

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe Rüdiger Bräuning

aus: Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels Phage Display

Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard K. F. Bautz
Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Adenoviren	5
2.2	Protein-Protein Wechselwirkungen.....	9
3	MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1	Abkürzungen.....	13
3.2	Materialien.....	13
3.2.1	Computeranalysen	13
3.2.2	Chromatographische Trennmedien	13
3.2.3	Chemikalien	14
3.2.4	Enzyme	14
3.2.5	Oligonukleotide	14
3.2.6	Bakterien- und Phagenstämme	14
3.2.7	Kulturmedien und Kulturböden	14
3.2.8	Genbanken.....	15
3.2.9	Elektrophorese	15
3.2.9.1	DNA-Agarosegele.....	15
3.2.9.2	DNA-Acrylamid Gele.....	16
3.2.9.3	DNA-Acrylamid Sequenziergele.....	16
3.2.9.4	Proteingele.....	16
3.2.10	sonstige Lösungen.....	17
3.2.11	Radiochemikalien	18
3.2.12	Photomaterialien	18
3.2.13	verwendete Kits	18
3.2.14	Antikörper.....	18
3.2.15	Weitere Gebrauchsmaterialien	18
3.2.16	Eichstandards	19
3.2.17	Proteinaufreinigung.....	19
3.2.18	Panning.....	19
3.2.19	ELISA.....	20
3.3	Methoden.....	20
3.3.1	Nukleinsäuren	20
3.3.1.1	Präparation genomischer DNA	20
3.3.1.2	Manipulation von DNA	21
3.3.1.3	DNA Sequenzierung	22
3.3.1.4	Auftrennen von DNA in horizontalen Agarose-Gelen.....	23
3.3.2	Proteine	24
3.3.2.1	Protein Expression.....	24
3.3.2.2	Proteinanalytik	24
3.3.2.3	Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen.....	25
3.3.2.4	Western Blot	29
3.3.2.5	Herstellung synthetischer Peptide nach Merrifield.....	29
3.3.3	Immunoassays	30
3.3.3.1	Aufreinigung von Proteinen über ihren His-Tag.....	30
3.3.3.2	Aufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose	30
3.3.3.3	Biotinylierung von Antikörpern	31
3.3.3.4	Dot-Blot zur Überprüfung der Biotinylierung	31
3.3.3.5	ELISA.....	31
3.3.3.6	Immunnachweis mit Western Blot.....	32
3.3.3.7	Immunnachweis der synthetischen Peptiden	32
3.3.4	Bakterien	32

4	ERGEBNISSE	33
4.1	Knob-Antikörper	33
4.2	Peptide Scan	57
4.3	Monomeres Knob	73
4.4	Erweiterung des Phage Display	75
4.4.1	T7Select human brain	75
4.4.2	T7Select human lung	79
4.4.3	Optimieren des Systems	80
4.4.4	Lambda foo	83
5	DISKUSSION	84
5.1	Monomeres Knob	86
5.2	Adenovirale Fiber und zellulärer Rezeptor	86
5.3	Schlussfolgerungen	107
5.4	Methodische Aspekte.....	107
5.5	Auswahlkriterien für Phage Display Systeme	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	110

1 Zusammenfassung

Adenoviren docken in spezifischer Weise an ihren zellulären Rezeptor CAR an. Da Adenoviren als Vektoren bei der Gentherapie eingesetzt werden, ist es äußerst interessant, den genauen Bindungsmechanismus zwischen den Adenoviren und humanen Zellen besser zu verstehen. Mit diesem Wissen können die Vektoren, den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend, modifiziert werden. Als erster und wichtigster Schritt hierfür sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bindungsrelevante Aminosäuren identifiziert werden. Hierzu wurden die Epitope von vier neutralisierenden, gegen das adenovirale Knob-Protein gerichteten, Antikörpern bestimmt. Diese Epitope können mit der Knob-CAR-Interaktionsstelle identisch sein, müssen es aber nicht. Für eine Neutralisation der Bindung reicht es aus, diese sterisch zu behindern (z.B. durch Bindung in unmittelbarer Nähe). Beide Möglichkeiten wurden gefunden. Die exklusive Erkennung trimeren Knobs durch die in dieser Studie benutzten Antikörper impliziert, dass die dreidimensionale Struktur von Knob essentiell ist. Eine Erklärung ist, dass die zugehörigen nicht-linearen Epitope nur gebildet werden, wenn mehr als eine Polypeptidkette des Knob-Proteins an der Bindung beteiligt ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Trimerisierung zu konformationellen Änderungen in den monomeren Untereinheiten führt, welche dann die korrekte Präsentation der Aminosäuren des Epitops erlauben. Auch hier wurden wieder beide Möglichkeiten gefunden. Die Antikörper 7A2.7 und 1D6.14 scheinen dasselbe Epitop zu erkennen. Es zeigte sich, dass ein Vergleich der Ergebnisse aus dem Phage Display und den ELISA Tests erste Hinweise auf falschpositive Klone liefert und dass identifizierte Konsensussequenzen noch weiter analysiert und verifiziert werden müssen. Die über das Phage Display angereicherten Sequenzen konnten in der Aminosäuresequenz des Knob nicht als lineare Abfolge gefunden werden. Diese Sequenzen können einzelne Komponenten eines nicht-linearen Epitops oder eines Mimotops repräsentieren. Unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur des Knob wurden Vorschläge für die Lokalisation der Antikörperepitope gemacht. Diese konnten durch die zwischenzeitlich verfügbaren Daten aus Kokristallisationsexperimenten (Knob-CAR) bestätigt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die untersuchten Antikörper Epitope vorgeschlagen und mit verschiedenen Methoden verifiziert wurden. Hierbei zeigte sich, dass nur die Kombination mehrerer Methoden erfolgversprechend ist. Um konformationelle Epitope in Zukunft besser charakterisieren zu können wurde die Methode des Peptide Scans etabliert und optimiert. Für die Suche nach unbekannte Bindungspartnern wurden die Möglichkeiten des Phage Displays überprüft und eine neue Primingstrategie für random primed cDNA Banken entwickelt.

Teile diese Arbeit wurden 1999 auf der Cold Spring Harbor Konferenz „Vector Targeting Strategies for Therapeutic Gene Delivery“ präsentiert (Titel des Posters: „Epitope-mapping of neutralizing monoclonal antibodies against Adenovirus fiber knob“). Teile der Methoden wurden in „Peptide arrays on membrane supports – synthesis and applications“ (Ed.: Koch und Mahler, 2001) veröffentlicht.

2 Einleitung

2.1 Adenoviren

Man kann die Adenoviren in zwei Gruppen einteilen. Die Subgruppen A, F kommen im gastrointestinalen, die Subgruppen B, C und E im respiratorischen Trakt des Menschen vor (Bailey und Mautner, 1994). Adenoviren sind DNA-Viren. Sie besitzen keine Hülle aber herausragende Fiber-Proteine und sind ca. 100 nm groß.

Ein Fiber-Protein ist ein Homotrimer und ragt von den Ecken des ikosaedrischen Virions (Abbildung 1) hervor. Es besteht aus drei Domänen: Knob, Schaft und Schwanz. Der Schwanz verankert die Fiber in der Penton-Basis. Der Schaft enthält repetitive Einheiten (4-22 Wiederholungen eines 15-mer Motivs, abhängig vom jeweiligen Adenovirus-Serotyp) und umfaßt 320 bis 587 Aminosäuren. 1992 schlugen Stouten *et al.* eine dreifache Helix für den Schaft vor.

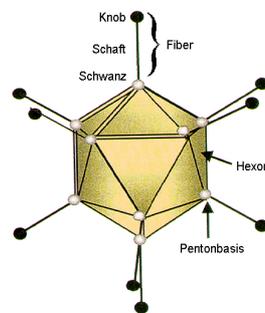


Abbildung 1. Schematischer Aufbau eines Adenoviruses (nach Bilbao, 1998)

Knob ist entscheidend für die Wirtsspezifität (Fender *et al.*, 1995, Henry *et al.*, 1994, Krasnykh *et al.*, 1996, Louis *et al.*, 1994, Roelvink 1996, Stevenson *et al.*, 1995). Rekombinantes Knob (AS 386-581, 21,3 kDa) kann in *E. coli* exprimiert werden und konkurriert mit dem adenoviralen Serotyp 5 (Ad5) um den Rezeptor (Xia *et al.* 1994).

Die Röntgenkristallstruktur von Ad5-Knob wurde von Xia *et al.* 1994 gelöst. Jedes Knob-Monomer stellt ein 8-strängiges antiparalleles beta-Sandwich dar. Die trimere Form (Abbildung 2) ist eindeutig bevorzugt und zeigt einen dreiblättrigen Propeller mit einer oberflächlichen Vertiefung.

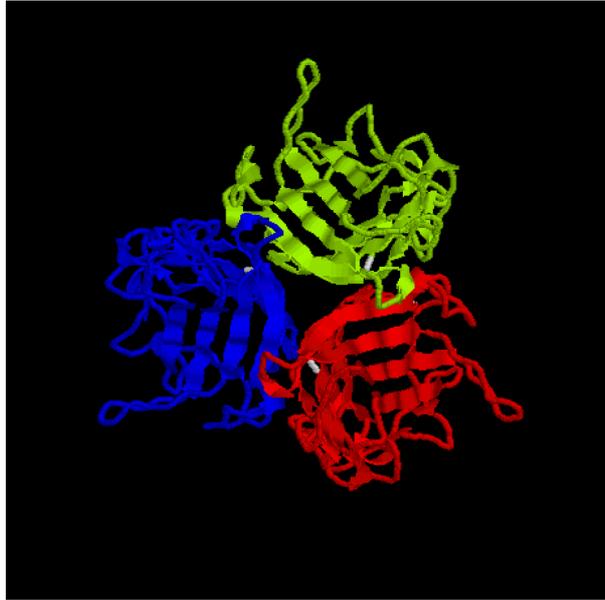


Abbildung 2. Ribbon-Diagramm des Ad5 -Knob, entlang der dreifachen Symmetrieachse in Richtung auf die Virusoberfläche gesehen.

(Die 3D Struktur ist unter PDB:1knb, die quartanäre Struktur in der *Macromolecular Structure Database* (<http://msd.ebi.ac.uk>) zu finden. Die drei monomeren Untereinheiten sind rot, grün und blau gefärbt. Die Amino- bzw. Carboxytermini der Untereinheiten sind weiss gefärbt.)

Basierend auf der Struktur sowie auf Sequenzalignments verschiedener Fiberproteine wurden zwei Bindszenarien vorgeschlagen:

- a) Bindung über die zentrale Vertiefung (1 Trimer pro Rezeptor)
- b) Bindung an die Täler und die HI-Schleife (1 Trimer pro 3 Rezeptormoleküle).

Eine simultane Bindung an drei virale Andockstellen wäre eine Erklärung für die, mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-9} - 10^{-10} M, starke und spezifische Bindung der Fiber an ihren Rezeptor.

Bei dem Rezeptor handelt es sich um den, von Tomko (Tomko et al 1997) und Bergelson (Bergelson *et al.*, 1997) isolierten, Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). An diesen Rezeptor binden neben Adenoviren auch Coxsackieviren des Serotyps B, für die CAR den Hauptrezeptor darstellt. Coxsackieviren sind sehr verschieden von Adenoviren. Sie haben keine Hülle und gehören zu den Picorna- und somit zu RNA-Viren. Sie sind ca. 30 nm groß und haben keine Fiberproteine. Coxsackieviren verursachen u.a. Meningoencephalitis und Herzentzündungen.

Bei CAR handelt es sich um ein 46 kDa Transmembranglykoprotein dessen 365 AS in extrazelluläre Region, helikale membrandurchspannende Domäne und intrazelluläre Domäne eingeteilt werden können (Abbildung 3). Die beiden extrazellulären Domänen zeigen Sequenzähnlichkeit zu Immunglobulinen. CAR ist stark konserviert: humanes CAR und murines CAR sind zu 91% identisch, in der zytoplasmatischen Domäne beträgt die Ähnlichkeit sogar 95%. CAR-Homologe wurden in Ratte, Schwein, Hund und Zebrafisch gefunden. Die zelluläre Funktion des humanen CAR ist unbekannt, ebenso sind außer Adenoviren und Coxsackie-Viren keine weiteren Liganden bekannt. Roelvink *et al.* zeigten 1998, dass die adenoviralen Subgruppen A, C, D, E und F CAR als Rezeptor verwenden. Subgruppe B bindet an einen anderen Rezeptor (Stevenson *et al.*, 1995).

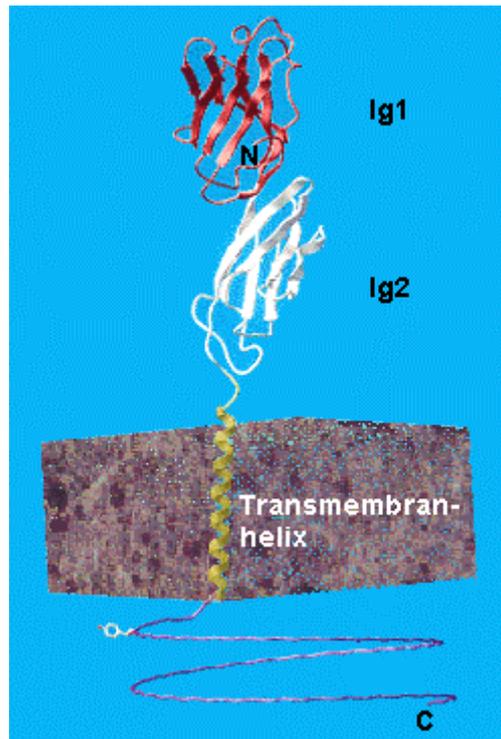


Abbildung 3. Schematischer Aufbau von CAR (nach Tomko, 2000, basierend auf Sequenzhomologien)

Um Zellen effizient mit Adenoviren zu infizieren, müssen diese an zwei Rezeptoren binden. Das adenovirale Fiberprotein erkennt den primären Rezeptor, CAR, so dass es zu einer hochaffinen Bindung des Virus an die Zelloberfläche kommt (Defer *et al.*, 1990, Philipson *et al.*, 1968). (Ein weiterer primärer Rezeptor wurde vorgeschlagen (Hong *et al.*, 1997), konnte aber nicht bestätigt (Davison *et al.*, 1999) werden). Unabhängig davon vermittelt ein Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenzmotiv in der adenoviralen Pentonbasis die Assoziation mit den sekundären Rezeptoren, den $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_v\beta_5$ Integrinen (Mathias *et al.*, 1998). Dies löst die Internalisation des Virus aus (Wickham *et al.*, 1993, Wickham *et al.*, 1994) und führt zu Clathrin-vermittelter Endozytose (Wang *et al.*, 1998). Auch beim Verlassen des Endosoms spielt die Pentonbasis eine wichtige Rolle (Seth, 1994). Eine durch die Interaktion Pentonbasis-Integrin aktivierte Protease baut die virale Hülle ab (Greber *et al.*, 1996). Schließlich wird die virale DNA zum Zellkern transportiert (Hong und Engler, 1991, Greber *et al.*, 1997).

