigeren molaren Dichte detektierbarer C-terminaler tags auf den Beads resultieren. Zum anderen führt die Expression von größeren Proteinen zu steigenden Mengen an N-terminalen Fragmenten der GST-Fusionsproteine, die an Glutathion binden, aber mangels des C-terminalen tags nicht nachgewiesen werden können. Illustriert wird dies am Beispiel von HPV-31 E6 und L1 (Abbildung 4-22).

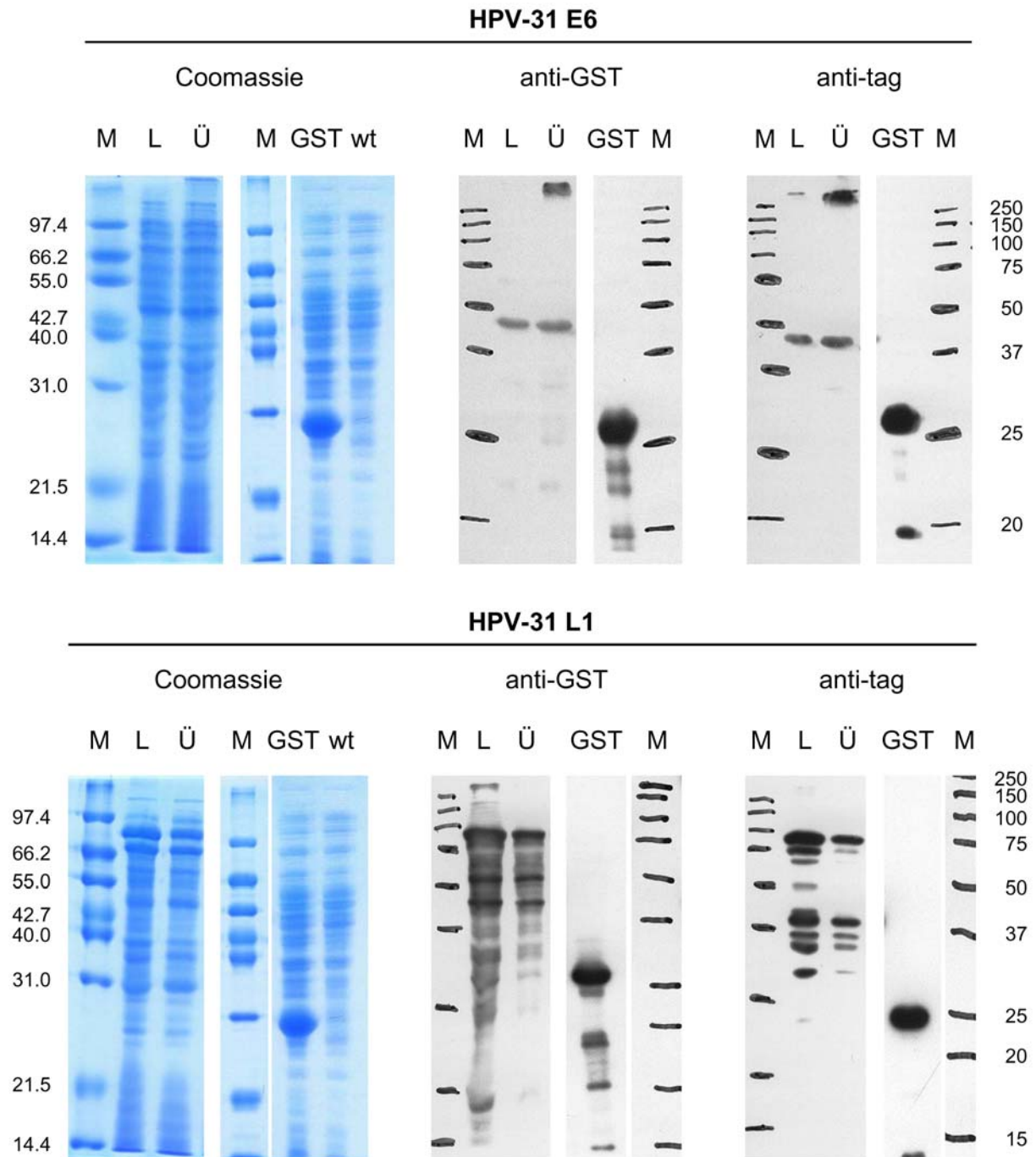


Abbildung 4-22 Expression der HPV-31 E6- und L1-GST-Fusionsproteine. Coomassie-Färbungen, anti-GST- und anti-tag-Western Blots (WB) nach SDS-PAGE von 10 µg HPV-31 E6- bzw. L1-Lysaten (L, direkt nach Zellaufschluss) und -Überständen (Ü, nach anschließender Zentrifugation) sowie zur Kontrolle GST- und wt-Überstand (HPV-31 E6 45.1 kD, HPV-31 L1 83.8 kD). M = 2 µl Mid-Range (Coomassie) bzw. Precision Plus (WB) Marker (Angaben in kD ganz rechts bzw. links).

Beide Proteine sind in löslicher Form exprimiert worden, denn die Zentrifugation nach dem Zellaufschluss führte nicht zu Verlust oder Abschwächung einzelner Banden. Auf den HPV-31 E6 WB sind in den Überstand-Spuren Banden am oberen Gelrand zu erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Aggregate auf Grund hoher Proteinkonzentrationen.

Neben den Banden der Volle-Länge-Proteine sind in den WB vor allem für das HPV-31 L1-Protein auch kleinere Fragmente zu sehen. Im anti-GST-WB werden sowohl unvollständig translatierte Proteine als auch durch Proteolyse entstandene N-terminale Fragmente der Fusionsproteine detektiert. Im anti-tag-WB werden dagegen nur C-terminale Abbauprodukte vollständig translaterter Fusionsproteine erkannt. Die Präsenz der im anti-GST-WB detektierten Fragmente legt nahe, dass die effektive Beladung von GC-Beads mit HPV L1-Fusionsproteinen möglicherweise nicht wesentlich schlechter ist als die mit HPV E6- oder E7-Fusionsproteinen, wenn auch nicht alle HPV L1-Proteine volle Länge haben.

Man kann schlussfolgern, dass die *in situ*-Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen stark unterschiedlicher Größe und Expressionsrate eine vergleichbare Antigen-Dichte auf beladenen GC-Beads erlaubt.

4.2.4.4 Lagerbarkeit Antigen-beladener Beads

Die Lagerbarkeit von mit HPV E6- und E7-Proteinen beladenen Beads wurde getestet, indem zehn Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen an zwei aufeinander folgenden Tagen mit der gleichen Charge Antigen-beladener Beads auf Antikörper gegen HPV-16 E6 und E7 getestet wurden. Wegen der geringen Anzahl von Seren wurden beide Antigene für die Korrelationsanalyse zusammengefasst. Sowohl der Korrelationskoeffizient als auch die Steigung der Ausgleichsgeraden betrugen 0.99. Analoge Versuche haben gezeigt, dass sich auch HPV L1-beladene Beads für mindestens fünf Tage ohne Reaktivitätsverlust lagern lassen.

Die längerfristige Lagerbarkeit wurde untersucht, indem Seren im Abstand von 4 Wochen mit der gleichen Charge Antigen-beladener Beads getestet wurden (Abbildung 4-23).

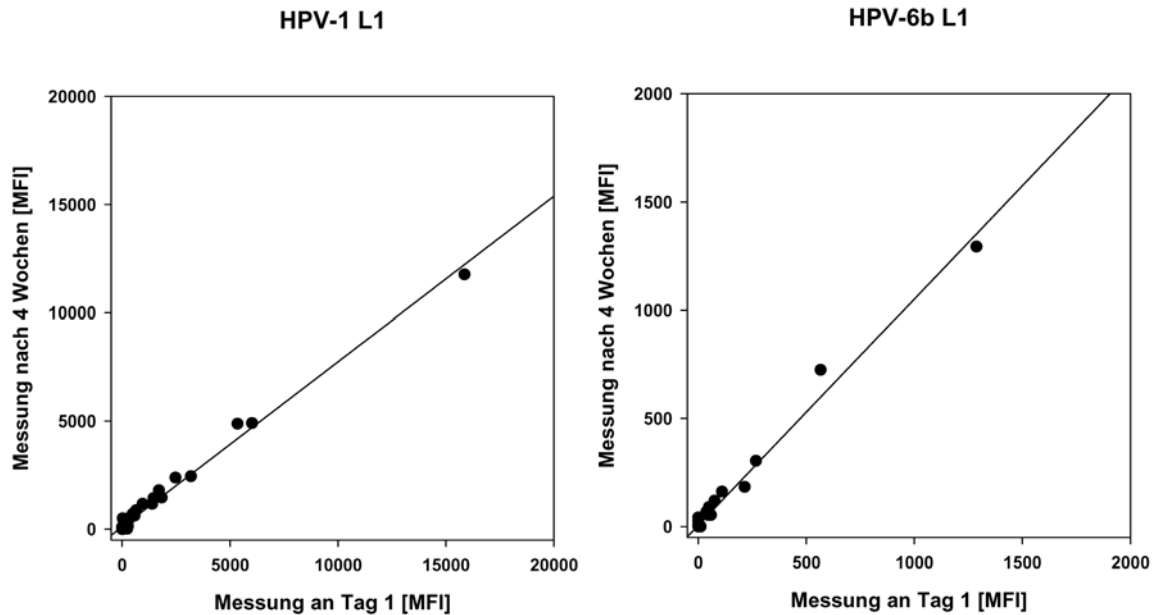


Abbildung 4-23 Längerfristige Lagerbarkeit von mit HPV L1-Proteinen beladenen GC-Beads. Beads wurden mit L1-Lysaten von HPV-1 und -6b beladen, in Azid-haltigem Lagerungspuffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Seren von 48 deutschen Kindern im Alter von 1-5 Jahren (Homburg 1-37, 39-43 und 45-50) wurden am Tag der Beladung und nach 4 Wochen getestet (HPV-1 L1: R^2 0.99, Steigung 0.76; HPV-6b L1: R^2 0.99, Steigung 1.05).

Die Korrelationskoeffizienten für beide Antigene wiesen auf sehr geringe individuelle Abweichungen hin. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden deuteten auf einen Reaktivitäts-Verlust von 24 % für HPV-1 L1 hin, während die HPV-6b L1-beladenen Beads nach 4 Wochen sogar um 5 % höhere Messwerte ergaben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Antigen-beladene Beads sich bei 4 °C in Azid-haltigem Puffer für mindestens 5 Tage ohne Signalverlust lagern lassen, während eine Lagerung über 4 Wochen je nach Antigen Signalverluste von 24 % mit sich bringen kann.

4.2.5 Primärantikörper

4.2.5.1 Dynamischer Bereich

Um den dynamischen Bereich von Multiplex-Serologie zu bestimmen, wurde ein stark Antikörper-positives Serum titriert und mit Antikörper-negativen Seren verglichen (Abbildung 4-24).

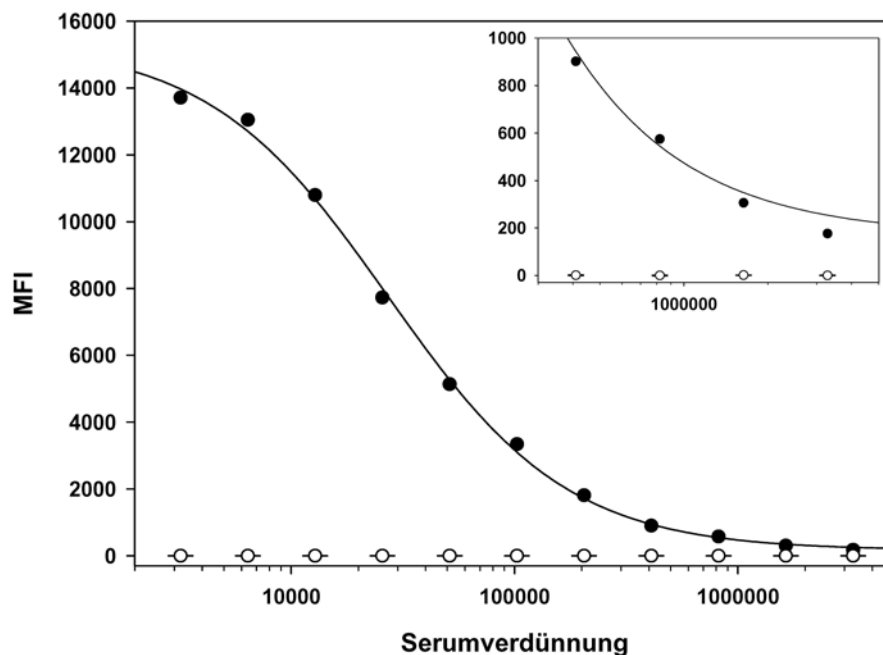


Abbildung 4-24 Dynamischer Bereich von Multiplex-Serologie. Ein stark HPV-16 E6-Antikörper-positives Serum (Chennai-Serum 364, schwarze Punkte) und vier Antikörper-negative Seren (Blutspender-Plasmen 1, 4, 5 und 8) wurden in 1 zu 2-Verdünnungsschritten titriert und die HPV-16 E6-Reaktivität bestimmt. Die Kurve für das Antikörper-positive Serum wurde mit SigmaPlot an die Datenpunkte angepasst. Die weißen Punkte stellen den Mittelwert der vier Antikörper-negativen Seren dar, die Fehlerbalken 3 Standardabweichungen. Für die Antikörper-negativen Seren wurde keine Kurve generiert, da diese die Fehlerbalken überdeckt hätte. Die Vergrößerung zeigt die Daten der 4 größten Serumverdünnungen mit gespreizter y-Achse.

Der lineare Teil der sigmoidalen Kurve des positiven Serums deckt ungefähr 1,5 logarithmische Größenordnungen der Serumverdünnung ab (von 1 zu 6000 bis 1 zu 200000). Die Spanne, die eine Unterscheidung positiver und negativer Seren erlaubt, ist allerdings wesentlich größer. Selbst bei einer Verdünnung von 1 zu 3×10^6 reagierte das

positive Serum noch signifikant stärker (200 MFI) als die negativen Seren bei einer Verdünnung von 1 zu 100 (im Mittel 11 MFI).

4.2.5.2 Spezifitätserhöhung durch Serum-Vorinkubation

Ein wesentlicher Teil der Entwicklung von Multiplex-Serologie diene der Erhöhung von Sensitivität und Spezifität des Systems. Insbesondere die Spezifität ließ sich durch verschiedene Parameter der Serum-Vorinkubation deutlich erhöhen.

In Multiplex-Serologie wird zusätzlich zu den viralen Proteinen immer GST als Antigen verwendet, um aus Rohdaten, sogenannten „Brutto“-Werten, durch Subtraktion des GST-Wertes Hintergrund-korrigierte „Netto“-Werte zu errechnen. Bei den MFI-Werten in den Tabellen dieses Kapitels handelt es sich um Brutto-Werte, wenn die Reaktivität gegen „nackte“ (Carboxy-)Beads, nicht mit Antigen beladene GC-Beads oder GST-beladene Beads dargestellt wird, da diese den Hintergrund bilden, während es sich immer um Netto-Werte handelt, wenn die Reaktivität gegen virale Proteine beschrieben wird. Darüber hinaus sind alle MFI-Werte mit einem Farbcode formatiert, um die Übersicht zu erleichtern.

4.2.5.2.1 Präabsorption von anti-*E.coli*-Antikörpern mit GST-Lysat

Obwohl GC-Beads bei der *in situ*-Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterienlysaten keine im Silbergel sichtbaren Mengen an Bakterienprotein binden (Kapitel 4.2.4.2), ist eine Vorinkubation von humanen Seren in Bakterienlysate unerlässlich, da Human-Seren Antikörper gegen *E.coli*-Proteine enthalten und eine Kontamination der GST-Fusionsproteine mit Bakterienproteinen nicht auszuschließen ist (siehe auch Kapitel 4.1.5).

Zunächst wurde untersucht, welche Menge an GST-Lysat in der Serumvorinkubation die unspezifische Bindung von anti-bakteriellen Antikörpern an restliches Bakterienprotein auf den Beads verhindert. Dazu wurden bekannt für HPV-16 E6- und E7 Antikörper-positive und -negative Seren in Blockpuffer mit bis zu 2 mg/ml GST-Lysat vorinkubiert und auf Reaktivität gegen HPV-16 E6, E7 und L1 untersucht. Tabelle 4-2 zeigt exemplarisch die Daten für jeweils ein Antikörper-positives (HPV-16 E6/E7-Positivmix) und -negatives (Blutspender-Plasma 8) Serum, sowie die Negativkontrolle (ohne Serum).

Tabelle 4-2 Effekt von Serumvorinkubation mit GST-Lysat

Farbcode		500 - 1000 MFI 1000 - 2000 MFI > 2000 MFI			
Serum	GST-Lysat [mg/ml]	GST	16 E6	16 E7	16 L1
16 E6/E7 positiv	0	164	13245	11411	663
	0.3	95	13405	10778	294
	1	84	14270	10567	239
	2	132	16921	12683	256
16 E6/E7 negativ	0	309	2655	3901	1496
	0.3	132	464	594	219
	1	55	144	192	53
	2	45	53	65	24
ohne Serum	0	18	18	3	7
	1	19	5	12	6

Das HPV-16 E6/E7-negative Serum reagierte ohne GST-Lysat stark mit allen drei viralen Antigenen. Diese Reaktionen ließen sich mit zunehmender Konzentration an GST-Lysat auf Werte drücken, die fast denen der Kontrolle ohne Serum entsprachen, so dass diese Reaktionen als unspezifisch interpretiert wurden. Auch der L1-Wert des Antikörper-positiven Serums ließ sich durch Vorinkubation in GST-Lysat auf weniger als die Hälfte drücken, während die E6- und E7-Werte bei höheren GST-Konzentrationen sogar leicht stiegen.

Die Sensitivität nahm demnach mit steigender GST-Konzentration nicht ab (die Werte der positiven Reaktionen blieben gleich hoch), während die Spezifität stark zunahm (die Werte der falsch-positiven Reaktionen sanken stark). Wie im GST capture ELISA auch, wurden Seren für Multiplex-Serologie immer in Blockpuffer mit 2 mg/ml GST-Lysat (GST-Blockpuffer) vorinkubiert.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass verbliebene unspezifische Reaktionen sich durch noch höhere Konzentrationen von GST-Lysat weiter reduzieren lassen. Dies ist jedoch aus technischen Gründen im normalen Laborbetrieb nicht praktikabel.

4.2.5.2.2 Bead-bindende Antikörper

Trotz Vorinkubation in GST-Blockpuffer fielen immer wieder Seren auf, die sehr stark (500 bis 5000 MFI) und unspezifisch mit allen verwendeten Antigenen reagierten. Eine Teilmenge dieser Seren reagierte mit dem den Hintergrund definierenden GST stärker als mit anderen Antigenen, was nach der Hintergrundkorrektur der Brutto-Werte zu negativen Netto-Werten und zum Ausschluss dieser Seren von der Analyse führte.

Dieses Problem hatte sich bereits in mehreren Serumkollektiven als z.T. stark störend erwiesen und nahm drastische Ausmaße an, als in einer Studie mit Seren aus verschiedenen afrikanischen Ländern und Lassa-Virus-Proteinen als Antigenen 59 % der Seren von der Elfenbeinküste, 45 % der Seren aus Guinea, 18 % der Seren aus Sierra Leone, 8 % der Seren aus Tansania und 4 % der Seren aus der deutschen Kontrollgruppe GST-Werte über 500 MFI zeigten. Das unspezifische Binden von Antikörpern an die Beads war offenbar abhängig von der Herkunft der Seren oder spiegelte systematische Unterschiede in den Blut-Abnahme- und -Lagerungs-Bedingungen wieder.

Ein Ausschluss von > 5 % der getesteten Seren wurde als nicht tolerabel für jede seroepidemiologische Methode erachtet, daher wurden intensive Anstrengungen unternommen, diesem Problem Herr zu werden. Während dieser Experimente wurde schrittweise festgestellt, dass die unspezifisch reagierenden Seren unabhängig von der Beladung mit viralen Proteinen direkt an GC-Beads und auch an nicht mit GC gekoppelte, „nackte“ (Carboxy-)Beads banden. Diese Ergebnisse prägten den Begriff „Bead-Binder“ für diese Seren.

In einem breit angelegten Versuch wurden daher auf Bead-Bindung selektionierte Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen auf Reaktivität gegen unbeladene GC-Beads sowie mit HPV-16 E6 und GST beladene GC-Beads untersucht. Getestet wurde die Verwendung von

- monoklonalen Sekundär-Antikörpern
- und der Zusatz von
- Esel-Serum, Ziegen-Serum und gereinigtem Maus-IgG,
 - Tween®-20,
 - Polystyrol- und Luminex Development Beads,
 - Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit einem mittleren Molekulargewicht von 360 kD und Polyvinylalkohol (PVA) mit einem mittleren Molekulargewicht von 30-70 kD sowie
 - CBS-K, einer Substanz mit geschützter Zusammensetzung zum GST-Blockpuffer.

Weder die Verwendung von mono- statt polyklonalen Sekundär-Antikörpern noch die Serumvorinkubation in Eselserum, Ziegenserum oder gereinigtem Maus-IgG verringerte das Ausmaß an unspezifischer Bindung an die Beads. Der Zusatz von Tween®-20, das vielfach zur Unterdrückung unspezifischer Bindungs-Reaktionen verwendet wird, war ebenso ineffizient, zumal es bei der Vermessung in den Mikrokapillaren des Analyzers zur Entstehung von Luftblasen beitrug, was den Messvorgang erheblich störte.

Luminex Development Beads sind eine nicht intern Fluoreszenz-markierte Version der für Multiplex-Serologie verwendeten Beads. Diese, sowie Polystyrol-Beads eines anderen Herstellers, waren nicht in der Lage, unspezifisch bindende Antikörper zu präabsorbieren. Man muss daher davon ausgehen, dass diese Antikörper nicht gegen das Polystyrol gerichtet sind, aus denen die Beads bestehen, sondern mit den Farbstoffen reagieren, mit denen die Beads intern gefärbt sind.

Von den getesteten Substanzen und Methoden erwiesen sich nur PVA, PVP und CBS-K als teilweise wirksam gegen die unspezifische Bindung von Antikörpern an GC-Beads.

4.2.5.2.3 Blockade von Bead-Bindern mit PVA oder PVP

Die Vorinkubation einiger Seren in GST-Blockpuffer mit 0.5 % PVA oder 0.8 % PVP zeigte verschiedene Effekte auf den unspezifischen Hintergrund und die spezifischen Reaktivitäten. Diese Effekte werden in Tabelle 4-3 exemplarisch für sechs ausgewählte Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen gezeigt, die mit unbeladenen GC-Beads, GST-beladenen Beads und mit HPV-16 E6 beladenen Beads getestet wurden.

Tabelle 4-3 Effekt von Serumvorinkubation mit PVA oder PVP

Farbcode	500 - 1000 MFI 1000 - 2000 MFI > 2000 MFI								
	GST-Blockpuffer			GST-Blockpuffer + 0.8 % PVP			GST-Blockpuffer + 0.5 % PVA		
Serum- Vorinkubation									
Chennai- Serum- Nummer	GC	GST	16 E6	GC	GST	16 E6	GC	GST	16 E6
3	1166	856	-474	602	434	-158	1012	690	-491
18	118	78	107	116	84	74	87	55	92
51	4048	3905	16941	1893	1999	14891	532	523	18625
63	1952	1917	633	1733	1595	860	165	100	181
74	1722	1713	657	1105	1010	626	204	115	143
92	2042	1552	21158	1363	896	17418	1662	1389	15325

Für 4 von 6 Seren (3, 51, 74, 92) konnte PVP den Hintergrund auf unbeladenen GC-Beads und GST-beladenen Beads deutlich senken. PVA reduzierte die Hintergrund-Reaktivität auf diesen beiden Beadsorten ebenfalls für 4 Seren (51, 63, 74, 92), davon besonders deutlich für die Seren 63 und 74. Der Hintergrund jeweils eines Serums konnte nur durch eine der beiden Substanzen reduziert werden (PVP Serum 3, PVA Serum 63). Der (niedrige) Hintergrund von Serum 18 wurde durch keine der beiden Substanzen nennenswert gesenkt.

Beide Substanzen veränderten die sehr niedrige spezifische Reaktivität von Serum 18 kaum. PVP konnte den Betrag des negativen HPV-16 E6-Netto-Wertes von Serum 3 etwas reduzieren. Die hohe spezifische Reaktivität der Seren 51 und 92 gegen HPV-16 E6 blieb nach Zugabe von PVP oder PVA weitestgehend erhalten.

Die schwach positiven HPV-16 E6-Reaktionen der Seren 63 und 74 wurden durch Vorinkubation in PVA zusammen mit dem Hintergrund stark reduziert. Da PVA HPV-16 E6-spezifische Antikörper nicht hemmen kann, wurden diese Reaktionen als falsch positiv interpretiert.

Die Hintergrund-Reaktivität von Bead-Bindern und ihr Einfluss auf spezifische Werte ist sehr heterogen. Die Hintergründe konnten teilweise nur durch eine, teilweise durch beide Substanzen in sehr unterschiedlichem Ausmaß reduziert werden. Starke spezifische Reaktionen blieben erhalten, während schwache falsch positive und der Betrag negativer Netto-Werte von der einen oder anderen Substanz reduziert wurden. Weder PVP noch PVA waren allerdings alleine in der Lage, die mit Bead-Bindern verbundene Problematik zu lösen.

4.2.5.2.4 Blockade von Bead-Bindern mit PVX

Die gemeinsame Wirkung der zusammen als PVX bezeichneten Substanzen wurde überprüft, indem 35 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen mit „nackten“ (Carboxy-)Beads, GST-beladenen Beads und HPV-16 E6 beladenen Beads getestet wurden (Tabelle 4-4). Dabei wurden die Seren in GST-Blockpuffer mit und ohne PVX vorinkubiert und in drei Gruppen eingeteilt: Seren, die bei Vorinkubation in GST-Blockpuffer ohne PVX sehr hohe (> 1000 MFI, A), hohe (500 - 1000 MFI, B) oder niedrige (< 500 MFI, C) GST-Werte zeigten.

Die quantitative Analyse ergab eine PVX-vermittelte Reduktion der mittleren Hintergrund-Werte auf GST-beladenen Beads um 87 % (Gruppe A), 63 % (Gruppe B) und 48 % (Gruppe C). Auf „nackten“ Beads wurde der mittlere Hintergrund um 97 % (Gruppe A), 70 % (Gruppe B) und 54 % (Gruppe C) verringert. Dennoch konnte für 5 der 17 Seren der Gruppen A (Serum 72, 92) und B (Serum 2, 9, 45) der Hintergrund auf „nackten“ und GST-beladenen Beads auch mit PVX auf nicht unter 500 MFI gesenkt werden. Die Hintergrund-Reduktion war in zwei Fällen heterogen: Für Serum 72 (Gruppe A) konnte nur der Hintergrund auf „nackten“, für Serum 45 (Gruppe B) nur der Hintergrund auf GST-beladenen Beads gesenkt werden.

Eine Analyse der spezifischen Reaktionen gegen HPV-16 E6 ist nur individuell, d.h. nicht im Mittel für eine Gruppe sinnvoll. Die HPV-16 E6-Werte der stark positiven Seren (> 1000 MFI) in allen Gruppen wurden durch PVX-Vorinkubation kaum verringert oder sogar erhöht. Der Betrag negativer Netto-Werte wurde dagegen reduziert (Gruppe A: Serum 18; Gruppe B: Serum 9, 23, 109). Schwach positive HPV-16 E6-Werte wurden durch PVX-Vorinkubation häufig zusammen mit dem Hintergrund stark reduziert, so dass sie als falsch positiv interpretiert wurden (Gruppe A: Serum 46, 63, 64, 74; Gruppe B: Serum 1, 87, 100; Gruppe C: Serum 5).

Die Wirkung von PVX entsprach der Summe der Einzelwirkungen von PVA und PVP: Starke spezifische Reaktionen blieben erhalten, während schwache falsch positive und der Betrag negativer Netto-Werte reduziert wurden. Das fortdauernde Auftreten hoher Hintergründe und negativer Netto-Werte (5 bzw. 6 von 35 Seren) zeigte jedoch, dass auch eine Serumvorinkubation in PVX-haltigem GST-Blockpuffer Bead-Bindung nicht vollständig eliminieren kann.

Tabelle 4-4 Effekt von Serumvorinkubation mit PVX

Farbcode		500 - 1000 MFI 1000 - 2000 MFI > 2000 MFI					
Serum-Vorinkubation		GST-Blockpuffer			GST-Blockpuffer + PVX		
Chennai-Serum-Nummer	Gruppe	"nackt"	GST	16 E6	"nackt"	GST	16 E6
18	A	418	1667	-1386	49	493	-413
46		2944	2100	322	83	48	12
51		5539	3790	13554	101	236	13457
63		3919	2455	252	57	107	0
64		4881	3252	327	152	109	46
72		1065	1107	491	68	552	-172
74		3417	1841	260	72	83	21
92		184	1192	13267	70	806	13715
116		3290	2692	13531	179	117	15234
		Mittelwert	2851	2233		92	283
1	B	1288	787	125	40	27	11
2		1111	889	7768	727	607	6452
9		83	817	-756	61	627	-579
23		1048	684	-132	133	134	-63
45		1221	604	1310	605	95	679
87		1108	529	164	47	60	8
100		915	586	304	374	212	118
109		797	890	-440	300	388	-216
	Mittelwert	946	723		286	269	
5	C	546	263	207	109	112	50
6		311	245	14689	178	165	17130
10		501	139	17	456	166	-85
11		92	175	18306	45	121	16871
12		359	181	3093	158	95	3135
13		535	281	25	74	42	2
22		206	304	14703	144	170	17401
28		296	166	3117	215	120	2228
29		176	219	7135	114	88	5424
35		99	42	3919	48	25	2821
39		114	83	7432	55	56	6551
40		106	56	9727	73	38	8326
44		117	99	2439	78	67	1829
53		858	463	5031	264	150	4398
65		233	232	10365	98	151	11161
79		345	225	10380	214	108	9873
108		485	458	3578	125	214	4059
111		110	145	17316	69	88	16027
		Mittelwert	305	210		140	110

Die Seren wurden auf Reproduzierbarkeit der HPV-16 E6-Werte für Vorinkubation mit und ohne PVX untersucht (Abbildung 4-25).

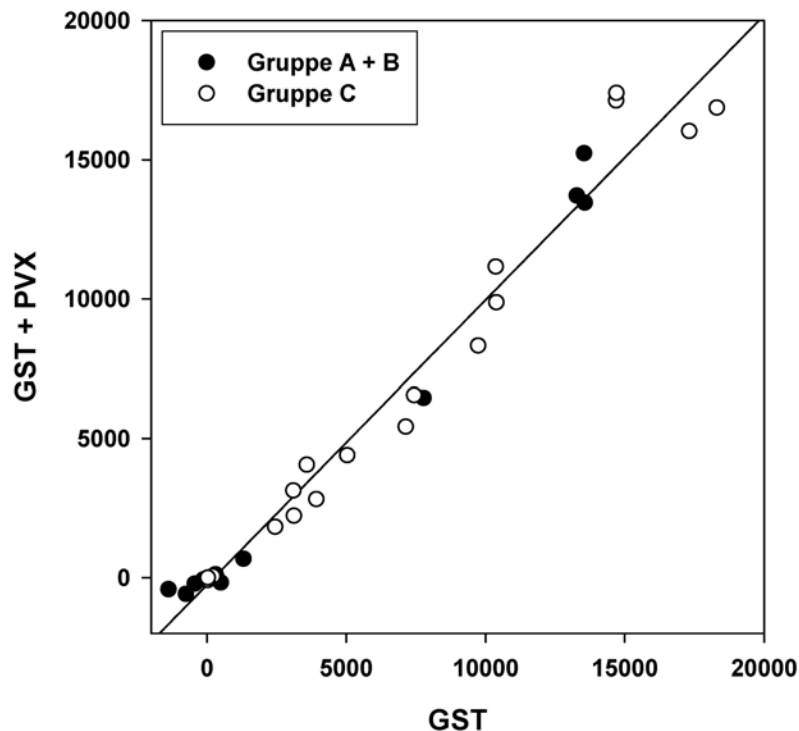


Abbildung 4-25 Reproduzierbarkeit von spezifischer HPV-16 E6-Reaktivität nach PVX-Vorinkubation. Seren von 46 Zervix-Karzinom-Patientinnen wurden in GST-Blockpuffer ohne (x-Achse) oder mit PVX (y-Achse) vorinkubiert und auf Reaktivität gegen HPV-16 E6 untersucht. Gruppen A und B: Seren, die ohne PVX-Vorinkubation hohe (> 500 MFI) oder sehr hohe (> 1000 MFI) GST-Werte gezeigt hatten. Gruppe C: Seren, die ohne PVX-Vorinkubation niedrige (< 500 MFI) GST-Werte gezeigt hatten. Die Korrelationsanalyse wurde für alle Gruppen gemeinsam durchgeführt und ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.98 und eine Steigung von 1.02.

Der Vergleich aller Seren ergab eine sehr gute individuelle und systematische Reproduzierbarkeit der HPV-16 E6-Reaktivitäten für Vorinkubation mit und ohne PVX. Dies galt sowohl für Seren der Gruppen A und B als auch für Seren der Gruppe C, war also unabhängig von der Hintergrund-Reaktivität, die die Seren ohne PVX gezeigt hatten.

Dieses Experiment zeigte, dass hohe Hintergrund-Reaktionen in den meisten Fällen bereits Resultat einer Bindung von Antikörpern an die Beads selber sind. Diese unspezifische Interaktion lässt sich aber durch Serumvorinkubation in PVX-haltigem Puffer weitgehend

verhindern, ohne dass die Reaktivität von Seren, die nicht an Beads binden, dadurch negativ beeinflusst wird. Die Spezifität der Messung lässt sich durch PVX-Vorinkubation also deutlich steigern, ohne die Sensitivität zu verringern. Seren wurden nach diesem Experiment immer in GST-Blockpuffer mit PVX vorinkubiert, wenn nicht anders erwähnt.

4.2.5.2.5 Blockade von Bead-Bindern mit CBS-K

Da Serumvorinkubation in PVX-haltigem Blockpuffer den hohen unspezifischen Hintergrund von Bead-Bindern nicht immer ausreichend unterdrücken konnte, wurde zusätzlich „CBS-K“, eine Substanz mit geschützter Zusammensetzung in der Serumvorinkubation getestet. CBS-K ist als Blockreagenz beschrieben, das in serologischen Versuchen den unspezifischen Hintergrund reduzieren kann.

In einem ersten Versuch wurden zehn Bead-Binder-Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen mit GST-Blockpuffer, PVX-haltigem GST-Blockpuffer oder GST-Blockpuffer mit 20 % CBS-K vorinkubiert und mit unbeladenen GC-Beads, GST-beladenen Beads und mit HPV-16 E6 beladenen Beads untersucht (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5 Effekt von Serumvorinkubation mit PVX oder CBS-K

Farbcode	500 - 1000 MFI 1000 - 2000 MFI > 2000 MFI								
	GST-Blockpuffer			GST-Blockpuffer + PVX			GST-Blockpuffer + CBS-K		
Serum-Vorinkubation									
Chennai-Serum-Nummer	GC	GST	16 E6	GC	GST	16 E6	GC	GST	16 E6
447	4342	4284	-3867	3030	3206	-2866	43	55	132
529	1841	1651	-822	233	189	74	322	287	-22
542	2999	3728	6900	1376	1140	8405	273	164	3470
568	3040	3147	-1391	1184	1021	-409	222	254	12
569	2500	2723	-1264	924	680	-290	125	164	71
594	2704	2192	1758	1378	1141	1683	99	149	1240
606	1456	1641	-613	264	277	38	67	102	65
683	4126	3118	4534	2708	2636	3111	353	231	2521
710	723	748	724	604	642	779	71	82	401
474	3291	2870	7552	1591	1113	6038	612	354	5402
Mittelwert	2702	2610		1329	1204		219	184	

Die Serumvorinkubation in CBS-K-haltigem GST-Blockpuffer konnte den Hintergrund auf unbeladenen GC- und GST-beladenen Beads für 9 bzw. 10 von 10 Seren auf unter 500 MFI drücken. Auf unbeladenen GC-Beads wurde der Hintergrund im Mittel um 92 % gegenüber GST-Blockpuffer und um 83 % gegenüber PVX-haltigem GST-Blockpuffer gesenkt. Auf GST-beladenen Beads war der Hintergrund um 93 % (nur GST) bzw. 85 % (GST + PVX) verringert.

Die spezifischen Reaktionen der stark HPV-16 E6-positiven Seren (> 1000 MFI) wurden durch die Vorinkubation mit CBS-K gegenüber GST-Blockpuffer mit oder ohne PVX etwas verringert (deutlich für Serum 542). Alle 5 (GST) bzw. 3 (GST + PVX) Seren mit negativen Netto-Werten zeigten bei CBS-K-Vorinkubation sehr niedrige positive oder sehr schwach negative Werte.

Insgesamt kann man schlussfolgern, dass die Serumvorinkubation in GST-Blockpuffer mit 20 % CBS-K das unspezifische Binden von Antikörpern an unbeladene GC-Beads und GST-beladene Beads weitgehend verhindert, die Sensitivität der Messung aber evtl. etwas verringert.

4.2.5.2.6 Titration von CBS-K und synergistischer Effekt mit PVX

CBS-K ist eine nur kommerziell erhältliche, teure Substanz. Um die Konzentration an CBS-K zu bestimmen, die ausreicht, um unspezifische Bindung von Antikörpern an Beads zu verhindern, wurden 4 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen mit bekannten Bead-Bindungs-Eigenschaften in Blockpuffer mit 0.3 bis 20 % CBS-K vorinkubiert und auf Antikörper gegen GST getestet. Während der durchschnittliche unspezifische Hintergrund auf GST-Beads bei einer Konzentration von 1.3 % CBS-K noch bei 413 MFI lag, fiel er bei einer CBS-K-Konzentration von 2.5 % auf 115 MFI und mit 5 % CBS-K auf 45 MFI.

Um CBS-K und PVX auf einen synergistischen Effekt zu untersuchen, wurde der Versuch mit PVX-haltigem GST-Blockpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an CBS-K wiederholt. Mit 0.6 % CBS-K lag der durchschnittliche GST-Wert bei 644 MFI, mit 1.3 % CBS-K bei 198 MFI und mit 2.5 % CBS-K bei 49 MFI. Die Anwesenheit von PVX halbierte also die notwendige CBS-K-Konzentration. Seren wurden nach diesem Experiment immer in PVX-haltigem GST-Blockpuffer mit 2.5 % CBS-K vorinkubiert, wenn nicht anders erwähnt.

Der Effekt von PVX und CBS-K auf Cut-Off-Werte wurde untersucht, indem 15 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen und von 20 gesunden Blutspendern mit und ohne CBS-K in PVX-haltigem GST-Blockpuffer vorinkubiert und auf Antikörper gegen GST, HPV-16 E6 und zusätzlich HPV-16 L1 getestet wurden (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6 Effekt von Serumvorinkubation mit PVX und CBS-K

Farbcode		500 - 1000 MFI			1000 - 2000 MFI			> 2000 MFI		
Serum-Vorinkubation		GST-Block-puffer + PVX			GST-Block-puffer + PVX + CBS-K					
		GST	16 E6	16 L1	GST	16 E6	16 L1			
Chennai-Serum-Nummer	4	426	6647	175	51	4086	142			
	10	162	7962	3574	51	4705	2739			
	29	94	2104	14	36	1521	19			
	41	131	74	-10	38	-14	-3			
	47	115	-20	1080	37	-9	721			
	57	237	1465	-3	33	897	18			
	83	121	-32	7234	48	-17	4936			
	123	101	1450	5809	42	1064	2857			
	138	133	1017	234	63	193	10			
	149	79	1242	591	46	820	369			
	155	708	-157	-373	40	-9	6			
	157	510	7100	1404	57	4769	726			
	167	121	40	269	32	-4	113			
	170	51	2086	457	35	1282	380			
	187	134	313	2420	35	-10	1366			
Mittelwert		208			43					
Blutspender-Seren	1	230	-50	-22	59	-18	0			
	4	61	41	61	34	-10	-11			
	5	386	210	135	38	-6	1			
	7	150	-4	95	60	-25	52			
	8	133	5	3	33	-14	-1			
	11	267	-19	-51	32	-7	7			
	12	63	86	-6	35	58	-7			
	13	491	-329	657	34	-10	43			
	14	260	-72	-41	37	-15	8			
	15	85	23	9	33	-17	-5			
	18	58	-12	131	41	-16	129			
	19	630	-228	-145	35	-15	-4			
	20	199	-76	-26	59	-39	-15			
	21	111	-3	-18	37	-15	1			
	22	112	5	-26	37	-20	-2			
	25	131	-80	-57	42	-20	-9			
	26	475	-242	-116	36	-21	-13			
	27	73	-16	62	47	-23	44			
	28	153	-8	-8	43	-14	7			
	29	106	46	33	40	-11	25			
Mittelwert		209			41					

Der mittlere Hintergrund der Seren der Zervix-Karzinom-Patientinnen auf GST-beladenen Beads fiel durch das CBS-K um 79 %. Fast das gleiche Bild ergab sich für die Blutspender-Seren: Der Hintergrund fiel um 80 %.