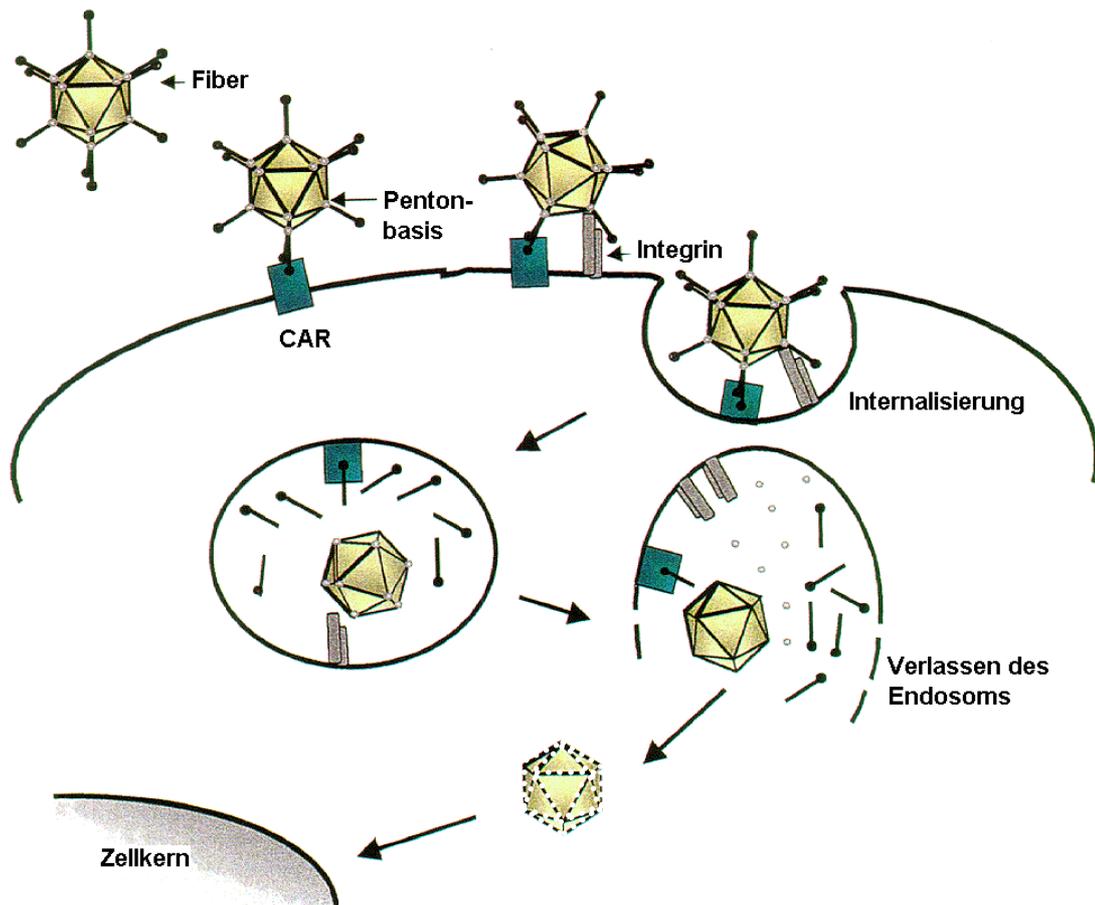


Abbildung 4 Aufnahme von Adenoviren der Subgruppe C (nach Bilbao, 1998)

Das Virus bindet zunächst über seine Knop-Region an den zellulären Rezeptor CAR. Nachfolgend vermittelt die Interaktion des RGD-Motivs der Pentonbasis mit zellulären Integrinen die Endocytose. Das Virus befindet sich nun in einem Endosom in der Zelle. Die Ansäuerung des Endosoms erlaubt dem Virus ins Cytoplasma zu entkommen und schließlich seine DNA durch eine Kernpore in den Zellkern zu bringen.

Knob sollte so mutiert werden, dass es nicht mehr mit seinem natürlichen Partner, dem zellulären Rezeptor CAR interagieren kann. Hierzu sollten die Epitope verschiedener, gegen Knob gerichteter neutralisierender Antikörper, identifiziert werden. Das Wissen über die Epitope der verschiedenen Anti-Knob-Antikörper sollte es erlauben, die für die Knob-CAR Interaktion essentiellen Aminosäuren auszutauschen und gleichzeitig andere Funktionen von Knob (Trimerisierung, Kernimport, Pentonbildung) zu erhalten. Auf diesem Wege sollte der Einsatz von Adenoviren in der Gentherapie erleichtert werden. Adenoviren sind als Vektoren beliebt, weil man sie in grossen Mengen produzieren kann und weil sie sich nicht teilende Zellen effizient transduzieren (Kay *et al.*, 1997). Man begann damit, Transferrin-Poly(Lysin)-DNA Komplexe mit replikationsinkompetenten Adenoviren zu internalisieren um die Fähigkeit der Adenoviren, aus den Endosomen zu entkommen auszunutzen und so die Konjugat-DNA Komplexe in das Zellzytoplasma zu entlassen. Dies verhindert die lysosomale Degradation und verbessert den rezeptorvermittelten Endozytoseweg (Curiel *et al.*, 1991). Bei adenoviralen Vektoren der ersten Generation wird das E1-Gen aus dem viralen Genom deletiert um Platz für große Inserts (8 kb) zu schaffen und die Viren replikationsdefizient zu machen. Bei der intravenösen Verabreichung dieser adenoviralen Vektoren bleiben mehr als 90% der Viren in der Leber hängen (Zinn *et al.*, 1998). Verhindern kann man das bisher nur durch Absättigen der Bindestellen oder durch Verwendung anderer Vektoren. Um den natürlichen Tropismus der Adenoviren zu unterbinden, sollten essentiellen Aminosäuren der Knob-CAR Bindung mutiert werden.

In der Zwischenzeit wurden u.a. die Klonierung eines hochaffinen Bindemotivs am Carboxyterminus der Ad5 (Wickham *et al.*, 1997), die Insertion heterologer Proteine in die HI-Schleife (Krasnykh *et al.*, 1998) und die Einführung modifizierter Fibergene in Adenoviren (Krasnykh *et al.*, 1996) erfolgreich durchgeführt. Auch bispezifische Antikörper kamen zur Anwendung. So wurden Antikörper mit Spezifität für Integrin und das gewünschte Epitop in der Pentonbasis (Wickham *et al.*, 1996) geschaffen. Ebenso wurde mit bispezifischen Antikörpern die Knob-CAR Spezifität geblockt und gleichzeitig eine neue Spezifität für das gewünschte Zielproteine eingeführt (Douglas *et al.*, 1996, Watkins *et al.*, 1997). Feng versuchte die Vorteile adenoviraler und retroviraler Vektoren miteinander zu kombinieren. Er entwickelte adenovirale Vektoren, welche in ihren Zielzellen die Produktion von retroviralen Vektorpartikeln induzieren, die wiederum ihre Nachbarzellen transduzieren (Feng *et al.*, 1997).

2.2 Protein-Protein Wechselwirkungen

Die Interaktion von Proteinen bildet die Grundlage biologischer Prozesse. Die Erkenntnisse über Protein-Protein Wechselwirkungen werden in Datenbanken (z.B. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, <http://www.dip.doe-mbi.ucla.edu/>) abgespeichert, so dass man im Laufe der Zeit ein immer genaueres Bild des Interaktionsnetzwerkes erhält.

Um das Proteom der Zelle zu analysieren oder auch nur die Funktion identifizierter Gene bzw. das Zusammenspiel der kodierten Proteine zu erfassen, bedient man sich verschiedener Display-Systeme welche eine effiziente Kopplung von präsentiertem Peptid/Protein und der zugrundeliegenden kodierenden Sequenz gewährleisten (Li, 2000). Im optimalen Fall steht ein Zellsystem zur Verfügung, welches den *in vivo* Verhältnissen entspricht, und daher auch dieselben posttranslationalen Modifikationen aufweist.

Eigenschaft	Poly-somales Display	Peptid an Plasmid	Filamentöses Phage Display	Lytisches Phage Display	Prokaryontisches zellbasiertes Display	Säugerzell-basiertes Display
Theoretische Obergrenze für die Bibliotheksgröße	>10 ¹¹	<10 ¹¹	<10 ¹¹	<10 ¹¹	~10 ⁹	~10 ⁸
Typ	<i>In vitro</i>	prokaryontisch	prokaryontisch	prokaryontisch	prokaryontisch	Säugerzellen
Linker	(nicht) kovalent	nicht kovalent	Virus kapsid	Viruskapsid	Zelle	Zelle
cDNA Größenrestriktion	ja	nein	ja	ja	nein	nein
Faltung	nein	nicht nativ	nicht nativ	nicht nativ	Nicht nativ	nativ
Post-translationale Modifikationen	nein	nein	nein	nein	nein	nativ

Tabelle 1. Vergleich aktueller Display-Methoden (nach Li, 2000)

Ein Weg zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen und zur Identifizierung von Interaktionspartnern basiert auf der Methode des Phage Display. Dabei wird ein Peptid oder Protein in Fusion mit einem Hüllprotein eines Bakteriophagen exprimiert. Das fusionierte Protein wird auf der Oberfläche des Phagenpartikels präsentiert, während die DNA, welche für die Fusion kodiert, im Inneren des Virions verbleibt. Dies erlaubt die rasche Identifizierung von Peptidliganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen (Antikörper, Enzyme, Rezeptoren, etc.) durch einen Biopanning genannten *in vitro* Selektionsprozess. In seiner

einfachsten Form wird Biopanning durchgeführt, indem man eine Platte, welche mit dem Zielmolekül beschichtet ist, mit einer Bibliothek von 'phage-displayed' Peptiden inkubiert. Nicht gebundene Phagen werden abgewaschen und spezifisch gebundene Phagen eluiert. Eluierte Phagen werden anschließend amplifiziert und zusätzlichen Biopanning- und Amplifikationsrunden unterworfen, um die am besten bindenden Phagen anzureichern. Nach 3 - 4 Runden werden individuelle Klone durch Sequenzieren ihrer DNA und entsprechende Bindungsanalysen (z.B. ELISA) charakterisiert.

Zum Phage Display werden unterschiedliche Phagenspezies eingesetzt. Die verwendeten filamentösen Phagen (f1, M13 und fd) sind einzelsträngige DNA Phagen die nur *E. coli* Stämme infizieren können, welche den F-Faktor enthalten. Sie lysieren ihre Wirtsbakterien nicht, sondern verlassen die Bakterien, ohne diese dabei zu zerstören. Hierzu ist es erforderlich, dass die N-terminal an Hüllproteine fusionierten Proteine durch die Plasmamembran der Wirtsbakterien geschleust werden können. Filamentöse Phagen sind bei niedrigem pH stabil. Dies erlaubt die saure Elution von gebundenen Phagen beim Biopanning. Seit der Einführung durch Smith, 1985 wird das Hüllprotein III (Abbildung 5), welches an der Spitze der Phagen sitzt und in 5 Kopien vorkommt standardmäßig verwendet. Eine höhere Kopienzahl bietet das Protein VIII (Abbildung 6) der Phagen (Greenwood *et al.*, 1991). Dieses bildet mit 2.700 Kopien das Haupthüllprotein. Der Austausch sämtlicher Haupthüllproteine durch große Fusionsproteine kann mit dem Zusammenbau der Phagen interferieren. In beschränktem Umfang kann man dieser Limitation Rechnung tragen, indem man ein Phagemidsystem einsetzt. Das heißt, man stellt plasmidkodiert Wildtyp-Hüllprotein zur Verfügung, was in Phagen resultiert die abhängig von der Größe der Fusionsproteine Fusions- und Wildtypproteine in unterschiedlichen Verhältnissen auf ihrer Oberfläche tragen. Zur Struktur, Infektion und Zusammenbau filamentöser Phagen vergleiche auch Marvin, 1998.

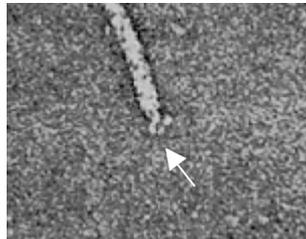


Abbildung 5. pIII Proteine am Kopf eines fd Phagen (Kay, 1996. pIII Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.)

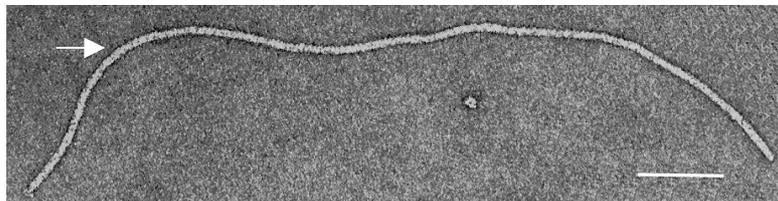


Abbildung 6. fd Phage (Kay, 1996. Der Balken entspricht 100 nm. pVIII Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet)

Als Alternative bzw. Ergänzung zu den filamentösen Phagen wurden Phage Display Vektoren auf Basis lytischer Phagen entwickelt. Präsentierte Peptide und Proteine müssen hier nicht, wie in filamentösen Systemen, durch die Zellmembran sekretiert werden. Die bakterioviralen Hüllproteine falten sich im Cytoplasma und assemblieren dort zu reifen Phagenpartikeln. Reduzierende Bedingungen im Cytoplasma der Bakterien verhindern, dass sich Disulfidbrücken ausbilden. Bei den lytischen Phagen sind verschiedene Vertreter zu nennen:

T7 sind ikosaedrische Phagen mit einem aus 415 Kopien des Proteins 10 (Abbildung 7) zusammengesetzten Kapsid. Das Kapsidprotein wird normalerweise in zwei Formen gebildet, 10A (344 AS) und 10B (397 AS). 10B wird durch einen translationalen frameshift an Aminosäure 341 von 10A produziert und macht bis zu 10% des Kapsidproteins aus (Condrón *et al.*, 1991). Allerdings können funktionelle Kapside auch ganz aus 10A oder 10B oder unterschiedlichen Anteilen dieser Proteine zusammengesetzt sein. Dieser Befund war der Anlaß für die Vermutung, dass das T7 Kapsid Variationen tolerieren kann, und dass die Region des Kapsidproteins, welche einzigartig für 10B ist, auf der Oberfläche der Phagen liegen und für Phage Display eingesetzt werden könnte. Die gewünschten Peptide werden C-terminal an dieses Protein fusioniert. Peptide und größere Proteine mit bis zu 1.200 Aminosäuren sollen in niedriger (0.1–1 pro Phage) bis mittlerer Kopienzahl (10 pro Phage) präsentiert werden können (novagen, USA). T7 Phagen vermehren sich sehr schnell. Plaques bilden sich innerhalb von 3 Stunden bei 37 °C und Bakterienkulturen sind 1–2 Stunden nach der Infektion lysiert. Dies bedeutet einen klaren Zeitvorteil im Vergleich zu filamentösen Phagen. Außerdem sind T7 Phagen extrem stabil. Die Phagen bleiben infektiös, auch wenn man sie 1% SDS, 5 M NaCl, bis zu 4 M Harnstoff, 2 M Guanidinium-HCl, 10 mM EDTA, reduzierenden Bedingungen (bis zu 100 mM DTT), oder alkalischen Bedingungen (bis zu pH 10) aussetzt. Allerdings sind sie bei niedrigem pH (unter pH 4), im Gegensatz zu filamentösen Phagen, nicht stabil.

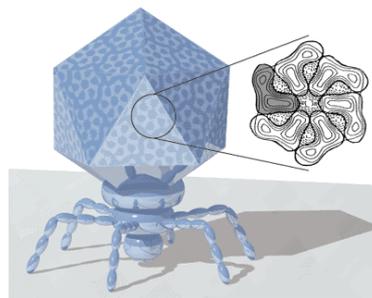


Abbildung 7. Schematische Darstellung eines T7 Phagen mit dem Oberflächenprotein 10 (novagen, USA)

Ein weiteres System stützt sich auf die Verwendung von **lambda** Phagen. Dies sind ikosaedrische Phagen deren Kapsid sich aus den Proteinen D und E zusammensetzt. Das Protein D (Abbildung 8) kommt in 405 Kopien auf dem Kapsid vor und liegt als Trimer vor. Die gewünschten Peptide werden C-terminal an dieses Protein fusioniert. Dies erlaubt die Präsentation großer Proteine. So konnte Maruyama *et al.* 1994 zeigen, dass man die beta-Galaktosidase funktionell auf der Oberfläche der lambda Phagen präsentieren kann. Gebundene Phagen können über eine Collagenase-Schnittstelle unter milden Bedingungen eluiert werden.

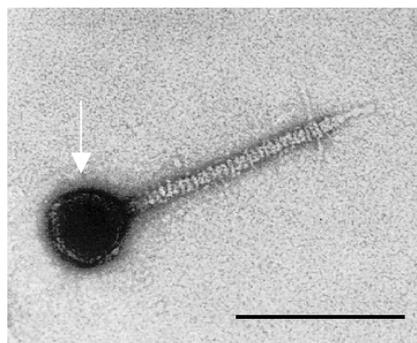


Abbildung 8. lambda Phage (Klaus, 1992. Der Balken entspricht 100 nm. D Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet)

Bei allen verwendeten Phagen kann zwischen polyvalentem Phage Display und monovalentem Phage Display unterschieden werden.

Beim **polyvalenten** Phage Display wird ein kleines Stück Fremd-DNA in das Phagenoberflächengen inseriert. Bei dieser Methode wird das Fusionsprotein in vielen Kopien auf den Phagen exprimiert, d.h. das Peptid wird in allen Kopien des Genprodukts exprimiert. Das Insert ist einer Größenlimitation unterworfen, weil die Infektiosität des Phagen beeinflusst wird. Diese Limitation ist umso größer, je häufiger das zur Fusion benutzte Protein in den Phagen ist.

Für **monovalentes** Phage Display, wird die Genfusion (Fremdprotein-Hüllprotein) in einem Phagemid konstruiert. Ein Phagemid ist ein Plasmid, das die intergenischen Sequenzen des benutzten Phagen, sowie dessen *origin of replication* enthält. Die intergenische Sequenz enthält die Verpackungssequenz, die für den Zusammenbau von Phagen notwendig ist. Alle anderen Phagengene sind nicht enthalten, weshalb dies nicht für die Produktion neuer Phagen ausreicht. Die Virionen werden nach der Infektion von Zellen, welche das Phagemid tragen, mittels eines Helferphagen produziert. Der Helferphage stellt die Funktionen und Gene zur Verfügung, die dem Phagemid fehlen, zusätzlich enthält er das Wildtypgen des Oberflächenproteins. Der Helferphage ist verpackungsdefizient, d.h. seine Verpackungssequenz ist nicht so effizient wie die im Phagemid kodierte. Nach Transfektion des Phagemid in einen bakteriellen Wirt (*E. coli*) wird auf phagemidkodierte Antibiotikaresistenz selektioniert. Mit dem Phagemidsystem wird das Problem, dass ein Fusionsprotein die Verpackung der Phagen inhibiert, umgangen. Ca. 10 % der Phagemidpopulation tragen eine Kopie des Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche.

Nicht nur in Bezug auf die Art des Displays, sondern auch in Bezug auf das präsentierte Material gibt es Unterschiede:

Ursprünglich wurden Phagenbibliotheken mit kurzen Peptiden zufälliger Aminosäurezusammensetzung zur Identifizierung der von monoklonalen Antikörpern erkannten Epitope eingesetzt. Da es jedoch unmöglich ist, repräsentative Bibliotheken von längeren Peptiden herzustellen, eignen sich diese sogenannten '**random**' Phage Display Banken nicht, wenn

- die Interaktionsdomänen über komplexe räumliche Ausdehnung verfügen und für die Bindung definierte Strukturen ausgebildet werden müssen.
- unbekannte Interaktionspartner identifiziert werden sollen.

Um solche Fragestellungen zu bearbeiten, wurde von uns das **genspezifische** Phage Display entwickelt (Petersen *et al.*, 1995). Voraussetzung für die Erstellung einer genspezifischen Phagen Bibliothek ist, dass einer der putativen Interaktionspartner als cDNA zur Verfügung steht, so dass er in Form verschiedener Abschnitte der natürlichen Aminosäuresequenz des Liganden präsentiert werden kann. Erreicht wird dies indem man das für den Liganden kodierende Gen in Stücke zufälliger Größe schneidet und diese in Phagen kloniert.

Ein weitere, rein chemische, Methode um Protein-Protein Wechselwirkungen zu untersuchen ist der **Peptide Scan**. Sie basiert auf der Synthese von immobilisierten Peptiden auf aktivierten Membranen (Frank, 1992) und bietet eine schnelle und akkurate Synthese von Peptiden durch Roboter auf mehrfach wiederzuverwendende Membranen. Zu untersuchende Proteine können mit einer enormen Diversität durchsucht werden. Die Methode des Peptide Scan führte bereits zur erfolgreichen Kartierung und funktionellen Charakterisierung von linearen (Korth *et al.*, 1997) oder diskontinuierlichen Interaktionsstellen (Geysen *et al.*, 1984, Gao *et al.*, 1996, Reineke *et al.*, 1999). Zusätzlich erwies sich diese Technik als nützlich beim Mappen von Rezeptor-Ligand Kontaktstellen (Piossek *et al.*, 1999) und intrazellulären Protein-Protein-Interaktionsstellen (Rudiger *et al.*, 1997). Eine zusammenfassende Übersicht findet sich bei Reineke *et al.*, 2001.

3 Material und Methoden

3.1 Abkürzungen

Amp	Ampicillin	μl	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat	min	Minute
AS	Aminosäure	ml	Milliliter
bp	Basenpaar	mM	millimolar
BSA	Rinderserumalbumin	MOI	multiplicity of infektion
cDNA	complementary DNA	mRNA	messenger RNA
cfu	colony forming unit	MW	molecular weight
Da	Dalton	NMP	1-Methyl-2-pyrrolidinon
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	OD	Optische Dichte
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	PBS	phosphate buffered saline
DMF	N,N-Dimethylformamid	PEG	Polyethylenglykol
DMSO	Dimethylsulfoxid	pfu	plaque forming unit
DNA	desoxyribonucleicacid	PNK	Polynukleotid Kinase
ds	Doppelstrang	rpm	rounds per minute
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	RT	Raumtemperatur
ECL	enhanced chemiluminescence	SDS	sodiumdodecylsulfate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Strp	Streptomycin
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno Sorbent Assay	ss	Einzelstrang
FCS	fetal calf serum	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
h	hour	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
HRP	horse radish peroxidase	TBS	Tris-Borat-Puffer
IgG	Immunglobulin G	TE	Tris-EDTA-Puffer
Kan	Kanamycin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen
kb	Kilobasen	Tet	Tetracyclin
kDa	Kilodalton	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
LB	Luria-Bertani	tu	transforming unit
M	molar	U	Enzymeinheit (Aktivität)
MCS	multiple cloning site	UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm		

Aminosäuren und ihre Kürzel:

A, Ala	Alanin	I, Ile	Isoleucin	R, Arg	Arginin
C, Cys	Cystein	K, Lys	Lysin	S, Ser	Serin
D, Asp	Asparaginsäure	L, Leu	Leucin	T, Thr	Threonin
E, Glu	Glutaminsäure	M, Met	Methionin	V, Val	Valin
F, Phe	Phenylalanin	N, Asn	Asparagin	W, Trp	Tryptophan
G, Gly	Glycin	P, Pro	Prolin	Y, Tyr	Tyrosin
H, His	Histidin	Q, Glu	Glutamin		

3.2 Materialien

3.2.1 Computeranalysen

Programme und Datenbanken von HUSAR (DKFZ), NIH-Image, Rasmol

3.2.2 Chromatographische Trennmedien

Protein G Sepharose Fast Flow Pharmacia
Ni²⁺-NTA-Agarose Qiagen
Sephadex®G-25M PD-10 columns Pharmacia Biotech.

3.2.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Janssen (Beerse, Belgien), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Aldrich (Steinheim), Sigma (St. Louis, USA) und Riedel-de Haen (Seelze).

3.2.4 Enzyme

Alle Enzyme wurden von New England Biolabs (Schwalbach), Gibco/BRL (Eggenstein) und Boehringer Ingelheim bezogen.

3.2.5 Oligonukleotide

M13 gIII -96 Primer

5'- CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3'

T7Select10-3b Primer I (Position: 20.374-20.393)

5'- GGA GCT GTC GTA TTC CAG TCC GG -3'

T7Select10-3b Primer II (Position: 20.301-20.319)

5'- TGC TAA CTT CCA AGC GGA C -3'

5N-knob Primer

5'- GTC GGA TCC AAT GAT AAG CTA ACT TTG T -3'
 G S N D K L T L
 |BamHI|

3C-knob Primer

5'- T GCC CAA GAA TAA GCT TAA TTA GCT GAG C -3'
 A Q E
 |HindIII|

3.2.6 Bakterien- und Phagenstämme

<i>E. coli</i>	Beschreibung
BLT5615	F ⁻ , ompT hsdSB(rB-mB-) gal dem lac pAR5615 (amp ^R), wobei pAR5615 das T7 Kapsidprotein unter Kontrolle des lacUV5 Promoters trägt.
ER2537	F ['] lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺ /fhuA2 supE thi Δ(lac-pro AB) Δ(hsdMS-mcrB)5 (r _k m _k ⁻ McrBC ⁻)
K91kan	kan ^r , besitzt ~ 5 Pili pro Zelle
MC1061	strept ^r , F ⁻ , Genotyp araD139, Δ(ara-leu)7695, Δlac174, galU, galk ⁻ , hsr ⁻ , hsm ⁺ , strA.
M15(pREP4)(pQE30-Ad5knob)	Der pQE-Vektor trägt eine Ampicillinresistenz und hat einen ColE1-Origin. Der pREP4-Vektor trägt eine Kanamycinresistenz, hat einen p15A-Origin und exprimiert den lac Repressor.
TG-1	supE thi-1 Δ(lac-proAB) hsdΔ5[F ['] traD36 proAB ⁺ lacIq lacZΔM15]

3.2.7 Kulturmedien und Kulturböden

Alle Medien werden mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Selektionsmedien, -platten

11 LB-Medium

15 g Agar

Erst nach dem Autoklavieren der Medien und Abkühlen auf 50 °C werden Antibiotika hinzugegeben.

Amp-Platten 50 µg/ml Amp

Tet/Kan-Platten 20 µg/ml Tet

100 µg/ml Kan

Tet/Strp-Platten 20 µg/ml Tet

50 µg/ml Strp

LB Medium

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Yeast Extract
10 g	NaCl

Mit deionisiertem Wasser zu 1l auffüllen und autoklavieren.

LB Platten

1l	LB-Medium + 15 g Agar
----	-----------------------

Terrific broth

12 g	Bacto-Trypton
24 g	Bacto-Yeast Extract
4 ml	Glycerol

In 900 ml Wasser auflösen und 90 ml Portionen autoklavieren. Danach fügt man 10 ml separat autoklavierten Phosphatpuffer (0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4) hinzu.

Minimalplatten

6 g	NaHPO_4
3 g	KH_2PO_4
1 g	NH_4Cl (pH7,4)
15 g	Bacto-Agar

Mit deionisiertem Wasser zu 1l auffüllen und autoklavieren. Nachdem das Medium auf 50- 60°C abgekühlt ist, fügt man 1 ml 1M Thiaminhydrochlorid, 5 ml 20%ige Glucoselösung, 1 ml 1M MgCl_2 und 1 ml 1M CaCl_2 hinzu.

SOB Medium

20 g	Bacto-Trypton
5 g	Yeast-Extract
0.58 g	NaCl
0.19 g	KCl

In 1l deionisiertem Wasser lösen und in 100 ml Portionen autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 1ml 2M Mg^{2+} (1M MgCl_2 , 1M MgSO_4 , steril filtriert) zufügen.

SOC Medium

zu 100 ml SOB Medium werden 2 ml 1 M Glucose (steril filtriert) hinzugegeben.

Top-Agarose

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
5 g	NaCl
1 g	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
7 g	Agarose

Alle Bestandteile, bis auf die Agarose In 1l deionisiertem Wasser lösen und in 7l Portionen aufteilen. Je 0.5 g Agarose hinzufügen und autoklavieren.