Die HPV-16 E6- und L1-Werte der Seren der Zervix-Karzinom-Patientinnen sanken durch das CBS-K im Mittel um 37 % (s.u., Steigungen der Ausgleichsgeraden in der Korrelationsanalyse). Die Reaktivitäten der Blutspenderplasmen gegen HPV-16 E6 und L1 waren auch ohne Zusatz von CBS-K zur Serumvorinkubation bereits überwiegend sehr niedrig oder sogar negativ (da es sich um eine gesunde Kontrollgruppe handelt) und veränderten sich durch das CBS-K kaum. Auffällig war, dass ohne CBS-K 60 % der Werte zum Teil stark negativ (im Mittel -69 MFI, minimal -329 MFI) und mit CBS-K 70 % der Werte sehr schwach negativ waren (im Mittel -13 MFI, minimal -39 MFI).

Die Seren der Zervix-Karzinom-Patientinnen wurden auf Reproduzierbarkeit der HPV-16 E6-, L1- und GST-Werte für Vorinkubation mit und ohne CBS-K untersucht (Abbildung 4-26).

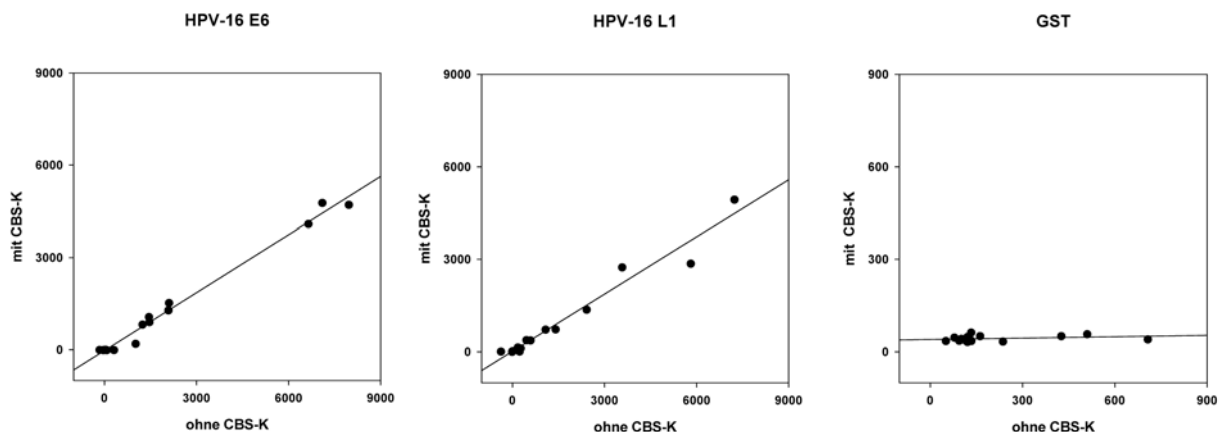


Abbildung 4-26 Effekt von Serumvorinkubation mit PVX und CBS-K auf HPV-16 E6-, L1- und GST-Reaktivitäten. Seren von 15 Zervix-Karzinom-Patientinnen wurden ohne (x-Achsen) und mit (y-Achsen) 2.5 % CBS-K in PVX-haltigem GST-Blockpuffer vorinkubiert und auf Antikörper gegen GST, HPV-16 E6 und L1 getestet. Die Korrelationsanalyse der Reaktivitäten ergab für HPV-16 E6 (links) $R^2 = 0.99$ und Steigung = 0.63, für HPV-16 L1 (Mitte) $R^2 = 0.96$ und Steigung = 0.62 und für GST (rechts) $R^2 = 0.09$ und Steigung = 0.02.

Für GST war die Korrelation sehr schlecht und die Steigung der Ausgleichsgeraden fast Null, was die Hintergrund-reduzierende Wirkung des CBS-K deutlich zeigte. Die Werte für HPV-16 E6 und L1 mit und ohne CBS-K korrelierten sehr gut miteinander. Die Reduktion der spezifischen Reaktivitäten spiegelte sich in den Steigungen der Ausgleichsgeraden wieder.

Die Blutspender-Seren wurden zur Ermittlung von Cut-Off-Werten für die viralen Antigene eingesetzt (Mittelwert plus 3 Standard-Abweichungen). Die auf Grund der gesteigerten Spezifität gesunkenen GST-Werte führten zu sehr niedrigen HPV-16 E6- und L1-Netto-Werten mit geringer Variation. Diese spiegelte sich in reduzierten Standardabweichungen (für HPV-16 E6 ohne CBS-K 100 MFI und mit CBS-K 7 MFI, für HPV-16 L1 ohne CBS-K 73 MFI und mit CBS-K 20 MFI) und letztlich niedrigeren Cut-Off-Werten wieder.

Die aus den Blutspender-Seren ermittelten Cut-Off-Werte sanken für HPV-16 E6 von 278 auf 6 MFI und für HPV-16 L1 von 221 auf 66 MFI. Daraus ergibt sich, dass trotz leicht gesunkener Netto-Werte die gleiche Anzahl von Seren als Antikörper-positiv eingestuft wurden (mit und ohne CBS-K für beide Antigene 10 von 15 Seren), aber mit deutlich besserem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis mit CBS-K.

4.2.5.2.7 Unterschiedliche Typen von Beads

Zeitgleich mit der Evaluierung von CBS-K stellte die Firma Luminex zusätzlich zu den bisherigen „MultiAnalyte“-Beads Prototypen eines weiteren Beadtyps („SeroMap“) zur Verfügung. SeroMap-Beads sollten einen niedrigeren Serum-Hintergrund haben.

Elf Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen wurden mit und ohne CBS-K in GST-Blockpuffer (ohne PVX) vorinkubiert und mit „nackten“ (Carboxy-)SeroMap-Beads sowie mit unbeladenen und mit GST oder HPV-16 E6 beladenen Beads beider Typen untersucht. Für diesen Versuch standen leider keine „nackten“ MultiAnalyte-Beads mehr zur Verfügung (Tabelle 4-7).

Die beiden Typen von Beads zeigten deutliche Unterschiede. Bei den „nackten“ SeroMap-Beads war bereits in GST-Blockpuffer der Hintergrund um durchschnittlich 36 % geringer als zuvor (für andere Seren) auf MultiAnalyte-Beads beobachtet worden war (Tabelle 4-4). Selbst dieser geringere Hintergrund wurde durch CBS-K fast völlig eliminiert (minus 81 %).

Auf unbeladenen und GST-beladenen SeroMap-Beads war der Hintergrund in GST-Blockpuffer ohne CBS-K nur ca. halb so hoch wie auf analogen MultiAnalyte-Beads (minus 47 bzw. 49 %). Auch bei Serumvorinkubation mit CBS-K war der Hintergrund auf SeroMap-Beads deutlich niedriger (minus 51 bzw. 31 %).

Tabelle 4-7 Vergleich von SeroMap- und MultiAnalyte-Beads mit CBS-K

Farbcode		500 - 1000 MFI 1000 - 2000 MFI > 2000 MFI						
Beadtyp		SeroMap				MultiAnalyte		
Chennai-Serum-Nummer	Serum-Vorinkubation	"nackt"	GC	GST	16 E6	GC	GST	16 E6
447	GST-Blockpuffer	330	2916	2904	-2602	4342	4284	-3867
529		530	363	367	-20	1841	1651	-822
542		574	1330	1306	7273	2999	3728	6900
568		69	1091	1038	-346	3040	3147	-1391
569		179	1061	881	-334	2500	2723	-1264
594		413	1426	1173	1841	2704	2192	1758
606		778	534	526	83	1456	1641	-613
683		1016	3593	3205	3344	4126	3118	4534
710		626	471	527	827	723	748	724
474		1329	1455	1245	8404	3291	2870	7552
Mittelwert		584	1424	1317		2702	2610	
447	GST-Blockpuffer + CBS-K	49	36	49	102	43	55	132
529		80	50	57	88	322	287	-22
542		17	174	127	5764	273	164	3470
568		30	40	52	118	222	254	12
569		35	44	50	89	125	164	71
594		49	40	43	875	99	149	1240
606		27	25	38	76	67	102	65
683		154	272	217	2687	353	231	2521
710		81	33	35	339	71	82	401
474		545	554	479	4902	612	354	5402
Mittelwert		107	127	115		219	184	

In GST-Blockpuffer ohne CBS-K wurden die spezifischen HPV-16 E6-Werte der Seren durch die Verwendung von SeroMap- anstelle von MultiAnalyte-Beads kaum beeinflusst. Darüber hinaus traten auf MultiAnalyte-Beads bei 4 Seren stark negative Netto-Werte auf, deren Betrag auf SeroMap-Beads deutlich reduziert wurde. Für ein Serum (606) konnte ein negativer HPV-16 E6-Wert sogar völlig verhindert werden.

Die spezifischen HPV-16 E6-Werte auf beiden Beadtypen waren in GST-Blockpuffer mit CBS-K ebenfalls kaum unterschiedlich. Stark negative Netto-Werte traten weder auf SeroMap- noch auf MultiAnalyte-Beads auf.

Insgesamt kann man schlussfolgern, dass die Verwendung von SeroMap- anstelle MultiAnalyte-Beads den unspezifischen Hintergrund stark verringert, ohne der Sensitivität zu

schaden. Der höhere Hintergrund der MultiAnalyte-Beads wird jedoch bei Serumvorinkubation in CBS-K weitgehend ausgeglichen. Die Kombination von SeroMap-Beads mit Serumvorinkubation in CBS-K erhöhte die Sensitivität und Spezifität am meisten und minimierte darüber hinaus die Anzahl negativer Netto-Werte.

Der Unterschied zwischen den beiden Beadtypen in Kombination mit PVX-Serumvorinkubation (aber ohne CBS-K) wurde anhand der Reaktionen von 32 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen gegen GST und HPV-16 E6 untersucht (Abbildung 4-27).

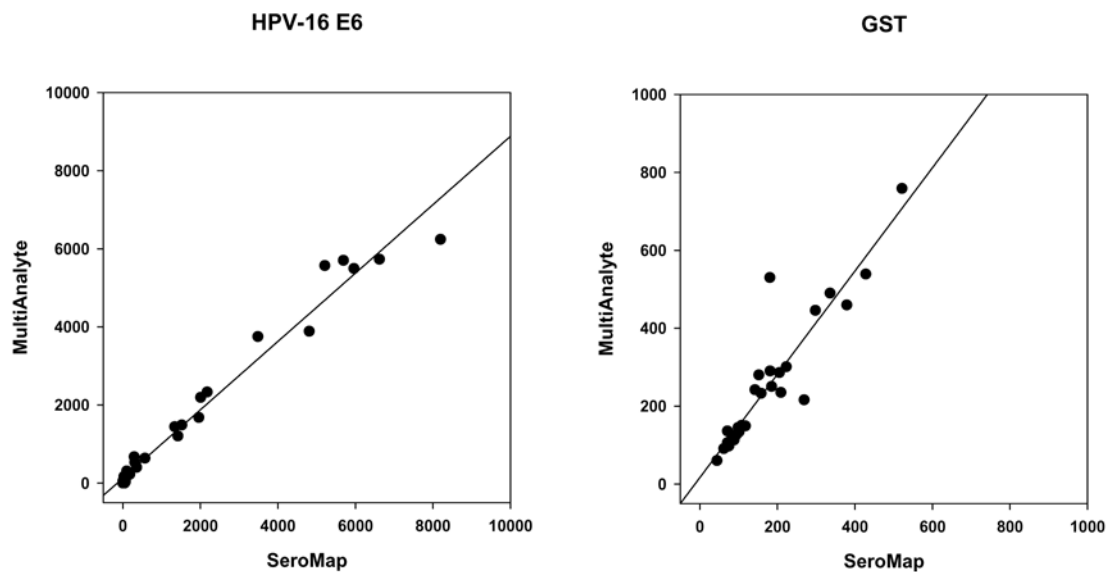


Abbildung 4-27 Vergleich von SeroMap- und MultiAnalyte-Beads mit PVX. 32 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen (Chennai 2, 4, 6, 8, 10, 25, 30, 32, 42, 44, 47, 52, 55, 57, 71, 83, 85, 99, 109, 123, 138, 141, 145, 149, 151, 155, 157, 165, 167, 170, 178, 187) wurden mit beiden Beadtypen getestet. Links: Korrelationsanalyse für HPV-16 E6 (R^2 0.98, Steigung 0.88). Rechts: Analyse für GST (R^2 0.86, Steigung 1.33).

Auf SeroMap-Beads zeigten sich konsistent höhere HPV-16 E6- (gesteigerte Sensitivität) und niedrigere GST-Werte (höhere Spezifität).

Der Unterschied zwischen beiden Beadtypen in Kombination mit PVX und CBS-K wurde anhand der HPV-16 E6-, L1- und GST-Reaktionen von 94 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen untersucht (Abbildung 4-28).

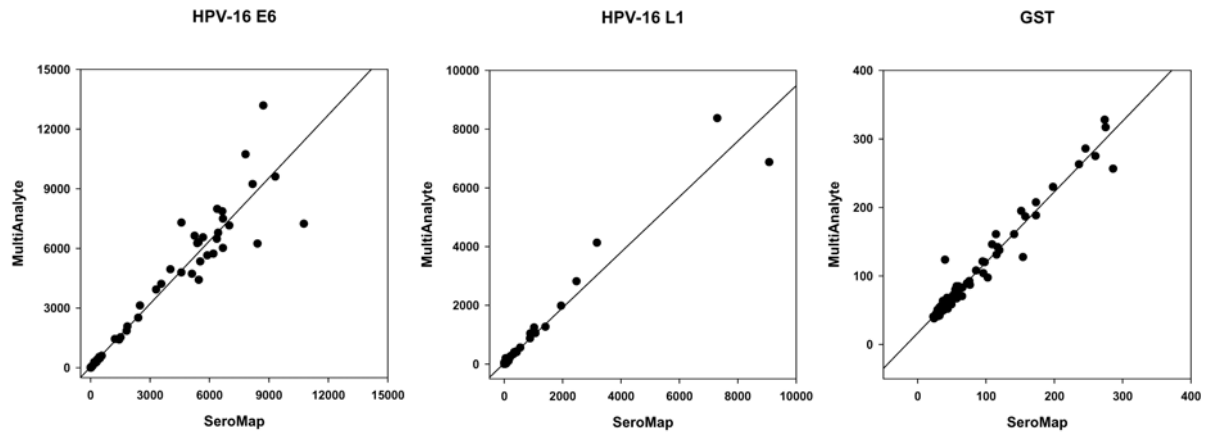


Abbildung 4-28 Vergleich von SeroMap- und MultiAnalyte-Beads mit CBS-K und PVX.

Seren von 94 Zervix-Karzinom-Patientinnen (Chennai 2, 4, 6, 8, 10, 13-15, 17, 19, 22-26, 28, 30-32, 36-38, 40, 42, 44, 47, 50, 52, 55-59, 62, 66, 70-71, 73-74, 82-83, 85-86, 89, 92-94, 96, 98-100, 102-103, 105-107, 109, 111, 113-114, 117, 119, 121-123, 125, 127, 129, 131-132, 137-138, 141, 145-147, 149, 151, 153-155, 157, 159-160, 164-167, 170, 172, 175-176, 178, 187) wurden mit PVX und CBS-K vorinkubiert und mit beiden Beadtypen auf Reaktivität mit HPV-16 E6, L1 und GST getestet. Links: Korrelationsanalyse für HPV-16 E6 (R^2 0.93, Steigung 1.06). Mitte: Analyse für HPV-16 L1 (R^2 0.95, Steigung 0.95). Rechts: Analyse für GST (R^2 0.96, Steigung 1.03).

Bei Serumvorinkubation in PVX und CBS-K zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Beadtypen mehr. Daraus muss man schließen, dass die Kombination beider Blocksubstanzen so effektiv ist, dass sie den höheren Hintergrund der MultiAnalyte-Beads vollständig eliminieren können. Alle folgenden Experimente wurden mit SeroMap-Beads durchgeführt, da diese auf Grund ihres Status als Prototyp zu diesem Zeitpunkt nur ein Viertel der MultiAnalyte-Beads kosteten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verwendung von CBS-K in der Serumvorinkubation nicht nur das Problem der unspezifisch an Luminex-Beads bindenden Antikörper deutlich reduziert; sondern auch den Hintergrund nicht Bead-bindender Beads reduziert. PVX und SeroMap-Beads komplementieren den Effekt. Die Kombination aller drei Methoden steigert die Spezifität der Messung drastisch. Unabhängig von ihrer Herkunft zeigten unter optimierten Bedingungen < 0.5 % der Seren GST-Werte > 500 MFI.

Zwar werden die Netto-Werte der positiven Reaktionen mit den viralen Antigenen etwas reduziert, aber die Senkung der Hintergrund-Reaktivität Antikörper-negativer Seren ist um

ein Vielfaches größer. Dies verbessert das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis drastisch und macht sich in deutlich niedrigeren Cut-Off-Werten bemerkbar. Die Detektion Antikörper-positiver Seren wird dadurch erleichtert, d.h. die Sensitivität der Messung wird ebenfalls gesteigert.

4.2.6 Sekundär-Antikörper

Um zu überprüfen, ob direkt mit PE markierte oder biotinylierte Sekundär-Antikörper (unter Verwendung von Strep-PE als Detektionskonjugat) bessere Signale ermöglichen, wurden 4 Sekundär-Antikörper getestet: kommerziell erhältlicher Esel-anti-human-Biotin und Ziege-anti-human-Biotin sowie selbst markierter Esel-anti-human-PE (Abbildung 4-29) und Ziege-anti-human-PE (Daten nicht gezeigt).

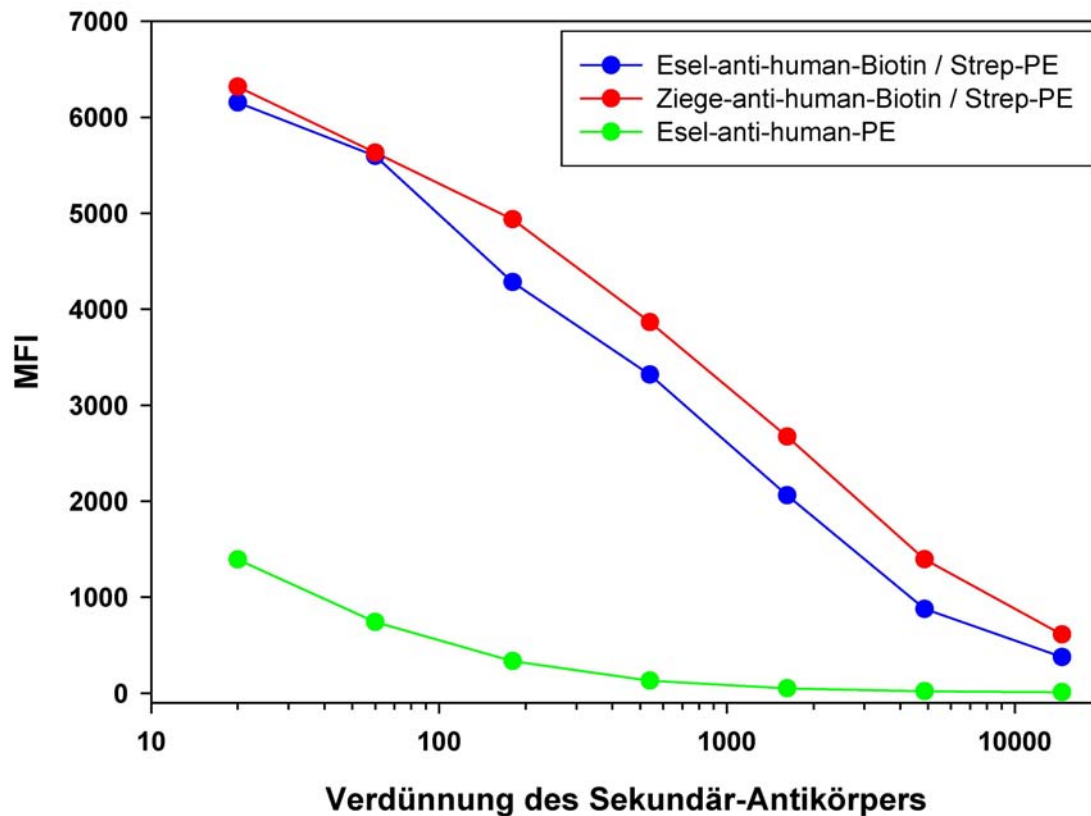


Abbildung 4-29 Titration verschiedener Sekundär-Antikörper. Beads wurden mit HPV-16 E7 beladen und mit einem stark gegen HPV-16 E7 reaktiven Serum (HPV-16 E6/E7-Positivmix 1 zu 400) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Verdünnungsreihen drei verschiedener Sekundär-Antikörper und ggf. Strep-PE detektiert.

Die biotinylierten Sekundär-Antikörper zeigten auch in weit größerer Verdünnung noch stärkere Signale als die direkt markierten Esel- und auch als der Ziege-anti-human-Antikörper, so dass eine fehlerhafte Kopplung als Erklärung ausgeschlossen werden konnte.

Die höheren Signale der biotinylierten Antikörper lassen sich durch eine Amplifikation des Signals erklären: Jeder Antikörper ist mehrfach biotinyliert und damit in der Lage, mehrere Strep-PE-Moleküle zu binden, während die direkte Markierung auf Grund des Molekulargewichts von PE (240 kD) und der begrenzten Anzahl von möglichen Bindungsstellen (reduzierte Disulfidbrücken) vermutlich nur die Kopplung eines PE-Moleküls pro Antikörper erlaubt. Für Multiplex-Serologie wird biotinylierter Ziege-anti-human-Sekundär-Antikörper aus Kostengründen in einer Verdünnung von 1 zu 1000 eingesetzt.

4.2.7 Streptavidin-R-Phycoerythrin

Das Detektionskonjugat Strep-PE ist kommerziell von mehreren Herstellern erhältlich. Zwei verschiedene Präparationen wurden getestet, um die für Multiplex-Serologie geeignete Verdünnung festzustellen (Abbildung 4-30).

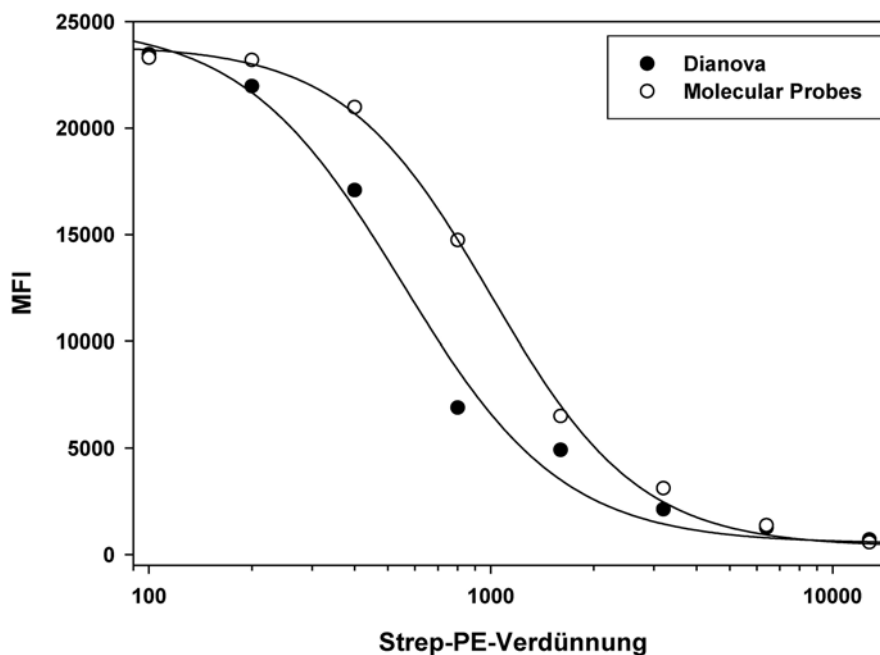


Abbildung 4-30 Titration verschiedener Strep-PE-Präparationen. Beads wurden mit HPV-16 E7 beladen und mit einem stark gegen HPV-16 E7 reaktiven Serum (HPV-16 E6/E7-Positivmix 1 zu 100) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Ziege-anti-human-Biotin und Verdünnungsreihen von Strep-PE-Präparationen zweier Hersteller detektiert.

Beide Produkte erreichten Sättigung bei einer Verdünnung von 1 zu 100, bei einer Verdünnung von 1 zu 800 ergab die Molecular Probes-Präparation aber ein fast doppelt so hohes Signal wie die Dianova-Präparation. Für Multiplex-Serologie wird Strep-PE von Molecular Probes aus Kostengründen in einer Verdünnung von 1 zu 1000 eingesetzt.

4.2.8 Erfolglose Versuche

4.2.8.1 Serum-Volumen-Kontrolle mittels anti-human-Ig-Beads

Für epidemiologische Studien werden 2 µl Serum aus dem Originalgefäß (z.B. Eppendorf-Gefäß) entnommen und in eine 96-Lochplatte mit 100 µl Serumvorinkubationspuffer pro Loch transferiert. Seren können sehr viskos sein, v.a. wenn sie längere Zeit bei 4 °C gelagert wurden und mit Mikroorganismen bewachsen sind. Trotz optischer Überprüfung kann dies dazu führen, dass keine vollen 2 µl pipettiert werden.

Daher wurde versucht, eine Kontrolle zu entwickeln, die z.B. 1 µl pipettiertes Serum von 2 µl unterscheiden kann und innerhalb des Multiplex Serologie-Systems eingesetzt werden kann. Menschliches Serum enthält eine relativ konstante Konzentration von 8.8 - 15.0 g/l Immunglobulin (88), sofern keine B-Zell-Defekte (Hypo- oder Hyperimmunglobulinämie) vorliegen. Eine Quantifizierung des Gesamt-Immunglobulins in Multiplex-Serologie würde daher eine Überprüfung des pipettierten Volumens ermöglichen.

Zum Nachweis von menschlichen Antikörpern wurde ein IgA-, IgG- und IgM-spezifischer Esel-anti-human-Antikörper direkt auf Beads gekoppelt. Dabei wurde analog zum Koppeln von GC auf Beads vorgegangen und Konzentrationen an Esel-anti-human-Antikörper von 1 µM bis 100 pM wurden untersucht. Nur die beiden höchsten Konzentrationen (1 und 0.1 µM) waren in der Lage, menschliche Antikörper in einer Serumverdünnung von 1 zu 100 zu detektieren (Abbildung 4-31).

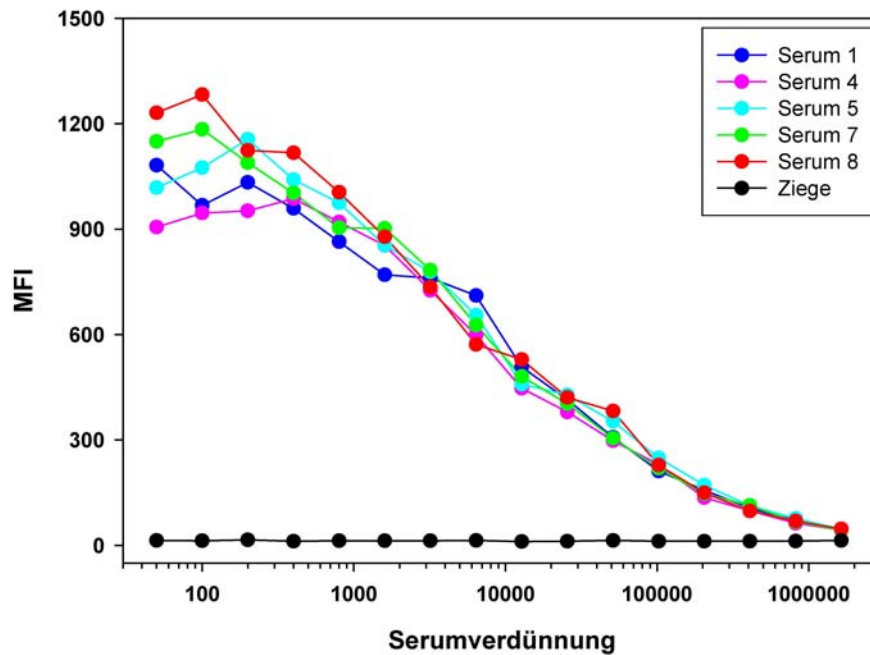
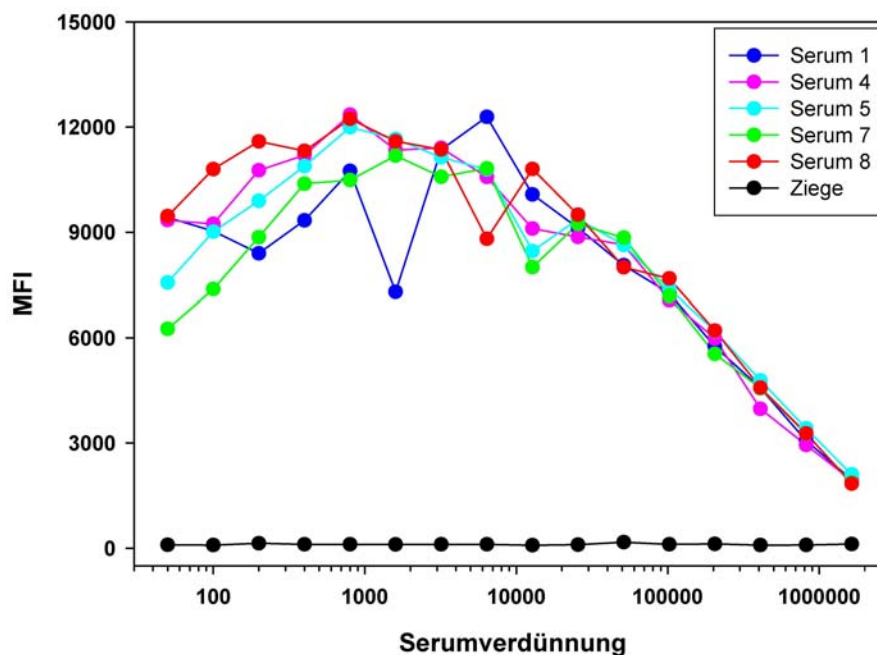
0.1 μM Esel-anti-human-Antikörper1 μM Esel-anti-human-Antikörper

Abbildung 4-31 Serum-Volumen-Kontrolle mit anti-human-Ig-Beads. Fünf menschliche Seren (Blutspender 1, 4-5, 7-8) und zur Spezifitäts-Kontrolle Ziegenserum wurden in Verdünnungsreihen mit Beads inkubiert, auf die 0.1 μM (oben) oder 1 μM (unten) Esel-anti-human-Antikörper gekoppelt worden war. Gebundene Antikörper wurden mit Ziege-anti-human-Biotin und Strep-PE detektiert.

Beide Sorten anti-human-Beads konnten menschliches Serum bis zu einer Verdünnung von 1.6×10^6 detektieren (im Mittel 1943 bzw. 45 MFI), wobei das Signal auf Beads mit $1 \mu\text{M}$ gekoppeltem anti-human-Antikörper („ $1 \mu\text{M}$ -Beads“) ungefähr 10 mal stärker war als auf Beads mit $0.1 \mu\text{M}$ gekoppeltem anti-human-Antikörper („ $0.1 \mu\text{M}$ -Beads“). Vermutlich können $1 \mu\text{M}$ -Beads Serum noch in wesentlich größeren Verdünnungen detektieren. Sowohl $1 \mu\text{M}$ -Beads als auch $0.1 \mu\text{M}$ -Beads zeigten selbst in einer Verdünnung von 1 zu 100 kaum Signal mit Ziegenserum (97 bzw. 14 MFI).

Die 5 menschlichen Seren zeigten erwartungsgemäß unterschiedliche Signale, insbesondere für hohe Serumkonzentrationen. Die Werte wichen auf $1 \mu\text{M}$ -Beads um bis zu 37 % (im Mittel 19 %) und auf $0.1 \mu\text{M}$ -Beads um bis zu 26 % (im Mittel 16 %) voneinander ab.

Da Seren für epidemiologische Studien in einer finalen Verdünnung von 1 zu 100 getestet werden, ist der flache Abfall der Kurven mit sinkender Serumkonzentration auf $0.1 \mu\text{M}$ -Beads problematisch, da er es nicht erlaubt, sicher zwischen Serumverdünnungen von 1 zu 100 und 1 zu 200 zu unterscheiden.

$1 \mu\text{M}$ -Beads erlauben diese Unterscheidung noch weniger, da die Signale für Serumverdünnungen < 1 zu 800 abfallen. Dies ist wahrscheinlich Folge eines *Rebinding*-Effektes (89). Dabei wird die Beadoberfläche vermutlich so mit Serum-Antikörpern überladen, dass weniger Sekundär-Antikörper binden können als bei einer niedrigeren Oberflächendichte von Primär-Antikörpern. Der Effekt entspricht also dem Mechanismus einer enzymatischen Substrat-Inhibition.

4.2.8.2 Lagerbarkeit der Serumverdünnung

Das manuelle Verdünnen der Seren stellt für eine epidemiologische Multiplex-Serologie-Studie mit > 1000 Seren den zeit- und arbeitsaufwändigsten Schritt dar. Es wurde untersucht, ob man die Serumverdünnungen einen Tag im voraus ansetzen kann, um den Versuchsablauf ggf. entzerren zu können (Abbildung 4-32).

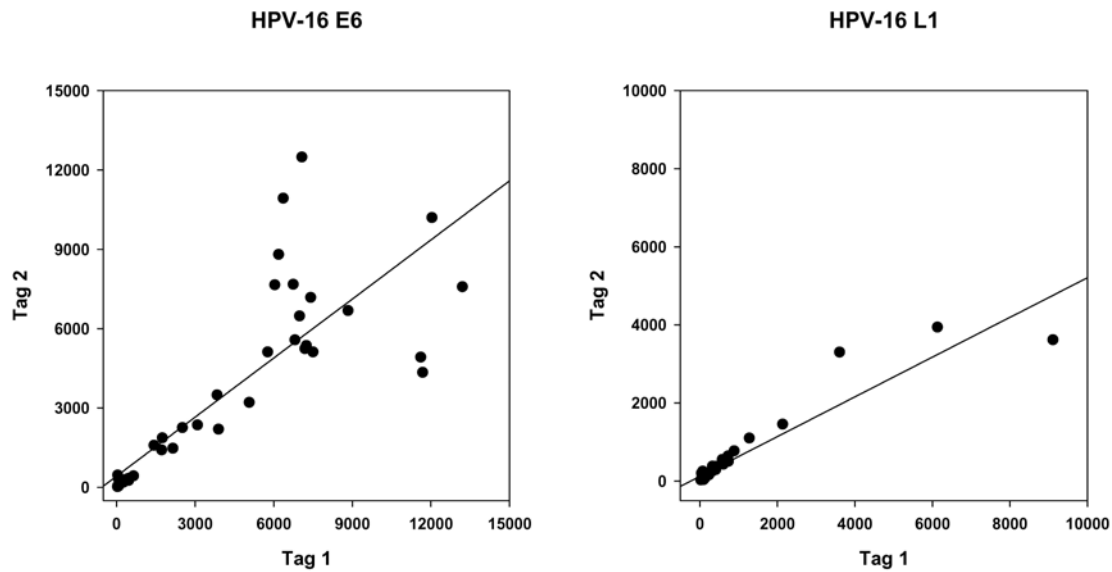


Abbildung 4-32 Lagerbarkeit der Serumverdünnung. 47 Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen (Chennai 2, 4, 6, 8, 10, 14-15, 19, 22, 25, 28, 30, 32, 38, 42, 44, 47, 52, 55, 57, 59, 71, 73, 83, 85, 89, 93-94, 96, 99, 103, 107, 109, 111, 113-114, 117, 119, 121, 123, 131, 137-138, 141, 145, 147, 149) wurden in PVX- und CBS-K-haltigem GST-Blockpuffer verdünnt (Tag 1), über Nacht bei 4 °C gelagert und parallel mit frisch verdünnten Seren (Tag 2) auf Reaktivität gegen HPV-16 E6 und L1 untersucht (HPV-16 E6: R^2 0.71, Steigung 0.75; HPV-16 L1: R^2 0.89, Steigung 0.51).

Das Ergebnis der Korrelationsanalyse zeigt, dass sowohl individuelle Schwankungen als auch starke systematische Reaktivitätsverluste bei den länger vorverdünnten Seren auftreten, vermutlich weil die Lysate eine geringe Menge von Proteasen enthalten, die bei nicht komplexierten Antikörpern leicht Proteolyse bewirken können.

4.3 Validierung von Multiplex-Serologie

Nach der Etablierung von Standard-Bedingungen wurde Multiplex-Serologie im Hinblick auf kritische Parameter wie Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität validiert.

4.3.1 Reproduzierbarkeit

Da die im Analyzer vermessenen Beads nach der Messung an ihre ursprüngliche Position in der Waschplatte zurückgegeben werden, lassen sich Messungen derselben Reaktionen wiederholen. Dabei wurden für das Nachmessen derselben Platte nach erneutem Waschen oder nach dazwischenliegender Übernacht-Inkubation Korrelationskoeffizienten von 0.99 und Steigungen der Ausgleichsgeraden von 1.00 ± 0.05 gefunden. Dies zeigte eine sehr hohe Reproduzierbarkeit des Messvorgangs.

Um die Reproduzierbarkeit von vollständigen Experimenten, von der Kopplung der Beads mit GC bis zur Vermessung der Beads im Analyzer, auf möglichst konservative Weise zu ermitteln, wurde das gleiche Experiment zweimal auf möglichst unabhängige Weise durchgeführt. Zwei Experimentatoren untersuchten Seren von 38 Zervix-Karzinom-Patientinnen auf Antikörper gegen HPV-16 E6 und E7, wobei unterschiedliche Sorten von GC-Beads aus unterschiedlichen Kopplungs-Chargen verwendet wurden und beide Experimentatoren die Verdünnungen von Seren, Sekundär-Antikörper und Detektions-Konjugat individuell ansetzten. Für beide Experimente wurde jedoch das gleiche bakterielle Lysat verwendet. Diese Einschränkung wurde für zulässig erachtet, weil die Lysate üblicherweise in einem Maßstab von 50 ml produziert werden, was selbst bei einer unterdurchschnittlichen Lysatkonzentration von 10 mg/ml Gesamtprotein die Durchführung von 500 Studien mit jeweils bis zu 1000 Seren mit demselben Lysat erlaubt (Abbildung 4-33).

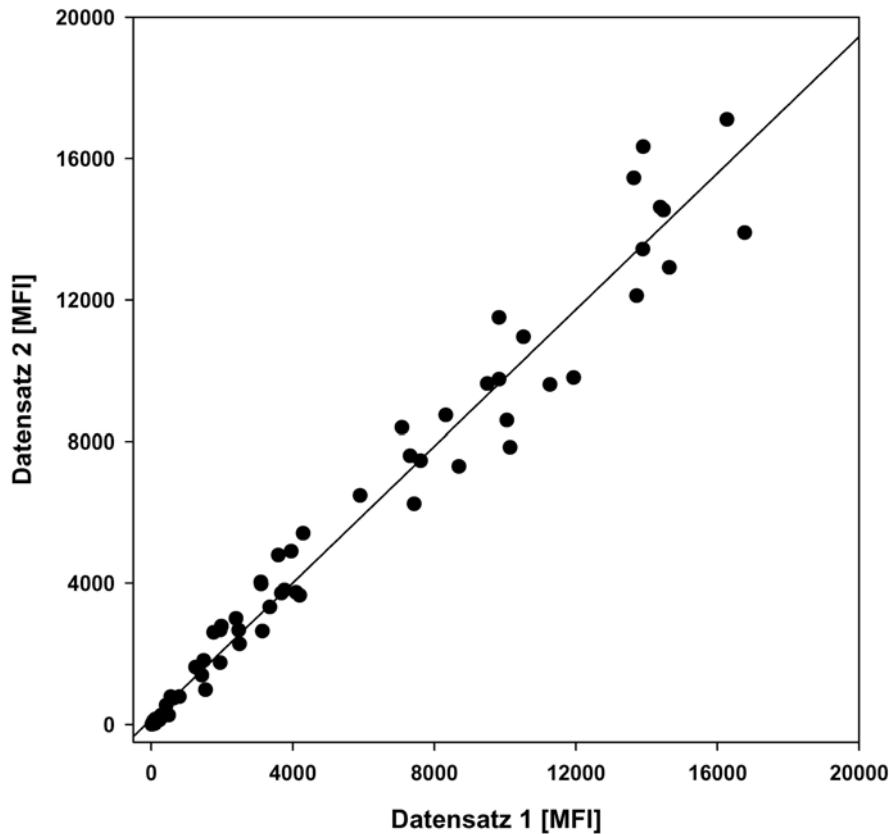


Abbildung 4-33 Reproduzierbarkeit von Multiplex-Serologie. Seren von 38 Zervix-Karzinom-Patientinnen (Chennai 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 22, 28, 30, 38, 42, 44, 47, 51, 55, 59, 65, 73, 75, 83, 89, 93, 99, 103, 107, 111, 113, 117, 119, 123, 125, 127, 131, 137, 139, 141, 145) wurden von zwei Experimentatoren unabhängig voneinander auf HPV-16 E6- und E7-Antikörper untersucht (R^2 0.97, Steigung 0.97).

Die Daten der Korrelationsanalyse, die für beide Datensätze zusammen durchgeführt wurde, deuteten auf sehr geringe individuelle und systematische Variationen beider Experimente hin. Die Reproduzierbarkeit von Multiplex-Serologie-Messungen ist demnach sehr hoch.

4.3.2 Korrelation mit GST capture ELISA

Um Multiplex-Serologie mit dem GST capture ELISA zu vergleichen, wurden die Seren von 91 Zervix-Karzinom-Patientinnen mit beiden Methoden auf Antikörper gegen HPV-16 E6 untersucht (Abbildung 4-34).

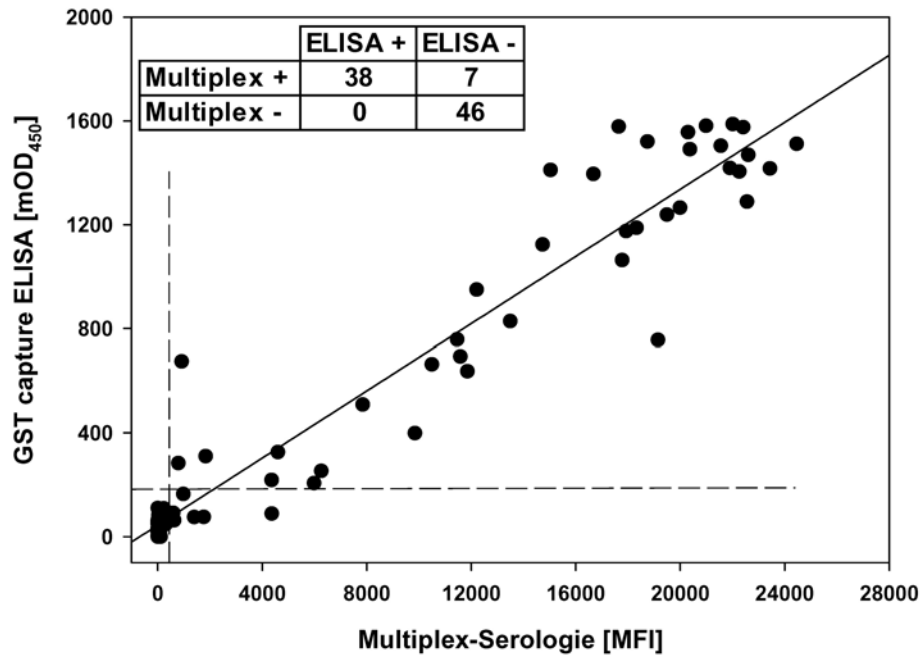


Abbildung 4-34 Korrelation von Multiplex-Serologie mit GST capture ELISA. Seren von 91 Zervix-Karzinom-Patientinnen (Chennai 2, 4, 6, 8, 10, 13-15, 17, 19, 22-26, 28, 30-32, 36-38, 40, 42, 44, 47, 50, 52, 55-59, 62, 66, 70-71, 73-74, 82-83, 85-86, 89, 92, 94, 96, 98-100, 102-103, 105-107, 109, 111, 113-114, 117, 121-123, 125, 127, 129, 131-132, 137-138, 145-147, 149, 151, 153-155, 157, 159-160, 164-167, 170, 172, 175-176, 178, 187) wurden mit beiden Methoden auf Antikörper gegen HPV-16 E6 untersucht (R^2 0.94) und Cut-Offs (gestrichelte Linien) anhand von 21 Blutspender-Seren ermittelt (180 mOD₄₅₀ bzw. 400 MFI).

Der Korrelationskoeffizient belegt, dass die Messwerte beider Methoden in hohem Maße übereinstimmen, auch wenn es individuelle Abweichungen gibt.

Der - aus statistischer Sicht - aussagekräftigere Test zur Analyse der Übereinstimmung zweier Testsysteme ist eine κ (kappa)-Analyse. Der κ -Wert ist ein dimensionsloser Index mit dem Wertebereich $0 \leq \kappa \leq 1$ und ebenso wie der R^2 -Wert ein Maß für die Abhängigkeit zweier Datensätzen voneinander. Im Gegensatz zum R^2 - beruht der κ -Wert allerdings auf einem statistischen Test, der berücksichtigt, dass die Übereinstimmung von Messwerten auch Zufall und nicht notwendigerweise auf Grund eines kausalen Zusammenhangs der Fall sein könnte. Praktisch bedeutet dies, dass der κ - konservativer als der R^2 -Wert ist. Im allgemeinen werden κ -Werte von > 0.4 als akzeptabel, von > 0.6 als gut und von > 0.8 als sehr gut erachtet.

Da die κ -Analyse auf qualitativen Daten beruht, mussten anhand von in beiden Systemen mitgetesteten Seren von 21 gesunden Blutspendern als Kontrollgruppe Cut-Offs für beide Systeme errechnet und die Seren der Zervix-Karzinom-Patientinnen als (Antikörper-)positiv oder negativ klassifiziert werden. Von den 91 Seren reagierten 38 konkordant (in beiden Systemen) positiv und 46 konkordant negativ. Sieben diskordante Seren waren im Multiplex-Serologie-Test positiv und im GST capture ELISA negativ. Die Aufstellung dieser Daten in einer Vier-Felder-Tafel erlaubt eine κ -Analyse, wobei ein Internet-basierter κ -Rechner benutzt wurde. Der ermittelte κ -Wert von 0.846 belegt, dass beide Testsysteme sehr gut miteinander korrelieren. Die sieben nur in Multiplex-Serologie positiven Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen deuten darüber hinaus auf eine erhöhte Sensitivität hin.

4.3.3 Sensitivität

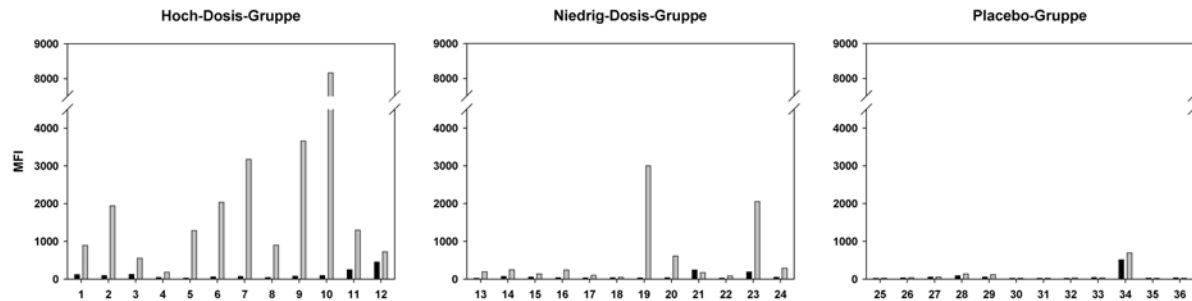
Die Sensitivität von Multiplex-Serologie wurde mit mehreren Methoden analysiert. Eine davon war es, den Titer eines stark Antikörper-positiven Serums zu ermitteln, also die größte Verdünnungsstufe des Serums, die noch eine eindeutige Klassifizierung als Antikörper-positiv erlaubt (im Vergleich zu mitgetesteten Antikörper-negativen Seren, siehe Kapitel 4.2.5.1). Dabei zeigte ein einfacher Titrations-Versuch (Daten nicht gezeigt), dass Multiplex-Serologie achtfach sensitiver als der GST capture ELISA war, solange für diesen direkt Peroxidase-markierter Sekundär-Antikörper verwendet wurde. Dies ist auf das Signal-Amplifikations-System zurückzuführen, das für Multiplex-Serologie verwendet wird (biotinylierter Sekundär-Antikörper und Streptavidin-R-Phycoerythrin). Bei Verwendung eines analogen Signal-Amplifikations-Systems im GST capture ELISA (biotinylierter Sekundär-Antikörper und Streptavidin-Poly-Peroxidase) ist Multiplex-Serologie nur noch um maximal eine Titerstufe, d.h. zweifach sensitiver.

Für Seroepidemiologie ist jedoch nicht die Detektion von stark Antikörper-positiven Seren entscheidend, sondern eine möglichst gute Diskriminierung von schwach positiven und negativen Seren. Daher wurde die Sensitivität von Multiplex-Serologie anhand von Seren einer klinischen Impfstudie untersucht, die schon einmal mit GST capture ELISA analysiert worden waren.

Frauen mit HPV-16 DNA-positiven zervikalen intraepithelialen Neoplasien (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN), einer Vorläuferläsion zum Zervix-Karzinom, hatten eine Präparation chimärer Virus-artiger Partikel (*chimeric virus-like particle*, cVLP) von HPV-16 L1/E7-Fusionsproteinen erhalten, die starke L1-Antikörper-Antworten ausgelöst hatte, aber nur sehr wenige und sehr schwache E7-Antikörper-Antworten. Die Verfügbarkeit von Seren

vor und nach der Impfung bzw. Placebo-Gabe in Kombination mit den schwachen E7-Antikörper-Antworten auf den Impfstoff erlaubte den Vergleich der Sensitivität von Multiplex-Serologie mit GST capture ELISA (Abbildung 4-35).

Multiplex-Serologie



GST capture ELISA

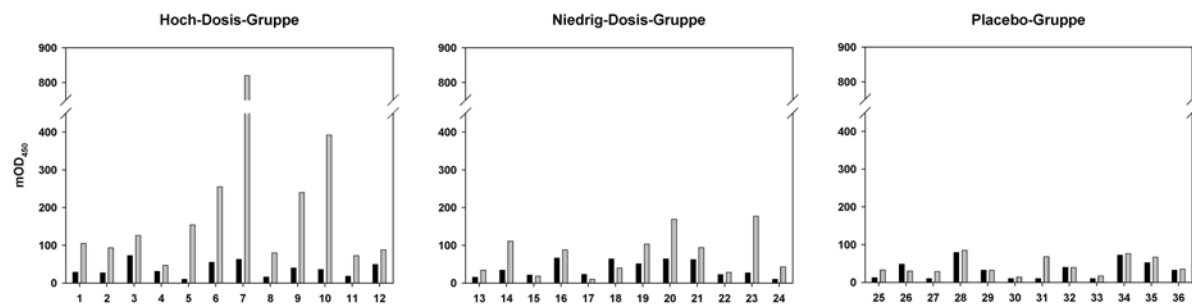


Abbildung 4-35 Sensitivität von Multiplex-Serologie im Vergleich zu GST capture ELISA. Je zwölf Frauen hatten in einer Impfstudie Placebo, Niedrig-Dosis-Impfstoff (75 µg) oder Hoch-Dosis-Impfstoff (250 µg) erhalten. HPV-16 E7-Antikörper-Reaktivitäten vor (dunkle Balken) und nach (helle Balken) der Impfung wurden mit beiden Methoden analysiert.

Erhöhte E7-Antikörper-Reaktionen nach der Impfung wurden mit beiden Methoden in der Hoch-Dosis- und weniger stark in der Niedrig-Dosis-Gruppe gefunden, die Steigerung war aber wesentlich deutlicher bei den Multiplex-Serologie-Daten.

Der Quotient der Antikörper-Reaktivitäten nach und vor der Impfung wurde zur quantitativen Analyse dieses Effektes herangezogen. Dieser Quotient erreichte für einzelne Studienteilnehmer bis zu 88.2 bei Analyse mit Multiplex-Serologie und nur 15.4 im GST capture ELISA. Die erhöhte Sensitivität von Multiplex-Serologie wurde durch die höheren Mediane und Mittelwerte der Quotienten für beide Impf-Gruppen bestätigt (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8 Sensitivität von Multiplex-Serologie und GST capture ELISA

Impf-Gruppe (jeweils n=12)		Multiplex- Serologie	GST capture ELISA
Hoch-Dosis	Spanne ¹	1.6 - 81.6	1.5 - 15.4
	Median / MW ^{1,2}	20.9 / 26.1	4.3 / 5.9
	Impf-Erfolge ³	11	6
Niedrig-Dosis	Spanne	0.7 - 88.2	0.4 - 6.6
	Median / MW	4.7 / 12.6	1.8 / 2.3
	Impf-Erfolge	7	4
Placebo	Spanne	0.7 - 2.1	0.6 - 6.8
	Median / MW	1.1 / 1.2	1.2 / 1.9
	Impf-Erfolge	0	0

¹ Quotienten der E7-Antikörper-Reaktivitäten nach und vor der Impfung

² MW: arithmetischer Mittelwert

³ Quotient von mindestens 2 und Reaktivität nach Impfung über Cut-Off

Serologischer E7-Impf-Erfolg wurde definiert über einen Quotienten von mindestens zwei und eine Reaktivität nach Impfung über Cut-Off, wobei Cut-Off-Werte aus den 36 Seren vor Impfung errechnet wurden. Unter Benutzung dieses Kriteriums und Multiplex-Serologie wurden in der Hoch-Dosis-Gruppe 11 und in der Niedrig-Dosis-Gruppe 7 Impf-Erfolge festgestellt, während der GST capture ELISA nur 6 bzw. 4 Impf-Erfolge feststellen konnte. In der Placebo-Gruppe wurden mit beiden Methoden keine Impf-Erfolge festgestellt. Multiplex-Serologie detektierte in 5 der 36 Seren vor Impfung schwache E7-Antikörper-Reaktionen über Cut-Off (eine davon in der Placebo-Gruppe), die im GST capture ELISA nicht gefunden wurden. Diese Antikörper könnten durch die persistierende HPV-16-Infektion verursacht worden sein, die zu der CIN-Läsion geführt hatte. Ihr Nachweis könnte ein weiteres Zeichen der erhöhten Sensitivität von Multiplex-Serologie darstellen.

4.3.4 Typen-Spezifität

Zervix-Karzinom-Zellen enthalten fast immer DNA mindestens eines Hoch-Risiko-HPV-Typs (90), deren Expression vermutlich auch die im Serum nachweisbaren E6- und E7-spezifischen Antikörper induziert hat. Zur Demonstration der Typen-Spezifität von Multiplex-Serologie wurden die Antikörper-Reaktivitäten von Frauen mit und ohne Zervix-Karzinom gegen die E6-, E7- und L1-Proteine von HPV-16 und -18 direkt verglichen (Abbildung 4-36).

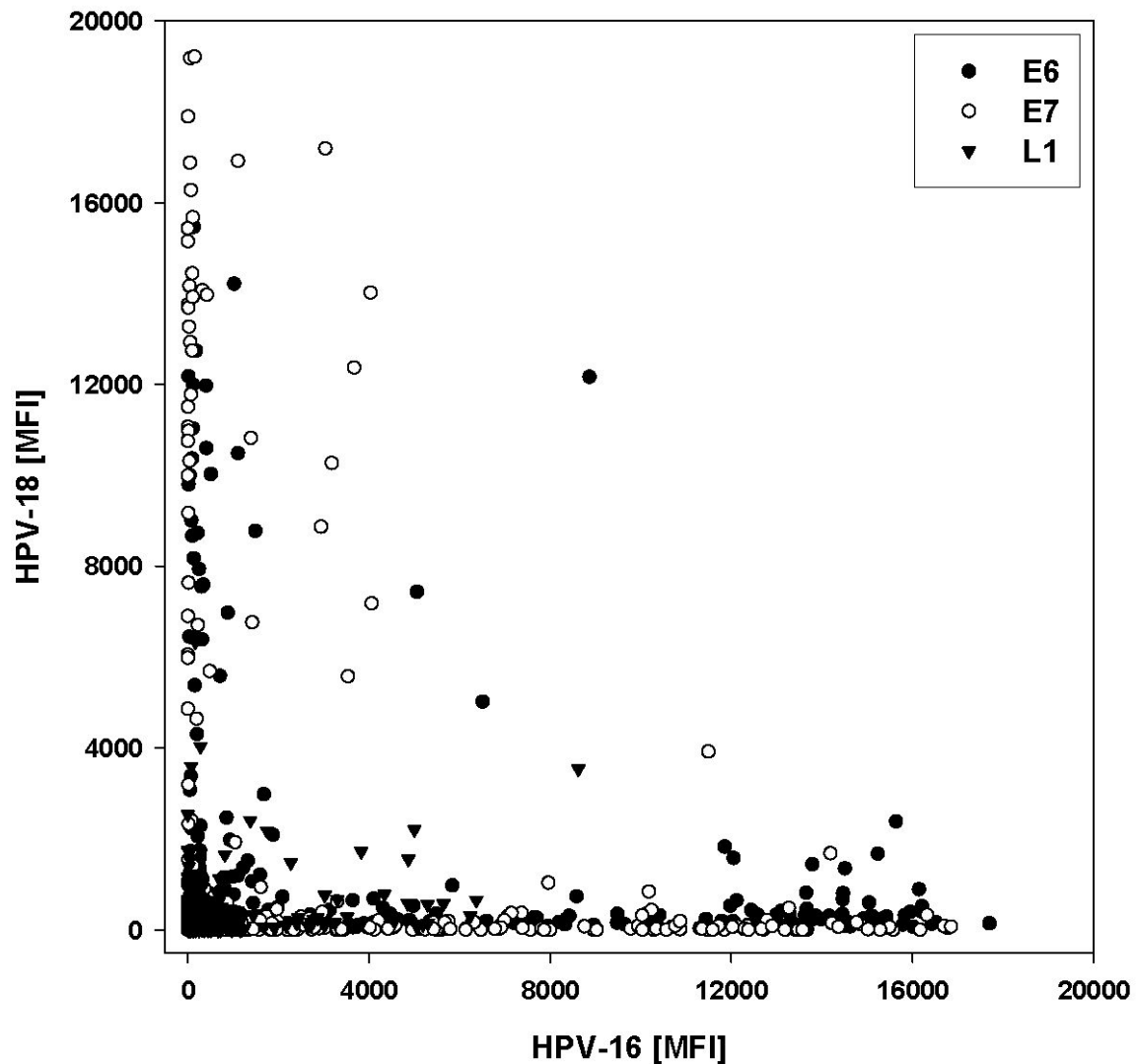


Abbildung 4-36 Typen-Spezifität von Multiplex-Serologie. Seren von 347 Frauen mit und 409 Frauen ohne Zervix-Karzinom wurden auf Antikörper gegen die E6-, E7- und L1-Proteine von HPV-16 und -18 untersucht und die Reaktivitäten gegen die homologen Proteine direkt verglichen.

Die große Mehrheit (> 99 %) der positiven Antikörper-Reaktionen wurde gegen nur eines der homologen Proteine gefunden. Dies deutet darauf hin, dass es keine substantielle Antikörper-Kreuzreaktivität zwischen den HPV-Typen 16 und 18 gibt und demonstriert das Potenzial von Multiplex-Serologie zur Typen-spezifischen Antikörper-Detektion.

4.4 Seroepidemiologische Studien

Seroepidemiologie erlaubt es, die Häufigkeit von Antikörpern in einem Kollektiv zu bestimmen (Prävalenz). Die untersuchten Seren können z.B. repräsentativ für einen Teil der Bevölkerung eines Landes oder für Menschen mit einer bestimmten Krankheit sein. Die Assoziation von Antikörpern mit einer Krankheit lässt sich mit Hilfe von Fall-/Kontroll-Studien ermitteln, die Seren von Fällen (kranken Menschen) und Kontrollen (Menschen, die nicht an der Krankheit leiden, ansonsten aber ähnliche Merkmale aufweisen) umfassen. Weitere Daten über die untersuchte Population erlauben es schließlich, den Zusammenhang mehrerer Parameter (z.B. Alter oder Geschlecht, Antikörperprävalenz und Krankheit) zu untersuchen.

Der wesentliche neue Aspekt dieser Arbeit ist, dass Multiplex Serologie es ermöglichte, eine große Zahl von Seren auf Antikörper gegen viele Antigene gleichzeitig zu untersuchen und damit biologische Fragen zu beantworten, die mit nicht-parallelen Methoden kaum zu beantworten sind. Nur so war es z.B. möglich, neue Erkenntnisse über Mehrfachpositivität gegen mehrere HPV-Typen einer phylogenetischen Spezies und Kreuzreaktionen zu gewinnen oder die Assoziation von Antikörpern gegen die L1-Proteine mehrerer HPV-Typen der B1-Spezies und *non melanoma skin cancer* (NMSC) zu zeigen.

Mehrere serepidemiologische Studien wurden inzwischen mit Multiplex-Serologie durchgeführt. Tabelle 4-9 gibt einen Überblick über die untersuchten Serumsammlungen und die Zahl getesteter Seren und Antigene. Insgesamt wurden in enger Zusammenarbeit mit Kollegen aus dem eigenen Labor (v.a. Dr. Peter Sehr, Dipl.-Biol. Kristina Michael und Dipl.-Biol. Stefanie Kerzel) in weniger als 15 Monaten 23 Studien mit ca. 10000 Seren und im Schnitt 14 Antigenen analysiert (91-95). In vielen Studien wurden Seren auf Antikörper gegen HPV-Proteine untersucht, das verwendete modulare Expressionssystem erlaubte es aber auch, Proteine anderer Viren (Lassa, Polyomaviren) als Antigene einzusetzen oder Autoantikörper gegen zelluläre Proteine zu detektieren. Nicht alle Studien wurden unter optimalen Bedingungen durchgeführt; häufig waren es gerade die Studien, die noch verbliebene technische Probleme aufzeigten. Auch das *scale up*, die besondere Logistik, die den Unterschied zwischen einem Verfahren im kleinen Maßstab und einem Hochdurchsatz-Verfahren kennzeichnet, musste erst entwickelt werden.

Multiplex-Serologie erlaubt zwar die Analyse von ca. 1000 Seren auf Antikörper gegen bis zu 100 parallele Antigene an einem Tag, dies erfordert aber umfangreiche Vorbereitungen. Die Kopplung von Luminex-Beads mit GC ist zeit- und arbeitsaufwändig, weil die empfindliche Kopplungs-Chemie die zeitgleiche GC-Derivatisierung von nur 4 Beadsorten pro Kopplungs-

Charge und zwei Chargen pro Tag erlaubt. Für Studien mit bis zu 24 verschiedenen Antigenen müssen demnach mindestens 3 Tage für das Koppeln von Beads mit GC eingeplant werden. Pro Sorte und Reaktion werden genug Beads mit GC gekoppelt, um mindestens 2500 Seren zu untersuchen.

Die untersuchten Serumsammlungen wurden von klinischen und epidemiologischen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Der Zeitraum, der für das Sortieren, Kontrollieren und das Umsetzen der Seren auf Ständer im 96-Loch-Format veranschlagt werden muss, variiert von wenigen Stunden bis mehreren Tagen, je nachdem, wie gut Listen der Serum-Nummern mit dem tatsächlichen Bestand übereinstimmen, ob die Seren vom Kooperationspartner bereits sortiert wurden und je nach Umfang der Studie.

Für Studien mit bis zu 1000 Seren wurden GC-Beads am ersten (Vorbereitungs-)Tag mit Antigen beladen, Serumverdünnungen und alle Bindungs- und Waschschrte wurden am zweiten (Versuchs-)Tag durchgeführt, die Platten bei 4 °C über Nacht gelagert und am dritten (Mess-)Tag analysiert. Für größere Studien wurden entsprechend mehr Versuchs- und Messtage benötigt. Üblicherweise konnte eine große seroepidemiologische Studie inklusive Vor- und Nachbereitungen in ca. zwei Wochen durchgeführt werden, Datenanalyse ausgenommen.

Da die Datenauswertung noch nicht für alle Studien abgeschlossen ist, werden hier nur drei Studien im Detail vorgestellt (zusätzlich zu der in Kapitel 4.3.3 bereits beschriebenen Impfstudie).

Tabelle 4-9 Mit Multiplex-Serologie untersuchte Serumsammlungen (Teil 1)

Kooperationspartner Anzahl und Herkunft ¹ der Seren Fremd-Literatur	Studie & Ziel der Untersuchung ² Anzahl & untersuchte Antigene ³	Stand der Datenanalyse eigene Literatur
Assoziation von Antikörpern gegen HPV-Proteine mit Zervix-Karzinomen		
S. Franceschi, IARC ⁴ , Lyon (Frankreich) 756 Seren Franceschi 2003 (75), Hammouda 2005 (76)	Fall-/Kontroll-Studien aus Chennai (Indien) und Algier (Algerien); 27 Antigene: HPV 6b, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 E6, E7, L1 ⁵	weitgehend abgeschlossen Michael 2004 (91)
J. Nieland, Medigene, Martinsried (D) 72 Seren (Kreuzreaktionen) 216 Seren (Antikörper-Kinetiken)	Antikörper in HPV-16 L1/E7-cVLP-Impfstudie Kreuzreaktionen 27 Antigene: s. S. Franceschi Kinetiken 4 Antigene: HPV-16 E6, E7, L1	weitgehend abgeschlossen Michael 2004 (91)
M. Dürst, Frauenklinik, Jena (D) 695 Seren	Follow up von therapierten Zervix-Karzinom- Patientinnen; 12 Antigene: HPV-16 E1, E2, E4, E6, E7, L1; HPV-18 E6, E7, L1; p16, p53	noch nicht abgeschlossen
Assoziation von Antikörpern gegen HPV-Proteine mit NMSC⁶		
D. Abeni, IDI ⁷ , Rom (Italien) 139 Seren	Pilot-Fall-/Kontroll-Studie zu NMSC 14 Antigene: HPV 1, 2, 5, 6b, 8, 11, 15, 16, 18, 20, 24, 36, 38 L1	weitgehend abgeschlossen
M. Karagas, Dartmouth College, Hanover (NH, USA) 1294 Seren; Karagas 2001	Fall-/Kontroll-Studie zu NMSC 22 Antigene: HPV 1, 2, 3, 5, 6b, 8, 9, 10, 15, 16, 20, 24, 32, 36, 38, 57 L1; HPV 8, 38 E6, E7; p53	noch nicht abgeschlossen
J. Dillner, Universität Malmö (Schweden) 477 Seren	Fall-/Kontroll-Studie zu NMSC 20 Antigene: s. M. Karagas ohne HPV 2, 3 L1	noch nicht abgeschlossen
M. Tommasino, IARC, Lyon (Frankreich) 70 Seren	Fall-/Kontroll-Studie zu NMSC 20 Antigene: s. J. Dillner	noch nicht abgeschlossen
Assoziation von Antikörpern gegen HPV-Proteine mit HNSCC⁸		
P. Brennan, IARC, Lyon (Frankreich) 1542 Seren	Fall-/Kontroll-Studie zu HNSCC 25 Antigene: HPV 16, 18 E1, E2, E4, E6, E7, L1; 6b, 31, 33, 35, 45, 52 E6; 1 L1; LPV, JC VP1; p16, p53	noch nicht abgeschlossen

¹ wenn nicht in "Studie & Ziel der Untersuchung" anders erwähnt² wenn nicht in Gruppenüberschrift bereits erwähnt³ plus GST⁴ IARC: International Agency for Research on Cancer⁵ ohne HPV-31 L1⁶ NMSC: *non melanoma skin cancer*⁷ IDI: Istituto Dermopatico Dell'Immacolata⁸ HNSCC: *head and neck squamous cell carcinoma*

Tabelle 4-9 Mit Multiplex-Serologie untersuchte Serumsammlungen (Teil 2)

Kooperationspartner Anzahl und Herkunft ¹ der Seren Fremd-Literatur	Studie & Ziel der Untersuchung ² Anzahl & untersuchte Antigene ³	Stand der Datenanalyse eigene Literatur
Prävalenz von Antikörpern gegen HPV-Proteine		
H. Boeing, IFE ⁹ , Potsdam (D) 566 Seren; Anders 1990 (77)	VERA ¹⁰ (18-85 Jahre) 14 Antigene: s. D. Abeni	abgeschlossen Sehr 2004 (93)
L. Gissmann, DKFZ, Heidelberg (D) 53 Seren; Mund 1997 (38)	Seren von hospitalisierten Kindern (1-10 Jahre) 14 Antigene: s. D. Abeni	abgeschlossen Sehr 2004 (93)
N. Müller-Lantusch, Universität Homburg (D) 128 Seren	Kinderseren aus der virologischen Diagnostik (2-18 Jahre); 14 Antigene: s. D. Abeni	abgeschlossen Sehr 2004 (93)
S. Syrjänen, Universität Turku (Finnland) 67 Seren	Eltern-/Kind-HPV-Infektions-Verlaufs-Studie (0-24 Monate); 14 Antigene: s. D. Abeni	noch nicht abgeschlossen
L. Aaltonen, Universität Helsinki (Finnland) 413 Seren	HPV-DNA-positive Tonsillen und RRP ¹¹ - Fall-/Kontroll-Studie; 9 Antigene: HPV 1,6b,11, 16 L1; HPV 6b,16 E6,E7	abgeschlossen Chen 2005 (163)
M. Müller, DKFZ, Heidelberg (D) 262 Seren	Seren von HPV-DNA-vakzinieren Mäusen 12 Antigene: HPV 1,2,6,8,11,16,18,33,45,52 L1; BPV L1	abgeschlossen Gasparic 2004 (92)
I. Nindl, Charité, Berlin (D) 18 Seren	Seren von HPV-RNA-positiven immunsupprimierten NMSC-Patienten; 22 Antigene: s. M. Karagas	abgeschlossen
Prävalenz von Antikörpern gegen Lassa-Virus-Proteine		
J. Luande, ORCI ¹² , Dar es salaam (Tansania) 96 Seren	Tansanianische Tumor-Fall-/Kontroll-Studie 5 Antigene: Lassa NP,Z,GP2; HPV-1 L1	abgeschlossen Kerzel 2004 (94)
J. ter Meulen, Universität Marburg (D) 612 Seren	Seren aus afrikanischen Lassa-Prävalenz-Studien 5 Antigene: s. J. Luande	abgeschlossen Kerzel 2004 (94)
R. Ulrich, Charité, Berlin (D) 20 Seren	Seren von deutschen Hanta-Virus-Infizierten 5 Antigene: s. J. Luande	abgeschlossen Kerzel 2004 (94)
Prävalenz von Antikörpern gegen Polyomavirus-Proteine		
K. Kjærheim, Krebsregister, Oslo (Norwegen) 328 Seren (Mesotheliome)	Fall-/Kontroll-Studie SV40-Antikörper bei Mesotheliom-Patienten 12 Antigene: BK,JC,SV40, LPV VP1,TAg; HPV-16 E6,E7	abgeschlossen
66 Seren (Osteosarcome)	Osteosarcom-Patienten 14 Antigene: s.o.; p16,p53	abgeschlossen
A. Nieters/N. Becker, DKFZ, Heidelberg (D) 1363 Seren	Fall-/Kontroll-Studie SV40-Antikörper bei Lymphom-Patienten; 14 Antigene: s. K. Kjærheim	noch nicht abgeschlossen
Prävalenz von Autoantikörpern		
M. Deichmann, Universität Heidelberg (D) 198 Seren	Antikörper gegen p53 und p16 in Seren von Melanom-Patienten; 6 Antigene: HPV-16 E6,E7,L1; p16,p53	abgeschlossen Kreutz 2004 (95)

¹ wenn nicht in "Studie & Ziel der Untersuchung" anders erwähnt² wenn nicht in Gruppenüberschrift bereits erwähnt³ plus GST⁹ IFE: Institut für Ernährungsforschung¹⁰ VERA: Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik¹¹ RRP: Rekurrende Respiratorische Papillomatose¹² ORCI: Ocean Road Cancer Institute

4.4.1 Alters- und geschlechtsabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz gegen HPV L1-Proteine in der deutschen Normalbevölkerung

In Kooperation mit Dr. Peter Sehr (DKFZ, Heidelberg) wurde erstmals die HPV-Seroprävalenz der deutschen Normalbevölkerung untersucht. Dazu wurden 750 Seren auf Antikörper gegen die L1-Proteine von 13 HPV-Typen untersucht.

76 % der untersuchten Seren entstammten der Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik (VERA). Dieses Serumkollektiv umfasst Seren von ungefähr gleich vielen Männern und Frauen im Alter von 18 bis 85 Jahren und ist repräsentativ für die nicht institutionalisierte deutsche Bevölkerung. 17 % der Seren wurden einer Serumsammlung der Universität Homburg entnommen, die Seren von 2 bis 18 Jahre alten Kindern und Jugendlichen umfasst. 7 % der Seren stammten von aus HPV-unabhängigen Gründen hospitalisierten Kindern im Alter von 1 bis 10 Jahren. Die untersuchten HPV-Typen sind in Tabelle 4-10 wiedergegeben.

Tabelle 4-10 Charakteristika verschiedener HPV-Typen

HPV-Typ	phylogenetische Spezies	Infektion von	assoziierte Krankheit
5 8 15 20 24 36 38	B1	Haut	keine klinische Symptomatik bei Gesunden; Haut-Karzinom bei EV ¹ -Patienten
16 18	A7 A9	Schleimhaut	Zervix-Karzinom; breite Kondylome; HNSCC ²
6b 11	A10	Schleimhaut	spitze Kondylome; RRP ³
2	A4	Haut ⁴	Warzen
1	E	Haut ⁵	Warzen

¹ Epidermodysplasia verruciformis

² head and neck squamous cell carcinoma

³ Rekurrenzierende Respiratorische Papillomatose

⁴ besonders die Fußsohle

⁵ vor allem am Nagelansatz

Die 7 HPV-Typen der B1-Spezies sind eng miteinander verwandt, ebenso wie die zwei Niedrig-Risiko-Typen der A10-Spezies, während die zwei Zervix-Karzinom-assoziierten Hoch-Risiko-Typen zu verschiedenen phylogenetischen Spezies gehören und nicht eng miteinander verwandt sind. HPV-2 gehört zur A4-Spezies und wird daher häufig als Schleimhaut-Typ bezeichnet, obwohl er die Haut infiziert. HPV-1 ist mit allen anderen untersuchten HPV-Typen nur sehr entfernt verwandt.

4.4.1.1 Prävalenz von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine

Nach Analyse der Serum-Reaktivitäten mussten seropositive von -negativen Reaktionen unterschieden werden. Normalerweise wird dazu ein diskriminatorischer Schwellenwert (*cut-off*) angelegt, der sich als der Mittelwert plus 3 Standardabweichungen der Seroreaktivitäten einer seronegativen Kontrollgruppe (unter Ausschluss Seropositiver) berechnet. Für L1-Reaktivitäten ist diese Methode der Cut-Off-Bestimmung jedoch problematisch, weil sehr viele Erwachsene Antikörper gegen die L1-Proteine häufiger HPV-Typen haben. L1-Antikörper indizieren nicht notwendigerweise eine akute Erkrankung, sondern können auch auf eine lange zurückliegende Infektion hindeuten, daher ist es schwierig, für diese Antigene eine weitgehend seronegative Kontrollgruppe zu definieren. Verwendet man Seren von (häufig infizierten) Erwachsenen, betragen die Cut-Offs für häufige Typen bis zu 1000 MFI und mehr, so dass trotz der hohen Durchseuchungsrate nur wenige Reaktionen als seropositiv definiert werden. Verwendet man Seren (meist nicht infizierter) Kinder, werden die Cut-Offs so niedrig, dass fast jeder Erwachsene seropositiv ist. In beiden Fällen erlaubt der Cut-Off nicht mehr die Unterscheidung schwach positiver von negativen Reaktionen.

Da sich L1-Cut-Offs nicht gut errechnen ließen, wurden willkürliche Cut-Offs anhand von Häufigkeitsverteilungen festgelegt. Dazu wurden für jedes Antigen alle Messwerte der Größe nach sortiert und gegen die Gesamtzahl der Messwerte (in Prozent) aufgetragen (Abbildung 4-37). Am Beispiel von HPV-8 lässt sich daraus ablesen, dass ca. 20 % der Seren L1-Reaktivitäten > 400 MFI und ca. 10 % der Seren L1-Reaktivitäten > 1000 MFI zeigten (rote Pfeile).

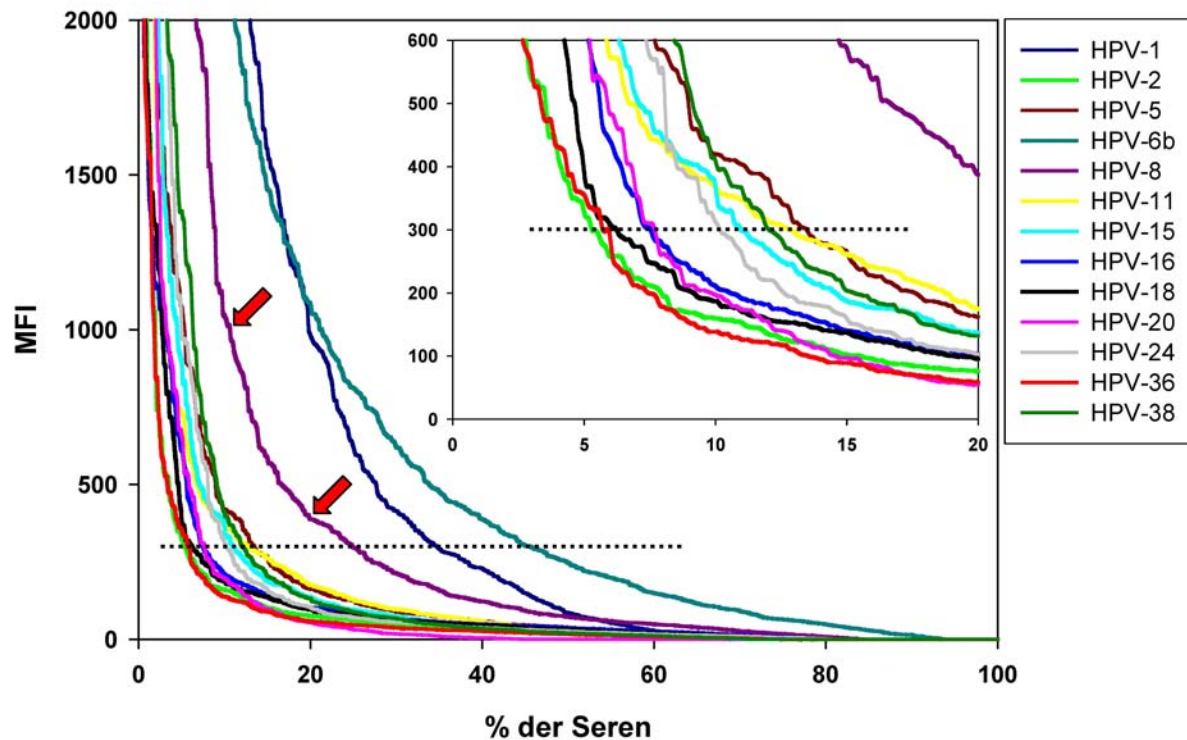


Abbildung 4-37 Häufigkeitsverteilung der Seroreaktivitäten von 750 Deutschen gegen L1-Proteine von 13 HPV-Typen. Rechts oben: Vergrößerung des unteren linken Segments der Grafik. Der Cut-Off von 300 MFI ist in Form gepunkteter Linien dargestellt. Rote Pfeile: siehe Text.