3.2.8 Genbanken

Die Komplexität der Ph.D. Bibliotheken wird vom Hersteller mit $2,8 \times 10^9$ für die 7mer Bibliothek bzw. $1,9 \times 10^9$ für die 12mer Bibliothek angegeben.

Die 7 bzw. 12 mere sind N-terminal an das pIII Protein der M13 Phagen gebunden. Zwischen Peptid und Protein ist ein kurzer (Gly-Gly-Gly-Ser) Spacer.

Die Komplexität der T7Select Human Brain cDNA Bibliothek wird mit $1,47 \times 10^7$ Primärtransformanten (amplifiziert auf $1,7 \times 10^{10}$ pfu/ml) angegeben.

3.2.9 Elektrophorese

3.2.9.1 DNA-Agarosegele

1x TAE

0,040 M	Tris-Acetat pH8,0
0,001 M	EDTA

DNA Probenpuffer

5x	TAE
20%	Glycerin
0,1%	Bromphenolblau
0,1%	Xylencyanol

3.2.9.2 DNA-Acrylamid Gele

10x TBE

1 <u>M</u>	Tris
890 mM	Borsäure
10 mM	EDTA pH8,5

8 ml	30%ige Acrylamidlösung
2 ml	10x TBE
10 ml	Bidest
120 µl	10% APS
12 µl	TEMED

Die Acrylamidlösung (Acrylamid plus Bisacrylamid) wurde mit Amberlite deionisiert.

3.2.9.3 DNA-Acrylamid Sequenziergele

“Weiße Lösung“ (6% Acrylamid)

74 ml	40%ige Acrylamidlösung
50 ml	5x TBE
230 g	Harnstoff

“Blaue Lösung“ (6% Acrylamid)

30 ml	40%ige Acrylamidlösung
100 ml	5x TBE
92 g	Harnstoff
20 g	Sucrose
10 mg	Bromphenolblau

Die Acrylamidlösung (Acrylamid plus Bisacrylamid) und der Harnstoff wurden mit Amberlite deionisiert. Danach wird die Lösung auf ein Volumen von 500 ml gebracht.

3.2.9.4 Proteingele

Upper-Tris

0.5 <u>M</u>	Tris/HCl pH 6.8
0.4 %	SDS
ad 100 ml	Bidest

Lower-Tris

1.5 <u>M</u>	Tris/HCl pH 8.8
0.4 %	SDS
ad 200 ml	Aqua Bidest

3%iges Sammelgel

1,25 ml	Upper Tris-Puffer pH 6,8
0,5 ml	30% iges Acrylamid
3,25 ml	Wasser
50 µl	APS 10%
10 µl	TEMED

12%iges Trenngel

2.6 ml	Lower-Tris-Puffer pH 8.8
4 ml	30%iges Acrylamid
3.4 ml	VE-Wasser
10 µl	TEMED
32 µl	APS 10%

Protein-Probenpuffer (2x)

4 ml	87% iges Glycerin
3 ml	20%iges SDS
600 µl	β-Mercaptoethanol
200 µl	1 <u>M</u> Tris pH7,5
2,2 ml	Bidest
1 Spatelspitze	Bromphenolblau

Laemmli-Puffer (10x)

30 g	Tris
10 g	SDS
144 g	Glycin
ad 1.000 ml	VE Wasser

Coomassie zum Färben

0,5 g	Coomassie R250
in 500 ml	Entfärber

Entfärber

235 ml	techn. Essigsäure
265 ml	VE Wasser
400 ml	techn. Ethanol
100 ml	VE Wasser

3.2.10 sonstige Lösungen**Transferpuffer**

5,8 g	Tris
0,37 g	SDS
2,9 g	Glycin
200 ml	Methanol
ad 1.000 ml	Aqua Bidest

TE-Puffer

10 <u>mM</u>	Tris/HCl pH 8,0
1 <u>mM</u>	EDTA pH 8,0

TBS-Puffer

50 <u>mM</u>	Tris/HCl pH 7,5
150 <u>mM</u>	NaCl

PBS-Puffer

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ PO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	Aqua Bidest
pH 7,4	

Blocklösung

0,1 <u>M</u>	NaHCO ₃
5 mg/ml	dialysiertes BSA
0,1 µg/ml	Streptavidin
0,02%	NaN ₃

Regenerationspuffer A

480,5 g	Harnstoff
10,0 g	SDS
ad 1 l	Aqua Bidest
1 ml	2-Mercaptoethanol

Regenerationspuffer B

400 ml	Aqua Bidest
500 ml	Ethanol
100 ml	Essigsäure

DNaseI-Puffer

50 <u>mM</u>	Tris/HCl pH 7.5
1 <u>mM</u>	MnSO ₄
0.1 mg/ml	BSA

10X Polynukleotid Kinase Puffer

500 <u>mM</u>	Tris/HCl pH 7,5
100 <u>mM</u>	MgCl ₂
50 <u>mM</u>	DTT
1 <u>mM</u>	Spermidine

PEG/NaCl

20 %	Polyethylenglycol -8000
2,5 <u>M</u>	NaCl

Iodid-Puffer

10 <u>mM</u>	Tris/HCl pH 8.0
1 <u>mM</u>	EDTA
4 <u>M</u>	NaI

Ponceau-S

0,2 g/l	Ponceau-S
3 g/l	TCA

3.2.11 Radiochemikalien

Desoxyadenosin-5'-[α -35S]-thiotriphosphat, Amersham/Buchler

3.2.12 Photomaterialien

HyperfilmTM ECL Amersham International plc, England
Kodak BioMax MR X-ray film Kodak, (Rochester, USA)
Entwickler und Fixierer Illford, (Neuiseburg, FRG)

3.2.13 verwendete Kits

T7-Sequencing TM Kit	Pharmacia
ECL protein biotinylation module	Amersham
ECL Western blotting detection reagents	Amersham
DNA-Jetsorb für Mini und Midi Präp.	Genomed
TMB stabilisiertes Substrat für horse-radish peroxidase	Promega
Bradford Reagenz	BioRad
SPOTs-Kit	Cambridge Research Biochemicals (CRB)
Ph.D.-7 TM Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs
Ph.D.-12 TM Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs
Dyabeads® mRNA Purification Kit	Dynal, Hamburg
QuikChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

3.2.14 Antikörper

Monoklonaler Anti-p53 (Klon Bp53-11) (aus Maus IgG Fraktion des Antiserums)	Progen
Peroxidase-conjugated F(ab') ₂ Fragment Goat Anti Mouse IgG (H+L)	Dianova
HRP/Anti-M13 Konjugat (polyklonaler Antikörper aus Schaf)	Pharmacia
HRP-Goat anti rabbit IgG	Dianova
HRP-Streptavidin Konjugat	Amersham
7A2.7 (Anti-Ad5 knob (Mausascites))	Prof. David T. Curiel, University of Alabama, Birmingham, USA
1D6.14 (Anti-Ad5 knob (Mausascites))	Prof. David T. Curiel, University of Alabama, Birmingham, USA
8C2.2 (Anti-Ad5 knob (Mausascites))	Prof. David T. Curiel, University of Alabama, Birmingham, USA
2A4.1 (Anti-Ad5 knob (Mausascites))	Prof. David T. Curiel, University of Alabama, Birmingham, USA

3.2.15 Weitere Gebrauchsmaterialien

Nitrocellulose	Schleicher & Schuell
Elisaplatten-Maxisorp und Polysorp	Nunc
96-deep well Platten	Beckmann
Petrischalen Ø 3,5 cm	Greiner
Microcon 30	Amicon
Amino-PEG Membranen	ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Germany
ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany
F _{moc} -L-Aminosäureester	Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, UK

3.2.16 Eichstandards

Molekulargewichtsmarker für Proteingele

„Low-Marker“

66.000 Da	Serumalbumin, Rind
45.000 Da	Ovalbumin, Huhn
36.000 Da	Glyceraldehyd-3-P- Dehydrogenase
29.000 Da	Carbonanhydrase, Rind
24.000 Da	Trypsinogen, Rinderpankreas
20.000 Da	Trypsininhibitor, Sojabohne
14.200 Da	α -Lactalbumin, Kuhmilch

„High-Marker“

205.000 Da	Myosin, Kaninchen
116.000 Da	β -Galaktosidase, <i>E. coli</i>
97.400 Da	Phosphorylas b, Kaninchen
66.000 Da	Serumalbumin, Rind
45.000 Da	Ovalbumin, Huhn
29.000 Da	Carbonanhydrase, Rind

Die Markerproteine wurden von der Firma Sigma bezogen.

DNA-Längenstandards

Als Längenstandard wurde mit HindIII und BstII geschnittene Lambda-DNA mit folgender Fragmentgröße eingesetzt (Biolabs, New England). Die Konzentration betrug 5 ng/ μ l.

λ HindIII:	bp	ng	BstEII:	bp	ng
23.130	240	240	8.454	87,15	87,15
9.416	100	100	7.242	74,66	74,66
6.557	70	70	6.369	65,66	65,66
4.361	45	45	5.686	58,62	58,62
2.322	20	20	4.822	49,71	49,71
2.027	20	20	4.324	44,58	44,58
564	10	10	3.675	37,89	37,89
125	1	1	2.323	23,95	23,95
48.502	500	500	1.929	19,89	19,89
			1.371	14,13	14,13
			1.264	13,03	13,03
			702	7,24	7,24
			224	2,31	2,31
			117	1,21	1,21
			48.502	500	500

Als detaillierter Längenstandard diente ein 100 bp-Marker (MBI Fermentas), welcher den Bereich von 80 bp bis 1.000 bp abdeckte.

3.2.17 Proteinaufreinigung

Lysepuffer

10 mM	Tris/HCl pH 7.5
130 mM	NaCl
1%	Triton-X-100
10 mM	NaF
10 mM	Na ₃ PO ₄
10 mM	NaP ₂ O ₇

Waschpuffer 1

50 mM	Tris/HCl pH 7.5
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol

Dialyseschlauch, benzoyliert für Proteine > 2.000 Da (Sigma, Steinheim,FRG)

3.2.18 Panning

Blocklösung I

0.1 M	NaHCO ₃
5 mg/ml	BSA
0.02 %	NaN ₃

Blocklösung II

0.1 M	NaHCO ₃
5 mg/ml	BSA
0.1 µg/ml	Streptavidin
0.02 %	NaN ₃

Panning-Puffer I

50 mM	Tris/HCl pH 8.0
2 mM	CaCl ₂
50 mM	NaCl
50 mg/ml	BSA

Panning-Puffer II

1 x	TBS
0.1%	Tween-20
2 mM	CaCl ₂

Elutionspuffer

1 mg/ml	BSA
0.1 N	HCl pH 2.2 mit Glycin eingestellt.
2 µl	Neutralrot

3.2.19 ELISA

Blocklösung

0.1 M	NaHCO ₃
5 mg/ml	BSA
0.02 %	NaN ₃

Phagenverdünnungspuffer

1 x	TBS
4 mM	CaCl ₂
0.2 %	Tween-20

Waschlösung

1 x	TBS
2 mM	CaCl ₂
0.1 %	Tween-20

Färbelösung

1 ml	1M Na-Acetat pH 6.0
25 µl	TMB-Stocklösung (40 mg/ml in DMSO)
9 ml	aqua bidest
10 µl	H ₂ O ₂

3.3 Methoden

3.3.1 Nukleinsäuren

3.3.1.1 Präparation genomischer DNA

Isolierung von DNA

Plasmid-DNA-Präparation aus E. coli (Mini- und Midi-Präp)

Diese Präparationsmethode erlaubt die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Zu Beginn werden die Bakterien zentrifugiert und das Pellet in Lösung 1 aufgenommen. Diese Lösung enthält RNase A, welche nach dem Zellaufschluß die RNA abbaut. Um die Bakterien aufzubrechen werden diese in ein alkalisches Milieu (Lösung 2) überführt, welches zusätzlich SDS enthält, das die zellulären Proteine denaturiert. Eine hohe Salzkonzentration führt zu einer Kopräzipitation der Zelltrümmer mit der chromosomalen DNA, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer zirkulären, verdrillten, kompakten Struktur die Fähigkeit hat nach Neutralisierung

der Lösung zu renaturieren und deshalb in Lösung zu sein. Mit Lösung 3 neutralisiert man das Milieu wieder. Durch die anschließende 10 minütige Zentrifugation bei 20°C und 15.000 x g pelletiert man diese Zellbestandteile und erhält ein klares Zellysat, welches auf eine Anionenaustauschersäule gegeben wird. Bei einer Salzkonzentration von 0,8 M wird die Säule gewaschen und anschließend die DNA mit einer Salzkonzentration von 1,25 M von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA wird aus dem Eluat mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (Mini-Präp: 30 µl, Midi-Präp: 100 µl) aufgenommen.

Lösung 1: (Resuspendieren der Zellen)

50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

Lösung 2: (Lyse der Zellen)

200 mM	NaOH
1,0 %	SDS (w/v)

Lösung 3: (Neutralisation)

3,2 <u>M</u>	Kaliumacetat/Essigsäure (pH 5,0)
--------------	----------------------------------

Lösung 4: (Equilibrierung der Säule)

600 mM	NaCl
100 mM	Natriumacetat/Essigsäure (pH 5,0)
0,15 %	Triton X-100

Lösung 5: (Waschen der Säule)

800 mM	NaCl
100 mM	Natriumacetat/Essigsäure (pH 5,0)

Lösung 6: (Elution der DNA)

1250 mM	NaCl
100 mM	Tris/HCl (pH 8,5)

Reinigung von DNA

Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit

Für die Absorption bei 260 nm gilt:

$A_{260nm} = 1$ entspricht

0,027 µg ssDNA pro ml

0,020 µg ds DNA pro ml

0,025 µg ss RNA pro ml

Ein Quotient von A_{260nm} und A_{280nm} von 1,8 – 2,0 zeigt reine Nukleinsäuren an, ein Quotient kleiner als 1,8 ist auf Verunreinigungen mit Protein zurückzuführen.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Um aus einem Nukleinsäure/Protein-Gemisch die Proteine zu entfernen, wird die Lösung mit 2 Volumen Phenol (TE-Puffer gesättigt) gemischt. Nach 5 minütiger Zentrifugation wird der wässrige Überstand, in dem sich die DNA befindet vorsichtig abgenommen. Die DNA-haltige Lösung wird nun mit einem Volumen Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Nachdem der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen wurde, kann die darin enthaltene DNA gefällt werden.