Idealerweise zeigt die Häufigkeitsverteilungskurve für ein Antigen einen Knick im unteren linken Segment der Kurve, der den Übergang von langsam ansteigenden „noch Seronegativen“ zu steil ansteigenden „schon Seropositiven“ markiert. Ein solcher Anstieg ist nicht immer zu sehen. Trotzdem kann ein gemeinsamer Cut-Off für alle Antigene verwendet werden, da die Reaktivitäten für verschiedene Antigene unter annähernd gleichen experimentellen Bedingungen ermittelt wurden (die Antigene sind in ihrer Dichte auf den Beads sehr ähnlich und wurden parallel analysiert). Auch aus Gründen der Datenanalyse ist es vorteilhaft, für alle untersuchten Antigene denselben Cut-Off zu verwenden. In der Praxis wird häufig ein Wert knapp oberhalb des Knicks gewählt, so dass die Stringenz der Unterscheidung zwischen Seropositiven und -negativen für alle Antigene hoch ist. In der vorliegenden Studie wurde der Cut-Off auf 300 MFI festgelegt und die Prävalenz der Antikörper in der deutschen Bevölkerung errechnet (Abbildung 4-38).

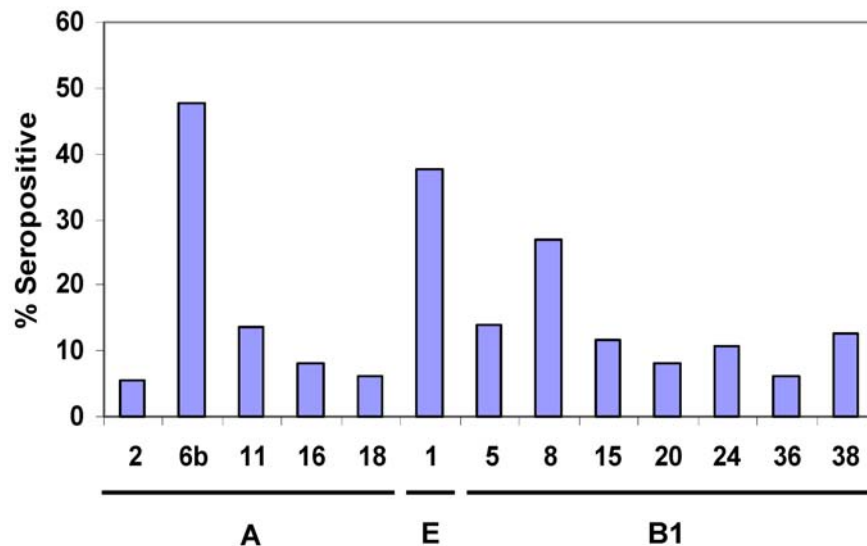


Abbildung 4-38 Prävalenz von Antikörpern gegen L1-Proteine von 13 HPV-Typen in der deutschen Bevölkerung. Die HPV-Typen sind nach phylogenetischen Spezies geordnet (Cut-Off 300 MFI).

Schließt man aus Antikörpern gegen HPV L1-Proteine auf Infektionen mit dem entsprechenden Virus-Typ, sind HPV-6b, -1 und -8 die häufigsten und HPV-2, -18, -36, -16 und -20 die seltensten HPV-Typen in der deutschen Normalbevölkerung.

4.4.1.2 Typenspezifische und altersabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz

Die 750 Seren wurden in 10 Altersgruppen auf Altersabhängigkeit der Antikörper-Positivität analysiert. Die Seren von 1- bis 10-Jährigen wurden in zwei Altersgruppen eingeteilt, um Serokonversion, d.h. das erste Auftreten von Antikörpern genauer differenzieren zu können. Die 11- bis 19-Jährigen wurden ebenfalls in zwei Gruppen geteilt, um den Beginn sexueller Aktivität mit ca. 16 Jahren berücksichtigen zu können. Die weiteren Altersgruppen bis hin zu 60- bis 69-Jährigen umfassten jeweils eine Dekade. Seren von 70- bis 85-Jährigen wurden in einer Gruppe zusammengefasst (Abbildung 4-39).

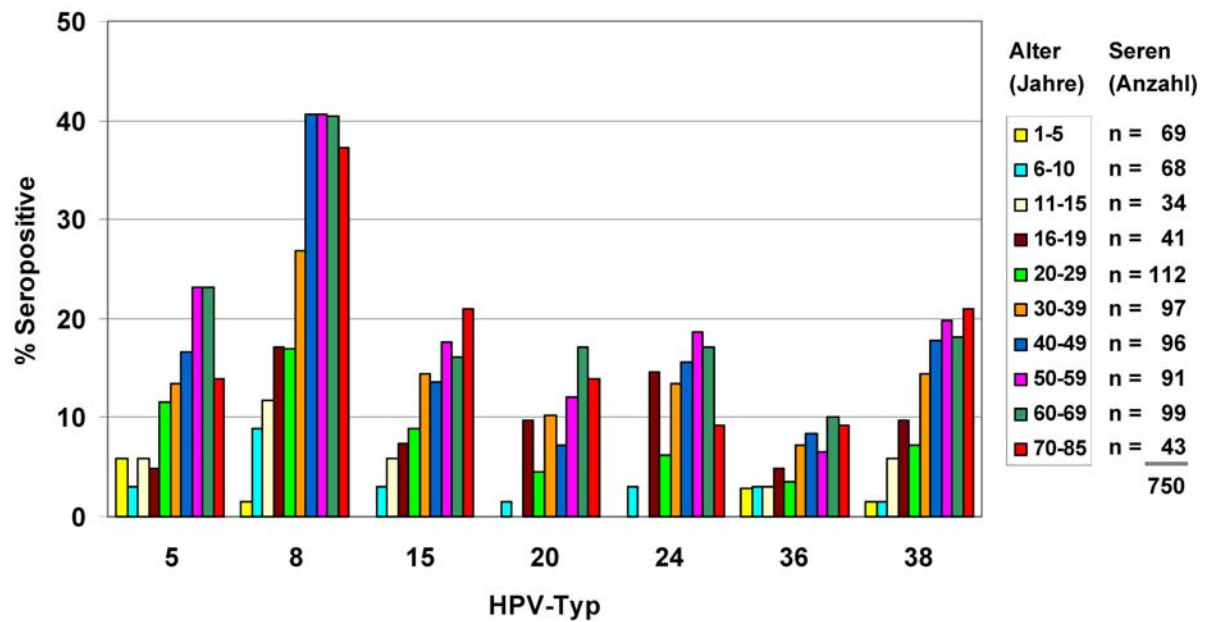


Abbildung 4-39 Altersabhängigkeit von Antikörpern gegen L1-Proteine von 7 HPV-Typen der Haut. Alle hier abgebildeten HPV-Typen gehören zur B1-Spezies. Die 10 verschiedenen Altersgruppen sind farblich markiert (siehe Legende) und die Anzahl an untersuchten Seren pro Gruppe wiedergegeben (Cut-Off 300 MFI).

Das erste Auftreten von Antikörpern war für die untersuchten HPV-Typen der B1-Spezies häufig erst in 6- bis 10-Jährigen zu erkennen. Es zeigte sich eine mit dem Alter kontinuierlich ansteigende Seroprävalenz mit unterschiedlich steilem Anstieg: Gemessen am Durchschnitt aller 7 Typen betrug die Steigung über die gesamte Spanne (1-85 Jahre) 92 % für HPV-5 (d.h. 8 % unterdurchschnittlich), 208 % für HPV-8, 98 % für HPV-15, 80 % für HPV-20, 78 % für HPV-24, 38 % für HPV-36 und 106 % für HPV-38. Im Mittel für alle Typen stellte sich bei über 50-Jährigen ein Plateau ein (ca. 20 % Seropositive). Einzelne Typen (HPV-15 und -38) erreichten ihr Maximum erst in 70- bis 85-Jährigen.

Da die HPV-B1-Typen eine speziesspezifische Altersdynamik zeigten, wurde die Seroprävalenz für mindestens einen der B1-Typen untersucht (Abbildung 4-40).

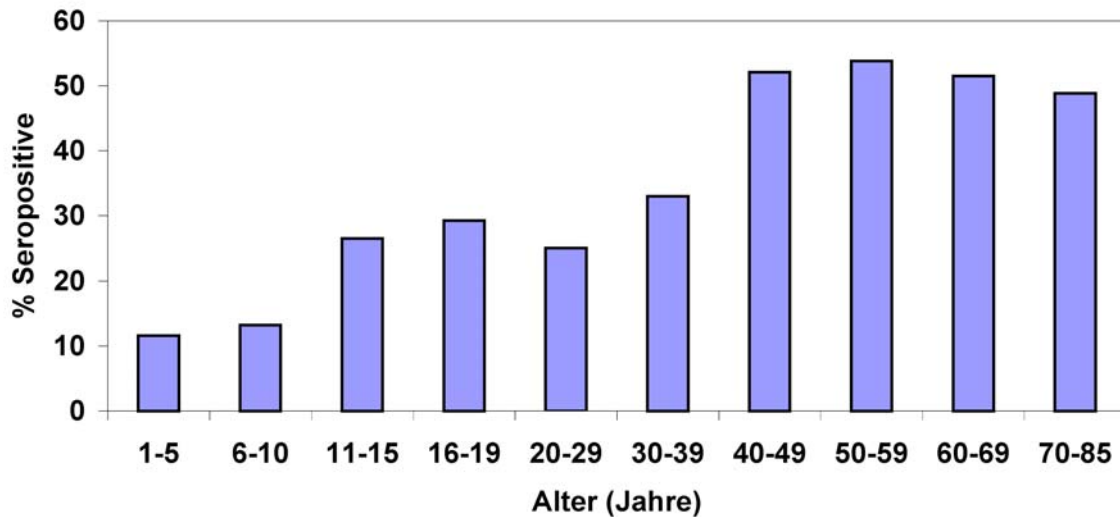


Abbildung 4-40 Altersabhängigkeit der Prävalenz mindestens eines HPV-Typen der B1-Spezies. Getestet wurde auf Antikörper gegen die L1-Proteine von HPV-5, -8, -15, -20, -24, -36 und -38 (Cut-Off 300 MFI).

Die Seroprävalenz für mindestens einen der untersuchten B1-Typen war bereits in 1- bis 5-Jährigen relativ hoch, gemessen an der Häufigkeit, mit der Antikörper gegen einzelne Typen vorkamen. Die Seroprävalenz für mindestens einen B1-Typ stieg mit 11 Jahren sprunghaft an, blieb für 4 Jahrzehnte relativ stabil, stieg mit 40 Jahren erneut sprunghaft an und blieb stabil bis zum Lebensende. Jeder zweite Erwachsene über 40 Jahren war seropositiv für mindestens einen der untersuchten HPV-Typen der B1-Spezies.

Für die HPV-Typen der A- und E-Spezies wurde eine andere Altersdynamik der Antikörper-Prävalenz festgestellt als für die Typen der B1-Spezies (Abbildung 4-41).

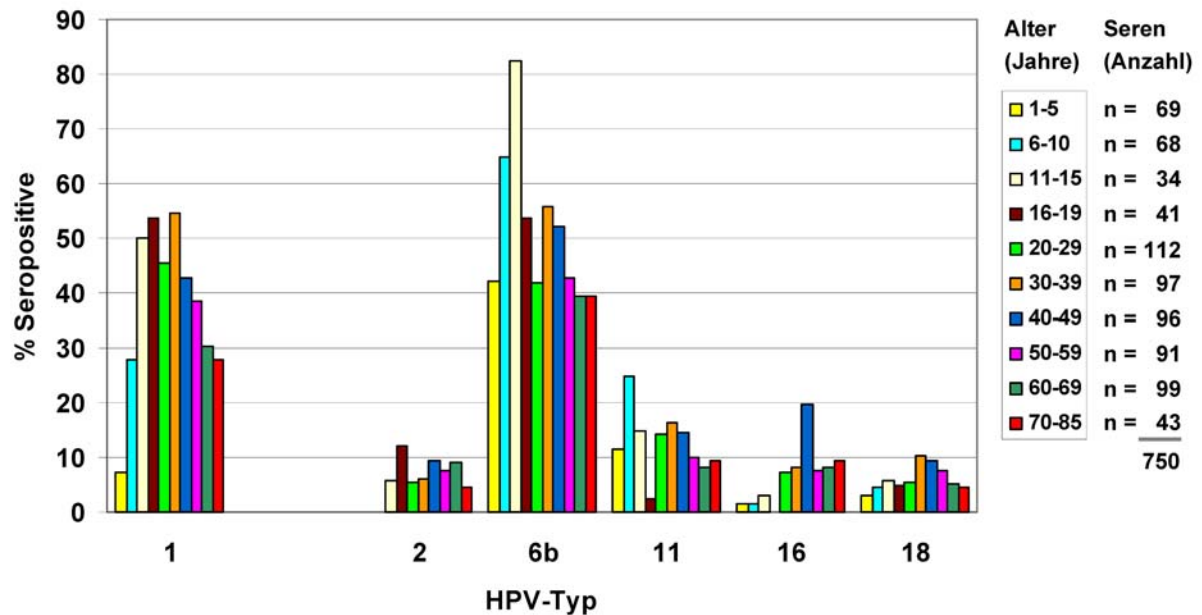


Abbildung 4-41 Altersabhängigkeit von Antikörpern gegen L1-Proteine von 6 HPV-Typen. HPV-1 gehört zum E-Genus, HPV-2, -6b, -11, -16 und -18 gehören zu verschiedenen A-Spezies. Die 10 verschiedenen Altersgruppen sind farblich markiert (siehe Legende) und die Anzahl an untersuchten Seren pro Gruppe wiedergegeben (Cut-Off 300 MFI).

HPV-6b war von allen A-Typen der häufigste. Für beide Niedrig-Risiko-Typen (HPV-6b und -11) zeigte sich Serokonversion bereits in sehr niedrigem Alter (1-5 Jahre), was auf Schmierinfektionen als primären Übertragungsweg hindeutet, auch wenn die mit diesen HPV-Typen primär assoziierte Krankheit (Feigwarzen) sexuell übertragen wird. Die Seroprävalenz war im frühen Lebensalter (6-15 Jahre) am höchsten, erreichte ein lokales Minimum mit 16-29 Jahren, ein lokales Maximum mit 30-39 Jahren und nahm mit steigendem Alter wieder ab. 70- bis 85-Jährige zeigten geringere Antikörper-Prävalenzen als 1- bis 5-Jährige.

Wenn der Rückgang der Seroprävalenz von Antikörpern gegen HPV-6b und -11 in hohem Alter nicht auf einen Kohorten-Effekt zurückzuführen ist, zeigt er, dass die Antikörper-Reaktivität gegen L1-Proteine mit dem Alter sinkt. In diesem Fall würde der Wiederanstieg der Seroprävalenz mit dem Eintritt in das sexuell aktive Alter (ab 20 Jahren) auf frische Infektionen hindeuten. Die beiden Spitzen des Kurvenverlaufs markieren also möglicherweise zwei verschiedene Infektionswege: einen asexuellen, dessen Antikörper-Antwort im Alter von 6-15 Jahren gipfelt, und einen sexuellen, der die stärkste Antwort mit 30-39 Jahren auslöst.

Für die Hoch-Risiko-HPV-Typen 16 und 18 ergab sich ein anderes Bild. Die Seroprävalenz war viel niedriger als für die HPV-Typen 6b und 11, Kinder bis 10 Jahren waren überwiegend seronegativ und die meisten Seropositiven fanden sich in mittlerem Alter (30 bis 49 Jahre). Die Seroprävalenzen von 20- bis 29-Jährigen unterschieden sich kaum von denen von 60- bis 85-Jährigen.

Der Rückgang der Seroprävalenz ab 50 Jahren für Niedrig- und Hoch-Risiko-HPV-Typen könnte ein Kohorten-Effekt sein, da die heute 80-Jährigen möglicherweise weniger Sexualpartner als jüngere Generationen hatten.

Für das phylogenetisch sehr entfernte HPV-1 zeigte sich ein eigenes Bild. Serokonversion erfolgte bereits in 1- bis 5-Jährigen, gefolgt von einem sehr steilen Anstieg der Seroprävalenz bis zum Alter von 11-15 Jahren. Für 11- bis 39-Jährige war ein hohes Plateau und für über 40-Jährige ein kontinuierlicher Rückgang der Seroprävalenz zu erkennen.

HPV-2 erlaubte auf Grund der sehr niedrigen Seroprävalenz nur wenig sichere Aussagen. Serokonversion war erst in über 10-Jährigen zu erkennen, gefolgt von einem über das Alter stabilen Maß an Seropositivität auf niedrigem Niveau.

Insgesamt wurde eine altersabhängige Dynamik von Antikörper-Prävalenzen beobachtet, die sich systematisch zwischen phylogenetischen Spezies von HPV unterschied, nicht jedoch zwischen zu einer Spezies gehörenden HPV-Typen.

4.4.1.3 Geschlechtsabhängigkeit der Antikörper-Prävalenz

Der Frauenanteil an den 750 untersuchten Seren lag bei 51.3 %, Männer und Frauen waren also ungefähr gleich häufig vertreten. Die Seroprävalenz wurde in Abhängigkeit vom Geschlecht untersucht (Abbildung 4-42).

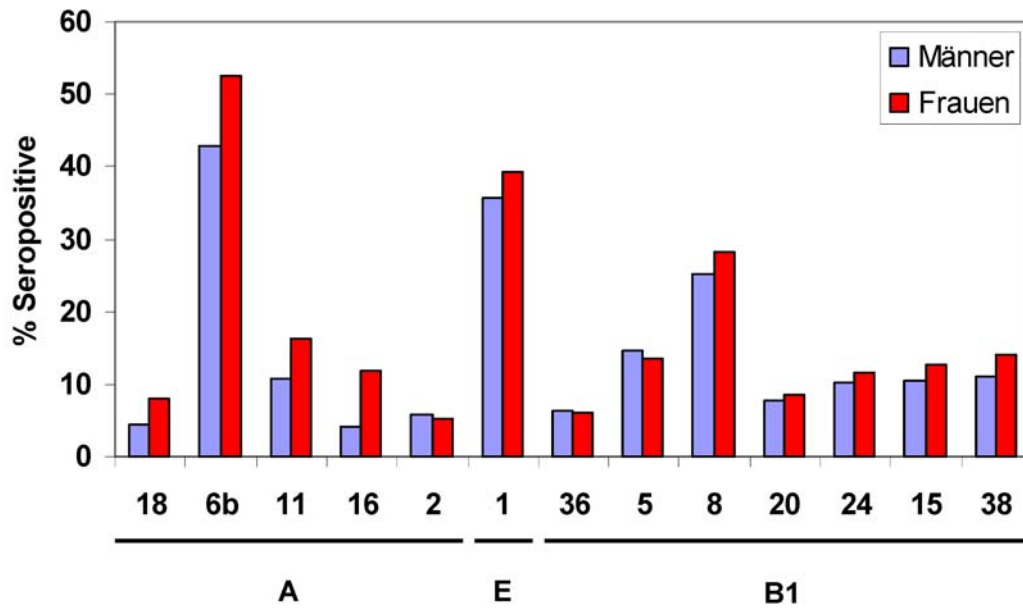


Abbildung 4-42 Geschlechtsabhängigkeit von Antikörpern gegen L1-Proteine von 13 HPV-Typen. Die HPV-Typen sind nach phylogenetischen Spezies geordnet (Cut-Off 300 MFI).

Für die Hoch- und Niedrig-Risiko-Typen der A-Spezies (HPV-6b, -11, -16, -18) war die Seroprävalenz in Frauen deutlich größer als die in Männern, während Männer und Frauen für die HPV-Typen der B1-Spezies sowie HPV-1 und -2 annähernd gleiche Seroprävalenzen aufwiesen. Die Signifikanz dieses Unterschiedes ließ sich auf Grund des qualitativen Charakters der Daten nur abschätzen (mit dem Standardfehler, d.h. Quadratwurzel des Messwertes als Standardabweichung und sich nicht überschneidenden Standardabweichungen als Signifikanzkriterium). Demnach war der Unterschied zwischen Männern und Frauen nur für HPV-16 signifikant. Legt man eine Abweichung des Männer- oder Frauen-Anteils von $\geq 15\%$ vom Mittelwert als Kriterium für Signifikanz fest, zeigten HPV-11 und -18 ebenfalls signifikante Unterschiede. HPV-6b erreichte das Signifikanzkriterium auf Grund der insgesamt hohen Seroprävalenzen nicht, zeigte aber einen Unterschied von ca. 10 % zwischen Männern und Frauen.

Die Geschlechtsabhängigkeit der Seroprävalenz wurde für die signifikant unterschiedlichen Typen sowie HPV-6b nach dem Alter aufgeschlüsselt (Abbildungen 43, 44).

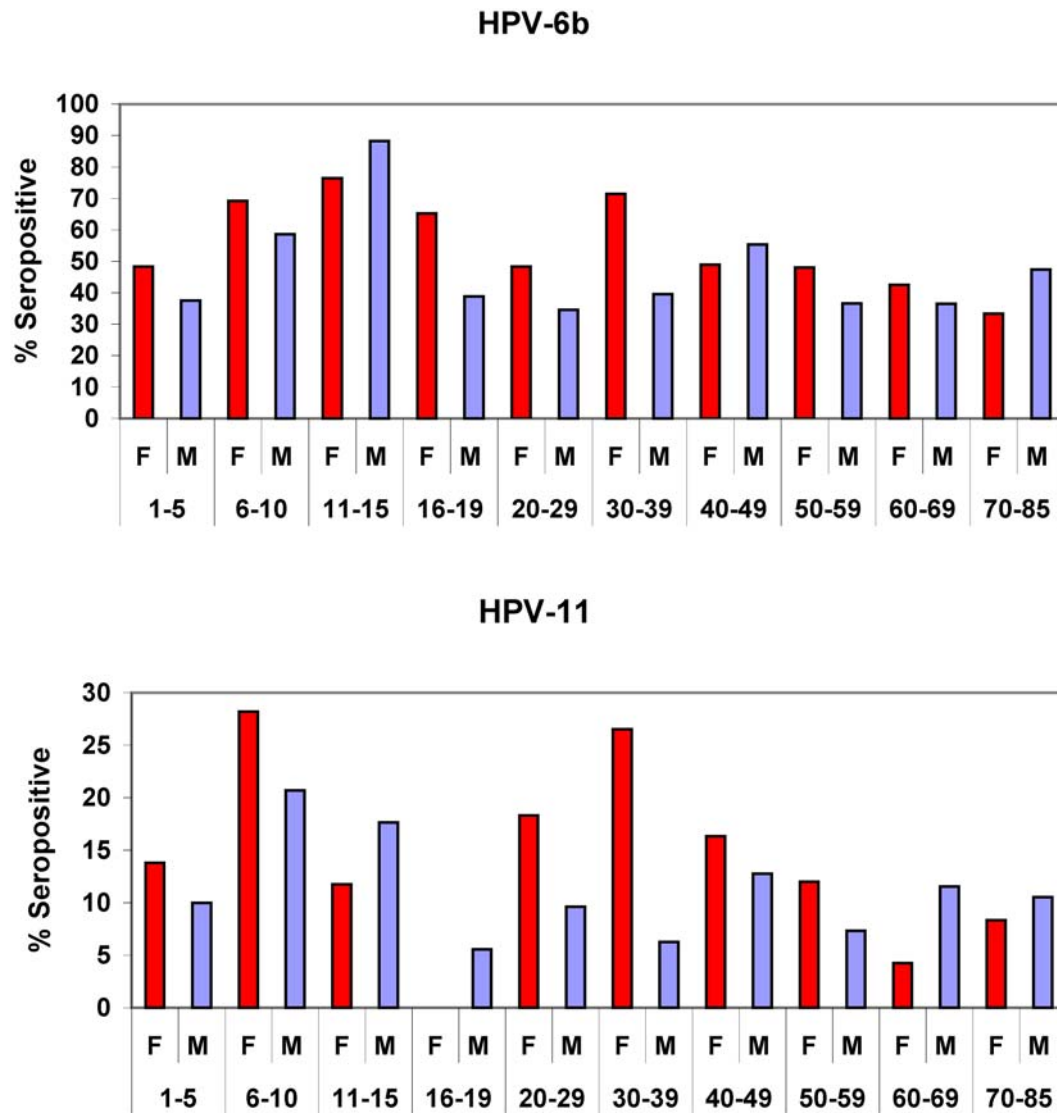


Abbildung 4-43 Geschlechts- und Altersabhängigkeit von Antikörpern gegen L1-Proteine von HPV-6b (oben) und -11 (unten) (F = Frauen, M = Männer, Alter in Jahren, Cut-Off 300 MFI).

Frauen im Alter von 16-39 zeigten eine signifikant höhere Seroprävalenz für HPV-6b (Kriterium: Abweichung $\geq 15\%$ vom Mittelwert), während unter 15- und über 39-jährige Frauen nur etwas häufiger bzw. ungefähr gleich häufig HPV-6b L1-Antikörper aufwiesen wie Männer. Für HPV-11 zeigte sich ein ähnliches Bild mit deutlich höheren Seropositivitäten in Frauen im Alter von 20-39 Jahren. Die Signifikanz des Unterschiedes konnte für HPV-11 auf Grund der niedrigen Seroprävalenzen nicht mit ausreichender Aussagekraft ermittelt werden.

Die höheren Seroprävalenzen in jungen Frauen könnten ein Hinweis darauf sein, dass ein in Kindern vorherrschender asexueller Infektionsweg bei Eintritt in das sexuell aktive Alter tatsächlich von einem sexuellen Infektionsweg abgelöst wird und die Viruslast in der weiblichen Genitalschleimhaut höher ist als in der männlichen.

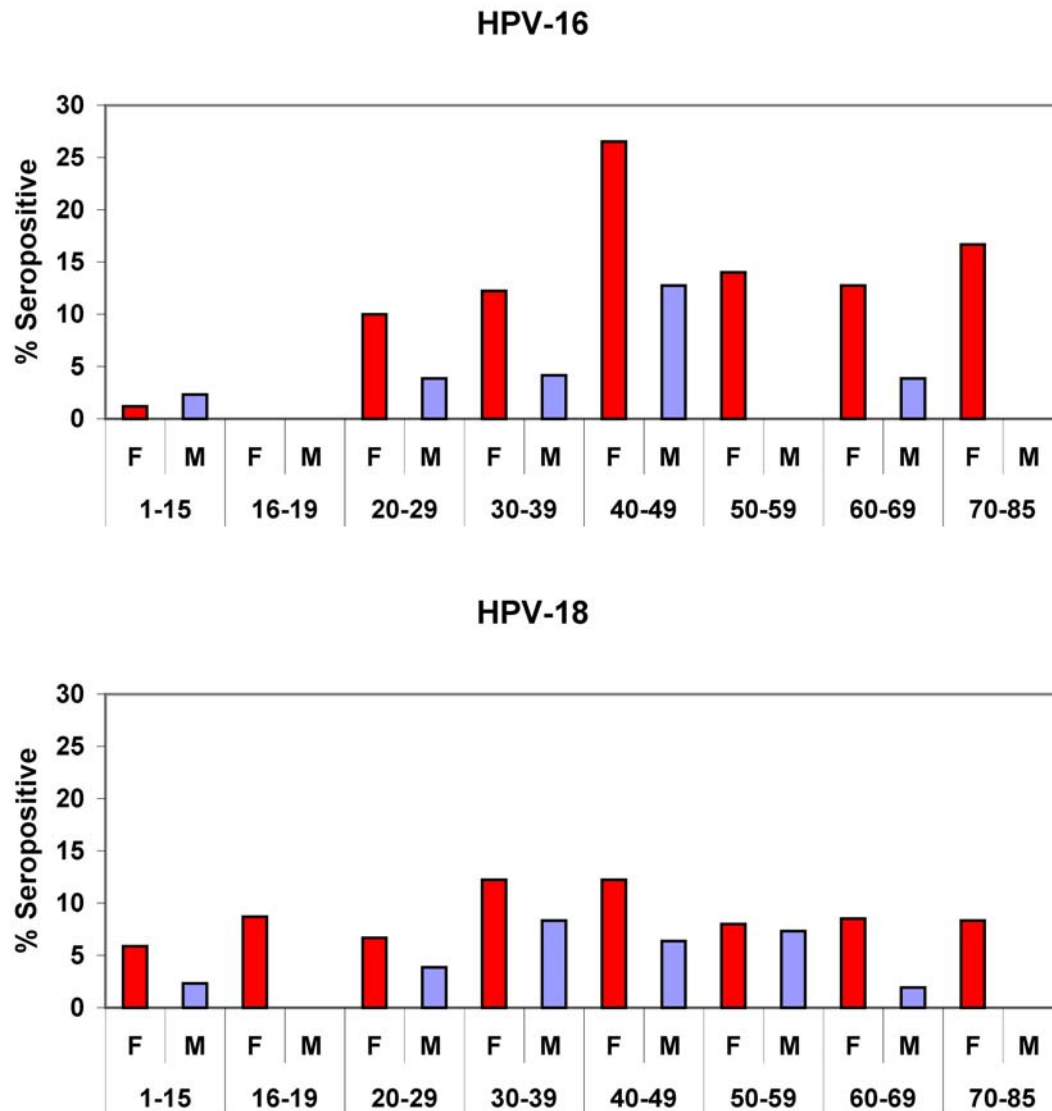


Abbildung 4-44 Geschlechts- und Altersabhängigkeit von Antikörpern gegen L1-Proteine von HPV-16 (oben) und -18 (unten) (F = Frauen, M = Männer, Alter in Jahren, Cut-Off 300 MFI). Die Gruppen der 1- bis 15-Jährigen wurden auf Grund der niedrigen Fallzahlen und Seroprävalenzen zusammengefasst.

Kinder (1-15 Jahre) waren überwiegend seronegativ für HPV-16 und -18. Für beide Virustypen wurden in fast allen Erwachsenen (ab 16 Jahren) höhere Seroprävalenzen für Frauen als für Männer gefunden. Die Signifikanz der Unterschiede konnte auf Grund der

niedrigen Seroprävalenzen nicht mit ausreichender Aussagekraft ermittelt werden. Für HPV-16 zeigten sich hohe Seroprävalenzen in Frauen bzw. höhere Seroprävalenzen in Frauen als in Männern ab einem Alter von 20 Jahren, während dies für HPV-18 schon für 11-jährige Frauen zutraf.

Die Geschlechtsabhängigkeit der Seroprävalenz wurde auch für HPV-1 für das Alter aufgeschlüsselt (Abbildungen 4-45).

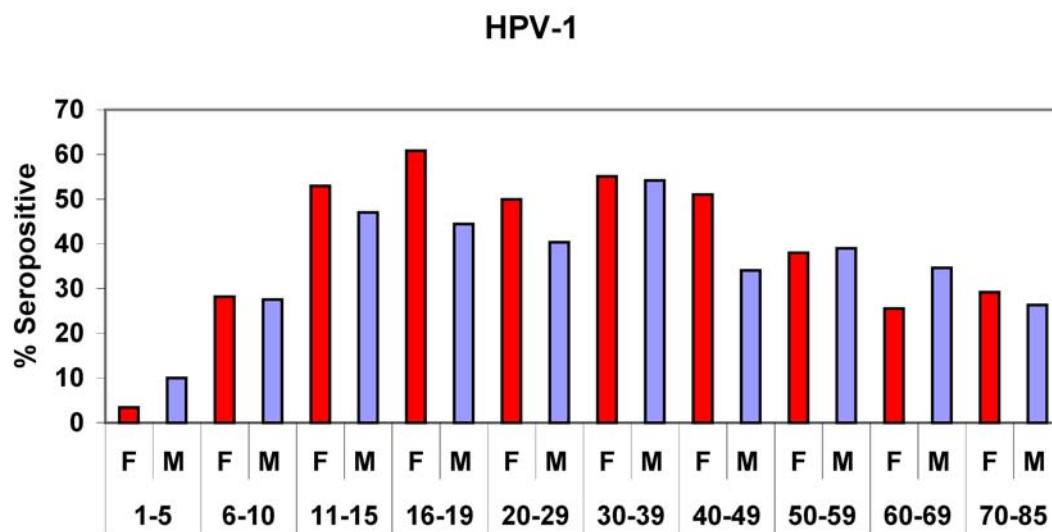


Abbildung 4-45 Geschlechts- und Altersabhängigkeit von Antikörpern gegen HPV-1 L1 (F = Frauen, M = Männer, Alter in Jahren, Cut-Off 300 MFI).

Da HPV-1 nicht die Genitalschleimhaut infiziert, finden sich erwartungsgemäß ungefähr gleich häufig Antikörper in Männern und Frauen. Signifikante Unterschiede zeigten sich in den Altersgruppen von 1-5 (mehr Männer), 16-19 (mehr Frauen), 40-49 (mehr Frauen) und 60-69 Jahren (mehr Männer) (Kriterium: Abweichung $\geq 15\%$ vom Mittelwert).

4.4.1.4 Altersabhängige Dynamik mehrfach positiver Antikörper-Reaktivitäten

Bei der Datenanalyse fielen einige Seren auf, die mehrfach positiv reagierten. Mehrfachpositivitäten waren bei verwandten HPV-Typen häufiger als bei nicht verwandten (Tabelle 4-11).

Tabelle 4-11 Mehrfach positive Seren

Farbcode		> Cut-Off (300 MFI)												
Phylogen. Spezies	Serum Code Nummer	A					E	B1						
		2	6b	11	16	18	1	5	8	15	20	24	36	38
1-m46	1	1050	1281	1818	961	3773	1519	1641	2256	1393	487	954	735	3755
2-f46	2	346	1605	1021	647	809	8808	813	1332	1037	677	986	365	1265
4-f32	3	781	2100	3873	1275	2092	30	4	100	36	48	76	12	335
5-m14	4	1605	1275	1124	1888	2713	284	240	247	150	31	10	46	1346
4-m23	5	352	186	98	202	1328	6893	7388	8771	6611	7092	6794	4569	8092
5-f41	6	68	1552	122	136	208	6746	3728	4296	5809	3623	2527	1788	6495
4-m29	7	176	60	14	96	62	37	1121	9726	1176	1069	787	840	2091
3-m16	8	21	279	46	52	41	84	2430	6119	2479	1476	2987	836	3484

Die Seren reagierten z.T. mehrfach positiv mit allen getesteten HPV-Typen (1, 2), fast nur mit den Typen der A-Spezies (3, 4) oder fast nur mit den Typen der B-Spezies (5-8).

Mehrfachpositivität wurde definiert als seropositive Reaktion gegen mindestens 4 der 5 untersuchten HPV-Typen der A-Spezies oder gegen mindestens 6 der 7 untersuchten HPV-Typen der B1-Spezies. Insgesamt zeigten 57 von 750 Seren (7.6 %) mehrfach positive Antikörper-Reaktionen, 7 (0.9 %) reagierten mehrfach positiv mit HPV-Typen der A- und B1-Spezies.

Die Seren, die mehrfach positiv gegen die HPV-Typen der B1-Spezies waren, reagierten entweder für alle Typen annähernd gleich stark (5, 6), was als Hinweis auf Mehrfachinfektionen gedeutet wurde, oder gegen einen Typ deutlich stärker als gegen alle anderen (7, 8; primäre Reaktion gegen HPV-8 L1), was auf Kreuzreaktionen hindeutete.

Kreuzreaktionen zwischen eng verwandten HPV-Typen sind möglich. Die phylogenetische Verwandtschaft auf DNA-Ebene spiegelt sich auch in der prozentualen Aminosäuren-Identität der L1-Proteine wieder (Abbildung 4-46).

HPV	E	A7	A10	A10	A9	A4	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1
	1	18	6b	11	16	2	36	5	8	20	24	15	38
1	100	49	51	52	52	51	53	52	51	53	53	52	52
18	49	100	63	62	63	64	51	52	53	52	53	52	53
6b	51	63	100	92	68	65	52	52	52	52	53	52	52
11	52	62	92	100	67	64	51	52	51	52	52	52	53
16	52	63	68	67	100	67	51	52	54	54	53	54	54
2	51	64	65	64	67	100	53	53	53	53	53	51	51
36	53	51	52	51	51	53	100	91	85	79	79	70	69
5	52	52	52	52	52	53	91	100	88	80	80	70	69
8	51	53	52	51	54	53	85	88	100	80	80	70	71
20	53	52	52	52	54	53	79	80	80	100	80	69	70
24	53	53	53	52	53	53	79	80	80	80	100	70	69
15	52	52	52	52	54	51	70	70	70	69	70	100	82
38	52	53	52	53	54	51	69	69	71	70	69	82	100

Abbildung 4-46 Sequenz-Verwandtschaft der L1-Proteine von 13 HPV-Typen. Dargestellt ist die paarweise prozentuale Aminosäuren-Identität. Übereinstimmungen von 60-70 % sind grün markiert, von 70-80 % blau und > 80 % rot. HPV-Typen sind nach phylogenetischen Spezies geordnet. Die Zugehörigkeit der Typen zur A- oder B1-Spezies ist durch Rahmen gekennzeichnet.

Mehrfachpositivität wurde in Abhängigkeit vom Alter analysiert. Dabei wurde auch untersucht, ob Mehrfachpositivität gegen B1-Typen mit Positivität für HPV-1 (E-Spezies) zusammenfällt (Abbildung 4-47).

Mehrfachpositivität gegen A-Typen trat erst mit 20 Jahren auf, erreichte ihr Maximum bei 30- bis 49-Jährigen und nahm mit weiter steigendem Alter wieder ab. Der Kurvenverlauf mehrfach positiver Antikörperreaktionen gegen A-Typen korrelierte damit mit der Altersdynamik der einzelnen A-Typen (Abbildung 4-41).

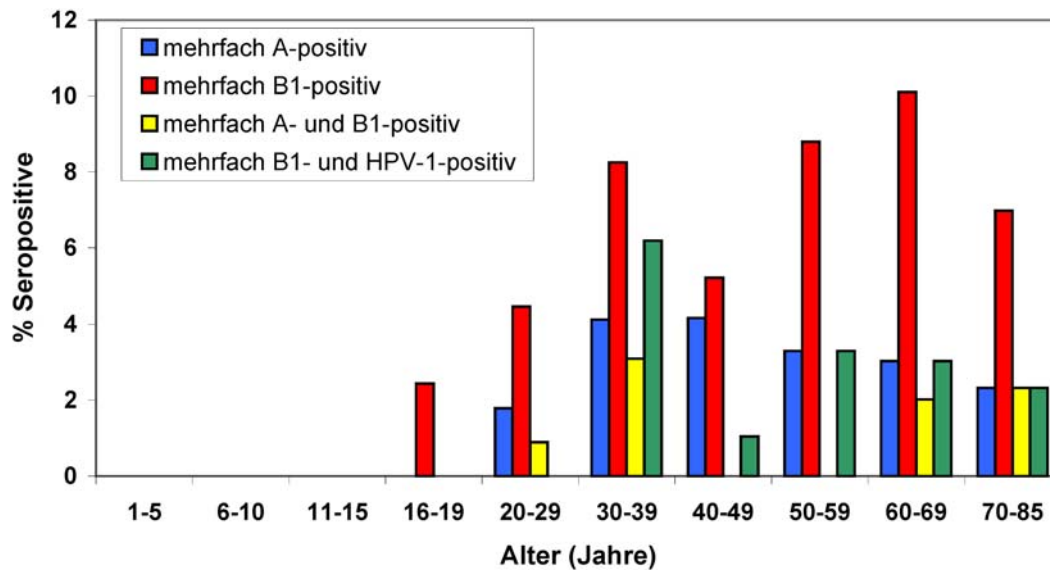


Abbildung 4-47 Altersabhängigkeit von Mehrfachpositivität für Antikörper gegen HPV-Typen einer Spezies (Cut-Off 300 MFI).