Ethanolfällung

Die DNA wird mit Phenol/Chloroform extrahiert, anschließend mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Volumen 100%igem Ethanol über Nacht bei 0°C gefällt und 1 h bei 13.000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und noch einmal 15 min zentrifugiert. Nachdem es getrocknet ist, kann es in TE-Puffer oder destilliertem Wasser gelöst werden.

3.3.1.2 Manipulation von DNA

CIP

Zum Dephosphorylieren der 5' Enden der DNA um die Selbstligation von Vektor-DNA während des Klonens zu verhindern. Das Enzym wurde durch Hitze (15 min 85°C) inaktiviert.

Transformation durch Elektroporation

Bei dieser Technik wird kurzfristig ein Hochspannungsfeld an die Zellen angelegt, das wahrscheinlich die Fluidität der Zellmembran verändert, wodurch die zu transformierende DNA leichter in die Zelle eintreten kann. Für die Transformation werden 50 µl elektrokompenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit ca. 1 µg DNA in einem Puffer niedriger Salzkonzentration oder Wasser versetzt, durchmischt und für kurze Zeit auf Eis inkubiert. Nach Übertragen der Bakterien in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Fa. Eppendorf) wird das elektrische Feld angelegt (GenePulser II, Biorad, 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω, Feldstärke ca. 12,5 kV/cm). Eine Zeitkonstante zwischen 4,9-5,2 ms zeigt das Gelingen der Elektroporation an. Danach wird sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben, die Suspension in ein steriles Wassermannröhrchen überführt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden verschiedene Volumina auf Tet/Strp-LB-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Anzahl der Kolonien auf den Platten gibt Auskunft über die Anzahl der Primärtransformanten.

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

Man benutzt einen dsDNA Vektor, sowie zwei Primer (einen Primer für jeden Strang). Die beiden Primer werden elongiert und es wird ein mutiertes Plasmid mit versetzten Einzelstrangsnitten generiert. Anschließend wird dieses Produkt mit *DpnI* behandelt, um die Ausgangs-DNA abzubauen. Hierbei wird der Umstand ausgenutzt, dass aus *E. coli* isolierte DNA dam-methyliert und somit empfindlich für *DpnI* ist. Nach Transformation in *E. coli* repariert die Zelle die Einzelstrangsnitte.

3.3.1.3 DNA Sequenzierung

Präparation von einzelsträngiger DNA zur Sequenzierung

Es werden 1,5 ml einer Phagen infizierten Übernachtskultur (5 ml 2xLB Medium) für 10 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Den Überstand überführt man in ein frisches Eppendorfgefäß und fällt die Phagen mit 150 µl PEG bei 4°C für mindestens 4 h. Danach sedimentiert man die gefällten Phagen bei 14.000 rpm für 30-40 min bei RT. Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und das Pellet in 200 µl TBS aufgenommen. Anschließend gibt man 200 µl Phenol hinzu, durchmischt gut und läßt dies 1 min auf Eis stehen. Nach nochmaligem Mischen zentrifugiert man 5 min ab und überführt den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß. Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat fällt man die DNA bei 0°C für mindestens 1 h. Im Anschluß zentrifugiert man das Präzipitat 40 min bei 14.000 rpm, 4°C, wäscht mit 70%igem Ethanol und nimmt die DNA in 10 µl TE auf.

Präparation von einzelsträngiger DNA zur Sequenzierung

M13

Mit 30 µl einer Übernachtskultur des Bakterienstamms *E. coli* ER2537 werden 3 ml LB-Medium angeimpft. Dazu gibt man den Phagen-Plaques, der mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Platte abgenommen wird. Die Inkubation erfolgt 4,5-5,0 h bei 37°C auf dem Schüttler. Anschließend werden 2 ml der Kultur 30 sek bei 13.000 rpm abzentrifugiert. 1,5 ml werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals kurz abzentrifugiert. Von dem Überstand wird 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phagen durch Zugabe von 200 µl PEG/NaCl 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die Phagen werden 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand gut entfernt und das Sediment in 100 µl Iodid-Puffer gelöst. Danach wird die DNA durch Zugabe von 250 µl 100%igem Ethanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 20 µl TE gelöst und 10 µl davon zum Sequenzieren eingesetzt.

Sequenzieren von Einzelstrang-DNA

radioaktiv markiert

"Annealing buffer": Pufferlösung mit MgCl₂ und DTT

"Labeling Mix A": dCTP, dGTP und dTTP in Lösung

A-Mix: dNTPs und ddATP

C-Mix: dNTPs und ddCTP

G-Mix: dNTPs und ddGTP

T-Mix: dNTPs und ddTTP

"Stop solution": deionisierte Formamidlösung mit EDTA, Xylencyanol und Bromphenolblau

T7-DNA-Polymerase 1,5 U/µl

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines Sequenzierkits der Firma Pharmacia und wird nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Sie macht von der Möglichkeit Gebrauch, mit T7-DNA-Polymerase an einer einzelsträngigen DNA von einem sequenzspezifischen Primer ausgehend einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Zur Polymerisation werden

neben dNTPs (darunter [α -³⁵S]dATP zur Markierung) in vier verschiedenen Reaktionsgefäßen die jeweiligen Didesoxynukleotide, das heißt, Nukleotide deren 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt, angeboten. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem Abbruch der DNA-Synthese, sobald ein Didesoxynuklotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird, da wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Der Einbau von Didesoxynukleotiden erfolgt zufallsgemäß, so dass eine Mischung von neusynthetisierten DNA-Strängen unterschiedlicher Länge entsteht. Da in jedem Reaktionsansatz immer nur eines der 4 verschiedenen Didesoxynukleotide enthalten ist, erfolgt der Kettenabbruch jeweils nur nach einem spezifischen Nukleotid und repräsentiert somit das Vorkommen des korrespondierenden Nukleotids in der Sequenz. Diese Reaktionsgemische werden in parallelen Positionen auf ein Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

fluoreszenzmarkiert

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach dem BigDye Terminator Sequenzierungsprotokoll (Applied Biosystems). Hierbei wurde folgende Markierungsreaktion durchgeführt:

Premix	2 μ l
DNA-Template	1-2 μ l (0,03 – 0,08 pmol eines PCR-Produkts)
Sequenzierungsprimer	1 μ l (5 – 10 pmol)
Bidest	ad 10 μ l

Reaktionsführung im Thermocycler

25 Zyklen

Denaturierung	96°C	10 sec
Annealing	58°C	5 sec
Extension	60°C	4 min

Anschließend wurde in einer Ethanol Fällung 2 μ l 3M NaAc, pH 4,6 und 55 μ l 100% EtOH bei Raumtemperatur zugegeben, 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, der Ethanol-Überstand abgenommen, mit 250 μ l 70% Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen, 5 min zentrifugiert und Ethanol-Überstand entfernt. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 25 μ l TSR gelöst, 2 min bei 90°C inkubiert, sowie auf Eis abgekühlt, oder aber direkt in Bidest aufgenommen.

Polyacrylamidgele zur DNA-Sequenzierung

Die bei der DNA-Sequenzierung entstehenden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden in denaturierenden Polyacrylamidgelen (0.4 mm dick, ca. 40 cm lang) aufgetrennt. Die Glasplatten werden vor dem Gießen der Gele sorgfältig mit heißem Wasser abgespült und mit 95%igem Ethanol gereinigt. Zusätzlich wird die „Ohrenplatte“ auf der Innenseite silikonisiert. Zum Gießen des Gels werden 35 ml „weiße Lösung“ mit 70 μ l 25%igem APS und 30 μ l TEMED sowie 10 ml „blaue Lösung“ mit 20 μ l 25%igem APS und 12 μ l TEMED gemischt. Beide Lösungen werden sofort nach Zugabe der „Radikalstarter“ verwendet. Zuerst zieht man 6 ml der „weiße Lösung“, dann 6 ml der „blaue Lösung“ in einer Glaspipette auf. Durch Ansaugen einer Luftblase wird ein homogener Übergang zwischen den beiden Lösungen geschaffen. Der hierbei entstehende Gradient dient dazu, die Wanderungsgeschwindigkeit der kleinen Fragmente im unteren Teil des Gels zu verlangsamen. Das noch verbleibende Volumen wird nun mit „weißer Lösung“ aufgefüllt. Danach schiebt man den Haifischzahnkamm mit der glatten Seite in das Gel, um nach dessen Polymerisation eine gerade Front für den Auftrag der Proben zu erhalten. Nach der Polymerisation werden dann durch Einschieben des Haifischzahnkammes die Taschen für den Probenauftrag gebildet. Dabei werden die Zähne des Kammes ca. 1 mm tief in das Gel gesteckt. Das obere Pufferreservoir der Gelkammer wird mit 0.5 x TBE, das untere mit 1 x TBE gefüllt. Die Proben werden vor dem Auftragen 2 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt dann bei 20 -23 mA und kann anhand der beiden in der „Stop-Solution“ enthaltenen Farbmarker (Bromphenolblau und Xylencyanol) verfolgt werden. Die Lauffront des Bromphenolblaus entspricht dabei ungefähr dem Laufverhalten eines 15 Nucleotid großen DNA-Fragments. In der Regel wird die Elektrophorese nach Austreten des Bromphenolblaus beendet, kann aber bis zum Auslaufen des Xylencyanols fortgesetzt werden, um vom Primer weiter entfernte Sequenzen lesen zu können. Im Anschluß an die Elektrophorese wird das Gel auf Whatmann 3 mm-Papier übertragen, faltenfrei mit Frischhaltefolie überzogen, unter Vakuum für 60 min bei 80°C getrocknet und für 12-24 h auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.3.1.4 Auftrennen von DNA in horizontalen Agarose-Gelen

Diese Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe und kann auch zu ihrer Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Als Laufpuffer wird bei Bakterien-DNA 1 x TAE und bei fUSE5-DNA 4 x TAE verwendet. Zur Gelzubereitung wird Agarose in einer Endkonzentration von 1% zu dem Elektrophoresepuffer gegeben und solange aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat.

Anschließend wird ein horizontales Gel gegossen (Länge: 8 cm, Breite: 10 cm). Die aufzutrennende Probe wird mit 0.25 Volumen 5x TAE-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 5 bis 10 V/cm und kann anhand des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus und Xylencyanols verfolgt werden. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid (0.5 µg/ml Wasser) für einige Minuten gefärbt. Der Ethidiumbromid-DNA-Komplex wird durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videoprinter-Anlage (S+L) dokumentiert.

3.3.2 Proteine

3.3.2.1 Protein Expression

Expression rekombinanten Proteins mittels des QIAexpress Expressionssystems

Dieses System bietet eine hohe prokaryontische Expressionsrate (bis zu 50% des Gesamtproteins) durch einen T5 Promoter und eine synthetische Ribosomenbindestelle. Die Expression wird durch ein doppeltes lac Operator System kontrolliert, was die Expression bei hohen Konzentrationen des lac Repressors effektiv unterbindet. Ein 6xHis-Tag wird N-terminal kloniert und die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Das System besteht aus zwei Vektoren, dem pQE- und dem pREP4-Vektor. Der pQE-Vektor trägt eine Ampicillinresistenz, hat einen ColE1-Origin und kommt in ca. 30 Kopien pro Zelle vor. Er exprimiert das klonierte Protein. Der pREP4-Vektor trägt eine Kanamycinresistenz, hat einen p15A-Origin und kommt in ca. 30 Kopien pro Zelle vor. Er exprimiert den lac Repressor, um sicherzustellen, dass man den pQE-Vektor ohne Probleme, d.h. ohne Expression des klonierten Gens, vermehren kann.

3.3.2.2 Proteinanalytik

Quantifizierung

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinmengenbestimmung wurde mit BioRad-Bradford-Reagenz durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 durch zugegebenes Protein von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Die Absorption bei 595 nm kann dann photometrisch bestimmt werden. Zur Proteinmengenbestimmung werden 10 µl der zu untersuchenden Probe mit 790 µl Aqua bidest und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wird der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz werden 10 µl des jeweiligen Puffers eingesetzt. Mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden kann auf diese Weise die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Eichgerade korreliert mit folgender Gleichung:

$$1 \text{ OD}_{595 \text{ nm}} = 1538.5 \text{ µg/ml Protein}$$

Da die notwendige Meßgenauigkeit mit Hilfe der Gleichung ausreichend ist, wird bei weiteren Proteinmengenbestimmungen auf diese Gleichung zurückgegriffen.

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry mittels des Bio-Rad Detergent Compatible Protein Assay

Hierbei handelt es sich um einen Färbenachweis zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Solubilisierung mit Detergenzien. Die Reaktion ähnelt der von Lowry 1951 beschriebenen. Die Absorption wird bei 650-750 nm gemessen.

Elektrophoretische Auftrennung

SDS-PAGE

Die Proteine werden unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bei dieser Gelelektrophorese verwendet man ein Sammel- und ein Trenngel, wodurch es zu einer höheren Trennschärfe kommt. Vor dem Auftrag auf das Gel, werden die Proben 2 Minuten in SDS-Probenpuffer bei 95°C aufgekocht. Hierbei kommt es zu einer Anlagerung von SDS an die Proteine, wodurch sie eine einheitliche negative Ladung erhalten. Aus diesem Grund hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nicht mehr von der eigenen Ladung, sondern nur noch vom molekularen Gewicht ab. Je nach Molekulargewicht der eingesetzten Proteine verwendet man unterschiedliche Gelkonzentrationen: bei niedermolekularen Proteinen benutzt man hochprozentige Gelkonzentrationen, bei hochmolekularen Proteinen dagegen niederprozentige Gelkonzentrationen. Der Gellauf wird bei 23 mA durchgeführt und kann durch das Bromphenolblau im SDS-Probenpuffer verfolgt werden. Anschließend kann das Gel mit Coomassie gefärbt oder zum Western Blot eingesetzt werden. Durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue werden Proteine in der Gelmatrix unspezifisch aber irreversibel angefärbt. Die Färbung der Matrix hingegen ist reversibel. Inkubiert man das Gel nach dem Färbevorgang in Entfärber, wird nur die Gelmatrix entfärbt, so dass die Proteinbanden deutlich erkennbar werden. Zur Dokumentation kann das Gel anschließend auf Whatman-Papier überführt und im Gelrockner bei 70°C für 1 h getrocknet werden.

Ponceau-Färbung

Filtergebundene Proteine können durch Ponceau-S-Rot-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Färbung ist reversibel und dient dazu, die Lokalisation der aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Außerdem dient diese Färbemethode als Kontrolle dafür, dass der Transfer aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose erfolgreich war. Die Nitrocellulose wird 10 min in Ponceau-Rot unter leichtem Schütteln gefärbt und anschließend so lange in VE-Wasser gewaschen, bis die Banden sichtbar werden. Mit Bleistift können nun die Banden des Markers markiert werden, um später bei der Immundetektion eine Größenabschätzung durchführen zu können.

3.3.2.3 Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen

Phage Display Systeme - M13 p3 - Ph.D. Random Peptide Bibliotheken

Reparatur der phosphorylierten DNA-Fragmente

Durch den DNase I-Verdau entstehen überhängende Enden, die durch Klenow-Enzym aufgefüllt werden. Nur an glatten Enden können die Linker ligieren. Zu den 50 µl der phosphorylierten Fragmente werden 4 µl 10 mM dNTPs und 2 µl Klenow-Enzym gegeben. Die Mischung wird 30 min bei 37°C inkubiert. Dem Reparaturschritt folgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine einstündige Ethanol-Fällung bei -20°C. Das getrocknete DNA-Präzipitat wird in 18 µl TE-Puffer aufgenommen und kann für die Ligation mit den Linkern eingesetzt werden.

Titerbestimmung der amplifizierten Phagen

Vom Phagenüberstand der Phagen-Bibliothek wird eine Verdünnungsreihe in TBS hergestellt. Von einer *E. coli* K91kan Übernachtskultur werden Terrific-Zellen gemacht. Um die Titerbestimmung durchzuführen, nimmt man 10 µl der *E. coli* K91kan-Terrific-Zellen und gibt 10 µl der einzelnen Phagenverdünnungen dazu. Damit die Phagen die Bakterienzellen infizieren können, läßt man die Mischung 30 min bei Raumtemperatur stehen. Zur Induktion der Tetracyclin-Resistenz gibt man 1 ml LB/Low Tet [0.2 µg/ml] zu den infizierten Bakterien und läßt diese 45 min bei 37°C schütteln. Um die genaue Zahl der infizierten Bakterien bestimmen zu können, werden 200 µl jedes Ansatzes auf Tet/Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durchführung der Panningrunden

Elution der Phagen

Um die an die Anti-Knob Antikörper gebundenen Phagen zu eluieren, werden 500 µl Elutionspuffer für die Dauer von 10 min bei Raumtemperatur in der Petrischale inkubiert. Nach der Inkubationszeit überführt man den Elutionspuffer mit den gelösten Phagen in ein Eppendorfreaktionsgefäß, in das 75 µl Tris/HCl pH 9.1 vor-gelegt werden, um den sauren pH-Wert des Elutionspuffers zu neutralisieren.

Durchführung der Panningrunden mit der PHD random peptide Phagenbank

Beschichten und Blocken der Petrischalen

Die Petrischalen mit einem Durchmesser von 3.5 cm werden über Nacht bei 4°C unter Schütteln mit 10 µg Anti-Knob Antikörper in 100 mM NaHCO₃ in einem Volumen von 1 ml beschichtet. Die freien Bindungsstellen der Petrischalen werden mit 1 ml Blocklösung I abgesättigt.

Phageninkubation "PANNING"

Die Blocklösung wird entfernt und die Petrischalen 6 x mit TBS/0.1% Tween-20 gewaschen. In einem Volumen von mindestens 400 µl (TBS/0.1% Tween-20) werden 10¹¹ Phagen der original Ph.D. Random-peptide-Library (7 und 12mer, New England Biolabs) zum "Panning" eingesetzt. Die Phagen werden unter Schütteln bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Bei diesem Schritt sollen nun die Phagen binden, die eine gewisse Affinität zum jeweils verwendeten Anti-Knob Antikörper besitzen. Nach der einstündigen Inkubationszeit werden die ungebundenen Phagen abgenommen. Um unspezifisch bzw. schwach bindende Phagen zu entfernen, wird die Petrischale 10 x mit TBS/0.1% Tween-20 gewaschen. Nach dem Waschen sind im Idealfall nur noch die spezifisch bindenden Phagen an das Protein gebunden. Um diese Phagen für weitere Panning-Runden einsetzen zu können, müssen sie von dem Protein getrennt und amplifiziert werden. Die Phagen werden eluiert. Bevor die Phagen für die nächste Panning-Runde amplifiziert werden, nimmt man 2 µl des neutralisierten Eluats ab, um die Anzahl der eluierten Phagen bestimmen zu können.

Infektion und Amplifikation der Phagen

20 ml LB-Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur von ER2537 angeimpft. Zu dieser Kultur werden die eluierten Phagen gegeben und der Ansatz 4.5 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach werden die Bakterien 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Phagenüberstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser wird nochmals 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die niedermolekularen, unlöslichen Substanzen aus dem Phagenüberstand zu entfernen. Bevor die Phagen mit 1/6 Volumen PEG/NaCl gefällt werden, müssen 2 µl für die Titerbestimmung nach der Amplifikation abgenommen werden. Die Fällung erfolgt

bei 4°C über Nacht. Die Phagen werden 15 min bei 10.000 rpm und 4°C sedimentiert. Der phagenfreie Überstand wird verworfen. Um die gesamte Flüssigkeit entfernen zu können, zentrifugiert man noch einmal 5 min bei 10.000 rpm. Das Phagenpellet wird in 1 ml TBS aufgenommen. Damit sich die Phagen, die während der Fällung Aggregate gebildet haben, vollständig lösen können, läßt man sie 10 min bei Raumtemperatur stehen. Die Phagenlösung wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die ungelösten Bestandteile 5 min und 13.000 rpm bei Raumtemperatur sedimentiert. Der Überstand wird in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß transferiert und die Phagen noch einmal mit 1/6 Volumen PEG/NaCl gefällt. Diesmal erfolgt die Fällung 1 h auf Eis. Nach erneutem Zentrifugieren werden die Phagen in 100 µl Panning-Puffer aufgenommen und für die nächste Panningrunde eingesetzt.

Bestimmung des Phagentiters

Der Titer nach der Elution der Phagen zeigt, wieviel Phagen während des Pannings an das Zielprotein gebunden haben. Die Bestimmung des Phagentiters nach der Amplifikation hingegen zeigt, wie groß das einzusetzende Volumen für die zweite bzw. dritte Panning-Runde sein muß, damit man ebenfalls 10^{11} Phagen einsetzt. Anhand dieser beiden Werte kann man ebenfalls feststellen, wie viele Phagen eines Klons nach der Amplifikation in der Lösung enthalten sind. Bei der Erstellung des Phagentiters ist allerdings zu beachten, dass die Anzahl der Plaques nur dann linear mit der zugegebenen Phagenmenge ansteigt, wenn die MOI kleiner als 1 ist. Die Terrific-Zellen müssen in einem großen Überschuß zugegeben werden, damit jeder Phage ein Bakterium infizieren kann und man keine Doppelinfektionen erhält. Um den Titer bestimmen zu können, werden die Phagen in TBS verdünnt. Für die nichtamplifizierten Phagen sollten die Verdünnungen im Bereich zwischen 10^{-1} und 10^{-4} liegen, für die amplifizierten Phagen zwischen 10^{-8} und 10^{-11} . Von einer Übernachtskultur ER2537 werden Terrific-Zellen hergestellt. Für die Infektion mischt man 10 µl der jeweiligen Phagenverdünnung mit 100 µl Terrific-Zellen und 40 µl einer ER2537 Übernachtskultur. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation bei RT gibt man 3 ml Top-Agar hinzu und verteilt alles auf einer vorgewärmten LB-Platte. Nachdem der Top-Agar erstarrt ist, kann die Platte umgedreht werden und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

T7 Select

Die T7 Bibliotheken wurden prinzipiell wie die Ph. D. Random Peptide Bibliotheken eingesetzt. ELISA-Platten wurden gecoatet, geblockt, gewaschen und mit Phagen inkubiert. Nach 30 min wurden Phagen zur Bestimmung des Inputtiters abgenommen und die ELISA-Platte gewaschen. Die „Elution“ gebundener Phagen erfolgte mit 200µl BLT5615 Bakterien. Mit diesen Bakterien erfolgte die Bestimmung des Outputtiters und die Infektion einer IPTG-induzierten BLT5615 Kultur ($OD_{600\text{ nm}} = 0,8$). Nach einer Stunde war die Bakterienkultur lysiert und das Phagenamplifikat wurde durch Zentrifugation (10 min 8.000 g) von den Zellen getrennt und bei 4°C gelagert.

Titern

250 µl einer BLT5615 Übernachtskultur werden mit 100µl IPTG (0,1 M) induziert, mit 100µl einer Phagenverdünnung und 2,5 ml 50°C warmen Topagars vermischt und auf vorgewärmte LB-Amp 50 Platten gegeben.

Plaque-Lift

Eine Platte des Titerns wird 1 h kaltgestellt, dann für 1 min mit einem Nitrozellulosefilter bedeckt. Der Filter wird getrocknet, geblockt, mit dem Erstantikörper und schließlich mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgt mittels ECL.

Sequenzieren

Ein Plaque wurde mit einem Zahnstocher abgehoben und in 100 µl 10mM EDTA pH8 überführt. Nach kurzem Mischen wurde 10 min bei 65°C inkubiert, bei RT abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die Phagenköpfe waren nun geöffnet und die DNA freigesetzt.

PCR-Ansatz (50 µl)

2 µl	Phagenlysate
5 µl	Puffer A
5 µl	Puffer B
3 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	T7 UP-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	T7 DOWN-Primer (5 pmol/µl)
1 µl	dNTP-Mix
1 µl	Elongase (Gibco, 1U/µl)
31 µl	bidest

PCR-Programm "Tseven"

35 x

94°C	50 sec
50°C	1 min
72°C	1 min

Final extension 72°C 6 min

Bei -20°C wegfrieren

Zum Sequenzieren

(falls nicht optimiert)

2 µl	Probe
3 µl	Mix
1 µl	T7 UP-Primer
<u>4 µl</u>	bidest
10 µl	

Peptide Scan

Optimieren der Parameter für die Verwendung membrangebundener Peptide

A) Immobilisierte Peptide

Ein Roboter (ASP222, Abimed, Langenfeld, Germany) wurde zur Produktion großer Mengen von Peptiden benutzt. Diese wurden, wie bereits beschrieben (Frank, 1992) in Arrays auf aktivierte Zellulose-Membranen (Abimed, Langenfeld, Germany, APEG-UC540+10/15, 84300) synthetisiert (vgl. 3.3.2.5). Nach der Synthese wurden Immunoassays nach bereits veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Bluthner *et al.*, 2000, Mahler M *et al.*, 2000). In Kürze: Nicht-spezifische Bindestellen wurden durch Übernachtinkubation der Membranen bei 4°C in Block-Puffer (Tabelle 2) geblockt. Nach Waschen mit 0.05% (v/v) Tween-20 in TBS, wurden die Membranen 2h bei Raumtemperatur mit den Antikörperverdünnungen inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden in drei Waschschritten von jeweils 5 min mit 0.05% (v/v) Tween-20 in TBS entfernt. Zur Detektion wurde 1h lang mit 1:5.000 im jeweiligen Block-Puffer verdünnten Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Mensch IgG oder Ziege-anti-Maus IgG+IgM Antikörpern (Dianova, Hamburg) inkubiert. Die nachfolgende Visualisierung wurde mit ECL™ Westernblot Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

B) Antikörper und Blocklösungen

Ausgewählt wurde der monoklonale Mausantikörper Bp53-11, gerichtet gegen das humane tumorsupprimierende Protein p53. Mit random peptide Phage Display Bibliotheken und immobilisierten Peptiden konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsstelle, welche von diesem Antikörper erkannt wird, aus dem N-terminalen Kern-Epitope-Motiv FSDLWKL (AS 19-25) (Fack *et al.*, 1997) zusammensetzt. Bei den Immunoassays wurden vier Antikörperverdünnungen eingesetzt (1 µg/ml, 0.2 µg/ml, 40 ng/ml, 8 ng/ml). Die Verdünnung erfolgte in der jeweiligen Blocklösung.

Weiterhin wurde ein humanes polyklonales Autoimmuneserum ausgewählt, welches von einem Patienten stammt, welcher an systemischer Sklerose litt. Dieses Serum enthält hohe Titer an anti-Centromer-Antikörpern, darunter auch Antikörper spezifisch für CENP-A. Ein gut definiertes Epitop liegt in der N-terminalen Domäne des Centromer-Proteins A (Mahler *et al.*, 2000). Das Serum wurde in Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 eingesetzt.

Als Zweitantikörper wurden Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Mensch IgG oder Ziege-anti-Maus IgG+IgM von Dianova (Hamburg, Deutschland). In beiden Modellsystemen diente der Zweitantikörper allein als Negativkontrolle.

Block-lösungen	Bei Verwendung von Seren	Bei Verwendung von Antikörpern
I (BSA)	5% (w/v) BSA, TBS mit 0.2% (v/v) Tween-20	5% (w/v) BSA, TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
II (Pferdeserum)	50% (v/v) Pferdeserum, TBS mit 0.2% (v/v) Tween-20	50% (v/v) Pferdeserum, TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
III (Milch)	5% (w/v) Magermilchpulver, TBS mit 0.2% (v/v) Tween-20	1% (w/v) Magermilchpulver, TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
IV (Tween-20)	TBS mit 0.2% (v/v) Tween-20	TBS mit 0.05% (v/v) Tween-20
V (Superblock)	TBS mit 50% (v/v) Pferdeserum, 10 % (v/v) 10x Blockpuffer Konzentrat (SU-07-250, 10x; Genosys, Cambridge, UK), 0.2% (v/v) Tween-20, 150 mM Sucrose	TBS mit 3% (v/v) Pferdeserum, 10 % (v/v) 10x Blockpuffer, 0.05% (v/v) Tween-20, 150 mM Sucrose

Tabelle 2. Verwendete Blocklösungen
(TBS (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl))

Antikörper	Epitop	Kontrolle
Bp53-11	QET FSDLWKL (p53 aa 19-25)	LSQETFSDLW (p53 aa 17-23)
CEN-0010	KPEAPRRRSP (CENP-A aa 9-16)	PRRRSPSPTP (CENP-A aa 13-20)

Tabelle 3. Eingesetzte Peptide (Kernepitope in rot)

C) Detektion

Beim Epitope Mapping wird der Erstantikörper, welcher seinen membrangebundenen Bindungspartner erkennt, mittels eines Zweitantikörpers detektiert, welcher gegen die konstanten Domänen des Erstantikörpers gerichtet ist. Der Zweitantikörper ist an ein Enzym, wie die Meerrettich Peroxidase oder die alkalische Phosphatase, gekoppelt. Der Komplex aus Erst- und Zweitantikörper wird durch die Zugabe des Substrats, welches durch das Enzym in ein sichtbares Reaktionsprodukt (farbiges Präzipitat, Emission von Licht) umgesetzt wird, visualisiert. Alternativ kann der Erstantikörper auch direkt markiert werden, indem man freie Aminogruppen biotinyliert. Biotinylierte Interaktionspartner werden durch Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin detektiert. Streptavidin hat eine enorme, fast irreversible, Affinität für Biotin. Abhängig von der Anzahl freier Aminogruppen, welche biotinyliert werden können, kann dies zu einer Verstärkung der Signale benutzt werden. Man muß allerdings sicherstellen, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung durch die Biotinylierung nicht behindert wird.