Mehrfachpositivität gegen B1-Typen trat initial mit 16 Jahren auf, steigerte sich mit zunehmendem Alter (mit Ausnahme der 40- bis 49-Jährigen) und erreichte mit 50-59 Jahren ein Plateau. Der Kurvenverlauf korrelierte damit mit der Altersdynamik einzelner B1-Typen (Abbildung 4-39).

Mehrfachpositivität gegen A- und B1-Typen war nicht in allen Altersgruppen zu sehen und in 30- bis 39-Jährigen am häufigsten. Angesichts der niedrigen Mehrfachpositivitätsraten für nur A- oder nur B1-Typen war das Zusammenfallen von Mehrfachpositivität gegen A- und B1-Typen in den Gruppen der 20- bis 39- und über 60-Jährigen ca. 7 bis 14 mal häufiger als zu erwarten wäre (Beispiel für Gruppe von 30-39 Jahren: 4 % mehrfach Positive für A-Typen, 8 % mehrfach Positive für B1-Typen; zufällig mehrfach Positive für A- und B1-Typen $4 \% \times 8 \% = 0.32 \%$, tatsächlich 3 %, d.h. ca. 10 mal häufiger als erwartet). Eine deutliche Altersdynamik war nicht erkennbar.

Mehrfachpositivität gegen B1-Typen und HPV-1 trat mit 30 Jahren initial auf und schien mit zunehmendem Alter seltener zu werden. Angesichts der hohen Seroprävalenz von HPV-1 (ca. 50 % von 11-39, ca. 40 % 40-59 und ca. 30 % von 60-85 Jahren, Abbildung 4-41) war das Zusammenfallen von Mehrfachpositivität gegen B1-Typen und HPV-1 seltener als zu erwarten wäre (außer für 30- bis 39-Jährige).

4.4.2 Assoziation von Antikörpern gegen L1-Proteine von Haut-HPV-Typen mit NMSC

Der Begriff *non melanoma skin cancer* (NMSC) umfasst zwei maligne Erkrankungen, die stark mit ultraviolettem (UV) Licht assoziiert sind: Basal-Zell-Karzinome (*basal cell carcinoma*, BCC) und Platten-Epithel-Karzinome (*squamous cell carcinoma*, SCC). Eine Rolle von HPV-Typen der B1-Spezies mit der Entstehung dieser Tumoren wird z.Z. rege diskutiert.

Als Pilotstudie für die Untersuchung von 6000 Seren, die von einem europäischen Konsortium gesammelt werden und im Sommer 2005 untersucht werden sollen, wurden in Kooperation mit Dr. Damiano Abeni (Istituto Dermopatico Dell'Immacolata, Rom, Italien) Seren einer kleinen NMSC-Fall-/Kontroll-Studie auf Antikörper gegen L1-Proteine von 13 HPV-Typen untersucht (Beschreibung der Typen siehe Kapitel 4.4.1). Diese NMSC-Studie umfasste ungefähr gleich viele Seren von italienischen Frauen und Männern im Alter von 33 bis 94 Jahren (Median 70 Jahre), 39 davon NMSC-Patienten (Fälle) und 71 Kontrollen mit anderen, nicht malignen und nicht UV-assoziierten Hauterkrankungen.

4.4.2.1 Prävalenz von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine

Da bekannt war, ob die Seren von einem NMSC-Fall oder einer gesunden Kontrolle stammten, konnten die Häufigkeitsverteilungen für die verschiedenen Antigene nach diesem Status aufgeschlüsselt werden. Da die Kurven sehr zahlreich sind und letztlich nicht für die Generierung eines Cut-Offs verwendet wurden, werden hier nur exemplarisch die Kurven für HPV-6b und -8 gezeigt (Abbildung 4-48). In die Diagramme wurden zum Vergleich italienischer und deutscher Seren die Häufigkeitsverteilungen für 142 Seren von exakt gleich vielen deutschen Männern und Frauen im Alter von 60 bis 85 Jahren (Median 67 Jahre) eingefügt (Herkunft der Seren siehe Kapitel 4.4.1).

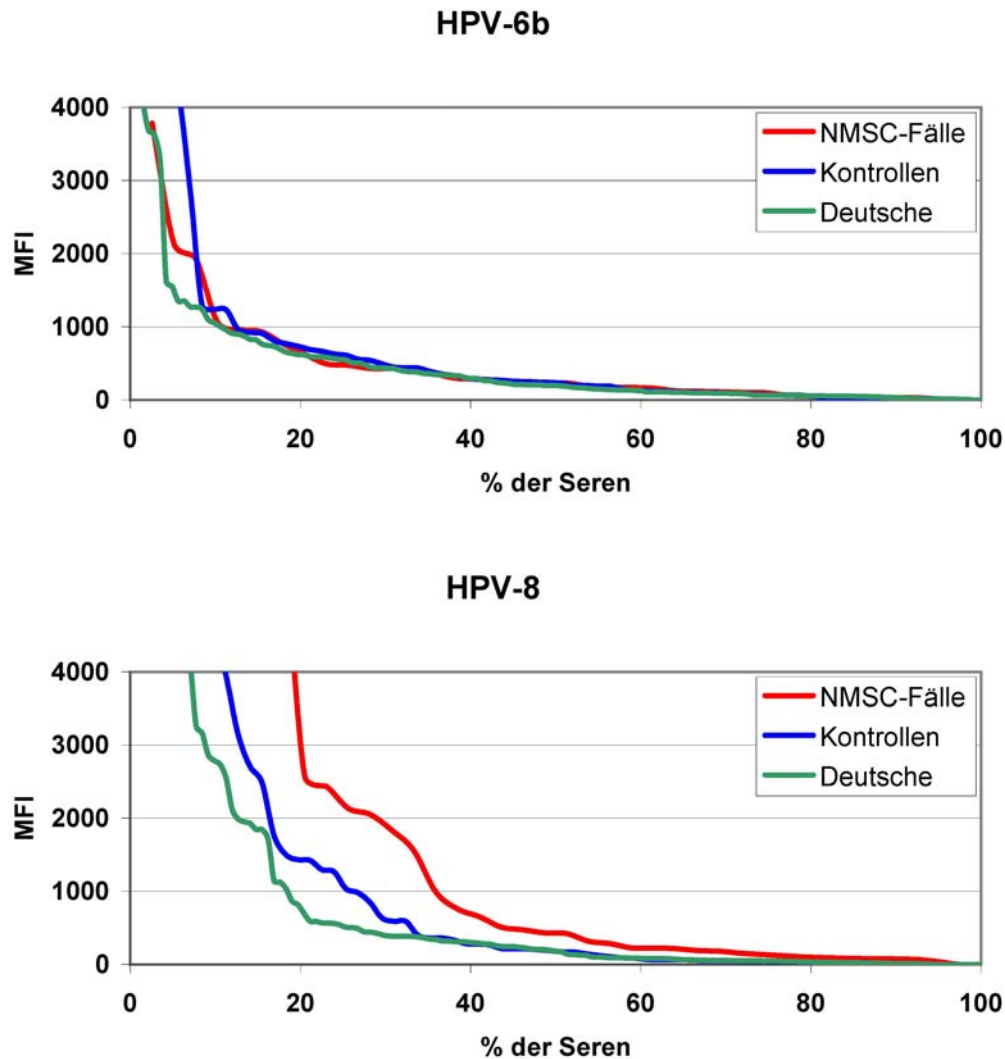


Abbildung 4-48 Häufigkeitsverteilungen der Seroreaktivitäten von italienischen NMSC-Fällen und Kontrollen sowie Seren von etwa gleich alten Deutschen gegen L1-Proteine von HPV-6b (oben) und -8 (unten).

In italienischen NMSC-Fällen und Kontrollen sowie deutschen Seren waren Antikörper gegen HPV-6b L1 ähnlich häufig. Antikörper gegen HPV-8 L1 waren in italienischen Fällen deutlich häufiger als in den Kontrollen, und selbst diese zeigten eine etwas höhere Antikörperprävalenz als deutsche Seren. Die Antikörperprävalenz für HPV-6b und -8 ist in deutschen Seren in dieser Altersgruppe (60-85 Jahre) ungefähr gleich groß (40 % bei einem Cut-Off von 300 MFI).

Es zeigte sich also ein deutlicher Unterschied zwischen italienischen Fällen und Kontrollen für HPV-8 (Antikörper in den Fällen häufiger), nicht aber für HPV-6b. Unabhängig vom Fall-

oder Kontroll-Status wiesen Italiener ungefähr gleich häufig Antikörper gegen HVP-6b auf wie Deutsche, aber deutlich mehr gegen HPV-8.

Die Bestimmung von Cut-Offs zur Klassifizierung der Seren als Antikörper-positiv oder -negativ war mangels seronegativer Kontrollgruppe schwierig. Eine willkürliche Festlegung auf Grundlage der Häufigkeitsverteilungen war in diesem Fall aus zwei Gründen ebenfalls problematisch. Zum einen war die Zahl der untersuchten Seren sehr gering. Die Kurvenverläufe waren daher eher sprunghaft als fließend und das Ablesen eines Kurvenanstiegs nicht ausreichend präzise möglich. Zum anderen war der Fall- oder Kontroll-Status der Seren bekannt. Legt man den Cut-Off unter diesen Umständen willkürlich fest; neigt man unwillkürlich dazu, sich an Typen zu orientieren, für die ein Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen zu erkennen ist und Typen zu vernachlässigen, für die das nicht der Fall ist. Damit würde die Trennschärfe zwischen Seropositiven und -negativen beeinflusst und ggf. die Assoziation von L1-Antikörpern mit NMSC unzulässig „verbessert“.

Eine Möglichkeit, den Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen unabhängig von einem Cut-Off-Wert zu quantifizieren, sind *Receiver Operating Characteristics* (ROC)-Kurven. Zur Berechnung von ROC-Kurven werden Vier-Felder-Tafeln generiert (Abbildung 4-49).

	Fall	Kontrolle
Test positiv	richtig positiv (rp)	falsch positiv (fp)
Test negativ	falsch negativ (fn)	richtig negativ (rn)

Abbildung 4-49 Schematische Darstellung von Vier-Felder-Tafeln.

Die Sensitivität des Tests beschreibt den Anteil der richtig Positiven an allen Fällen ($rp/[rp+fn]$), während die Spezifität den Anteil der richtig Negativen an allen Kontrollen beschreibt ($rn/[fp+rn]$). In ROC-Kurven werden die Wertepaare von Spezifität und Sensitivität des Tests für alle möglichen Cut-Offs innerhalb des Messbereiches aufgetragen. Üblicherweise verwendet man jeden Messwert als Cut-Off, erstellt dafür eine Vier-Felder-Tafeln, berechnet Sensitivität und Spezifität und erhält so für jeden Messwert einen Punkt der ROC-Kurve. Hierbei werden die Sensitivität entlang der Ordinate und die Spezifität entlang der Abzisse aufgetragen. Der Test weist dann Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen unterscheidet. Im Idealfall liegt die Kurve auf der linken und oberen Begrenzungs-Seite des umschließenden Quadrates. Je größer also der Abstand der

ROC-Kurve von der Diagonalen, desto besser die Trennschärfe des Tests. Exemplarisch werden hier die ROC-Kurven von HPV-6b und -8 gezeigt (Abbildung 4-50).

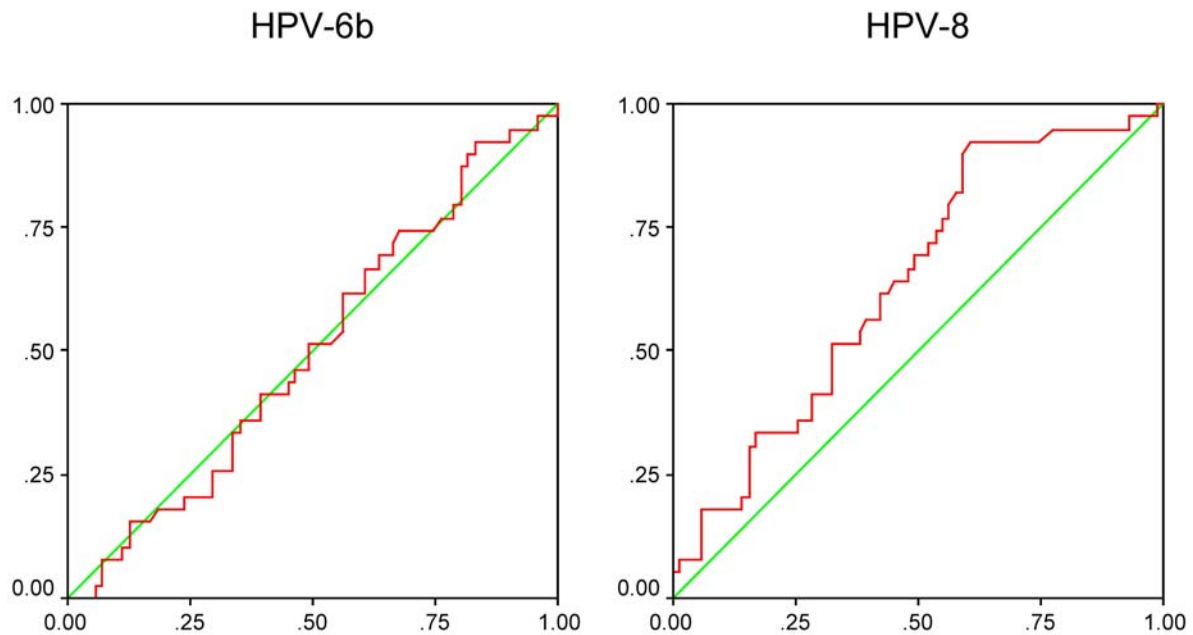


Abbildung 4-50 ROC-Kurven für HPV-6b (links) und -8 (rechts). Die Sensitivität ist auf der y-Achse und die Spezifität auf der x-Achse aufgetragen.

Ebenso wie die Häufigkeitsverteilungen zeigte bereits die optische Auswertung der ROC-Kurven, dass es keinen Unterschied zwischen NMSC-Fällen und Kontrollen für HPV-6b gab (die Kurve liegt nahe an der Diagonalen), der Unterschied für HPV-8 war aber deutlich zu sehen (die Kurve weicht von der Diagonalen ab). Der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen kann über die Fläche unter der Kurve (*area under curve*, AUC) quantifiziert und auf Signifikanz untersucht werden. Zusätzlich lässt sich für AUC-Werte ein 95 % Konfidenzintervall (*confidence interval*, CI) errechnen. Der AUC-Wert für HPV-6b war 0.500 (95% CI 0.389-0.611), der für HPV-8 war 0.638 (95 % CI 0.533-0.744). Da das 95 % CI für den AUC-Wert von HPV-8 vollständig > 0.5 war, kann man für diesen HPV-Typ von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen NMSC-Fällen und Kontrollen ausgehen.

Die Assoziation von UV-Licht mit NMSC war wesentlich stärker als die von Antikörpern gegen HPV-Proteine mit NMSC. Daher mussten die Daten mit Hilfe einer multivariaten Analyse vom Einfluss der Sonneneinstrahlung auf die in dieser Studie untersuchten Individuen bereinigt werden. Dies lässt sich mit Hilfe von *odds ratios* (OR) bewerkstelligen, für die sich andere

Faktoren als der untersuchte Marker (in diesem Fall Antikörperpositivität) rechnerisch berücksichtigen lassen.

Für die Berechnung von OR werden aber definierte Cut-Offs benötigt, d.h. eine vollständig ROC-basierte (Cut-Off-freie) Analyse der Studie war nicht möglich. Da die Daten der beiden Studien im gleichen Experiment entstanden waren, waren die experimentellen Bedingungen vergleichbar. Um einen möglichen systematischen Unterschied zwischen Italienern und Deutschen (v.a. im Hinblick auf Sonnenexposition) zu berücksichtigen, wurde der Cut-Off, der für die deutsche Normalbevölkerung benutzt worden war (300 MFI für alle HPV-Typen) verdoppelt und die italienische NMSC-Studie mit einem sehr stringenten Cut-Off von 600 MFI für alle Antigene analysiert.

Mit diesen Cut-Offs ließen sich Antikörper-Positivitäts-Raten in Fällen und Kontrollen berechnen (Abbildung 4-51).

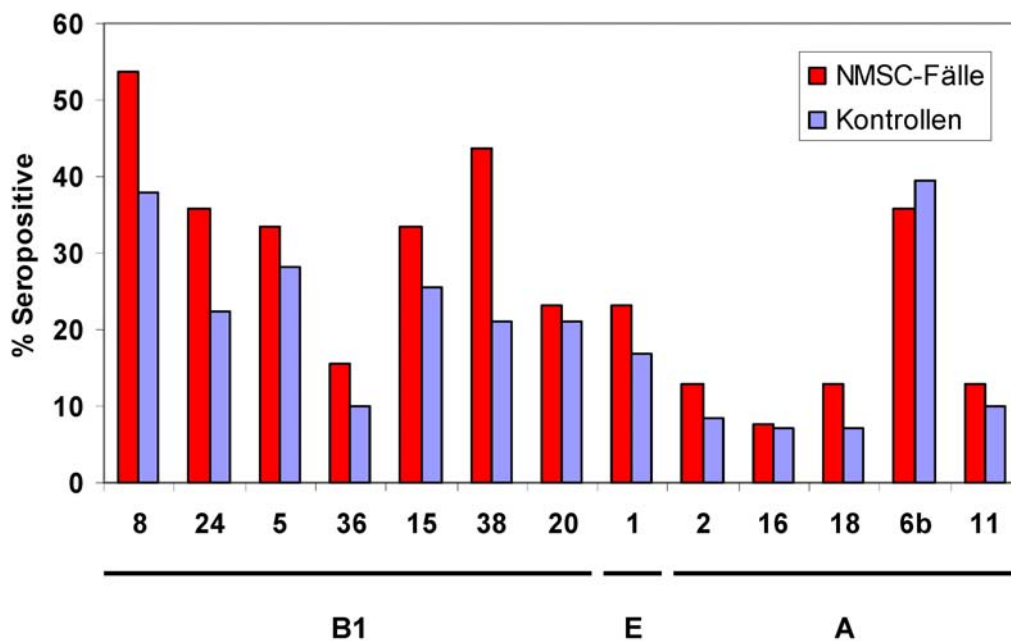


Abbildung 4-51 Prävalenz von Antikörpern gegen L1-Proteine von 13 HPV-Typen in italienischen NMSC-Fällen und Kontrollen. Die HPV-Typen sind nach phylogenetischen Spezies geordnet (Cut-Off 600 MFI).

Auf Grund des qualitativen Charakters der Daten ließ sich die Signifikanz des Unterschieds nur abschätzen. Unter Verwendung des Standardfehlers (siehe Kapitel 4.4.1.3) war der Unterschied zwischen NMSC-Fällen und Kontrollen für HPV-8, -24 und -38 signifikant. Legt

man eine Abweichung des Männer- oder Frauen-Anteils von $\geq 15\%$ vom Mittelwert als Kriterium für Signifikanz fest, zeigten zusätzlich HPV-36, -1, -2 und -18 signifikante Unterschiede.

Reine Positivitäts-Raten waren jedoch auf Grund der Assoziation von NMSC mit UV-Strahlung wenig informativ. Der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen wurde mit Hilfe von OR vom Einfluss der Sonneneinstrahlung bereinigt. OR sind definiert als die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt eines bestimmten Ereignisses geteilt durch die Wahrscheinlichkeit des Eintritts des Gegenereignisses. Daraus ergibt sich, dass $OR > 1$ eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Assoziation der untersuchten Parameter bedeuten. Zusätzlich lässt sich für OR ein 95 % CI errechnen. Ist dieses vollständig > 1 , geht man nicht nur von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit aus, sondern interpretiert die Assoziation als statistisch signifikanten Unterschied.

In dieser Studie wurden OR für mehrere mit Sonneneinstrahlung verbundene Parameter angepasst. Damit geben die OR Aufschluss über die Assoziation von Antikörpern gegen L1-Proteine verschiedener HPV-Typen mit NMSC (Abbildung 4-52).

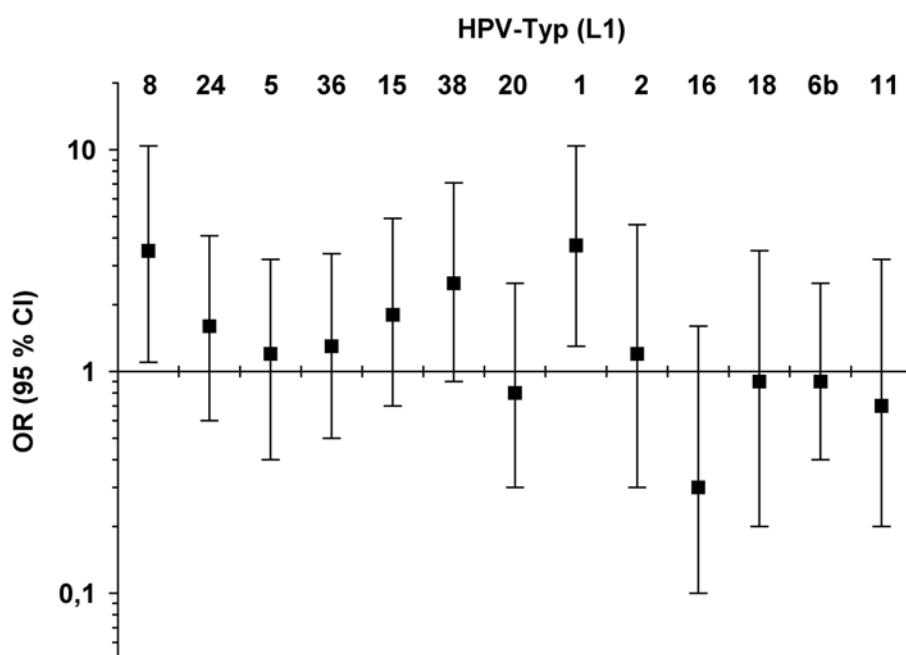


Abbildung 4-52 OR für die Assoziation von Antikörpern gegen 13 HPV L1-Proteine und NMSC. Die HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-8,-24,-5,-36,-15,-38,-20: B1-Spezies; HPV-1: E-Spezies; HPV-2,-16,-18,-6b,-11: verschiedene A-Spezies). OR wurden für Alter, Geschlecht, Sonnenexposition und Augenfarbe (als Maß für Sonnenempfindlichkeit der Haut) der untersuchten Individuen angepasst.

Für 4 der 7 untersuchten HPV-Typen der B1-Spezies (HPV-8, -24, -15, -38) und HPV-1 waren erhöhte (≥ 1.5) OR festzustellen. Die OR für HPV-8 und -1 waren statistisch signifikant und belegten eine Assoziation von L1-Antikörpern mit NMSC. Die 5 untersuchten HPV-Typen der A-Spezies zeigten keine erhöhte Assoziation mit NMSC. In dieser Untersuchung zeigte HPV-16 sogar ein deutlich verringertes (≤ 0.5) OR und damit einen scheinbar protektiven Effekt gegen NMSC.

4.4.2.2 Geschlechtsabhängigkeit der Antikörper-Prävalenz

Die Analyse des mit einer HPV-Infektion verbundenen Risikos für NMSC wurde auch im Hinblick auf das Geschlecht der Probanden vorgenommen. An dieser Stelle wird auf die Darstellung der nicht angepassten Seropositivitätsraten verzichtet und direkt zu angepassten OR übergegangen (Abbildung 4-53).

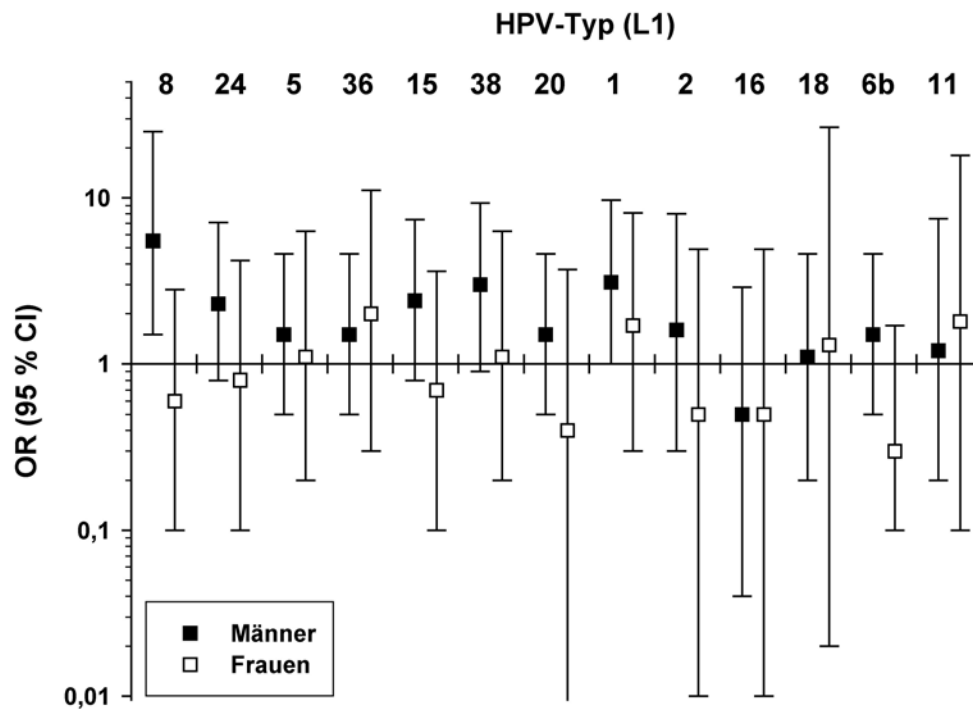


Abbildung 4-53 Geschlechtsabhängige OR für die Assoziation von Antikörpern gegen 13 HPV L1-Proteine und NMSC. Die HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-8,-24,-5,-36,-15,-38,-20: B1-Spezies; HPV-1: E-Spezies; HPV-2,-16,-18,-6b,-11: verschiedene A-Spezies). OR wurden für Alter, Geschlecht, Sonnenexposition und Augenfarbe (als Maß für Sonnenempfindlichkeit der Haut) der untersuchten Individuen angepasst.

In Männern zeigten sich erhöhte (≥ 1.5) OR für HPV-2 und -6b sowie für alle untersuchten HPV-Typen der B1-Spezies, von denen die OR für HPV-8 und -1 statistisch signifikant waren. Für Frauen waren (statistisch insignifikante) erhöhte OR für HPV-36, -1 und -11 zu beobachten. Herabgesetzte (statistisch insignifikante) OR (≤ 0.5) waren in Männern für HPV-16 und in Frauen für HPV-20, -2, -16 und -6b zu finden. Die weiten CI resultieren aus den im Vergleich zur nicht nach Geschlechtern getrennten Analyse halbierten Serumzahlen pro Untersuchungsgruppe.

Die Assoziation von Antikörpern gegen HPV-Typen der B1-Spezies mit NMSC war also für Männer deutlich höher als für Frauen. Dies galt in besonderem Maße für HPV-8.

4.4.2.3 Mehrfachpositivität von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine

Auf Grund des kleinen Serumkollektivs konnte keine aussagekräftige Untersuchung der mehrfach positiven Antikörper-Reaktivitäten vorgenommen werden (Kriterien siehe Kapitel 4.4.1.4).

Von 39 NMSC-Fällen reagierte keiner mehrfach positiv mit den HPV-Typen der A-Spezies, dementsprechend gab es auch kein Serum, das mehrfach positiv mit A- und B1-Typen reagierte. Vier Fälle (10 %) zeigten mehrfach positive Reaktionen mit B1-Typen, von denen drei gleichzeitig positiv mit HPV-1 reagierten. 18 Seren (46 %) waren positiv für mindestens einen B1-Typ.

Eine von 71 Kontrollen reagierte mehrfach positiv mit A-Typen und zeigte gleichzeitig Mehrfachpositivität für B1-Typen. Weitere drei Seren reagierten mehrfach positiv mit B1-Typen, eines davon war gleichzeitig positiv für HPV-1 (insgesamt 6 % mehrfach B1-Positive). 28 Seren (39 %) waren positiv für mindestens einen B1-Typ.

Damit zeigte sich eine leicht erhöhte Tendenz zu mehrfach B1-Positiven bei NMSC-Fällen.

4.4.3 Assoziation von Antikörpern gegen E6- und E7-Proteine seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen mit Zervix-Karzinomen

DNA eines von 15 HPV-Typen verschiedener A-Spezies ist in nahezu allen Zervix-Tumoren detektierbar. Von diesen so genannten Hoch-Risiko-Typen sind HPV-16 und -18 weltweit die häufigsten: ca. 57 % der Tumore enthalten DNA von HPV-16, ca. 12 % von HPV-18 (90). Die Assoziation von Antikörpern gegen die E6- und E7-Proteine dieser beiden HPV-Typen mit Zervix-Karzinomen ist beschrieben (51,53).

In Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Kristina Michael (DKFZ, Heidelberg) wurde untersucht, ob die gleiche Assoziation auch für die E6- und E7-Proteine der seltenen Hoch-Risiko-HPV-Typen 45, 31, 33, 52, 58 und 35 gilt, deren DNA in zusammen ca. 18 % der Tumore detektierbar ist (Abbildung 4-54).

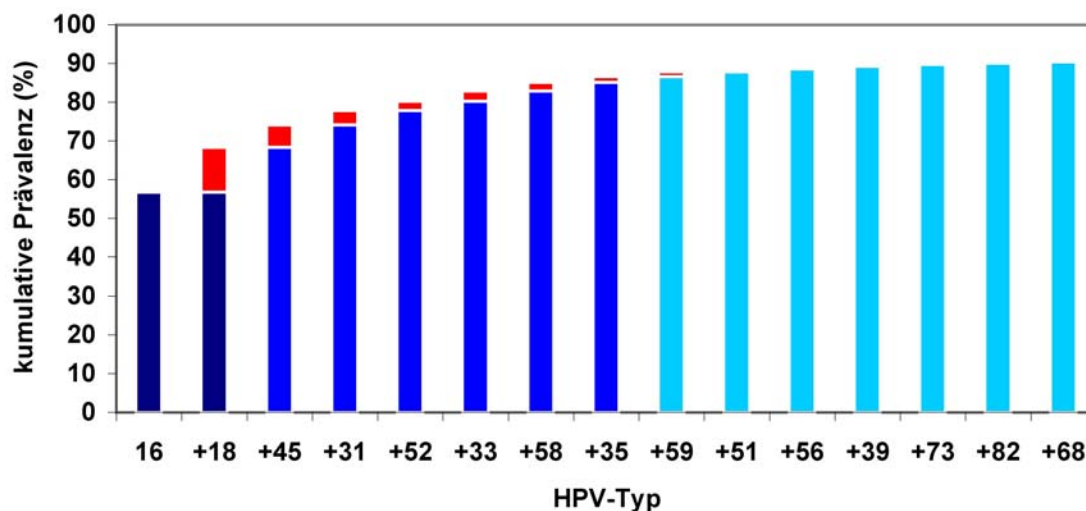


Abbildung 4-54 Kumulative Häufigkeit von Hoch-Risiko-HPV-Typen in Zervix-Karzinomen. Häufige Hoch-Risiko-Typen sind in dunkelblau dargestellt; seltene Typen in mittelblau und sehr seltene Typen in hellblau. Der jeweils zusätzliche Anteil an der Gesamtprävalenz ist in rot dargestellt und für die sehr seltenen Typen (außer HPV-59) nicht sichtbar (Datenquelle: (90)).

Seren von 756 Frauen aus zwei Zervix-Karzinom-Fall-/Kontroll-Studien aus Chennai (Indien) und Algier (Algerien) wurden mit Multiplex-Serologie auf Antikörper gegen die E6-, E7- und L1-Proteine der 2 häufigen und 6 seltenen Hoch-Risiko-HPV-Typen sowie des Niedrig-Risiko-HPV-Typs 6b untersucht. Die Ergebnisse der L1-Untersuchungen werden hier aus Platzgründen nicht gezeigt.

4.4.3.1 Prävalenz von Antikörpern gegen HPV E6- und E7-Proteine

Die Häufigkeitsverteilungs-Diagramme für alle neun HPV-Typen und zwei Antigene, jeweils getrennt nach Fällen und Kontrollen, sind sehr umfangreich und in wenigen Diagrammen nicht übersichtlich darstellbar. Um einen Eindruck von der Prävalenz von Antikörpern gegen die E6- und E7-Proteine zu vermitteln, wurden Kurven für alle Seren (ohne Trennung nach Fällen und Kontrollen) erstellt (Abbildung 4-55).

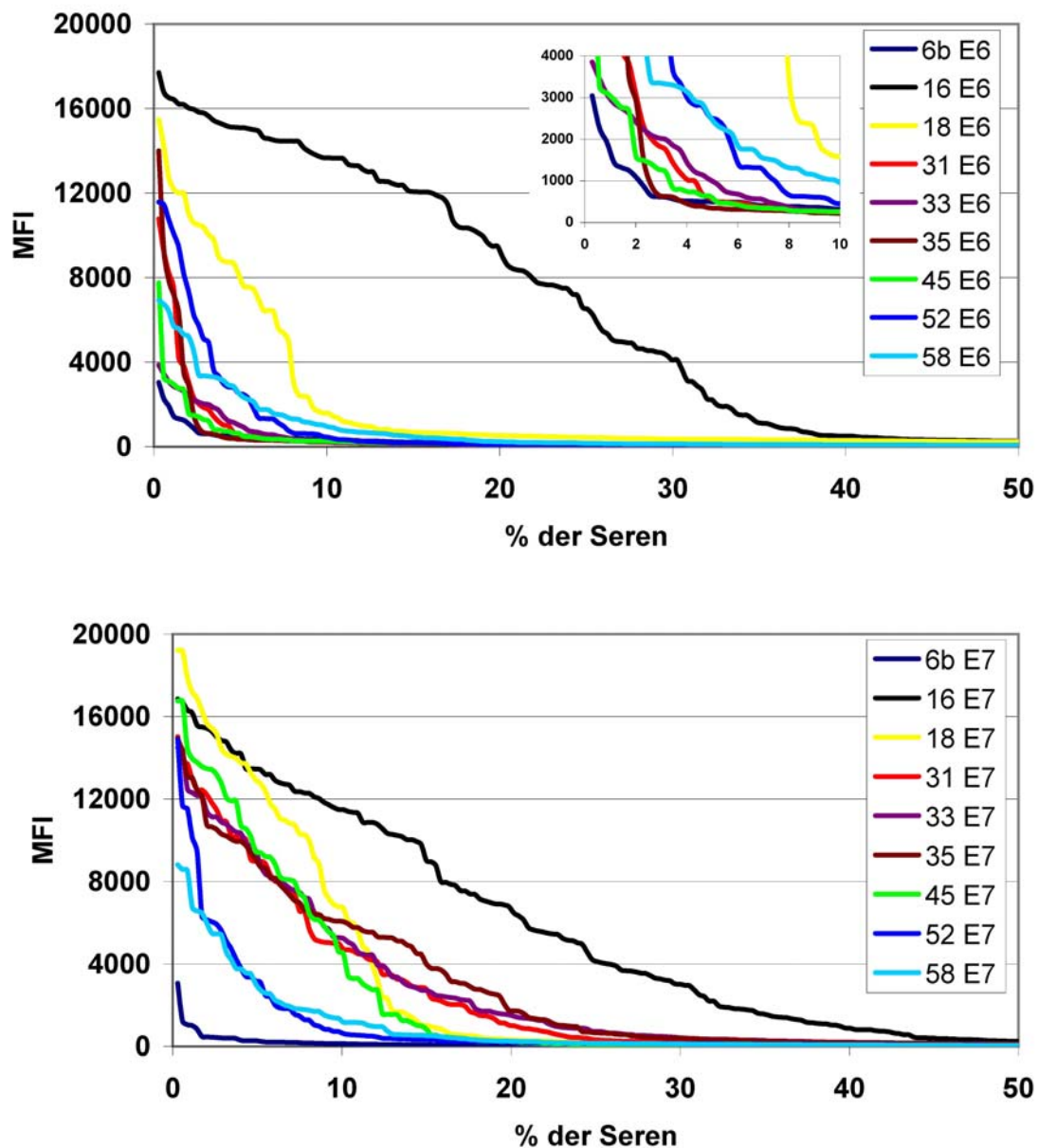


Abbildung 4-55 Häufigkeitsverteilungen der Seroreaktivitäten gegen E6-(oben) und E7-(unten) Proteine von 8 Hoch-Risiko-HPV-Typen und HPV-6b. Rechts oben im oberen Panel: Vergrößerung des unteren linken Segments der Grafik.

Unter den Reaktionen gegen E6-Proteine sind die gegen HPV-16 mit Abstand am häufigsten, gefolgt von HPV-18, -52 und -58. Bei den E7-Proteinen ist ebenfalls HPV-16 am häufigsten, der Abstand zu den folgenden Typen (HPV-18, -31, -33, -35 und -45) ist aber geringer als bei E6-Proteinen. HPV-6b ist bei beiden Proteinen der seltenste Typ. Insgesamt sind Antikörper gegen E7-Proteine wesentlich häufiger als gegen E6-Proteine.

Häufigkeitsverteilungen getrennt für Zervix-Karzinom-Fälle und Kontrollen sind für HPV-16 (exemplarisch für häufige Hoch-Risiko-Typen) und -52 E6 (exemplarisch für seltene Hoch-Risiko-Typen) wiedergegeben (Abbildung 4-56).

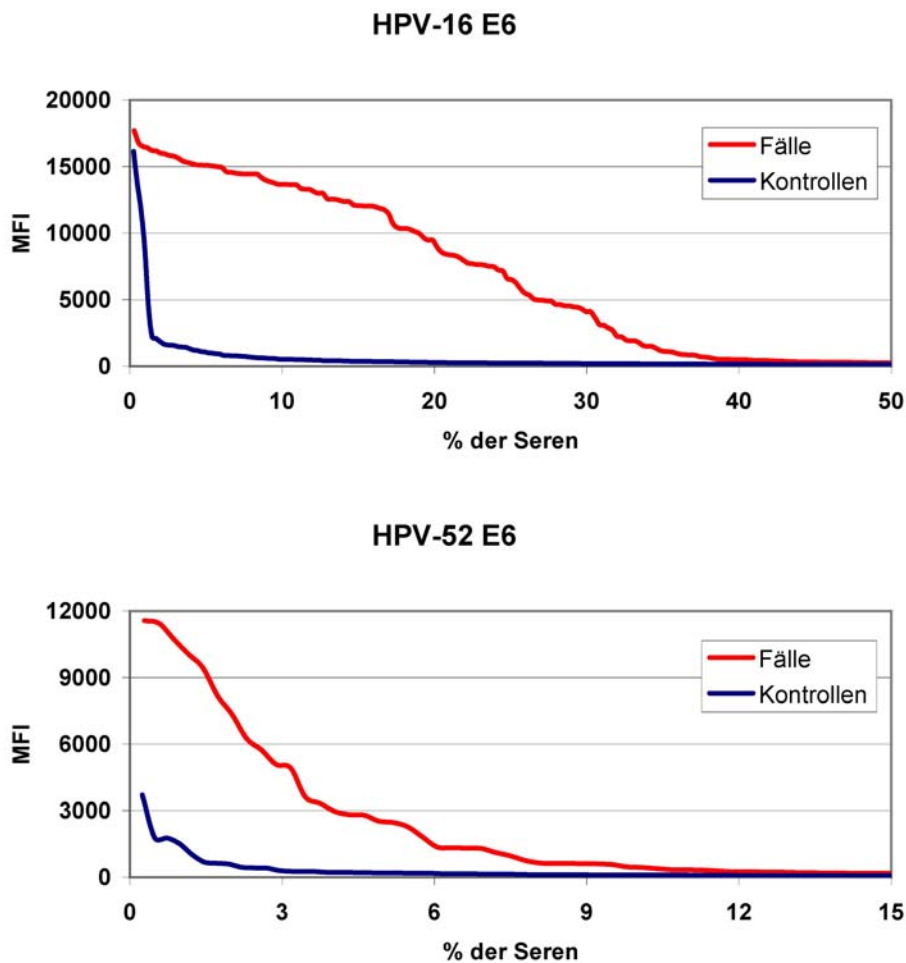


Abbildung 4-56 Häufigkeitsverteilungen für HPV-16 E6 (oben) und HPV-52 E6 (unten) für Zervix-Karzinom-Fälle und Kontrollen.