D) Regeneration

Nach Gebrauch wurden die Membranen regeneriert. Hierbei wurde die Elution durch reduzierende Bedingungen und die Elution durch niedrigen pH der Lösung kombiniert. In Kürze: Die Membranen wurden mit Wasser, Dimethylformamid und wieder Wasser gespült. Anschließend wurde 3 x 10 min in Regenerationspuffer A (8 M Harnstoff, 1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) beta-Mercaptoethanol) und 3 x 10 min in Regenerationspuffer B (50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig in destilliertem Wasser). Zum Schluß wurden die Membranen noch mit Ethanol gespült und getrocknet.

Ligand-Dot-Blot

Mit dieser Methode können Interaktionen zwischen dem Knob und den Anti-Knob Antikörpern im nativen Zustand nachgewiesen werden. Dazu werden 5 µg Knob auf eine Nitrozellulosemembran getropft und die freien Bindungsstellen der Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit TBS/ 5%Milch/0.1% Tween-20 geblockt. Nach Entfernen der Blocklösung wird kurz mit TBS/0.1% Tween-20 gewaschen. Der Anti-Knob Antikörper wird in einer Konzentration von 10 µg/ml in TBS/0.1% Tween-20 für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird 3 x 10 min mit TBS/0.1% Tween-20 gewaschen. Die Bindung von Knob wird mit einem HRP-gekoppeltem Zweitantikörper oder über SP-Komplex detektiert. Nach Zugabe des TMB-Substrats wird ein farbiges Präzipitat sichtbar.

3.3.2.4 Western Blot

Die auf einem SDS-PAGE separierten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Verfahren in 1 Stunde bei 50 mA pro Minigel (7 x 8 cm) auf eine Nitrocellulosemembran gleicher Größe transferiert. Durch 10 min Färben mit Ponceau S konnte die Transferqualität und Lage der Proteine auf der Nitrocellulosemembran beurteilt und angezeigt werden.



Abbildung 9. Aufbau des Blotes

Die Whatman Papiere, die Nitrocellulose und das SDS-PAGE Gel werden in Transferpuffer getränkt.

3.3.2.5 Herstellung synthetischer Peptide nach Merrifield

Die Synthese der Peptide wurde unter Verwendung der Schutzgruppen-Technik auf einer vorbehandelten Membran durchgeführt.

Zuerst müssen DMF und NMP auf ihre Reinheit überprüft werden. Hierfür löst man 1 mg Bromphenolblau in 10 ml DMF auf. Hat die Lösung eine gelbe Farbe, so ist das DMF zur Peptidsynthese geeignet. Verfärbt sich die Lösung jedoch grün oder blau, so enthält das DMF zu viele freie Amine, welche unter anderem während der Peptidsynthese zu einer vorzeitigen Ablösung der F_{moc} -Schutzgruppe führen könnten. Um die Reinheit des NMP zu bestimmen, stellt man eine 1%ige Bromphenolblaulösung mit DMF her. Von dieser Lösung gibt man 10 μ l zu 1 ml NMP, vermischt beides gut und läßt es 5 Minuten stehen. Auch hier sollte die Lösung gelb gefärbt sein, damit das NMP zur Synthese verwendet werden kann. Ist dies nicht der Fall, so muß das NMP über einen Molekularsieb aufgereinigt werden, um die freien Amine zu beseitigen.

Alle Schritte der Peptidsynthese werden aufgrund der toxischen Reagenzien unter dem Abzug durchgeführt. Alle Inkubationsschritte, ausgenommen der Inkubation nach dem Aminosäureauftrag, werden auf einem langsam laufenden Schüttler durchgeführt. Die Aminosäurealiquots werden aus dem -70°C Schrank genommen und zusammen mit der Membran im Excikator aufgetaut. Entsprechend dem Pipettierschema des Syntheseprotokolls werden 0,9 μ l Aminosäurederivat-Lösung auf die jeweiligen Spots aufgetragen und 15 min im geschlossenen Reaktionsgefäß inkubiert. Danach werden nochmals 0,9 μ l Aminosäurederivat-Lösung aufgetragen und ebenfalls 15 min inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Kopplung der Aminosäuren, welches man anhand der Verfärbung des Bromphenolblaus der einzelnen Spots nach hellblau, grün oder gelb erkennen kann. Diesem ersten Schritt folgen nun mehrere Waschschrte:

30 Sek Inkubation in 20 ml DMF und 800 μ l Essigsäureanhydrid
2 min Inkubation in 20 ml DMF und 800 μ l Essigsäureanhydrid
5 min Inkubation in 20 ml DMF und 800 μ l Essigsäureanhydrid

Das Essigsäureanhydrid hat die Aufgabe die noch freien Aminogruppen zu acetylieren. Es folgen 3 Waschschrte von 2 min mit je 20 ml DMF. Durch eine 5-minütige Inkubation mit 20 ml 20% Piperidin/DMF werden die F_{moc} -Schutzgruppen der frisch gekoppelten Aminosäuren entfernt. 10 x 2 min mit 20 ml DMF waschen. Danach wird die Membran mit 20 ml DMF und 200 μ l 1% Bromphenolblau/DMF 5 min inkubiert, wodurch die freien Aminosäuren angefärbt werden. Anschließend wäscht man 3 x 2 min mit 20 ml Ethanol. Nach dem letzten Waschschrte legt man die Membran zwischen ein Filterpapier und trocknet sie mit einem Fön

auf kalter Stufe. Nun kann man die Membran bei -20°C einfrieren oder mit dem nächsten Aminosäureauftrag beginnen. Im letzten Synthese-Zyklus werden die N-terminalen Aminosäuren einer Acetylierung unterzogen, weshalb das Syntheseprotokoll abgewandelt wird: Nach dem Auftrag der Aminosäurederivat-Lösungen inkubiert man die Membran 2 min in 20 ml DMF, anschließend 5 min in 20% Piperidin/DMF. Als nächster Schritt wäscht man 10 x mit 20 ml DMF und färbt dann für 5 min mit 20 ml DMF und 200 μl 1% Bromphenolblau die Spots an. Man inkubiert mit 20 ml DMF und 400 μl Essigsäureanhydrid solange bis die Spots entfärbt sind, ist dies nach 15 min noch nicht passiert erneuert man die Lösung und inkubiert nochmals. Im Anschluß daran wäscht man 3 x mit 20 ml DMF und 3 x mit 20 ml Ethanol. Ganz zum Schluß müssen noch die Schutzgruppen der Aminosäuren abgespalten werden. Dies erfolgt durch eine 1-stündige Inkubation der Membran in 5 ml Dichlormethan, 5 ml Trifluoressigsäure und 250 μl Triisobutylsilan. Anschließend wäscht man 4 x 2 min mit 20 ml Dichlormethan, 3 x 2 min in DMF und 3 x 2 min in Ethanol. Zu guter Letzt trocknet man die Membran wie schon oben beschrieben. Im Anschluß daran kann die Membran zum Immunnachweis eingesetzt werden. Um verschiedene Nachweise durchzuführen, muß die Membran nach jedem Immunnachweis regeneriert werden. Dies geschieht wie folgt:

3 x 10 min Waschen in 20 ml Bidest
3 x 10 min Waschen in 20 ml DMF
2 x 10 min Waschen in 20 ml Bidest
3 x 15 min Waschen in 20 ml 30°C warmem Regenerationspuffer A
3 x 10 min Waschen in 20 ml Regenerationspuffer B
2 x 10 min Waschen in 20 ml Ethanol
Membran mit kaltem Föhn trocknen

3.3.3 Immunoassays

3.3.3.1 Aufreinigung von Proteinen über ihren His-Tag

Zur Aufreinigung von Proteinen mit einem His-Tag wurde Ni-NTA Agarose (QIAGEN) verwendet. Die Imidazolringe der Histidinreste binden an die Nickelionen, welche durch die NTA-Gruppen an die Matrix gebunden sind. Wählt man die Bedingungen nicht stringent genug, so reinigt man auch Proteine auf, welche an die Proteine mit His-Tag binden. Unterbinden kann man dies durch Detergenzien, Zugabe von Salz oder Reduktion hydrophober Wechselwirkungen durch Glycerin.

Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden die Bakterien durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Danach wird das Lysat durch Zentrifugation bei 40.000 x g für die Dauer von 30 min bei 4°C geklärt. Das Zell-Lysat wird mit dem zehnfachen Volumen Waschpuffer 1 gemischt und mit 0.5 Volumen Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden), die zuvor mit 10 Volumen dieses Puffers äquilibriert wird, versetzt. Die Inkubation erfolgt für die Dauer von 4 h bei 4°C auf einer Drehscheibe. In dieser Zeit bindet das Fusionsprotein mit seinem 6 x His-Tag an die Ni-NTA-Agarose. Für die verschiedenen Waschschrte und die Elution des Proteins wird die Ni-NTA-Agarose in eine Säule gepackt. Um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen, wird die Säule zuerst mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer, der 20 mM Imidazol beinhaltet, und dann mit dem gleichen Volumen Waschpuffer mit 30 mM Imidazol gewaschen. Das Protein wird dann in mehreren 1ml-Fractionen mit Elutionspuffer [0.9M Imidazol] vom Säulenmaterial gelöst. Um das Imidazol aus den einzelnen Fractionen nach der Elution zu entfernen, wird bei 4°C über Nacht gegen TBS dialysiert. Von den einzelnen Fractionen wird mittels der Proteinmengenbestimmung nach Bradford der Proteingehalt in den einzelnen Fractionen bestimmt. Um die Aufreinigung zu kontrollieren, werden die Proteine der Säulenfractionen in einem 12%igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Zur Aufbewahrung des Proteins wird ein 15%iger Glycerinstock angefertigt und die Proben bei -70°C gelagert.

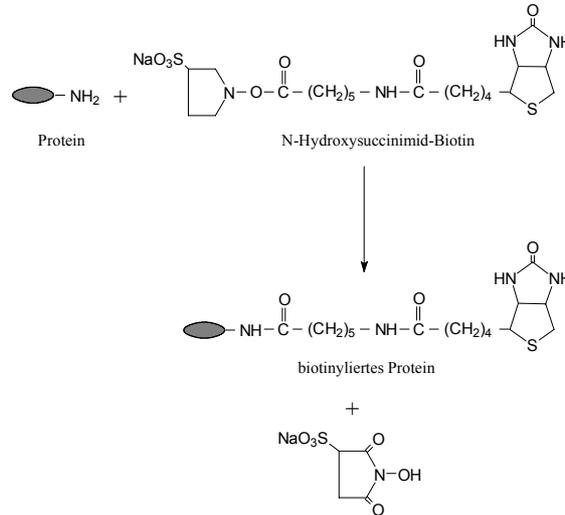
3.3.3.2 Aufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose

Die Protein-G-Sepharose Säule wird mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0 äquilibriert. In einem Volumen von 200 μl gibt man den Antikörper auf die Protein-G-Sepharose-Säule, läßt die Flüssigkeit einsinken und gibt dann 1,5 ml Natriumphosphat-Puffer auf die Säule. Den Durchlauf sammelt man auf und gibt ihn nochmals auf die Säule. Ist der Durchlauf ebenfalls eingelaufen, so wäscht man mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0 bis kein Protein mehr aus der Säule gewaschen wird. Dies überprüft man, indem man einen Tropfen auffängt und mit Bradford-Reagenz den Proteingehalt bestimmt. Kommt kein Protein mehr von der Säule, so gibt man nochmals 800 μl 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.0 auf die Säule, läßt es einlaufen und eluiert danach mit 0,1M Glycin pH 2,75. Fractionen aus 8 Tropfen, dies entspricht ca. 400 μl , werden aufgefangen und sofort mit 50 μl 1M Tris pH 9.0 neutralisiert.

Die Fractionen, welche den Antikörper enthalten, werden mittels Bradford-Reagenz bestimmt und mit Hilfe von Microcon 30 auf ein Volumen von etwa 200 μl konzentriert.

3.3.3.3 Biotinylierung von Antikörpern

Für die Biotinylierung verdünnt man 100 µg Antikörper mit Natriumboratpuffer pH 8,6 auf ein Volumen von 1 ml und gibt dann 2 µl Biotinylierungsreagenz (Amersham) hinzu. Die Biotinylierung erfolgt bei Raumtemperatur für 1 Stunde auf dem Drehschüttler. Hierbei bindet ein N-Hydroxysuccinimid-Biotin-Ester an primäre Aminogruppen.



Dieser Biotin-Ester hat den Vorteil, dass er einen Spacer enthält, so dass sterische Hindernisse für die Bindung Avidin-Biotin minimiert werden.

Danach gibt man den Biotinylierungsansatz auf eine mit PBS/0,1% BSA äquilibrierte Sephadex-G-25 Säule und fraktioniert ebenfalls mit PBS/0,1% BSA. Fraktionen von 10 Tropfen werden aufgefangen, dies entspricht etwa 500 µl. Von jeder Fraktion werden 10 µl für eine Proteinnengenbestimmung mit dem Bradford-Reagenz eingesetzt. Verfolgt man die OD bei 595 nm, so ist bei den Fraktionen, die den Antikörper enthalten, ein Abfall in der optischen Dichte zu erkennen. Dies ist damit zu erklären, dass diese Fraktionen kein BSA sondern den Antikörper enthalten. Die vereinigten Antikörperfraktionen werden mit Natriumazid (Endkonzentration 0,02 %) konserviert. Um den Erfolg der Biotinylierung zu überprüfen, führt man einen Dot-Blot durch.