Für beide HPV-Typen zeigten sich deutlich mehr Antikörper in Fällen als in Kontrollen, wobei die Antikörper-Reaktivitäten der Zervix-Karzinom-Fälle gegen HPV-16 E6 wesentlich häufiger und auch stärker waren als gegen HPV-52 E6.

Für alle Antigene stiegen die Häufigkeitsverteilungskurven bei einem Wert von 700 ± 100 MFI steil an (nicht gezeigt), so dass der Cut-Off auf 700 MFI gelegt wurde. Mit diesem Cut-Off ließen sich Positivitäts-Raten berechnen (Abbildung 4-57).

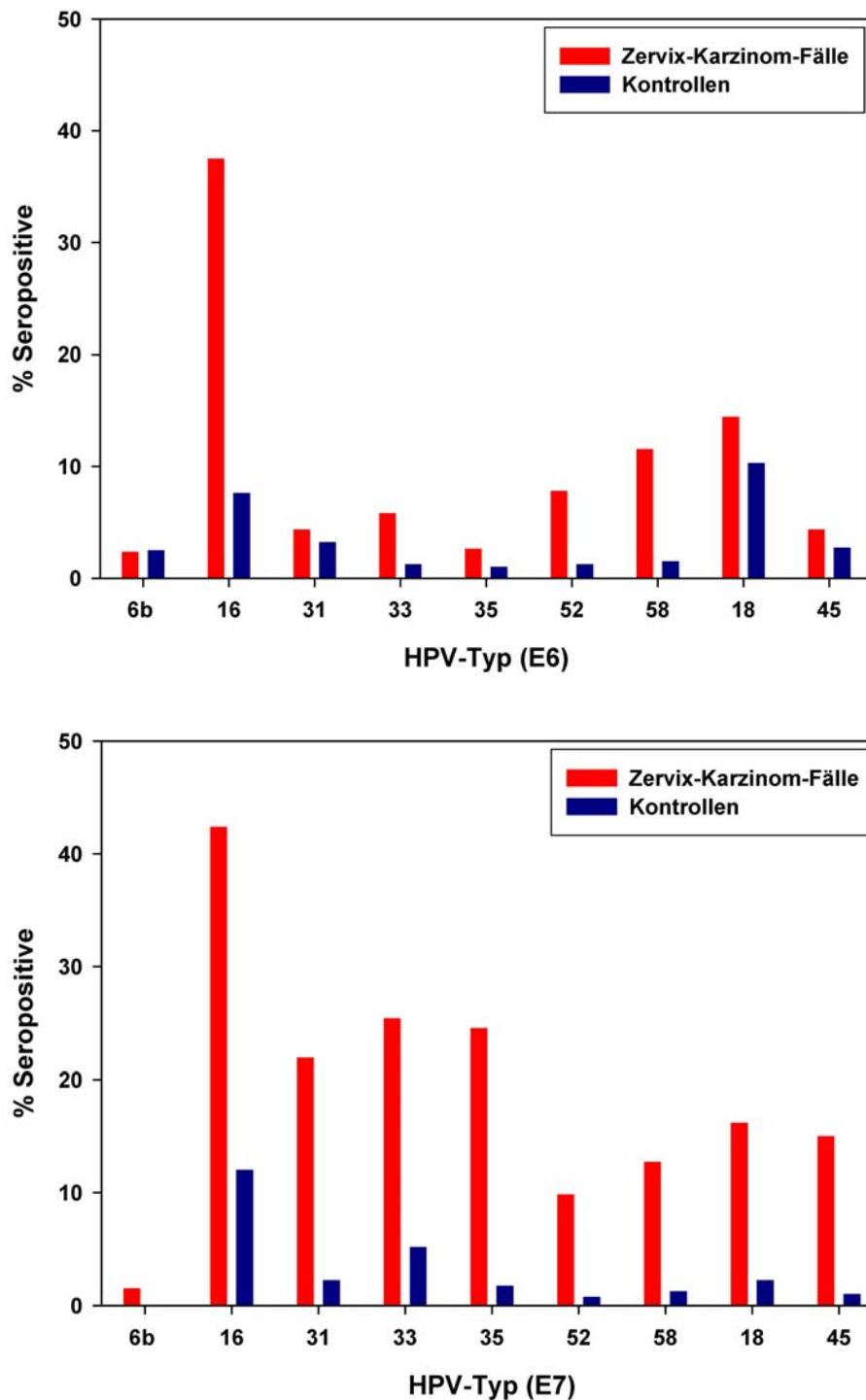


Abbildung 4-57 Seropositivitätsraten für Antikörper gegen E6- (oben) und E7- (unten) Proteine von von 8 Hoch-Risiko-HPV-Typen und HPV-6b in Zervix-Karzinom-Fällen und Kontrollen (Cut-Off 700 MFI).

Bei den Antikörper-Reaktivitäten gegen E6-Proteine war in den Zervix-Karzinom-Fällen HPV-16 der häufigste Typ, gefolgt von HPV-18, -58 und -52. Antikörper gegen E7-Proteine waren am häufigsten für HPV-16, -33, -35 und -31, gefolgt von den anderen Hoch-Risiko-Typen.

Häufig zeigten die Zervix-Karzinom-Fälle wesentlich höhere Seroprävalenzen als die Kontrollen: Der Unterschied war für Antikörper gegen die E6-Proteine von HPV-16, -33, -52 und -58 sowie alle E7-Proteine der Hoch-Risiko-Typen deutlich zu sehen, nicht aber für den Niedrig-Risiko-Typ 6b.

Da sich die Signifikanz der Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen anhand der Seropositivitätsraten nicht adäquat bestimmen lässt, wurden Box-Plots der Seroreaktivitäten erstellt und der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen mit Hilfe eines Student'schen t-Tests ermittelt (Abbildungen 4-58, 4-59).

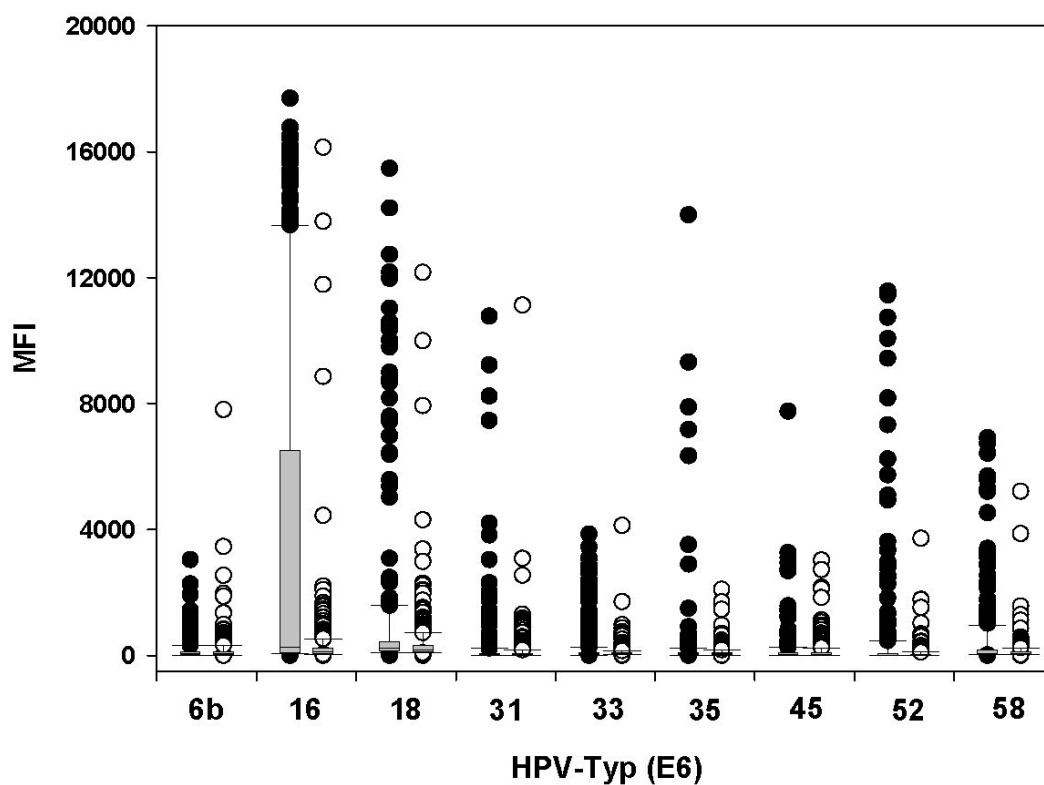


Abbildung 4-58 Box-Plots für E6-Seroreaktivitäten von Zervix-Karzinom-Fällen (dunkle Symbole) und Kontrollen (helle Symbole) gegen 9 HPV-Typen. p-Werte sind für HPV-6b 0.56, HPV-16 $<1 \times 10^{-23}$, HPV-18 $<1 \times 10^{-4}$, HPV-31 0.09, HPV-33 $<1 \times 10^{-3}$, HPV-35 0.03, HPV-45 0.20, HPV-52 $<1 \times 10^{-4}$ und HPV-58 $<1 \times 10^{-5}$.

Die im Mittel stärksten Seroreaktionen wurden für HPV-16 E6 (Median 259 MFI) und -18 E6 (Median 238 MFI) beobachtet. Der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen war für HPV-16, -18, -33, -35, -52 und -58 signifikant.

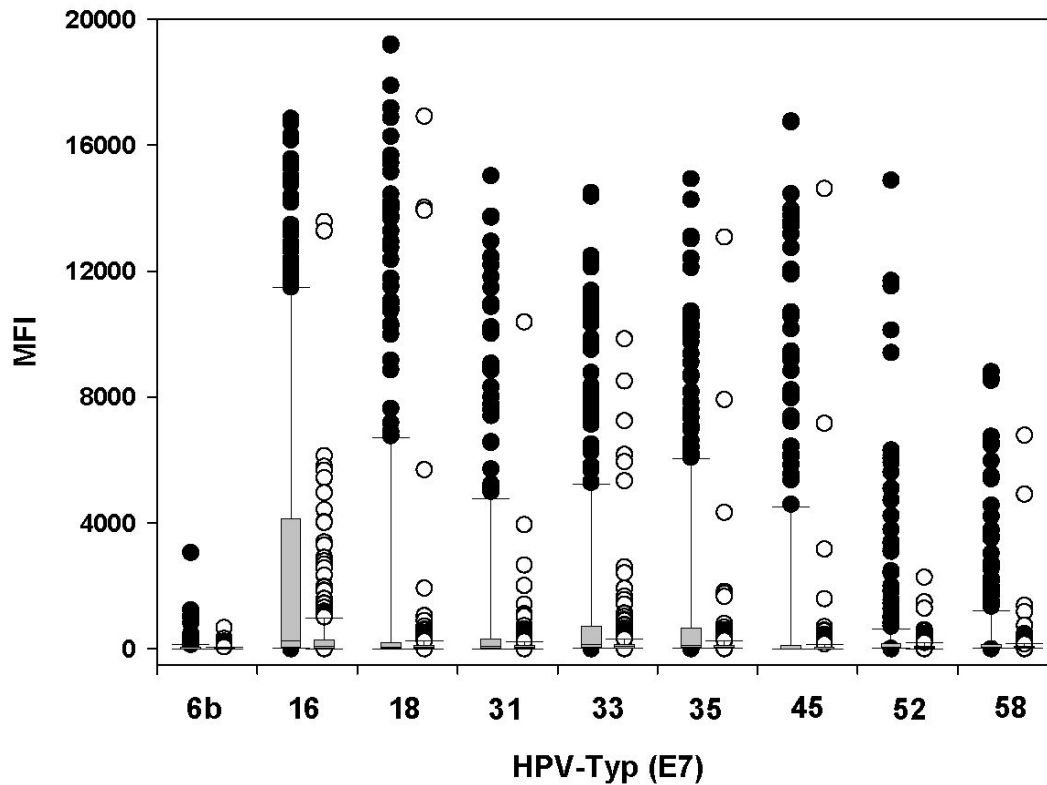


Abbildung 4-59 Box-Plots für E7-Seroreaktivitäten von Zervix-Karzinom-Fällen (dunkle Symbole) und Kontrollen (helle Symbole) gegen 9 HPV-Typen. p-Werte sind für HPV-6b $<1 \times 10^{-2}$, HPV-16 $<1 \times 10^{-20}$, HPV-18 $<1 \times 10^{-7}$, HPV-31 $<1 \times 10^{-11}$, HPV-33 $<1 \times 10^{-10}$, HPV-35 $<1 \times 10^{-13}$, HPV-45 $<1 \times 10^{-7}$, HPV-52 $<1 \times 10^{-4}$ und HPV-58 $<1 \times 10^{-6}$.

Die im Mittel stärksten Reaktionen gegen E7-Proteine wurden für HPV-16 (Median 247 MFI), -33 (127 MFI) und -35 (113 MFI) beobachtet. Der Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen war für alle Hoch-Risiko-Typen und HPV-6b signifikant. Die Signifikanz für HPV-6b resultierte aus 5 Antikörper-positiven Seren in den Fällen und keinem in den Kontrollen.

4.4.3.2 Mehrfachpositivität von Antikörpern gegen homologe E6- und E7-Proteine

Viele Seren, die stark mit E6- bzw. E7-Proteinen eines HPV-Typs reagierten, zeigten gleichzeitig Reaktivität gegen die E6- bzw. E7-Proteine anderer Typen. Um zu untersuchen,

welches Maß an Mehrfachpositivität für mehrere HPV-Typen auftrat, wurden die Seroreaktivitäten gegen homologe Proteine der untersuchten HPV-Typen direkt verglichen. Exemplarisch für nicht eng verwandte HPV-Typen ergab der Vergleich zwischen HPV-16 und -18 ein minimales Niveau an Mehrfachpositivität für die homologen E6- und E7-Proteine (in Kapitel 4.3.4 gezeigt). Beispielhaft für eng verwandte HPV-Typen zeigte der Vergleich von HPV-16 und -33 ein hohes Maß an Mehrfachpositivität vor allem für E7-Antikörper (Abbildung 4-60).

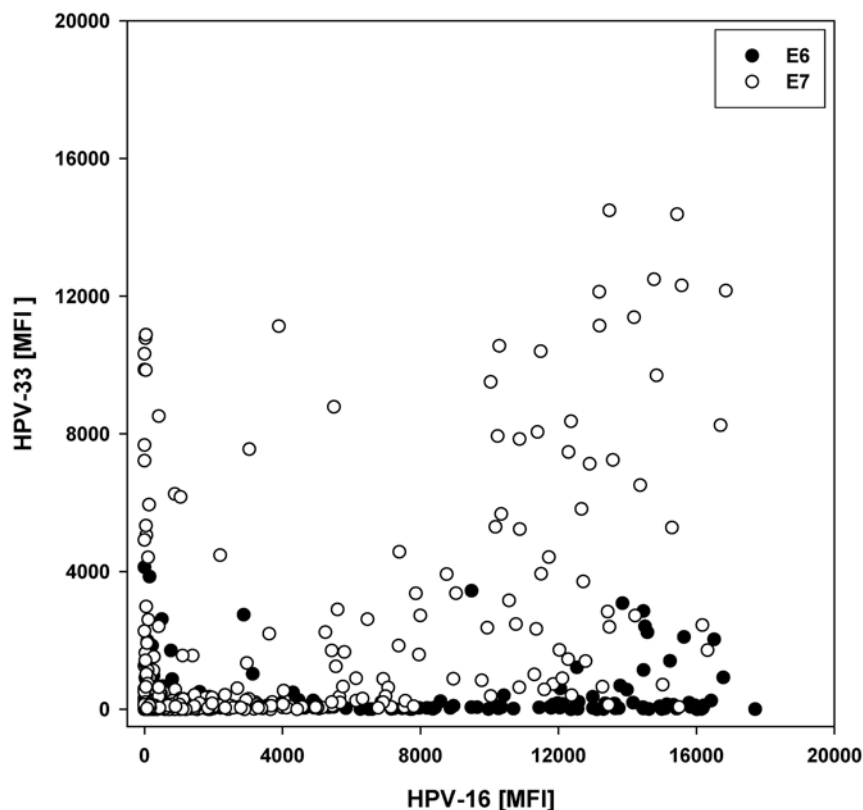


Abbildung 4-60 Mehrfachpositivität von Antikörpern gegen homologe Proteine von HPV-16 und -33.

Monospezifische E6-Antikörper, d.h. Antikörper, die ausschließlich gegen einen Virustyp gerichtet waren, zeigten sich für HPV-33 selten und für HPV-16 häufig. Nur wenige der mit HPV-16 E6 reagierenden Seren zeigten gleichzeitig HPV-33 E6-Reaktivität.

Es konnten HPV-33-spezifische E7-Antikörper mit Reaktivitäten bis zu ca. 12000 MFI beobachtet werden. Einige davon reagierten mit HPV-16 E7 mit bis zu 6000 MFI. HPV-16 E7-spezifische Antikörper, die nicht mit HPV-33 reagierten, zeigten sich nur mit Reaktivitäten bis ca. 8000 MFI. Noch stärker HPV-16 E6-reaktive Seren zeigten immer stärker werdende

Reaktionen auch mit HPV-33 E7. Nur sehr wenige Seren reagierten gleich stark mit beiden HPV-Typen.

Diese Form der Analyse verdeutlicht, dass es Mehrfachpositivität zwischen eng verwandten HPV-Typen gibt und dass diese für E7- häufiger als für E6-Proteine sind. Die Tatsache, dass die Reaktivität fast immer stärker gegen einen Virus-Typ ist, spricht dafür, dass es sich bei den mehrfach positiven Reaktionen um Kreuzreaktionen handelt.

4.4.3.3 Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen homologe E6- und E7-Proteine

Kreuzreaktionen zwischen eng verwandten HPV-Typen der A-Spezies sind möglich. Die phylogenetische Verwandtschaft auf DNA-Ebene spiegelt sich auch in der prozentualen Aminosäuren-Identität der E6- und E7-Proteine wieder (Abbildung 4-61).

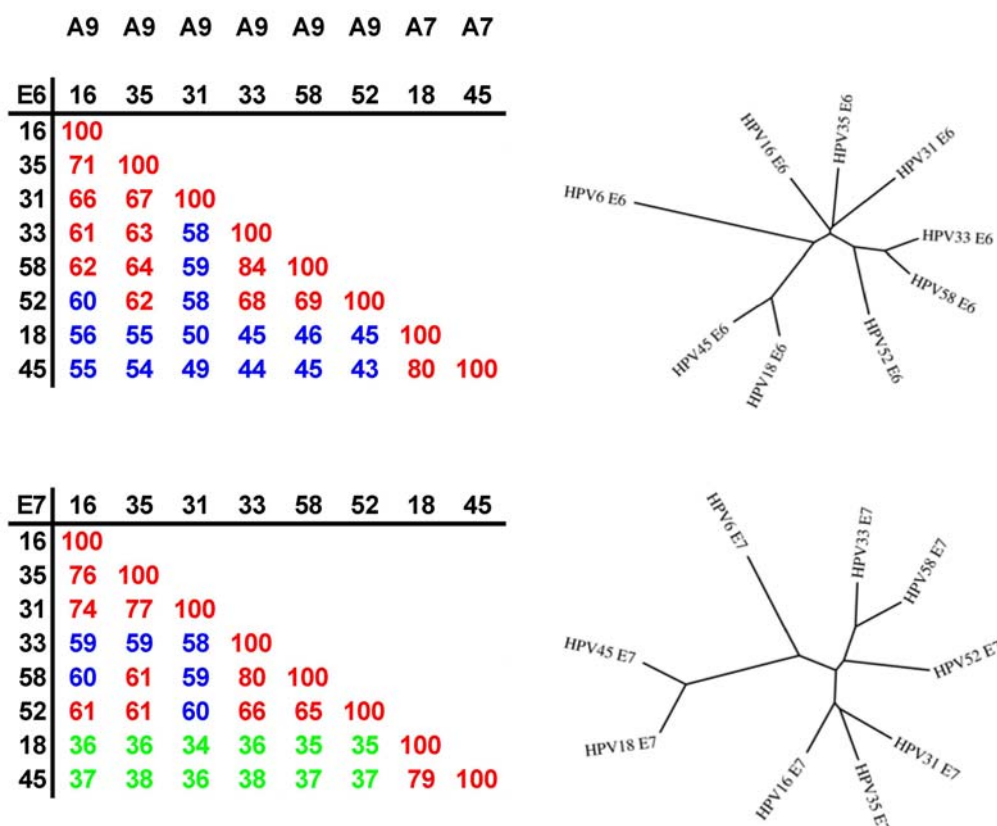


Abbildung 4-61 Sequenz-Verwandtschaft und phylogenetische Bäume der E6- (oben) und E7- (unten) Proteine von 8 Hoch-Risiko-HPV-Typen. Dargestellt ist die paarweise prozentuale Aminosäuren-Identität. Übereinstimmungen < 40 % sind grün markiert, von 40-60 % blau und > 60 % rot. HPV-Typen sind nach phylogenetischen Spezies geordnet. Die phylogenetischen Bäume basieren auf den Tabellen; die Maßstäbe sind nicht identisch.

Die auf L1-Sequenzen basierende Einteilung der HPV-Typen in Spezies trifft auch für E6 und E7 zu. HPV-33 und -58 zeigen die größte Verwandtschaft, gefolgt von HPV-18 und -45. Innerhalb der A9-Spezies zeichnen sich zwei Untergruppen ab (HPV-33, -52 und -58 einerseits, HPV-16, -31 und -35 andererseits). E6-Proteine zeigen intraspezies (16-42 %) etwas weniger sowie interspezies (44-57 %) deutlich weniger Divergenz auf als E7-Proteine (intraspezies 20-42 %, interspezies 62-65 %), wobei die Verwandtschaft von HPV-16, -31 und -35 für die E7- enger als für die E6-Proteine dieser HPV-Typen ist.

Um Untersuchung von Kreuzreaktivität möglichst aussagekräftig zu gestalten, wurde die HPV-DNA-Typisierung der Tumore zu Hilfe genommen. In die Analyse wurden Seren von Zervix-Karzinom-Patientinnen aufgenommen, die DNA nur eines HPV-Typs im Tumor hatten und die die stärkste Antikörperreaktion gegen das E6- oder E7-Protein dieses HPV-Typs gezeigt hatten. Die Hintergrundseroprävalenz dieser potentiell kreuzreagierenden Antikörper wurde aus Kontrollen bestimmt, die seronegativ für das zu untersuchende Antigen waren.

Für die HPV-Typen 16 und 18 stand eine für generalisierende Aussagen ausreichende Anzahl an Seren zur Verfügung (Abbildungen 4-62 bis -65).

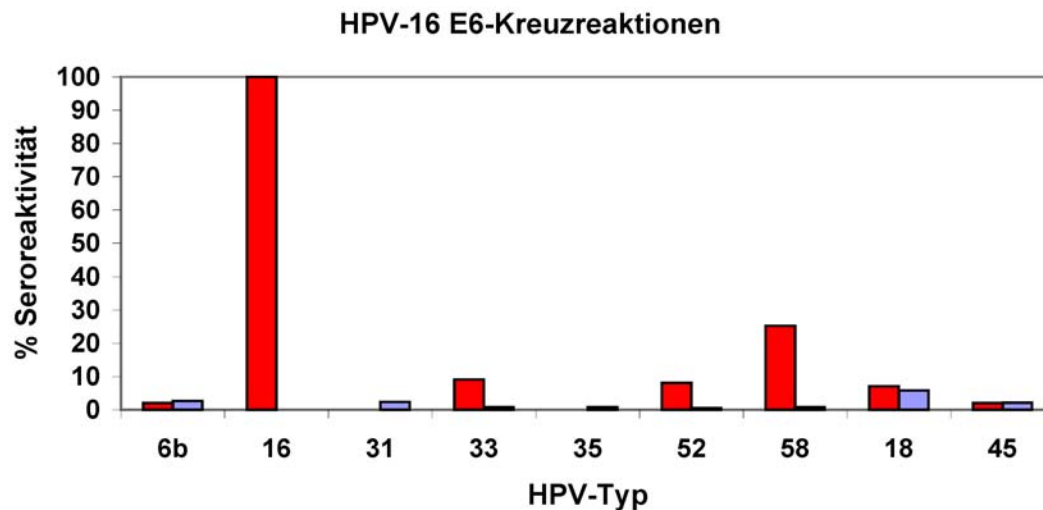


Abbildung 4-62 Kreuzreaktivität von HPV-16 E6-Antikörpern. Rote Balken: Reaktionen mit E6-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 99 Seren von HPV-16 E6 sero- und HPV-16 DNA-positiven Tumor-Patientinnen. Blaue Balken: Reaktionen mit E6-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 378 Seren von HPV-16 E6-seronegativen Frauen aus der Kontrollgruppe (Hintergrundseroprävalenz). HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-6b: A10-Spezies; HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58: A9-Spezies; HPV-18, -45: A7-Spezies).

Von den HPV-16 DNA-positiven Seren, die die stärkste E6-Reaktion mit HPV-16 gezeigt hatten, reagierten 33 % auch mit E6-Proteinen anderer HPV-Typen: 19 % mit einem anderen HPV-Typ, 8 % mit zwei und 6 % mit drei anderen HPV-Typen.

Nach Subtraktion der Hintergrundseroprävalenz zeigten 25 % der HPV-16 E6-positiven Seren Kreuzreaktionen mit HPV-58 E6, jeweils 8 % mit HPV-33 und -52 E6 und 1 % mit HPV-18 E6. Mit E6-Proteinen der HPV-Typen 6b, 31, 35 und 45 wurden keine Kreuzreaktionen gefunden. Die stärksten Kreuzreaktionen waren demnach innerhalb der A9-Spezies zu beobachten; nur 1 % der HPV-16 E6-Antikörper reagierten mit einem Vertreter der A7-Spezies (HPV-18).

HPV-33 und 35 E6 sind die mit HPV-16 E6 am nächsten verwandten Proteine. Deshalb ist es überraschend, dass die häufigsten Kreuzreaktionen von HPV-16 E6-Antikörpern mit HPV-58 beobachtet wurden.

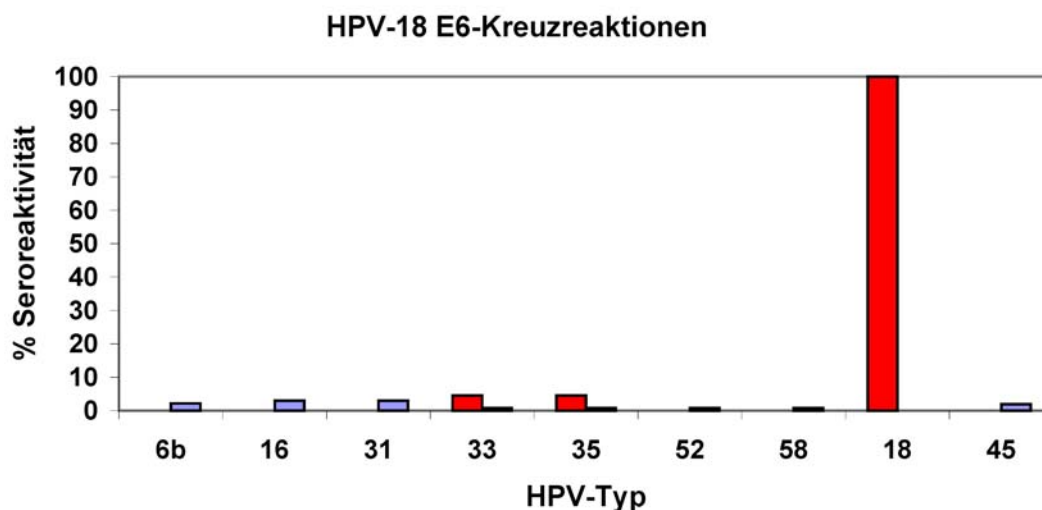


Abbildung 4-63 Kreuzreaktivität von HPV-18 E6-Antikörpern. Rote Balken: Reaktionen mit E6-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 22 Seren von HPV-18 E6 sero- und HPV-18 DNA-positiven Tumor-Patientinnen. Blaue Balken: Reaktionen mit E6-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 367 Seren von HPV-18 E6-seronegativen Frauen aus der Kontrollgruppe (Hintergrundseroprävalenz). HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-6b: A10-Spezies; HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58: A9-Spezies; HPV-18, -45: A7-Spezies).

Kreuzreaktivität von HPV-18 E6-Antikörpern mit E6-Proteinen anderer HPV-Typen war sehr selten. Von den HPV-18 E6 seropositiven Seren von HPV-18 DNA-positiven Patientinnen reagierte eines auch mit HPV-33 und -35 E6.

Auffällig ist, dass keine Kreuzreaktivität von HPV-18 E6-Antikörpern mit dem nahe verwandten HPV-45 beobachtet werden konnte.

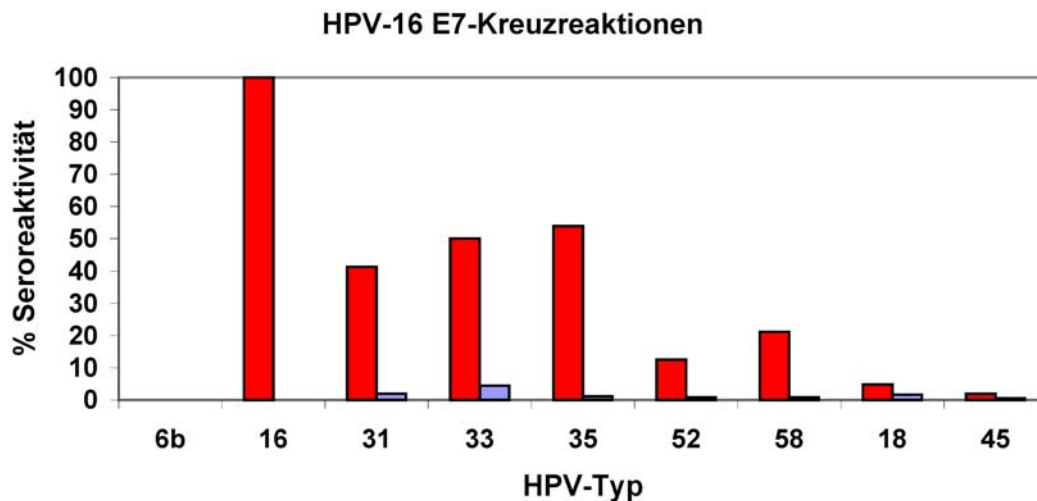


Abbildung 4-64 Kreuzreaktivität von HPV-16 E7-Antikörpern. Rote Balken: Reaktionen mit E7-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 104 Seren von HPV-16 E7 sero- und HPV-16 DNA-positiven Tumor-Patientinnen. Blaue Balken: Reaktionen mit E7-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 360 Seren von HPV-16 E7-seronegativen Frauen aus der Kontrollgruppe (Hintergrundseroprävalenz). HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-6b: A10-Spezies; HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58: A9-Spezies; HPV-18, -45: A7-Spezies).

Von den HPV-16 DNA-positiven Patientinnen, die die stärkste E7-Antikörperreaktivität gegen HPV-16 E7 aufwiesen, reagierten 66 % auch mit E7-Proteinen anderer HPV-Typen: 13 % mit einem weiteren HPV-Typ, 16 % mit zwei, 17 % mit drei, 10 % mit vier, 9 % mit fünf und ein Serum (1 %) mit 6 weiteren HPV-Typen.

Nach Abzug der Hintergrundseroprävalenz reagierten 53 % der HPV-16 E7-positiven Seren mit HPV-35 E7, 46 % mit HPV-33 E7, 39 % mit HPV-31 E7, 20 % mit HPV-58 E7, 12 % mit HPV-52 E7, 3 % mit HPV-18 E7 und 1 % mit HPV-45 E7.

Die Kreuzreaktion von HPV-16 E7-Antikörpern ist am stärksten mit E7-Proteinen eng verwandter HPV-Typen der A9-Spezies und sehr schwach mit E7-Proteinen der HPV-Typen 18 und 45 (A7-Spezies). Innerhalb der A9-Spezies sind Kreuzreaktionen von HPV-16 E7 am häufigsten mit HPV-33 und -35 E7, was direkt mit der Sequenzhomologie der Proteine korreliert.

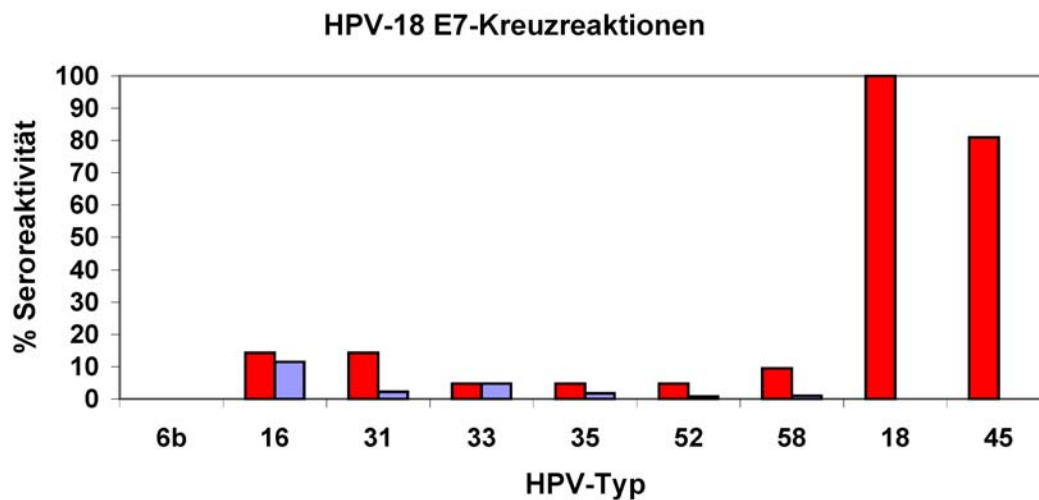


Abbildung 4-65 Kreuzreaktivität von HPV-18 E7-Antikörpern. Rote Balken: Reaktionen mit E7-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 21 Seren von HPV-18 E7 sero- und HPV-18 DNA-positiven Tumor-Patientinnen. Blaue Balken: Reaktionen mit E7-Proteinen verschiedener HPV-Typen in 400 Seren von HPV-18 E7-seronegativen Frauen aus der Kontrollgruppe (Hintergrundseroprävalenz). HPV-Typen sind nach phylogenetischer Verwandtschaft geordnet (HPV-6b: A10-Spezies; HPV-16, -31, -33, -35, -52, -58: A9-Spezies; HPV-18, -45: A7-Spezies).

Von den HPV-18 DNA-positiven und HPV-18 E7-seropositiven Patientinnen reagierten 81 % auch mit HPV-45 E7. Diese starke Kreuzreaktion ausgenommen, reagierten 48 % mit einem weiteren HPV-Typ, 24 % mit zwei und 10 % mit vier weiteren HPV-Typen. Nach Abzug der Hintergrundseroprävalenz verblieben nur wenige Kreuzreaktionen mit HPV-Typen der A9-Spezies (12 % mit HPV-31 und 8 % mit HPV-58 E7).

Die Kreuzreaktivität von HPV-18 E7-Antikörpern korrelierte mit den phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der E7-Proteine: Die stärkste Kreuzreaktivität wurde innerhalb der Spezies mit HPV-45 E7 gemessen, Kreuzreaktionen mit HPV-Typen anderer Spezies (A10 und A9) sind selten.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass für HPV-16 und -18 E7-Kreuzreaktionen häufiger sind (bis 81 %) als E6-Kreuzreaktionen (bis 25 %). Starke Kreuzreaktionen von E6- und E7-Antikörpern finden immer mit homologen Proteinen derselben Spezies statt, sind jedoch innerhalb der Spezies nicht strikt mit der Sequenzhomologie assoziiert.

Für die Kreuzreaktionen seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen können nur Einzelbeispiele diskutiert werden, da die Zahl entsprechend DNA-positiver Tumore sehr begrenzt war (Tabellen 4-12 und 4-13). Seren von nur HPV-58 DNA-positiven Patientinnen standen nicht zur Verfügung.

Tabelle 4-12 Antikörper gegen E6-Proteine

Farbcode		> Cut-Off (700 MFI) typisierte DNA									
Spezies			A10	A9						A7	
Chennai-Serum-Code	HPV-DNA	Nummer	6b	16	31	33	35	52	58	18	45
908012	1	31	0	311	3826	44	18	13	25	112	16
910212	2	31	59	1778	9230	27	4	972	98	438	0
814512	3	31	18	76	8232	268	32	0	57	191	21
819512	4	31	32	39	23	14	32	0	19	56	11
820712	5	31	37	72	7	316	21	11570	5702	288	0
906912	6	33	141	234	106	51	104	0	100	397	55
907512	7	33	55	61	27	32	24	26	39	266	0
910612	8	33	152	531	76	143	152	0	295	521	218
911712	9	33	72	259	36	762	53	0	498	163	11
917112	10	33	108	299	1021	100	169	0	129	534	40
918312	11	33	19	275	183	91	19	4	40	110	0
801312	12	33	1085	265	327	117	518	0	656	426	108
810812	13	33	0	49	6	53	73	25	4	291	36
814412	14	33	1925	43	85	70	45	5	100	123	0
901912	15	35	221	52	36	62	124	101	109	168	0
912112	16	35	11	125	36	30	34	0	63	360	34
903512	17	52	0	75	15	157	135	85	74	148	199
813012	18	52	22	71	32	13	0	1368	202	279	0
813412	19	52	107	102	72	45	84	9445	57	190	0
906312	20	45	35	881	40	0	37	26	17	6977	7754
912912	21	45	16	284	0	95	44	23	162	1194	1493
914012	22	45	0	128	1	118	36	131	71	244	16
915512	23	45	11	137	0	35	21	32	66	229	275
920212	24	45	99	1335	25	22	48	0	83	105	9
801112	25	45	34	98	55	131	42	0	46	183	645
806112	26	45	37	151	19	16	29	0	41	140	132
818612	27	45	84	135	40	43	23	0	718	181	96
820912	28	45	176	43	0	39	20	12	17	175	57

Tabelle 4-13 Antikörper gegen E7-Proteine

Farbcode			> Cut-Off (700 MFI) typisierte DNA								
Spezies			A10	A9						A7	
Chennai-Serum-Code	HPV-Nummer	HPV-DNA	6b	16	31	33	35	52	58	18	45
908012	1	31	14	55	83	66	39	24	28	86	0
910212	2	31	3062	5595	12201	2903	9387	11528	3033	0	2741
814512	3	31	66	817	15029	246	12111	2475	183	0	63
819512	4	31	-2	13	19	63	11	18	25	24	0
820712	5	31	104	105	173	4412	18	5921	3514	277	0
906912	6	33	-17	27	0	10780	72	78	1940	53	36
907512	7	33	-18	0	6	307	12	36	43	29	14
910612	8	33	79	74	0	126	74	64	32	53	19
911712	9	33	14	79	247	95	126	52	36	63	0
917112	10	33	404	372	12	138	57	54	25	541	0
918312	11	33	11	3967	0	178	202	141	80	53	48
801312	12	33	49	3430	101	28	7072	5	1	0	401
810812	13	33	-17	64	53	128	100	42	36	71	0
814412	14	33	12	117	63	39	71	59	51	101	0
901912	15	35	-83	0	33	34	231	158	128	66	132
912112	16	35	24	5148	429	51	7840	24	48	72	0
903512	17	52	0	8955	86	886	329	33	42	0	24
813012	18	52	43	68	188	121	48	14889	147	1729	0
813412	19	52	25	26	27	923	86	9412	50	0	36
906312	20	45	-46	0	108	221	3131	78	33	4861	7963
912912	21	45	-41	173	40	13	188	36	150	61	0
914012	22	45	14	3538	0	58	44	847	116	5579	9390
915512	23	45	96	70	7	0	73	39	58	60	2
920212	24	45	-66	0	31	1262	8	67	2	15436	14461
801112	25	45	6	12	3492	345	79	56	109	33	0
806112	26	45	-15	0	0	38	5	14	32	6900	9467
818612	27	45	24	2940	1618	263	52	71	0	8867	11911
820912	28	45	-26	0	208	7673	70	1821	5973	9992	9175

Drei von fünf HPV-31-DNA positiven Seren zeigten Antikörperreaktionen gegen HPV-31 E6 und zwei gegen HPV-31 E7. Serum 2 zeigte viele und hohe E7-Antikörperreaktionen mit anderen HPV-Typen und reagierte auch mit HPV-6b und -45, die andere Spezies (A10 bzw. A7) repräsentieren. Serum 5 reagierte stark mit den E6- und E7-Proteinen von HPV-52 und schwächer mit denen von HPV-58, nicht aber mit den HPV-31-Proteinen. Wahrscheinlich wurde der Tumor falsch oder unvollständig DNA-typisiert oder das Ergebnis dem falschen Serum zugeordnet.

Antikörper gegen die E6- oder E7-Proteine von HPV-33 waren auffallend selten. Von 9 Seren reagierte nur eines schwach mit HPV-33 E6 und ein anderes stark mit HPV-33 E7. Drei HPV-33 DNA-positive Patientinnen (Seren 10-12) zeigten Antikörperreaktionen gegen

die E6- und E7-Proteine anderer A9-Typen, was vielleicht für unzutreffende DNA-Typisierungen spricht. Ungeklärt sind die HPV-6b E6-Reaktivitäten der Seren 12 und 14.

Beide HPV-35 DNA-positiven Patientinnen waren E6-seronegativ, eine zeigte Antikörper gegen HPV-35 E7 und etwas schwächer gegen HPV-16 E7.

Von drei HPV-52 DNA-positiven Patientinnen zeigten zwei Antikörper gegen HPV-52 E6 und E7, eine davon auch mit HPV-18 E7 (A7-Spezies). Serum 17 reagierte stark mit HPV-16 E7 und schwach mit HPV-33 E7, nicht aber mit HPV-52 E6 und/oder E7, was auf einen Fehler in der DNA-Typisierung hindeuten könnte.

Antikörper gegen HPV-45 E6 oder E7 wurden in 7 der 9 HPV-45 DNA-positiven Patientinnen detektiert. Alle Seren mit HPV-45 E7-Antikörpern reagierten auch stark mit HPV-18 E7. Fünf der sechs HPV-45 E7-positiven Seren zeigten Kreuzreaktionen mit E7-Proteinen von ein bis drei Typen der A9-Spezies. Die zwei HPV-45 E6-positiven Seren (20 und 21) reagierten auch mit HPV-18 E6, eines davon zusätzlich mit HPV-16 E6. Ein Serum (Nummer 25) zeigte ausschließlich Antikörper gegen HPV-31 E7, was nicht mit der DNA im Tumor übereinstimmt.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass es Antikörper auch gegen die E6- und E7-Proteine seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen gibt. Diese Antikörperreaktivitäten waren etwas häufiger und auch stärker gegen die E7- als gegen die E6-Proteine gerichtet. E7-Antikörper zeigten mehr Kreuzreaktivität, in Einzelfällen auch über Speziesgrenzen hinweg, als E6-Antikörper.

5. Diskussion

Über 100 unterschiedliche humane Papillomvirus (HPV)-Typen können den Menschen infizieren. Fast alle dieser Virustypen können benigne proliferative Erkrankungen wie Warzen oder Kondylome auslösen, und viele sind sogar mit malignen Krankheiten assoziiert. Mindestens 15 die Genitalschleimhaut infizierende sogenannte Hoch-Risiko-Typen sind für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs verantwortlich. Einige dieser Typen (v.a. HPV-16) werden auch mit anderen anogenitalen Tumoren und Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Kehlkopfes (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) in Verbindung gebracht. Aus einer weiteren Gruppe von die Haut infizierenden HPV (die B1-Spezies), die mindestens 19 verschiedene humane Virustypen umfasst, kommen einige als Mitverursacher für nicht melanotischen Hautkrebs (*non melanoma skin cancer*, NMSC) in Frage.

Das Genom jedes dieser HPV-Typen kodiert für mindestens acht Proteine, gegen die typenspezifisch und u.U. krankheitsabhängig Antikörper gebildet werden können. Die Antikörperantwort gegen diese Proteine ist unterschiedlich gut untersucht. Das Auftreten von Antikörpern gegen das Hauptkapsidprotein L1 deutet sowohl auf akute als auch auf zurückliegende, geklärte Infektionen hin. Antikörper gegen E6- und E7-Proteine werden dagegen fast ausschließlich in Patienten mit invasiven Tumoren gefunden und können als Krebsmarker dienen. Die Immunantwort gegen die anderen fünf häufig exprimierten Proteine ist auf Grund der Komplexität der Materie kaum untersucht.

Weder Serologie noch DNA-Typisierung allein können zur Individualdiagnostik HPV-assoziiierter Karzinome eingesetzt werden. HPV-DNA-Einzelbefunde haben einen guten negativen Vorhersagewert (ohne DNA keine [persistierende] Infektion, ohne diese kein Krebs), aber einen schlechten positiven Vorhersagewert (die Detektion von DNA erlaubt es nicht, auf die Entstehung von Krebs zu schließen). Im Gegensatz dazu haben serologische Befunde für HPV-Infektionen einen schlechten negativen Vorhersagewert (die Abwesenheit von Antikörpern bedeutet nicht, dass nicht trotzdem Krebs entstanden sein kann). Der gute positive Vorhersagewert von HPV-Serologie in Verbindung mit den krankheitsabhängigen Antikörperprofilen erlaubt jedoch die Differenzierung zwischen reiner Virusinfektion und daraus resultierender Krebserkrankung.

Darüber hinaus ist die Typisierung von HPV-DNA u.U. schlecht reproduzierbar (96) und steht in epidemiologischen Studien manchmal im Widerspruch zum Fall- oder Kontroll-Status von Individuen. Auf Grund der Typenspezifität der Antikörper ermöglicht HPV-Serologie hier eine

eindeutige Klärung. Des weiteren lässt sich mit HPV-Seroepidemiologie die Assoziation anderer Tumore mit HPV-Infektionen untersuchen.

5.1 GST capture ELISA

Der von Dr. Peter Sehr (DKFZ, Heidelberg) entwickelte GST capture ELISA ermöglicht es, sensitiv und spezifisch Antikörper gegen HPV-Proteine zu detektieren (67). Die modulare Klonierung und bakterielle Expression der Virusproteine als GST-Fusionsprotein erlaubt die einfache Herstellung großer Mengen der rekombinanten Proteine. Keine andere Herstellungsmethode für ELISA-Antigene (z.B. Expression in Insektenzellen oder Hefen oder Herstellung von VLP) ist so vielseitig anwendbar und gleichzeitig einfach zu handhaben. Der GST-Fusionsanteil erhöht zudem die Löslichkeit der Proteine. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Methode ist die *in situ*-Affinitätsreinigung der GST-Fusionsproteine, die in Kombination mit der Vorinkubation der Seren in Bakterienlysate eine aufwändige Reinigung der Proteine unnötig macht und die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die überexprimierten Proteine in nativer Konformation vorliegen.

Einziger Nachteil des GST capture ELISA ist, dass er keine Multiplex-Analyse mehrerer Antigene erlaubt, was zu so hohem Serumverbrauch und Zeit- und Normalisierungsaufwand führt, dass die Analyse von z.B. 1000 Seren auf Antikörper gegen 25 verschiedene Antigene praktisch unmöglich ist. Um dieser Beschränkung zu begegnen, wurden zwei verschiedene Antikörperscreeningsysteme zur simultanen Analyse von Antikörper-Reaktivitäten gegen mehrere Antigene entwickelt.

5.2 Chip-ISA

Die Verwendung der für DNA-Microarrays verwendeten Technologie zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen begann in den späten 90er Jahren. Publikationen in den hochrangigsten Zeitschriften beschreiben die Generierung verschiedener Peptid-, Protein- und Antikörper-Arrays (70,71,97,98), von denen jedoch keiner über den *proof of principle*-Status hinauskam. Gleiches gilt für die publizierten Microarray-ELISA (99-102). Bis heute gibt es auf diesem Gebiet - soweit der Autor dieser Arbeit es überblickt - nur Publikationen, die primär eine Methode, aber keine, die primär damit gewonnene biologische Erkenntnisse beschreiben.

Der Grund für diese relative Erfolglosigkeit liegen darin, dass planare Protein-Arrays mit drei Problemen zu kämpfen haben, die für die wesentlich erfolgreicherer DNA-Arrays keine (oder nur eine wesentlich kleinere) Rolle spielen.

Erstens eignen sich Objektträger nur bedingt als feste Phase für Bindungsexperimente, wenn man viele Proben analysieren möchte (der Durchsatz ist extrem begrenzt). Objektträger lassen sich durchaus kompartimentieren (z.B. durch „Aufmalen“ von Reaktionsfeldern mit Fettstift oder durch Aufbringen von Gel-Pads anstelle einer flächendeckenden Gel-Beschichtung), was die Analyse mehrerer Proben auf einem Objektträger erlaubt. Der Zeit- und Kostenaufwand für die Herstellung der Arrays und für die weitere Handhabung ist aber trotzdem so hoch, dass eine Studie mit 1000 Proben *de facto* nicht durchführbar ist.

Zweitens müssen die aufgespotteten Proteine getrocknet werden, wenn chemisch modifizierte Glasobjektträger verwendet werden. Wenn die Proteine in einer wasserhaltigen Umgebung gehalten werden sollen und in einem die Verdunstung minimierenden Spotting-Puffer aufgetragen werden, verschmieren die Spots bei der weiteren Prozessierung des Arrays. Antikörper- und Peptid-Arrays lassen sich u.U. ohne Verlust von Bindungseigenschaften trocknen, dies gilt jedoch nicht für ELISA mit Volle-Länge-Proteinen, deren native Epitope erhalten werden müssen. In diesem Fall können Gel- oder Membranbeschichtete Objektträger Abhilfe schaffen.

Drittens muss die Reinigung der verwendeten Proteine vor dem Aufspotten (oder gar nicht) geschehen (s.u.). Den Gipfel in dieser Hinsicht markieren Heng Zhu und Michael Snyder (Yale University), die 5800 ORFs überexprimiert und die Produkte gereinigt haben, um einen *Yeast Full Proteome*-Chip (mit getrockneten Proteinen) zu generieren ([70](#)).

Dabei ist die Idee, Objektträger mit einem Liganden zu beschichten, der die *in situ*-Affinitäts-Reinigung von Fusionsproteinen aus aufgespotteten, komplexen Mischungen (z.B. Zelllysate) erlaubt, offensichtlich. Mit Beginn der Protein-Microarray-Ära wurden verschiedene, z.T. chemisch außerordentlich komplexe Systeme publiziert, die die Funktionalisierung von Oberflächen mit Liganden (z.B. Streptavidin) und anschließende Immobilisierung von Proteinen mit entsprechenden Modifikationen (z.B. Biotin) erleichtern sollten ([103-105](#)). Trotzdem fehlen Artikel, die die Liganden-gestützte Aufreinigung von Proteinen aus komplexen Gemischen auf dem Chip beschreiben, völlig. Zumindest ein weiterer Ansatz, ein solches System zu etablieren, ist an ähnlichen Problemen gescheitert wie der Versuch in dieser Arbeit (Heng Zhu, persönliche Kommunikation).

Ein entscheidender Fortschritt für Protein Microarrays wurde durch die Arbeit von Andrei Mirzabekov (Russische Akademie der Wissenschaften) erzielt, der als erster Gelbeschichtete Protein-Microarrays entwickelte ([83,106-108](#)). Die heutzutage propagierten Oberflächen für Protein Microarrays sind grundsätzlich Membran- oder Gel-beschichtet, um eine wasserhaltige Umgebung für Protein-Protein-Interaktionen auf Chips zu schaffen. Nichtsdestotrotz ist die Verwendung von Protein-Microarrays zur parallelen Analyse der

Bindungsreaktionen vieler Proteine unter identischen äußerlichen Bedingungen heute noch Zukunftsmusik (73).

Der in dieser Arbeit entwickelte Chip-ISA stellt in dieser Hinsicht leider keine Ausnahme dar. Die dem Chip-ISA zu Grunde liegende Idee war, Protein Microarray-Technologie zu nutzen, um Antikörper gegen mehrere *in situ* Affinitäts-gereinigte Antigene gleichzeitig zu detektieren. Dazu sollten Glasobjektträger mit Glutathion beschichtet werden. Mit Hilfe eines Spotters sollten GST-Fusionsproteine enthaltende Bakterienlysate auf die Glutathion-funktionalisierten Objektträger aufgetragen werden und die GST-Fusionsproteine dadurch *in situ* Affinitäts-gereinigt werden.

Genau dieser Schritt gelang nicht, da sich GST-Fusionsproteine im Vergleich zu Bakterienproteinen ohne GST-Anteil nicht auf Glutathion-funktionalisierten Oberflächen anreichern ließen (Kapitel 4.1.4). Zunächst wurde dies auf eine mangelnde Glutathion-Beschichtung der Oberflächen zurückgeführt bzw. die Hoffnung gehegt, dass eine *in situ*-Reinigung der GST-Fusionsproteine durch andere Oberflächen ermöglicht wurde. Die Fokussierung auf Oberflächenchemie, wie sie in der Literatur, aber auch in vielen persönlichen Gesprächen mit führenden deutschen Wissenschaftlern auf diesem Gebiet (Thomas Joos [NMI, Reutlingen], Dolores Cahill [MPI für Molekulare Genetik, Berlin], Ulrike Korf [DKFZ, Heidelberg]) propagiert wurde, führte zur Synthese immer neuer, Glutathion-funktionalisierter Oberflächen (Kapitel 4.1.1), bis nach einigen Monaten erkannt wurde, dass das Problem gar nicht an einer mangelnden Glutathion-Immobilisierung auf den Objektträgern lag, sondern daran, dass einmal auf eine Glasoberfläche gespottetes Protein nicht mehr abwaschbar ist, selbst wenn das Aufbringen der Lösung kontaktfrei abläuft und Objektträger aus dem gleichen Kunststoff-Material verwendet werden, aus dem auch 96-Loch-Platten für ELISA hergestellt werden. Über den Grund dafür kann nur spekuliert werden. Das extrem kleine Volumen eines Spots, verbunden mit seiner relativ zum Volumen großen Oberfläche und der nicht völlig zu verhindernden Verdunstung, führt wahrscheinlich zu einem Mikroklima, dass zur Aggregation von Proteinen auf der Glasoberfläche führt (Heng Zhu, persönliche Kommunikation).

Im Gegensatz zur Reinigung von Proteinen aus einem aufgespotteten Gemisch ließen sich spezifische Protein-Protein-Interaktionen auf Chips dann generieren, wenn der eine Bindungspartner als gereinigtes Protein gespottet wurde und sich der andere Partner in einer Lösung befand, in der der Objektträger inkubiert wurde (Kapitel 4.1.3). Dieses Ergebnis war auf serologische Assays übertragbar. Ein funktionaler Chip-ISA zur Analyse von Seren auf Antikörper gegen mehrere HPV-Proteine gleichzeitig ließ sich mit gereinigten Proteinen

durchaus bewerkstelligen (Kapitel 4.1.3 und 4.1.5), und es gibt Hinweise darauf, dass der Test mit gereinigten Proteinen so sensitiv und spezifisch wie der Goldstandard, der GST capture ELISA, war. Insofern wurde mit dem entwickelten Chip-ISA mit gereinigten Proteinen der Stand der publizierten Chip-ELISA erreicht und sogar übertroffen, weil er mit nativen (nicht getrockneten) Antigenen durchgeführt wurde. Vollständig auf die *in situ*-Affinitätsreinigung zu verzichten und alle verwendeten Proteine vorzureinigen wäre jedoch aus arbeitsökonomischen Gründen nicht in Frage gekommen und ein zu hoher Preis für die gewonnene Multiplex-Analyse gewesen. Hinweise darauf, dass eine Reinigung der Proteine nicht notwendig ist, solange die zu testenden Seren in Balterienlysat vorinkubiert werden (Kapitel 4.1.5), zerschlugen sich, als in einer kleinen serologischen Studie festgestellt wurde, dass der resultierende Test wesentlich weniger sensitiv als der Goldstandard war (Kapitel 4.1.6). Daher wurde die Weiterentwicklung des Chip-ISA nach ca. einem Jahr eingestellt.

5.3 Multiplex-Serologie

Suspensions-Arrays wurden wie Protein Microarrays erstmals Mitte der 90er Jahre entwickelt. Sie erlauben Multiplex-Bindungsassays auf der Grundlage unterscheidbarer Populationen von Polystyrol-Beads, die als feste Phase dienen und in einem Durchflusszytometer detektiert werden können.

Die ersten Suspensions-Array beruhten auf Beads unterschiedlicher Größe oder Farbe, die in Durchflusszytometern von Becton Dickinson (BD, vermutlich auch in Geräten anderer Hersteller) analysiert werden konnten. Angeboten wurden diese Systeme von BD (*cytometric bead array*, CBA, 8 unterschiedliche größenkodierte Beadsorten) und Luminex (FlowMetrix, 64 unterschiedliche farbkodierte Beadsorten). Diese Suspensions-Arrays hatten und haben den ökonomischen Vorteil, mit bereits vorhandenen Durchflusszytometern kompatibel zu sein. Das CBA-System von BD wird noch heute angeboten, die Zahl der unterschiedlichen Beadsorten ist aber weiterhin sehr begrenzt.

Luminex brachte Ende der 90er Jahre ein weiterentwickeltes System auf den Markt (xMAP), das in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. Es beruht auf 100 unterschiedlichen farbkodierten Beads und lässt sich nur mit einem speziellen Durchflusszytometer verwenden, dem Luminex Analyzer. Ob letzteres primär ökonomische Gründe hatte (die Beads sind relativ preisgünstig, der Analyzer kostet jedoch ca. 50.000 €, s.u.) oder ob es technische Schwierigkeiten mit 64 bzw. 100 unterschiedlichen Beadsorten auf Standard-Durchflusszytometern gab, ist schwierig abzuschätzen, da sich zum Flowmetrix-System nur wenig Literatur finden lässt (in der jedoch von Schwierigkeiten keine Rede ist) (109-114).

Das xMAP-System, inzwischen überwiegend einfach Luminex genannt, nimmt heute praktisch eine Monopol-Stellung unter den Suspensions-Arrays ein und ist das sowohl

kommerziell als auch wissenschaftlich erfolgreichste System. Die Zahl der Unternehmen, die Luminex-Kits anbieten, und die Zahl der Publikationen, die auf der Verwendung des Systems beruhen, steigen ständig.

Das Luminex-System ist eine offene Plattform für die Analyse molekularer Interaktionen. Es wurde zur Detektion von bakterieller rRNA ([115](#)), Zytokinen ([116](#)) oder Genotypisierung von Einzelbasen-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) genutzt ([117](#)). Verschiedene Assays wurden zum Screening monoklonaler Antikörper ([118](#)) oder zur Detektion von Antikörpern gegen virale Antigene ([119-121](#)), bakterielle Toxine ([122](#)), Polysaccharide ([123](#)) oder Autoantigene ([124](#)) in Serum, Cerebrospinalflüssigkeit ([125](#)), getrocknetem Blut auf Filterpapier ([126](#)) und Stuhlproben ([127](#)) entwickelt. In all diesen Publikationen wurden vorgereinigte Proteine direkt an die Beads gekoppelt und nur wenige Antigene parallel analysiert. Darüber hinaus handelt es sich in den meisten Fällen um methodische Einzelarbeiten ohne Folgepublikationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage des Luminex-Systems erfolgreich eine Methode zur Multiplex-Analyse von komplexen Antikörper-Antworten gegen bis zu 100 Antigene entwickelt, die direkt auf den Beads *in situ*-gereinigt werden. Die bisherige Literatur wurde im Hinblick auf die Zahl der getesteten Seren und Antigene weit übertroffen, und Folgepublikationen zur Methodenentwicklung sind absehbar (Tabelle 4-9).

5.3.1 Entwicklung und Validierung von Multiplex-Serologie

Die Details der technischen Entwicklung und Validierung von Multiplex-Serologie wurden bereits bei der Darstellung der Resultate diskutiert (Kapitel 4.2 und 4.3). Hier werden nur die Punkte diskutiert, wo widersprüchliche oder schwer interpretierbare Ergebnisse aufgetreten oder ergänzende Kommentare angebracht sind.

5.3.1.1 Kopplung von Glutathion an Luminex-Beads

Grundlage von Multiplex-Serologie sind Polystyrol-Beads. Diese Beads sind nicht nur „nackt“, d.h. als carboxyliertes Polystyrol, sondern auch mit verschiedenen Beschichtungen kommerziell erhältlich, z.B. mit Avidin, Nickel-Chelat oder verschiedenen, direkt gekoppelten Proteinen (letztere überwiegend in Kits). Zu Beginn der Entwicklung von Multiplex-Serologie wurden bereits Glutathion-beschichtete Beads von einem Unternehmen angeboten (Upstate), jedoch nur vier verschiedene Sorten und zu einem inakzeptablen Preis (ca. 60 mal

teurer als nackte Beads). Daher wurde eine Methode entwickelt, Glutathion-Casein (GC) an die Beads zu koppeln (Kapitel 4.2.2).

Die Herstellung der GC-Beads ist ein kritischer Teil von Multiplex-Serologie. Pro Arbeitstag lassen sich 8 Beadsorten (jeweils genug für mind. 2500 Seren) mit GC koppeln. Die Qualität des Produktes unterliegt einer Lernkurve des Experimentators: Mit ausreichender Erfahrung werden die Beads homogen und reproduzierbar mit GC gekoppelt.

Der Zeit- und Arbeitsaufwand für die Herstellung der GC-Beads stellt jedoch nur einen Teil der Vorbereitungen für eine seroepidemiologische Studie dar und kann auf Grund der Lagerbarkeit der gekoppelten Beads leicht Wochen oder sogar Monate im voraus erledigt werden. Gutes technisches Personal ist relativ schnell in der Lage, GC-Beads herzustellen, die für eine Studie verwendet werden können. (Diplomanden und Doktoranden brauchen meistens etwas länger.) Bei genauer Einhaltung des Kopplungsprotokolls ist die Herstellung von GC-Beads nicht schwieriger als z.B. die Silberfärbung eines Polyacrylamidgels.

Die Technologie zur Herstellung von GC-Beads wurde durch das DKFZ an Progen, ein Heidelberger Biotechnologie-Unternehmen, auslizensiert und dort unabhängig überprüft. Glutathion-beschichtete Beads werden von Progen genau nach dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll hergestellt.

5.3.1.2 *In situ*-Affinitätsreinigung

Die *in situ* Affinitäts-Reinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgt durch Inkubation von GC-Beads in Bakterienlysate (Kapitel 4.2.4). Es konnte gezeigt werden, dass

- die hohe Affinität der Glutathion-GST-Interaktion einen Austausch von Antigenen zwischen beladener Beadsorten in einer Beadmischung verhindert (Kapitel 4.2.4.1),
- die Beads sich mit GST-Fusionsprotein sättigen lassen, wobei unterschiedlich hohe Konzentrationen der überexprimierten Proteine in den Lysaten partiell kompensiert werden können (Kapitel 4.2.4.3), und
- Antigen-beladene Beads sich für mindestens fünf Tage ohne Reaktivitätsverlust lagern lassen (Kapitel 4.2.4.4).

Die Reinigung der Proteine auf den Beads ließ sich nicht ideal zeigen (Kapitel 4.2.4.2). Nackte, GC-gekoppelte und mit GST-Fusionsproteinen beladene Beads wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und die Eluate per PAGE und Silberfärbung des Gels analysiert. Unerwarteterweise zeigte das Eluat auch von nicht mit Antigen beladenen GC-Beads (nicht

aber von nackten Beads) im Silbergel anfärbbare Banden zwischen ca. 30 und 80 kD. Die Herkunft dieser Banden ist ungeklärt. Um GC kann es sich nicht handeln, da dieses eine distinkte Bande bei ca. 33 kD erzeugt und durch eine kovalente Bindung an die Beads geknüpft ist, die durch das Aufkochen in SDS-Probenpuffer nicht aufgebrochen werden kann. Weitere Proteine sind in den Kopplungsprozess nicht involviert. Irritierend ist auch die Vielzahl distinkter Banden. Möglicherweise handelt es sich um Polystyrol-Bruchstücke der Beads, da durch die Silberfärbung nicht nur Proteine, sondern auch andere Makromoleküle (z.B. Polysaccharide) sichtbar gemacht werden können (128). Die Entstehung von Bruchstücken ist bei der radikalischen Polymerisation von Phenylethen zu Polystyrol unvermeidlich, es war jedoch nicht zu klären, ob derartige Bruchstücke auch im fertigen Produkt enthalten sind. Polystyrol-Bruchstücke würden aber nicht erklären, warum die Banden nicht auch in den Eluaten nackter Beads auftauchen.

Neueste Experimente (Januar 2005) haben gezeigt, dass es sich bei den unspezifischen Banden um eine Kontamination mit Proteinen handeln könnte, da sich von einer anderen Präparation GC-gekoppelter Beads nur wenige Banden eluieren ließen, die ein Casein-ähnliches Muster zeigten. Auch diese Versuche ließen jedoch keine eindeutige Klärung zu. Die Spezifität des Assays (Kapitel 4.3.4) und die *in situ*-Affinitätsreinigung der GST-Fusionsproteine auf den GC-Beads werden jedoch nicht beeinträchtigt, wie besonders auch für im Vergleich zu den kleineren E6- und E7-Proteinen schlechter exprimierte L1-Proteine klar gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2.4.2).

5.3.1.3 Bead-bindende Antikörper

Ein wesentlicher Teil der Entwicklung von Multiplex-Serologie war der Blockade von Antikörpern gewidmet, die unspezifisch an die Luminex-Beads banden (Bead-Binder, Kapitel 4.2.5.2). Bead-Binder waren ein gravierendes Problem, dass (bis zu seiner Lösung) in fast allen durchgeführten seroepidemiologischen Studien zum Ausschluss eines kaum tolerablen Anteils der Seren von der Analyse (d.h. > 5 %) und sogar dazu geführt hatte, dass eine große seroepidemiologische Studie mit über 700 Seren vollständig nicht ausgewertet werden konnte (Kapitel 4.2.5.2.2). Dieses Problem tritt im GST capture ELISA nicht auf und ist auch in der Luminex-Literatur nicht beschrieben, so dass zu seiner Lösung nicht auf vorhandene Daten aufgebaut werden konnte. Trotzdem war das Problem der Firma Luminex offensichtlich nicht unbekannt, da sie 2004 spezielle Beads auf den Markt brachte, die in serologischen Anwendungen reduzierten Hintergrund zeigen sollten (SeroMap). Die Tatsache, dass sich Bead-Binder nicht mit ungefärbten Polystyrol-Beads präabsorbieren ließen, deutet darauf hin, dass die Antikörper unspezifisch an die Farbstoffe banden, mit

denen die Beads intern gefärbt sind. SeroMap-Beads verringern das Problem durchaus, es ist jedoch im Wesentlichen die Serumvorinkubation in mehreren Blocksubstanzen, die den Anteil von Bead-Bindern auf unter 0.5 % drückt und damit für seroepidemiologische Studien tragbar macht (Kapitel 4.2.5.2.7).

Von den diversen Substanzen und Methoden, die für die Serumvorinkubation getestet wurden, erwiesen sich Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP) und ein kommerzielles Produkt namens CBS-K als wirksam gegen Bead-Binder. Gerade über die effektivste Substanz, CBS-K, kann hier auf Grund ihrer geschützten Zusammensetzung faktisch nichts gesagt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der wirksamen Komponente um ein hochmolekulares Polymer, das sich an die Oberfläche der Beads anlagert und mögliche Bindestellen für Bead-Binder maskiert.

Die Eigenschaften von PVA und PVP wurden in VLP-basierten HPV-ELISAs untersucht ([129](#)). Dabei zeigte sich, dass PVA das unspezifische Binden von Antikörpern an VLPs und an die verwendete 96-Lochplatte reduzieren konnte, während PVP die Sensitivität der Antikörper-Detektion steigerte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ein auf PVA basierendes Hydrogel in der Lage ist, Lipoproteine mit niedriger Dichte (*low density lipoproteins*, LDL) aus humanem Plasma zu entfernen ([130](#)), und dass PVA IgG-Auto-Antikörper gegen die Glycoproteine Desmoglein 1 und 3 aus humanem Serum entfernen konnte ([131](#)). Von PVP ist bekannt, dass es die Aggregation von mit Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) beschichteten Sphäroiden verringern kann ([132](#)). HPMC wird ebenfalls als Cholesterinsenker verwendet. Ein gemeinsamer Mechanismus für die publizierten Effekte und die Reduktion der unspezifischen Bindung von Antikörpern an Luminex-Beads ist schwer zu postulieren. LDL und Polystyrol sind stark hydrophob, während HPMC, PVA und PVP zumindest teilweise hydrophilen Charakter haben und sich in wässrigen Puffern (z.B. PBS) gut lösen lassen (Abbildung 5-1).

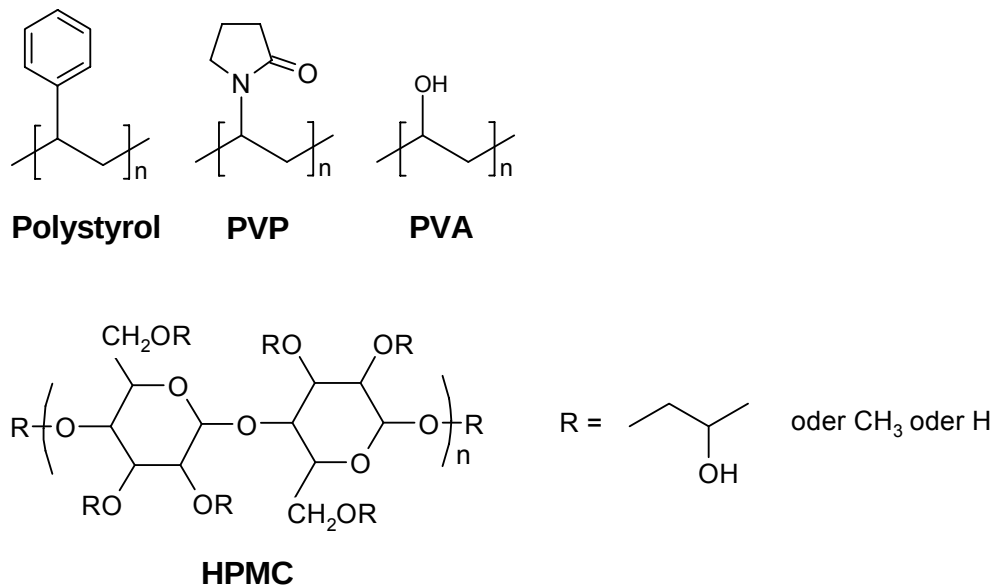


Abbildung 5-1 Strukturformeln von Polystyrol, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyvinylalkohol (PVA) und Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC).

5.3.1.4 Validierung von Multiplex-Serologie

Nach Optimierung aller Bedingungen erfüllt Multiplex-Serologie die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit und alle Anforderungen, die an ein Antikörperscreeningsystem für komplexe Antikörperantworten gestellt werden. Multiplex-Serologie ist ein Hochdurchsatz-Verfahren zur simultanen Analyse von Antikörper-Reaktivitäten gegen mehrere *in situ*-Affinitäts-gereinigte Antigene in einem Reaktionsansatz. Die Methode korreliert sehr gut mit ihrem Goldstandard (dem GST capture ELISA, Kapitel 4.3.2), ist sehr gut reproduzierbar (Kapitel 4.3.1) und sehr sensitiv (Kapitel 4.3.3) und spezifisch (Kapitel 4.3.4).

Multiplex-Serologie ermöglicht große Studien aber auch deshalb, weil die Methode relativ preisgünstig ist. Der Luminex-Analyzer kostet ca. 50.000 € und damit nicht mehr als viele andere laborübliche Großgeräte. Die Beads kosten ca. 0.04 € pro Sorte und Serum, die Waschplatten schlagen mit 0.17 € pro Serum zu Buche und Verbrauchsmaterial kostet weitere 0.18 € pro Serum. Für eine Studie mit 2000 Seren und 20 Antigenen fallen für Beads, Platten und Verbrauchsmaterial Kosten in Höhe von 2300 € an. Die tatsächlichen Personalkosten für eine derartige Studie belaufen sich auf fast 9000 €, was zeigt, dass auch in der Wissenschaft Zeit Geld ist. Eine derartige Studie mit einem nicht Multiplex-fähigen Sytem durchzuführen würde Monate dauern und wäre daher in jedem Fall teurer.

5.3.2 Seroepidemiologische Studien

Die technischen Aspekte der Analyse großer Serumsammlungen mit Multiplex-Serologie wurden bereits im Ergebnisteil diskutiert (Kapitel 4.4).

5.3.2.1 Alters- und geschlechtsabhängige Dynamik der Antikörper-Prävalenz gegen HPV L1-Proteine in der deutschen Normalbevölkerung

Die meisten serologischen Studien zu HPV konzentrieren sich auf den - auf Grund seiner Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren - am besten untersuchten HPV-Typ 16 und kranke Individuen. Zwar werden epidemiologische Studien grundsätzlich unter Einschluss gesunder Individuen durchgeführt, die Prävalenz von Antikörpern in diesen Kontrollgruppen hängt aber von deren Definition und den verwendeten Cut-Offs ab und variiert stark. (Das Problem, geeignete Kontrollgruppen für die Generierung von Cut-Offs für Antikörperreaktionen gegen L1-Proteine zu definieren, wurde bereits in Kapitel 4.4.1.1 diskutiert.) Hinzu kommt, dass serologische Studien, bei denen die Alters- und Geschlechtsdynamik der Seroprävalenz im Mittelpunkt stehen, bisher kaum durchgeführt wurden. Die in der vorliegenden Studie generierten Daten sind daher überraschend schwierig im Kontext der Literatur zu diskutieren.

Die hier vorgenommene Untersuchung zur allgemeinen Prävalenz von Antikörpern gegen HPV L1-Proteine zeigte, dass die häufigsten HPV-Typen in der deutschen Normalbevölkerung HPV-6b (mit einer Seroprävalenz von 48 %), HPV-1 (38 %) und HPV-8 (27 %) sind (Abbildung 4-38). Abgesehen von der hohen Seroprävalenz für HPV-6b fallen diese Werte in die Spanne der publizierten Daten. In drei Studien wurden in 59 % ([133](#)), 23 % ([134](#)) und 19 % ([135](#)) der gesunden Kontrollen Antikörper gegen HPV-1 L1 gefunden. Antikörper gegen HPV-8 L1 wurden in 0.3 % ([136](#)), 8 % ([137](#)), 20 % ([138](#)) und 32 % ([139](#)) der gesunden Kontrollen gefunden, Antikörper gegen HPV-6b L1 in 23 % ([140](#)) und 7 % ([141](#)). Die Spannweite der Daten lässt sich v.a. mit dem Einfluss des verwendeten Cut-Off sowie mit der Heterogenität der Kontrollgruppen und der Unterschiedlichkeit der verwendeten Methoden erklären und macht deutlich, wie wenig aussagekräftig ein Literaturvergleich auch für die anderen getesteten HPV-Typen ist.

Antikörper gegen die Haut infizierende B1-Typen treten in den meisten Fällen erstmals im Vorschul- oder Grundschulalter auf und werden danach kontinuierlich häufiger, bis mit ca. 50 Jahren ein Plateau erreicht wird (Abbildungen 4-39, 4-40). Der jahrzehntelange Anstieg deutet darauf hin, dass Serokonversion und vermutlich auch Infektion für diese Typen auch

noch als Erwachsener erfolgen können, das anschließende Plateau darauf, dass die Antikörper entweder lange überdauern oder sich ein Gleichgewicht zwischen Neuinfektion und Serokonversion einerseits und Klärung der Infektionen und Rückgang der Seroprävalenz andererseits einstellt. Erwähnenswert ist, dass die Prävalenz von Antikörpern gegen mindestens einen B1-Typ (Abbildung 4-40) mit 12 % (in 1- bis 5-Jährigen) bis 54 % (in 50- bis 59-Jährigen) wesentlich höher ist als in einer publizierten Arbeit beschrieben (12 %, (136)). Dies ist vermutlich auf die gesteigerte Sensitivität von Multiplex-Serologie und unterschiedliche Cut-Off-Definitionen zurückzuführen.

Die Altersabhängigkeit der Prävalenz von Antikörpern gegen HPV-1 und verschiedene Typen der A-Spezies (Abbildung 4-41) wurde insbesondere für HPV-6b und -11 bereits im Ergebnisteil diskutiert (Kapitel 4.4.1.2). Aus dem frühen Auftreten von Antikörpern gegen diese beiden HPV-Typen wurde geschlossen, dass Schmierinfektionen der primäre Übertragungsweg sein könnten, auch wenn die von diesen HPV-Typen ausgelösten Feigwarzen sexuell übertragen werden. Die Tatsache, dass HPV-6b- und -11-assoziierte Rekurrenzierende Respiratorische Papillomatose (RRP) auch in Kindern auftreten kann, könnte diese Theorie unterstützen. Der Rückgang der Seroprävalenz gegen HPV-16 und -18 L1 in über 50-Jährigen wird durch zwei veröffentlichte Arbeiten bestätigt (142,143). Auffällig ist die niedrige Seroprävalenz von HPV-2 (6 % in der gesamten Studie, 0 % in Kindern unter 11 Jahren), obwohl dieser Virustyp bei Kindern und Jugendlichen häufig zur Warzenbildung am Nagelansatz führt und in einer Publikation eine allgemeine Seroprävalenz von 42 % beschrieben ist (134). Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass dem überexprimierten HPV-2 L1-Antigen ein konformationelles Epitop fehlt. Versuche mit monoklonalen, HPV-2 VLP-spezifischen Antikörpern wären notwendig, um dies zu klären.

Antikörper gegen die mucotropen Hoch- und Niedrig-Risiko-Typen der A-Spezies (HPV-6b, -11, -16, -18) waren in Frauen häufiger als in Männern, während Männer und Frauen für die HPV-Typen der B1-Spezies sowie HPV-1 und -2 annähernd gleiche Seroprävalenzen aufwiesen. Die nach Alter und Geschlecht aufgelösten Analysen für HPV-6b, -11, -16, -18 und -1 (Abbildungen 4-43 bis 4-45) erbrachten gegenüber den nur alters- (Abbildungen 4-39 und 4-41) oder nur geschlechtsaufgelösten Daten (Abbildung 4-42) keine wesentlichen neuen Erkenntnisse. Die höhere Seroprävalenz in Frauen für die Schleimhaut-HPV-Typen weist vermutlich auf höhere Viruslast (*viral load*) hin, da das weibliche Epithel mehr Virusreplikation und -persistenz erlauben könnte. Im Gegensatz dazu sind klinisch auffällige persistierende Infektionen beim Mann sehr selten und daher wenig untersucht.

Die Analyse der Mehrfachpositivitäten gegen HPV-Typen mehrerer Spezies deutete interessante Zusammenhänge an: Mehrfachpositivität gegen Typen der B1-Spezies und HPV-1 war unterzufällig häufig, während Mehrfachpositivität gegen Typen der B1- und A-Spezies deutlich überzufällig häufig war (Abbildung 4-47). Auf Grund der niedrigen Fallzahlen können statistisch signifikante Analysen jedoch nur auf der Grundlage größerer Serumsammlungen unternommen werden.

5.3.2.2 Assoziation von Antikörpern gegen L1-Proteine von Haut-HPV-Typen mit NMSC

Im Gegensatz zu der eindeutigen Rolle, die die Hoch-Risiko-HPV-Typen der Genitalschleimhaut bei der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs spielen, ist die Rolle von HPV-Typen der Haut bei der Entstehung von nicht melanotischem Hautkrebs (*non melanoma skin cancer*, NMSC) nicht eindeutig geklärt ([144](#)).

Der Oberbegriff NMSC umfasst zwei verschiedene Krebserkrankungen: kutane Plattenepithelkarzinome (*squamous cell carcinoma*, SCC) und Basalzellkarzinome (*basal cell carcinoma*, BCC). UV-Licht ist der größte Risikofaktor für die Entstehung von NMSC, der häufigsten malignen Erkrankung der hellhäutigen Bevölkerung weltweit ([145](#)). Hinweise auf eine Rolle bestimmter HPV-Typen bei der Entstehung von NMSC ergaben sich aus Studien zur seltenen, genetisch prädisponierten Krankheit Epidermodysplasia verruciformis (EV) ([146](#)). Ein bis zwei Drittel der EV-Patienten entwickeln an sonnenexponierten Stellen SCC, und in 90 % dieser Tumore kann DNA von HPV-Typen der B1-Spezies detektiert werden, die daher auch als EV-Typen bezeichnet werden ([144](#)). Auf der anderen Seite wird DNA der EV-Typen auch (allerdings meist in episomaler Form und sehr geringer Kopienzahl) in der gesunden Bevölkerung ([147-151](#)), Immunsupprimierten, z.B. Transplantat-Empfängern ([152-154](#)), und Patienten mit Psoriasis (eine Krankheit, die sich durch extensive Proliferation von Keratinozyten auszeichnet) ([135,155,156](#)) gefunden.

Die viralen und zellulären Mechanismen, die zur Entstehung von NMSC in EV-Patienten führen, sind kaum verstanden ([96](#)). Möglich wäre eine Rolle von EV-HPV als Ko-Karzinogen durch die E6-vermittelte Degradation von BAK, einem Regulator UV-induzierter Apoptose ([157,158](#)).

In einer Vielzahl von Studien wurde DNA von HPV-EV-Typen in Patienten mit EV, aktinischer Keratose (AK, eine präkanzeröse Läsion der Epidermis), Psoriasis, BCC und SCC gefunden (Übersicht in [96](#)). Studien in den frühen 90er Jahren wurden mit Typ-spezifischen PCRs

durchgeführt und waren der großen Zahl unterschiedlicher EV-Typen in technischer Hinsicht nicht gewachsen (96). Dieses Problem wurde Mitte der 90er Jahre mit der Verwendung von Konsensus- oder degenerierten Primern weitgehend gelöst, hatte allerdings zur Folge, dass heutige Daten je nach der genutzten Methode sehr variabel sind (96). Darüber hinaus bringt die Entwicklung von PCR-Methoden mit gesteigerter Sensitivität immer die Gefahr von Kontaminationen mit sich (96). Aus diesen Gründen und wegen der scheinbaren Allgegenwärtigkeit von EV-HPV-DNA (151) stellen Serologie eine Alternative zu DNA-Detektions-Methoden dar, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Infektion mit EV-HPV und NMSC zu untersuchen (96).

Derartige Studien sind z.Z. aber noch selten, weil die entsprechende Technologie noch entwickelt und validiert werden muss. Mittels Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass Antikörper gegen HPV-8 L1 in Seren von 20 % der allgemeinen Bevölkerung, aber 40 % (BCC) bzw. 73 % (SCC) der Seren von NMSC-Patienten auftraten (138). In einigen neueren Studien kamen VLP-ELISA zum Einsatz. Stark *et al.* fanden Antikörper gegen HPV-8 in 46 % der NMSC-Patienten und 8 % der gesunden Bevölkerung (137). Erhöhte Prävalenzen von Antikörpern gegen HPV-5 wurden in EV- und Psoriasis-Patienten detektiert (156), nicht aber in Nierentransplantat-Empfängern (156), SCC- (135) und BCC-Patienten (159). Masini *et al.* untersuchten drei der auch in dieser Arbeit analysierten HPV-Typen in einer kleinen Fall-/Kontroll-Studie mit SCC-Patienten und fanden Antikörper gegen HPV-8 in 57 % der Fälle und 32 % der Kontrollen (OR 3.2, statistisch signifikant). Antikörper gegen HPV-36 waren statistisch insignifikant häufiger (20 % in Fällen, 8 % in Kontrollen). Für HPV-15 wurde überraschenderweise eine statistisch signifikante negative Assoziation mit SCC gefunden: 35 % der Fälle und 48 % der Kontrollen waren seropositiv (OR 0.4) (139). Feltkamp *et al.* untersuchten schließlich 6 der 7 EV-HPV-Typen, die auch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden (alle außer HPV-36). Antikörper gegen diese Typen waren fast immer mit SCC oder BCC assoziiert (OR > 1, statistisch signifikant für HPV-8 und SCC, HPV-8 und BCC, HPV-20 und BCC, sowie HPV-38 und SCC) (136).

In der vorliegenden Studie wurden positive NMSC-Assoziationen von Antikörpern gegen die L1-Proteine von HPV-5 (OR 1.2), -8 (OR 3.5, statistisch signifikant), -15 (OR 1.8), -24 (OR 1.6), -36 (OR 1.3) und -38 (OR 2.5) gefundenen (Abbildung 4-52). Diese Befunde sind also weitgehend - mit Ausnahme von Antikörpern gegen HPV-15 L1, für die im Gegensatz zu Masini *et al.* (139) eine positive NMSC-Assoziation gefunden wurde - im Einklang mit der Literatur. Überraschend ist die statistisch signifikante positive Assoziation von HPV-1 mit NMSC, obwohl in einer anderen Arbeit Antikörper gegen HPV-1 VLP in 29 % der BCC-, 33 % der SCC-Fälle und 19 % der Kontrollen gefunden wurden (135).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine starke Assoziation der untersuchten mucotropen HPV-Typen (2, 6b, 11, 16 und 18) mit NMSC gefunden (Abbildung 4-52). Die (statistisch nicht signifikante) negative Assoziation von HPV-16 mit NMSC könnte ein Artefakt der geringen Fallzahlen sein, obwohl in einer anderen Arbeit eine ähnliche Assoziation von Antikörpern gegen HPV-16 mit SCC (OR 0.6, statistisch insignifikant) und einer Untergruppe der BCC (OR 0.2, dito) in Patienten mit nur einem Typ von Hautkrebs (SCC, BCC, maligne Melanome als Kontrollgruppe) gefunden wurden (136).

Die Tatsache, dass Männer mit NMSC häufiger Antikörper gegen EV-HPV-Typen aufweisen als Frauen mit dieser Erkrankung (Abbildung 4-53), wird durch vorhandene Literatur gestützt. In Psoriasis-Erkrankten wurden Antikörper gegen HPV-8 häufiger in Männern als in Frauen gefunden (160), Antikörper gegen HPV-5 jedoch nicht (135). Feltkamp *et al.* fanden unter allen Seropositiven statistisch signifikant mehr Männer als Frauen für HPV-5 und -24 (Standardfehler-Kriterium, siehe Kapitel 4.4.1.3) (136).

Insgesamt kann man resümieren, dass die vorliegende Pilotstudie die vorhandene Literatur zur NMSC-Assoziation von Antikörpern gegen die L1-Proteine von EV-HPV-Typen untermauert und ergänzt. Die erzielten Ergebnisse können überprüft und wesentliche weitere Erkenntnisse gewonnen werden, wenn im Sommer 2005 6000 Seren von NMSC-Patienten aus zwei großen europäischen Studien zu dieser Thematik analysiert werden.

5.3.2.3 Assoziation von Antikörpern gegen E6- und E7-Proteine seltener Hoch-Risiko-HPV-Typen mit Zervix-Karzinomen

Gebärmutterhalskrebs ist (nach Brustkrebs) die zweithäufigste Krebsart bei Frauen weltweit (16). Der kausale Zusammenhang zwischen einer Infektion mit einem von 15 Hoch-Risiko (HR)-HPV-Typen und der Entstehung von Zervix-Karzinomen ist heute unbestritten.

HPV-Infektionen lösen häufig eine humorale Immunantwort aus. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen L1-Proteine, die überdauern und daher auch auf geklärte Infektionen hinweisen (161,162), werden Antikörper gegen E6- oder E7-Proteine überwiegend in Krebspatienten gefunden. Die Krebsassoziation dieser Antikörper wurde bisher nur für HPV-16 und -18 untersucht (51,53), weil es sich bei diesen beiden um die häufigsten HR-Typen handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob Antikörper gegen die E6- und E7-Proteine der selteneren HR-HPV-Typen 31, 33, 35, 45, 52 und 58 detektierbar sind und ob

auch sie mit Zervix-Karzinomen assoziiert sind. Da die Ergebnisse für die häufigen HPV-Typen 16 und 18 keine wesentlichen neuen Erkenntnisse mit sich brachten, konzentriert sich die vorliegende Diskussion auf die seltenen HR-HPV-Typen.

In Seren von Patientinnen mit DNA eines dieser Virustypen im Tumor wurden häufig Antikörper gegen die E6- oder E7-Proteine des entsprechenden Virustyps gefunden (HPV-31: in 3 von 5 Fällen; HPV-33: 2/9; HPV-35: 1/2; HPV-45: 7/9; HPV-52: 2/3; Seren von HPV-58 DNA-positiven Patientinnen standen nicht zur Verfügung; Tabellen 4-12 und 4-13). Auffällig ist, dass Antikörper gegen HPV-33 (2/9) wesentlich seltener waren als gegen HPV-45 (7/9), was auf eine unterschiedliche Immunogenität der E6- und E7-Proteine der beiden Typen oder eine unterschiedliche Exposition gegenüber dem Immunsystem hindeuten könnte. In Kontrollpersonen ohne Zervix-Karzinom sind Antikörper gegen seltene HR-Typen mit Prävalenzen von 1.0 - 3.2 % gegen E6- und 0.7 - 5.1 % gegen E7-Proteine selten (Abbildung 4-57). Trotz der niedrigen Fallzahlen ist dies ein starker Hinweis auf eine Krebsassoziation der untersuchten Antikörper.

Diese Assoziation wurde quantifiziert, indem die Seroreaktivitäten der Fall- und Kontrollgruppen mit Hilfe eines t-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht wurden. Signifikant unterschiedlich reagierten Fälle und Kontrollen bei den anti-E7-Antikörpern aller untersuchten seltenen HR-Typen und den anti-E6-Antikörpern von HPV-33, -35, -52 und -58 (Abbildungen 4-58 und 4-59). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass es Kreuzreaktionen mit den entsprechenden Proteinen der wesentlich häufigeren HPV-Typen 16 und 18 gibt, die besonders in stark reaktiven Seren gut sichtbar sind (Abbildung 4-60). Diese Kreuzreaktionen waren für E7- (bis 81 %, Abbildung 4-65) häufiger als für E6-Proteine (bis 25 %, Abbildung 4-62) und traten fast nur zwischen eng verwandten Virustypen einer Spezies auf (Abbildungen 4-62 bis 4-65), jedoch nicht in jedem Fall mit dem nach Protein-Sequenz-Homologie am nächsten verwandten Virustyp (Abbildung 4-62).

Auffällig, aber ungeklärt ist der Befund, dass zwar alle HPV-18 und -45 E7-positiven Seren stark miteinander kreuzreagierten (in vielen Fällen sogar mit annähernd gleich starker Seroreaktivität; Abbildung 4-65 und Tabelle 4-13) und auch die zwei HPV-45 E6-positiven Seren Kreuzreaktion mit HPV-18 E6 zeigten (dito, Tabelle 4-12), jedoch keines der 22 HPV-18 E6-positiven Seren mit HPV-45 E6 kreuzreagierte (Abbildung 4-63). Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass dem überexprimierten HPV-45 E6-Antigen ein konformationelles Epitop fehlt. Versuche mit experimentellen Seren könnten dabei helfen, dies zu klären.

In Einzelfällen traten Diskrepanzen zwischen DNA-Typisierungs- und serologischen Ergebnissen auf, deren Herkunft z.Z. noch ungeklärt ist. Es könnte sich um falsche oder unvollständige Typisierungen oder die fälschliche Zuordnung von Ergebnissen handeln. Eine Re-Typisierung der Tumoren ist kaum möglich, so dass es schwierig erscheint, in diesem Punkt Klarheit zu erlangen.

5.4 Ausblick

Multiplex-Serologie bietet die Möglichkeit, bis zu 1000 Seren pro Tag auf Antikörper gegen bis zu 100 gleichzeitig präsente Antigene zu analysieren. Dies ermöglicht größere Studien, mit denen sich auch niedrigere Assoziationen statistisch signifikant nachweisen lassen. Aus der ungeheuren Kapazität dieser Methode resultiert allerdings auch ihr der Haken: Die Bugwelle zu analysierender Daten und zu schreibender Publikationen wächst mit jeder Woche (Tabelle 4-9). Dieses Problem ist jedoch nicht methodischer Natur, und so könnte Multiplex-Serologie sich tatsächlich als Quantensprung für (HPV-)Serologie erweisen.

Auf Grund des etablierten modularen Expressionssystems ist die Herstellung weiterer Antigene für Multiplex-Serologie einfach und nicht auf HPV-Proteine beschränkt. Autoantikörper gegen p16 und p53 wurden bereits detektiert (Tabelle 4-9), und Projekte zur Entwicklung serologischer Tests zum Nachweis von *H.pylori*-Infektionen und assoziierten Krebserkrankungen haben bereits begonnen. Da das Luminex-System ein offene Plattform für Bindungsassays ist, gehen die Möglichkeiten über serologische Anwendungen hinaus. In Zusammenarbeit mit cand. biol. Markus Schmitt wird inzwischen ein Multiplex-HPV-Genotypisierungs-Assay entwickelt, der auf Bead-gekoppelten HPV-Typ-spezifischen Oligonukleotid-Sonden beruht. Erste Ergebnisse sind äußerst vielversprechend. Gleiches gilt für ein weiteres Projekt: Der Autor dieser Arbeit hat erste Schritte unternommen, ein Multiplex-System zur simultanen Messung der Affinität von Protein-Protein-Wechselwirkungen am Beispiel von pRb-E7-Interaktionen aufzubauen, das sich als nützlich für die Charakterisierung von Inhibitoren dieser Interaktion erweisen könnte.

Wir stehen gerade erst am Anfang...

6. Eigene Publikationen

publizierte oder im Druck befindliche Artikel

- **Prevalence of DNA of HPV type 16 but of no other types in tonsils with chronic tonsillitis.** Ren Wei Chen, Peter Sehr, Tim Waterboer, Ilmo Leivo, Michael Pawlita, Antti Vaheri, Leena-Maija Aaltonen. *J Clin Microbiol* (im Druck) (163)
- **Varicella-zoster Virus (VZV) Mediates a Delayed Host Shutoff Independent of Open Reading Frame (ORF) 17 Expression.** Tim Waterboer, Markus Rahaus, Manfred H. Wolff. *Virus Genes* (2002) 24:1, 49-56
- **New aspects of hepatic fibrosis.** David A. Brenner, Tim Waterboer, S.K. Choi, J.N. Lindquist, B. Stefanovic, E. Burchardt, M. Yamauchi, A. Gillan, R.A. Rippe. *J Hepatol* (2000) 32 (1 Suppl):32-8

eingereichte Artikel

- **Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on *in situ* Purified GST Fusion Proteins.** Tim Waterboer, Peter Sehr, Kristina M. Michael, Silvia Franceschi, John D. Nieland, Thomas O. Joos, Markus F. Templin, Michael Pawlita.

Artikel in Vorbereitung

- ***In situ* affinity purified GST fusion proteins as antigens for a Human Papillomavirus (HPV) Chip-Immunoassay.** Tim Waterboer, Peter Sehr, Ole Brandt, Thomas Conrad, Anette Jacob, Jörg Hoheisel, Michael Pawlita.
- **A flow cytometric method for detection of antibodies by particle bound 6xHis-tagged recombinant antigens: the Talon ELISA.** Michaela Pes, Tim Waterboer, Peter Sehr, Achim Schneider, Matthias Dürst, Andreas M. Kaufmann.

7. Abkürzungen

A (4, 7, 9, 10)	HPV-Spezies
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under curve</i>)
B1	HPV-Spezies
BCC	Basalzell-Karzinom (<i>basal cell carcinoma</i>)
BD	Becton Dickinson
Bis-Amino-PEG	Bis-(3-aminopropyl)-polyethylenglycol
BpS	Beads pro Sorte
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CBS-K	Superchemiblock
cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CI	Konfidenz-Intervall (<i>confidence interval</i>)
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
cVLP	chimärer Virus-artiger Partikel (<i>chimeric virus-like particle</i>)
DEDCS	Diethyldichlorsilan
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	HPV-Spezies oder früh (<i>early</i> , für Gene oder Genprodukte)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>)
ELISA	Enzym-gekoppeltes Immunabsorptionsverfahren (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EV	Epidermodysplasia verruciformis
F	Frauen
fn	falsch negativ
fp	falsch positiv
GC	Glutathion-Casein
Glut	Glutathion

GPTMS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
GST	Glutathion S-Transferase
HCV	Hepatitis C-Virus
HNSCC	Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Kehlkopfes (<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HPV	humane Papillomviren
HTLV-1	humanes T-lymphotropes Virus 1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ISA	Immunabsorptionsverfahren (<i>immunosorbent assay</i>)
K _d	Dissoziationskonstante
L	Lysat (für PAA-Gele/WB) oder spät (<i>late</i> , für Gene oder Genprodukte)
LDL	Lipoproteine mit niedriger Dichte (<i>low density lipoproteins</i>)
M	Marker (für PAA-Gele/WB) oder Männer
MBS	<i>m</i> -Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MFI	Median Fluoreszenz-Intensität
MMTV	Maus-Mamma-Tumor-Virus
MPTMS	3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan
NaAc	Natriumacetat
NEM	N-Ethylmaleimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMSC	nicht melanotischer Hautkrebs (<i>non melanoma skin cancer</i>)
Nuc	Nukleophil
OR	<i>odds ratio</i>
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0.05 % Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phytoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PV	Papillomviren
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVX	synonym für PVA plus PVP

RFU	relative Fluoreszenz-Einheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
rn	richtig negativ
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
rp	richtig positiv
RRP	rekurrierende respiratorische Papillomatose
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Raumtemperatur
SCC	Plattenepithel-Karzinom (<i>squamous cell carcinoma</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
SSMPB	Sulfosuccinimidyl-4-(<i>p</i> -maleimidophenyl)butyrat
Strep-PE	Streptavidin-R-Phycoerythrin
SV40	<i>simian virus 40</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Ü	Überstand
UV	ultraviolett
VCA	Viruskapsid-Antigen (<i>viral capsid antigen</i>)
VERA	Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik
VLP	Virus-artiger Partikel (<i>virus-like particle</i>)
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
wt	Wildtyp

8. Literatur

1. **Darnell J, Lodish H, Baltimore D.** Molekulare Zellbiologie. de Gruyter, 1994
2. **Modrow S, Falke D.** Molekulare Virologie. Spektrum, 2002
3. **Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD.** Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 1996;16:952-9
4. **zur Hausen H.** Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 2001;20:7820-3
5. **Fields B, Knipe D, Howley P, Chanock R, Monath T, Melnick J, et al.** Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, 1996
6. **Menaker RJ, Sharaf AA, Jones NL.** Helicobacter pylori infection and gastric cancer: host, bug, environment, or all three? *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:429-35
7. **Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al.** Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer* 2004;111:431-9
8. **Kondo S, Horikawa T, Takeshita H, Kanegane C, Kasahara Y, Sheen TS, et al.** Diagnostic value of serum EBV-DNA quantification and antibody to viral capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Sci* 2004;95:508-13
9. **De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27
10. **Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L.** Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo J* 1994;13:5451-9
11. **Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-7
12. **zur Hausen H.** Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78
13. **Bravo IG, Alonso A.** Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 2004;78:13613-26
14. **Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R.** The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* 1989;170:334-9
15. **Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D.** The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 1995;211:227-33

16. **zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50
17. **Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, et al.** Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1997;65:121-9
18. **Durst M, Bosch FX, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H.** Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol* 1991;65:796-804
19. **Chow LT, Broker TR.** In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. *Clin Dermatol* 1997;15:217-27
20. **Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC.** Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 1991;60:1445-56
21. **Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12180-4
22. **Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, et al.** Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 1995;206:126-35
23. **Sehr P, Muller M, Hopfl R, Widschwendter A, Pawlita M.** HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J Virol Methods* 2002;106:61-70
24. **Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, Garcea RL.** Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* 1997;71:2988-95
25. **Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC.** Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 2000;5:557-67
26. **Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL.** Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 2001;307:173-82
27. **Yuan H, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL, Schlegel R.** Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* 2001;75:7848-53

28. **Rose RC, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C, Garcea RL.** Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol* 1998;72:6151-4
29. **Dillner J.** The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1999;9:423-30
30. **Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G.** Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171:1026-30
31. **Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, et al.** Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169:235-40
32. **Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8
33. **Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, et al.** Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11553-7
34. **Kirnbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT.** A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:494-9
35. **Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS.** Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology* 1996;224:477-86
36. **Hines JF, Ghim SJ, Christensen ND, Kreider JW, Barnes WA, Schlegel R, Jenson AB.** The expressed L1 proteins of HPV-1, HPV-6, and HPV-11 display type-specific epitopes with native conformation and reactivity with neutralizing and nonneutralizing antibodies. *Pathobiology* 1994;62:165-71
37. **Combita AL, Bravo MM, Touze A, Orozco O, Coursaget P.** Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2002;97:796-803
38. **Mund K, Han C, Daum R, Helfrich S, Muller M, Fisher SG, et al.** Detection of human papillomavirus type 16 DNA and of antibodies to human papillomavirus type 16 proteins in children. *Intervirology* 1997;40:232-7
39. **Kjellberg L, Wang Z, Wiklund F, Edlund K, Angstrom T, Lenner P, et al.** Sexual behaviour and papillomavirus exposure in cervical intraepithelial neoplasia: a population-based case-control study. *J Gen Virol* 1999;80 (Pt 2):391-8

-
40. **Andersson-Ellstrom A, Dillner J, Hagmar B, Schiller J, Forssman L.** No serological evidence for non-sexual spread of HPV16. *Lancet* 1994;344:1435
 41. **Andersson-Ellstrom A, Dillner J, Hagmar B, Schiller J, Sapp M, Forssman L, Milsom I.** Comparison of development of serum antibodies to HPV16 and HPV33 and acquisition of cervical HPV DNA among sexually experienced and virginal young girls. A longitudinal cohort study. *Sex Transm Dis* 1996;23:234-8
 42. **af Geijersstam V, Eklund C, Wang Z, Sapp M, Schiller JT, Dillner J, Dillner L.** A survey of seroprevalence of human papillomavirus types 16, 18 and 33 among children. *Int J Cancer* 1999;80:489-93
 43. **Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, et al.** Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis* 1996;174:937-43
 44. **Viscidi RP, Kotloff KL, Clayman B, Russ K, Shapiro S, Shah KV.** Prevalence of antibodies to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in relation to cervical HPV infection among college women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:122-6
 45. **Dillner J, Kallings I, Brihmer C, Sikstrom B, Koskela P, Lehtinen M, et al.** Seropositivities to human papillomavirus types 16, 18, or 33 capsids and to Chlamydia trachomatis are markers of sexual behavior. *J Infect Dis* 1996;173:1394-8
 46. **Cason J, Kambo PK, Best JM, McCance DJ.** Detection of antibodies to a linear epitope on the major coat protein (L1) of human papillomavirus type-16 (HPV-16) in sera from patients with cervical intraepithelial neoplasia and children. *Int J Cancer* 1992;50:349-55
 47. **Le Cann P, Touze A, Enogat N, Leboulleux D, Mouglin C, Legrand MC, et al.** Detection of antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 virions by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant HPV 16 L1 capsids produced by recombinant baculovirus. *J Clin Microbiol* 1995;33:1380-2
 48. **Dillner J, Knekt P, Schiller JT, Hakulinen T.** Prospective seroepidemiological evidence that human papillomavirus type 16 infection is a risk factor for oesophageal squamous cell carcinoma. *Bmj* 1995;311:1346
 49. **Dillner J.** Disappearance of antibodies to HPV 16 E7 after treatment for cervical cancer. *Lancet* 1993;341:1594
 50. **Di Lonardo A, Marcante ML, Poggiali F, Venuti A.** HPV 16 E7 antibody levels in cervical cancer patients: before and after treatment. *J Med Virol* 1998;54:192-5
 51. **Zumbach K, Kisseljov F, Sacharova O, Shaichaev G, Semjonova L, Pavlova L, Pawlita M.** Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer* 2000;85:313-8

-
52. **Stanley M.** Antibody reactivity to HPV E6 and E7 oncoproteins and early diagnosis of invasive cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:3-4
 53. **Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, et al.** Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1998;36:475-80
 54. **Nindl I, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Farmanara N, Fisher S, Gross G, et al.** Antibodies against linear and conformational epitopes of the human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 oncoproteins in sera of cervical cancer patients. *Arch Virol* 1994;137:341-53
 55. **Baay MF, Duk JM, Groenier KH, Burger MP, de Bruijn HW, Hollema H, et al.** Relation between HPV-16 serology and clinico-pathological data in cervical carcinoma patients: prognostic value of anti-E6 and/or anti-E7 antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:211-5
 56. **Ghosh AK, Smith NK, Stacey SN, Glew SS, Connor ME, Arrand JR, Stern PL.** Serological response to HPV 16 in cervical dysplasia and neoplasia: correlation of antibodies to E6 with cervical cancer. *Int J Cancer* 1993;53:591-6
 57. **Tosi P, Pallini V, Cintonino M, Bugnoli M, Covacci A, Petracca R, et al.** Use of antibodies against a synthetic peptide of the E6 protein of human papillomavirus (HPV) type 16 for the diagnosis of genital HPV lesions. *Cytopathology* 1993;4:3-15
 58. **Muller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, et al.** Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* 1992;187:508-14
 59. **Muller M, Viscidi RP, Ulken V, Bavinck JN, Hill PM, Fisher SG, et al.** Antibodies to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus (HPV) type 16 in patients with HPV-associated diseases and in the normal population. *J Invest Dermatol* 1995;104:138-41
 60. **Zumbach K, Hoffmann M, Kahn T, Bosch F, Gottschlich S, Gorogh T, et al.** Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000;85:815-8
 61. **Rosales R, Lopez-Contreras M, Cortes RR.** Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA. *J Med Virol* 2001;65:736-44
 62. **Lehtinen M, Leminen A, Kuoppala T, Tiikkainen M, Lehtinen T, Lehtovirta P, et al.** Pre- and posttreatment serum antibody responses to HPV 16 E2 and HSV 2 ICP8 proteins in women with cervical carcinoma. *J Med Virol* 1992;37:180-6
 63. **Stellato G, Paavonen J, Nieminen P, Hibma M, Vilja P, Lehtinen M.** Diagnostic phase antibody response to the human papillomavirus type 16 E2 protein is associated

- with successful treatment of genital HPV lesions with systemic interferon alpha-2b. *Clin Diagn Virol* 1997;7:167-72
64. **Lehtinen M, Leminen A, Paavonen J, Lehtovirta P, Hyoty H, Vesterinen E, Dillner J.** Predominance of serum antibodies to synthetic peptide stemming from HPV 18 open reading frame E2 in cervical adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1992;45:494-7
65. **Jochmus I, Bouwes Bavinck JN, Gissmann L.** Detection of antibodies to the E4 or E7 proteins of human papillomaviruses (HPV) in human sera by western blot analysis: type-specific reaction of anti-HPV 16 antibodies. *Mol Cell Probes* 1992;6:319-25
66. **Engvall E, Perlman P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:871-4
67. **Sehr P, Zumbach K, Pawlita M.** A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods* 2001;253:153-62
68. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17
69. **Seidlin M, Takiff HE, Smith HA, Hay J, Straus SE.** Detection of varicella-zoster virus by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. *J Med Virol* 1984;13:53-61
70. **Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, et al.** Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001;293:2101-5
71. **MacBeath G, Schreiber SL.** Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000;289:1760-3
72. **Haab BB, Dunham MJ, Brown PO.** Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001;2
73. **Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S, Joos TO.** Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* 2003;3:2155-66
74. **Templin MF, Stoll D, Bachmann J, Joos TO.** Protein microarrays and multiplexed sandwich immunoassays: what beats the beads? *Comb Chem High Throughput Screen* 2004;7:223-9
75. **Franceschi S, Rajkumar T, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Sharmila A, Snijders PJ, et al.** Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: a case-control study. *Int J Cancer* 2003;107:127-33
76. **Hammouda D, Munoz N, Herrero R, Arslan A, Bouhadeb A, Oublil M, et al.** Cervical carcinoma in Algiers, Algeria: human papillomavirus and lifestyle risk factors. *Int J Cancer* 2005;113:483-9

-
77. **Anders H, Rosenbauer J, Matiaske B.** Repräsentative Verzehrstudie in der Bundesrepublik Deutschland incl. West-Berlin. Schriftenreihe der Arbeitsgemeinschaft Ernährungsverhalten. Umschau Verlag, 1990
 78. **MacArthur H, Walter G.** Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 1984;52:483-91
 79. **Sambrook J, Russell D.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
 80. **Angenendt P, Glokler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ.** Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal Biochem* 2002;309:253-60
 81. **Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, Diehl F, Hoheisel JD.** Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* 2003;3:254-64
 82. **Keen JH, Jakoby WB.** Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem* 1978;253:5654-7
 83. **Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, Gemmell A, Shick V, Proudnikov D, et al.** Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal Biochem* 1997;250:203-11
 84. **Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD.** Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E38
 85. **Brandt O, Hoheisel JD.** Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol* 2004;22:617-22
 86. **Staros JV, Wright RW, Swingle DM.** Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem* 1986;156:220-2
 87. **Friguet B, Chaffotte AF, Djavadi-Ohanian L, Goldberg ME.** Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1985;77:305-19
 88. **Geigy J.** Wissenschaftliche Tabellen. J.R. Geigy AG, 1968
 89. **Crowther J.** The ELISA Guidebook. Humana Press, 2001
 90. **Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27
 91. **Michael K.** Antikörperantwort gegen seltene Hochrisiko-Typen von humanen Papillomviren bei Patientinnen mit Gebärmutterhalskrebs und bei gesunden Probanden [Diplomarbeit]. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004
 92. **Gašparic M.** Cross-protective vaccination against different papillomavirus types [Master Thesis]. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004
-

-
93. **Sehr P, Waterboer T, Pawlita M.** Antibodies to L1 of 13 HPV-Types in the German Normal Population [Conference Proceedings]. 21st International Papillomavirus Conference 2004. Mexico City, Mexiko, 2004
 94. **Kerzel S.** Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Lassavirus-Antikörpern [Diplomarbeit]. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004
 95. **Kreutz M.** Klonierung von p53 in pGEXtag, Proteinexpression, Suche nach p53-Antikörpern [Praktikumsbericht]. DKFZ, 2004
 96. **Harwood CA, Proby CM.** Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:101-14
 97. **Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, et al.** Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 2000;26:283-9
 98. **Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et al.** Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002;8:295-301
 99. **Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A.** Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2002;48:121-30
 100. **Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M.** High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biotechniques* 1999;27:778-80, 82-6, 88
 101. **Wiese R, Belosludtsev Y, Powdrill T, Thompson P, Hogan M.** Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin Chem* 2001;47:1451-7
 102. **Joos TO, Schrenk M, Hopfl P, Kroger K, Chowdhury U, Stoll D, et al.** A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000;21:2641-50
 103. **Akkoyun A, Bilitewski U.** Optimisation of glass surfaces for optical immunosensors. *Biosens Bioelectron* 2002;17:655-64
 104. **Hodneland CD, Lee YS, Min DH, Mrksich M.** Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5048-52
 105. **Houseman BT, Mrksich M.** Towards quantitative assays with peptide chips: a surface engineering approach. *Trends Biotechnol* 2002;20:279-81
 106. **Rubina AY, Dementieva EI, Stomakhin AA, Darii EL, Pan'kov SV, Barsky VE, et al.** Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* 2003;34:1008-14, 16-20, 22

-
107. **Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A.** Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem* 2000;278:123-31
108. **Vasiliskov AV, Timofeev EN, Surzhikov SA, Drobyshev AL, Shick VV, Mirzabekov AD.** Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization. *Biotechniques* 1999;27:592-4, 6-8, 600 passim
109. **Earley MC, Vogt RF, Jr., Shapiro HM, Mandy FF, Kellar KL, Bellisario R, et al.** Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. *Cytometry* 2002;50:239-42
110. **Gordon RF, McDade RL.** Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1997;43:1799-801
111. **Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR, Jr.** Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1997;43:1749-56
112. **Vignali DA.** Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000;243:243-55
113. **Carson RT, Vignali DA.** Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1999;227:41-52
114. **McHugh TM, Viele MK, Chase ES, Recktenwald DJ.** The sensitive detection and quantitation of antibody to HCV by using a microsphere-based immunoassay and flow cytometry. *Cytometry* 1997;29:106-12
115. **Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW.** Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods* 2003;53:245-52
116. **Prabhakar U, Eirikis E, Davis HM.** Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *J Immunol Methods* 2002;260:207-18
117. **Ye F, Li MS, Taylor JD, Nguyen Q, Colton HM, Casey WM, et al.** Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat* 2001;17:305-16
118. **Seideman J, Peritt D.** A novel monoclonal antibody screening method using the Luminex-100 microsphere system. *J Immunol Methods* 2002;267:165-71
119. **Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, Esser MT.** Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:108-15
-

-
120. **Martins TB.** Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:41-5
121. **Jones LP, Zheng HQ, Karron RA, Peret TC, Tsou C, Anderson LJ.** Multiplex assay for detection of strain-specific antibodies against the two variable regions of the G protein of respiratory syncytial virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:633-8
122. **Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, MacKenzie BA, Striley CA, Semenova V, et al.** Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:50-5
123. **Pickering JW, Martins TB, Schroder MC, Hill HR.** Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:872-6
124. **Gilburd B, Abu-Shakra M, Shoenfeld Y, Giordano A, Bocci EB, delle Monache F, Gerli R.** Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjogren's syndrome: the ANA evaluation--a homogeneous, multiplexed system. *Clin Dev Immunol* 2004;11:53-6
125. **Wong SJ, Demarest VL, Boyle RH, Wang T, Ledizet M, Kar K, et al.** Detection of human anti-flavivirus antibodies with a west nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *J Clin Microbiol* 2004;42:65-72
126. **Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA.** Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay. *Early Hum Dev* 2001;64:21-5
127. **Dasso J, Lee J, Bach H, Mage RG.** A comparison of ELISA and flow microsphere-based assays for quantification of immunoglobulins. *J Immunol Methods* 2002;263:23-33
128. **Rehm H.** Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Spektrum Verlag, 2002
129. **Studentsov YY, Schiffman M, Strickler HD, Ho GY, Pang YY, Schiller J, et al.** Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 2002;40:1755-60
130. **Maaskant N, Bantjes A, Kempen HJ.** Removal of low density lipoprotein from blood plasma using cross-linked, sulfated polyvinylalcohol. *Atherosclerosis* 1986;62:159-66
131. **Luftl M, Stauber A, Mainka A, Klingel R, Schuler G, Hertl M.** Successful removal of pathogenic autoantibodies in pemphigus by immunoabsorption with a tryptophan-linked polyvinylalcohol adsorber. *Br J Dermatol* 2003;149:598-605
132. **Wong T, Heng P, Yeo T, Chan L.** Influence of polyvinylpyrrolidone on aggregation propensity of coated spheroids. *Int J Pharm* 2002;242:357-60
-

-
133. **Carter JJ, Hagensee MB, Lee SK, McKnight B, Koutsky LA, Galloway DA.** Use of HPV 1 capsids produced by recombinant vaccinia viruses in an ELISA to detect serum antibodies in people with foot warts. *Virology* 1994;199:284-91
134. **Steele K, Shirodaria PV, Pfister H, Pollock B, Fuchs P, Merrett JD, et al.** A study of HPV 1, 2 and 4 antibody prevalence in patients presenting for treatment with cutaneous warts to general practitioners in N. Ireland. *Epidemiol Infect* 1988;101:537-46
135. **Favre M, Majewski S, Noszczyk B, Maienfisch F, Pura A, Orth G, Jablonska S.** Antibodies to human papillomavirus type 5 are generated in epidermal repair processes. *J Invest Dermatol* 2000;114:403-7
136. **Feltkamp MC, Broer R, di Summa FM, Struijk L, van der Meijden E, Verlaan BP, et al.** Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* 2003;63:2695-700
137. **Stark S, Petridis AK, Ghim SJ, Jenson AB, Bouwes Bavinck JN, Gross G, et al.** Prevalence of antibodies against virus-like particles of Epidermodysplasia verruciformis-associated HPV8 in patients at risk of skin cancer. *J Invest Dermatol* 1998;111:696-701
138. **Steger G, Olszewsky M, Stockfleth E, Pfister H.** Prevalence of antibodies to human papillomavirus type 8 in human sera. *J Virol* 1990;64:4399-406
139. **Masini C, Fuchs PG, Gabrielli F, Stark S, Sera F, Ploner M, et al.** Evidence for the association of human papillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals. *Arch Dermatol* 2003;139:890-4
140. **Matsumoto K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.** Antibodies to human papillomavirus 16, 18, 58, and 6b major capsid proteins among Japanese females. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:369-75
141. **Kochel HG, Monazahian M, Sievert K, Hohne M, Thomssen C, Teichmann A, et al.** Occurrence of antibodies to L1, L2, E4 and E7 gene products of human papillomavirus types 6b, 16 and 18 among cervical cancer patients and controls. *Int J Cancer* 1991;48:682-8
142. **Wang SS, Schiffman M, Herrero R, Carreon J, Hildesheim A, Rodriguez AC, et al.** Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica. *Br J Cancer* 2004;91:1269-74
143. **Wang SS, Schiffman M, Shields TS, Herrero R, Hildesheim A, Bratti MC, et al.** Seroprevalence of human papillomavirus-16, -18, -31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. *Br J Cancer* 2003;89:1248-54
144. **Pfister H, Ter Schegget J.** Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997;15:335-47
-

-
145. **Alam M, Ratner D.** Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001;344:975-83
146. **Majewski S, Jablonska S.** Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 1995;131:1312-8
147. **Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, ter Schegget J, Green A.** Association between epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hair and solar keratoses. *J Invest Dermatol* 2001;117:1108-12
148. **Boxman IL, Berkhout RJ, Mulder LH, Wolkers MC, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J.** Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol* 1997;108:712-5
149. **Boxman IL, Mulder LH, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, Ter Schegget J.** Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 1999;141:246-9
150. **Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A.** Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer* 2000;86:118-21
151. **Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG.** The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol* 2000;74:11636-41
152. **Berkhout RJ, Bouwes Bavinck JN, ter Schegget J.** Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:2087-96
153. **de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, ter Schegget J, Vermeer BJ, de Fijter JW, Bruijn JA, et al.** The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation* 2000;69:44-9
154. **Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM.** Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000;61:289-97
155. **Weissenborn SJ, Hopfl R, Weber F, Smola H, Pfister HJ, Fuchs PG.** High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J Invest Dermatol* 1999;113:122-6
-

-
156. Favre M, Orth G, Majewski S, Baloul S, Pura A, Jablonska S. Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 1998;110:311-7
157. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 2000;14:3065-73
158. Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;19:592-8
159. Wieland U, Ritzkowsky A, Stoltidis M, Weissenborn S, Stark S, Ploner M, et al. Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol* 2000;115:124-8
160. Bouwes Bavinck JN, Stark S, Petridis AK, Marugg ME, Ter Schegget J, Westendorp RG, et al. The presence of antibodies against virus-like particles of epidermodysplasia verruciformis-associated humanpapillomavirus type 8 in patients with actinic keratoses. *Br J Dermatol* 2000;142:103-9
161. af Geijersstam V, Kibur M, Wang Z, Koskela P, Pukkala E, Schiller J, et al. Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. *J Infect Dis* 1998;177:1710-4
162. Shah KV, Viscidi RP, Alberg AJ, Helzlsouer KJ, Comstock GW. Antibodies to human papillomavirus 16 and subsequent in situ or invasive cancer of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:233-7
163. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, Aaltonen L. Prevalence of DNA of HPV type 16 but of no other types in tonsils with chronic tonsillitis. *J Clin Microbiol* (im Druck)