3.3.3.4 Dot-Blot zur Überprüfung der Biotinylierung

10 µl einer jeden Fraktion werden auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Danach werden alle übrigen Bindestellen der Nitrocellulosemembran 15 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS/0,3% Tween-20 geblockt. Im Anschluß daran wird kurz mit PBS/0,05% Tween-20 gewaschen und 15 Minuten mit 1:1500 in PBS/0,05% Tween verdünntem HRP-Streptavidin Konjugat inkubiert. Das HRP-Streptavidin Konjugat bindet an den biotinylierten Antikörper. Nach dieser Inkubation wäscht man zuerst 3x mit PBS/0,05% Tween-20 und dann 1x mit PBS. Anschließend entwickelt man mit stabilisiertem TMB. Ist die Biotinylierung erfolgreich gewesen, wird an der Stelle des aufgetropften Proteins eine grün-blaue Färbung sichtbar.

3.3.3.5 ELISA

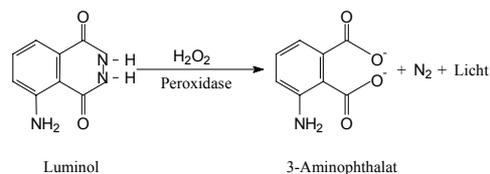
Die Maxisorp-Elisaplatten werden mit 100ng Antikörper pro well in 100 mM NaHCO_3 über Nacht bei 4°C oder 1-2 Stunden bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln beschichtet. Als Negativkontrolle werden zusätzlich Maxisorp-Elisaplatten mit 100 ng BSA pro well in 100 mM NaHCO_3 beschichtet. Anschließend blockt man die freien Bindungsstellen der Elisaplatten mit 200 µl Blocklösung (5% Milch in PBS) unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Nach 3x waschen mit PBS+0,02%Tween erfolgt die Inkubation mit den Phagen. Die Phagen werden in TBS/0,1% Tween-20/2mM CaCl_2 in einem Endvolumen von 100 µl für 1 h inkubiert. Anschließend wird 6x mit PBS+0,02%Tween gewaschen. Der zweite mit HRP gekoppelte Antikörper (1:5.000 in 5% Milch in PBS verdünnt) wird in einem Volumen von 100 µl pro well 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird 6x mit PBS+0,02%Tween gewaschen. Dann wird 3x nur mit PBS gewaschen. Die Detektion wird mit 100 µl TMB Substrat durchgeführt und die Farbreaktion mit 50 µl Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend mißt man die Lichtabsorption des farbigen Produkts bei 450 nm.

3.3.3.6 Immunnachweis mit Western Blot

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose und der Ponceaufärbung werden die freien Bindungsstellen der Nitrocellulose ½ Stunde mit 2% BSA bei Raumtemperatur abgesättigt. Im Anschluß daran kann die Detektion mit dem 1. Antikörper durchgeführt werden. Nach diesem Schritt wird 3 x 5 min mit PBS/0,05%Tween-20 gewaschen und es folgt dann die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Abhängig vom ersten Antikörper wird entweder mit Goat-anti-mouse Peroxidase IgG (L+H) oder mit Goat-anti-rabbit Peroxidase für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wäscht man 3 x 5 min mit PBS/0,05%Tween-20 und 1 x mit PBS und entwickelt dann mit stabilisiertem TMB.

3.3.3.7 Immunnachweis der synthetischen Peptiden

Die freien Bindungsstellen der Membran werden über Nacht bei 4°C mit 5% Milch/0,05% Tween-20/PBS abgesättigt. Der erste Antikörper wird 1 Stunde bei RT inkubiert (2µg/ml in Blockpuffer). Danach wäscht man die Membran 3 x 10 min mit PBS/0,05% Tween-20. Den 2. Antikörper, der mit einer *horseradish* Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert man ebenfalls 1 Stunde bei RT (1:5.000 in Blockpuffer verdünnt). Auch nach dieser Inkubation wäscht man 3 x 10 min mit PBS/0,05% Tween-20 und zusätzlich noch 10 min mit PBS. Die Detektion wird mit ECL durchgeführt, und je nach Stärke des Signals wenige Sekunden bis mehrere Minuten ein Film exponiert. Bei der Entwicklung mit ECL handelt es sich um eine Licht emittierende nicht radioaktive Methode zur Untersuchung von immobilisierten spezifischen Antigenen, die direkt konjugiert oder indirekt mit einem *horseradish* Peroxidase gekoppelten Antikörper markiert wurden. Lumineszenz ist definiert als Lichtemission, welche aus der Energieabgabe einer angeregten Substanz resultiert. Dies geschieht durch folgende chemische Reaktion:



Die maximale Lichtemission findet bei einer Wellenlänge von 428 nm statt und kann durch kurzzeitiges Auflegen eines Blaulicht sensitiven Autoradiographiefilms (Hyperfilm) detektiert werden.

3.3.4 Bakterien

Herstellung von Terrific Zellen

20 ml Terrific broth Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur K91kan angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Wenn die Zellen die logarithmische Wachstumsphase erreicht haben (OD_{600nm} = 1-2), werden sie 10 min bei 70 rpm geschüttelt, damit sich die Pili, die für die Phageninfektion notwendig sind, regenerieren können. Die Zellen sollten innerhalb 1 h für die Infektion eingesetzt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Knob-Antikörper

Knob wurde in *E. coli* mit einem N-terminalen Tag von 6 Histidinresten exprimiert, was eine Reinigung mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie erlaubte (Abbildung 11). Das exprimierte 21,3 kDa Protein umfasst mit den Aminosäuren 386-581 (Abbildung 10) die für die Trimerisierung notwendige 22. Wiederholung des Ad5 Fiberschafts sowie die eigentliche Knob-Domäne.

```
MKRARPS EDT FNPVYPYDTE TGPPTVPFLT PPFVSPNGFQ ESPPGVLSLR LSEPLVTSNG MLALKMGNGL
SLDEAGN L TS QNVTTVSPPL KKTKSNINLE ISAPLTVTSE ALTVA AAAAPL MVAGNTLTMQ SQAPLTVHDS
KLSIATQGPL TVSEGKLALQ TSGPLTTTDS STLTITASPP LTTATGSLGI DLKEPIYTQN GKLGLKYGAP
LHVTDDLNTL TVATGPGVTI NNTSLQTKVT GALGFDSQGN MQLNVAGGLR IDSQNRRLIL DVSYPFDAQN
QLNLR LGQGP LFINSAHNLD INYNKGLYLF TASNNSKKLE VNLSTAKGLM FDATAIAINA GDGLEFGSPN
APNTNPLKTK IGHGLEFDSN KAMVPKLG TG LSFDSTGAIT VGNKNNDKLT LWTTPAPSPN CRLNAEKDAK
LTLVLTKCGS QILATVSVLA VKGSLAPISG TVQSAHLIIR FDENGVL LNN SFLDPEYWNF RNGDLTEGTA
YTNAVGFMPN LSAYPKSHGK TAKSNIVSQV YLNGDKTKPV TLTTTLNGTQ ETGDTTPSAY SMSFSWDWSG
HNYINEIFAT SSYTFSYIAQ E
```

Abbildung 10. Aminosäure-Sequenz des Ad5 fiber Proteins

(Die Sequenz des in der vorliegenden Arbeit benutzten Knobs ist rot markiert)

Aus einem Liter Kultur ließen sich ca. 20 mg Knob-Protein reinigen.

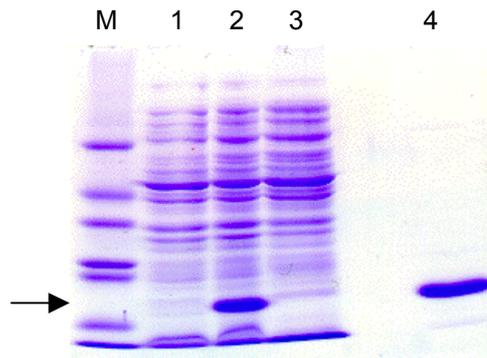


Abbildung 11. Reinigung von Ad5 Knob

Der Pfeil markiert exprimiertes Knob-Protein.

M) Marker,

1) Expressionsklon, nicht induziert,

2) Expressionsklon, induziert

3) Expressionsklon nicht induziert,

4) über eine Ni-NTA Säule aufgereinigtes Ad5 Knob-Protein

Die monoklonalen Erstantikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1 und 1D6.14 wurden über ProteinG-Sepharose gereinigt. Die Spezifität für Knob wurde in einem Dotblot getestet (Abbildung 12). Dies bedeutet weitestgehend native Bedingungen für Knob und erlaubt somit den Antikörpern sowohl lineare, als auch konformationelle Epitope zu erkennen. Die Anti-Knob-Erstantikörper wurden mittels eines Ziege-anti-Maus Zweitantikörpers detektiert, welcher gegen die konstanten Domänen des Erstantikörpers gerichtet ist. An den Zweitantikörper ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Gibt man das Peroxidasesubstrat dazu, so bildet sich an den Stellen, an welchen der Zweitantikörper gebunden hat, ein farbiges Präzipitat. Hierbei kam es zu einer leichten Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit der Kontrolle BSA, was auf die lange Inkubationszeit von 30 Minuten zurückzuführen ist.

Alternativ zur Verwendung eines Zweitantikörpers wurden die Erstantikörper durch Biotinylierung freie Aminogruppen direkt markiert. Gebundene biotinylierte Erstantikörper wurden durch Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin detektiert. In beiden Ansätzen erkannte jeder Erstantikörper spezifisch das Knob-Protein. Dabei lieferten biotinylierte Antikörper wesentlich schwächere Signale als unbiotinylierte.



Abbildung 12. Überprüfen der Erstantikörper im Dotblot (Die Reaktionszeit betrug 30 min.)

Bevor Knob in Westernblots eingesetzt wurde, wurden exemplarisch unterschiedliche Salzbedingungen bezüglich ihres Einflusses auf das Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörper 1D6.14 getestet. Eine Salzkonzentration von $0,137 \text{ M}$ NaCl erwies sich dabei als beste Wahl (Abbildung 13) und wurde im folgenden verwendet.

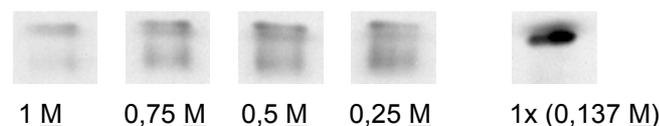


Abbildung 13. Einfluß der Salzkonzentration auf das Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 1D6.14 an natives Knob

Native PAGE, geblottet und mit 1D6.14 inkubiert. Strips 5 min entwickelt (angegeben ist der Salzgehalt im Puffer)

Um die Spezifität für trimeres Knob zu überprüfen wurde unterschiedlich behandeltes Knob-Protein in Westernblots verwendet (Abbildung 14). Die trimere Knob-Struktur bleibt nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung nativen Probenpuffers erhalten (Spur 1). Nach Aufkochen in SDS and beta-Mercaptoethanol enthaltendem Puffer zerfällt das Trimer in seine monomeren Untereinheiten (Spur 2). Alle Antikörper erkennen im Immunoblot ausschließlich trimeres Knob. Monomeres Knob wird nicht erkannt, mehr noch, es wirkt als Block der Membran und unterdrückt unspezifische Reaktionen der Membran mit dem Ziege-anti-Maus Antikörper.

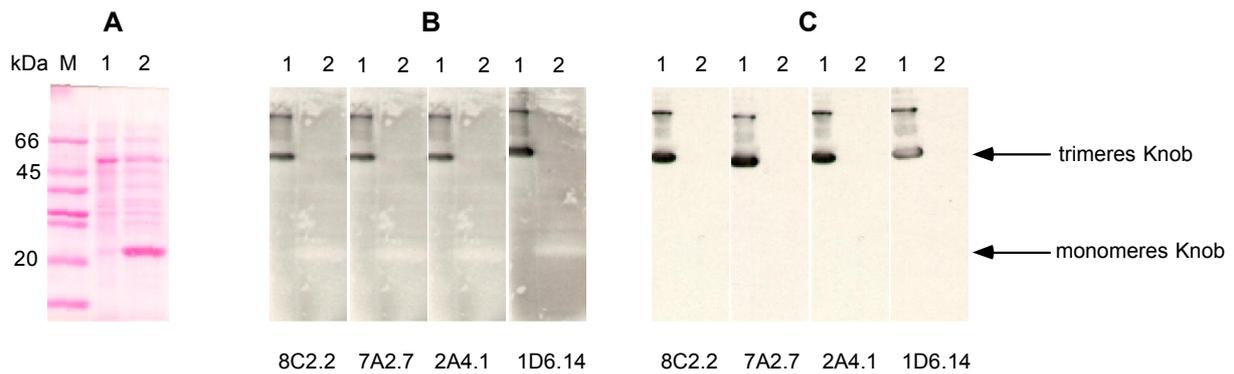


Abbildung 14. Expression rekombinanter Knobs und Detektion durch monoklonale Antikörper

M) Marker, 1) natives Knob, 2) denaturiertes Knob.

A) Ponceau Färbung exprimierten Proteins, welches in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose elektrotransferiert worden ist.

B) Gebundene, mit Ziege-anti-Maus Antikörper detektierte, Antikörper.

C) Gebundene biotinylierte Antikörper, mit Streptavidin-Meerrettich Peroxidase Konjugat detektiert.

Hüllprotein III Phage Display

Mit den kommerziell verfügbaren Ph.D.-C7C und Ph.D.-12 Bibliotheken (New England Biolabs) wurde nach Epitopsequenzen, also Sequenzen, an die die monoklonalen Erstantikörper binden, gesucht. Die Ph.D.-C7C Bibliothek enthält 2.8×10^9 unabhängige Klone mit disulfidflankierten 7-mer Inserts. Dies ist komplex genug, um die meisten der $20^7 = 1.28 \times 10^9$ möglichen 7-mer Sequenzen zu enthalten. Im Gegensatz dazu repräsentiert die Ph.D.-12 Bibliothek, mit 1.9×10^9 unabhängigen Klonen nur einen kleinen Teil des möglichen Sequenzraumes von $20^{12} = 4.1 \times 10^{15}$ 12-mer Sequenzen. Eine 12-mer Bibliothek erlaubt allerdings die Selektion von Peptidliganden für Bindungspartner, welche mehr als 7 Ligandenreste für eine feste Bindung benötigen, oder welche eine Interaktion mit Resten, die zu weit auseinander liegen um in einem 7mer Peptid enthalten sein zu können, eingehen. Zusätzlich ist es längeren exponierten Peptiden möglich, sich in kleine Strukturelemente (kurze Helices, beta-turns, etc.) zu falten welche für die Bindung an den Interaktionspartner notwendig sein können.

Um den Anreicherungsprozess zu kontrollieren wurde jeweils der Titer der eingesetzten Phagen, sowie der eluierten Phagen bestimmt (Abbildung 15, Abbildung 16).

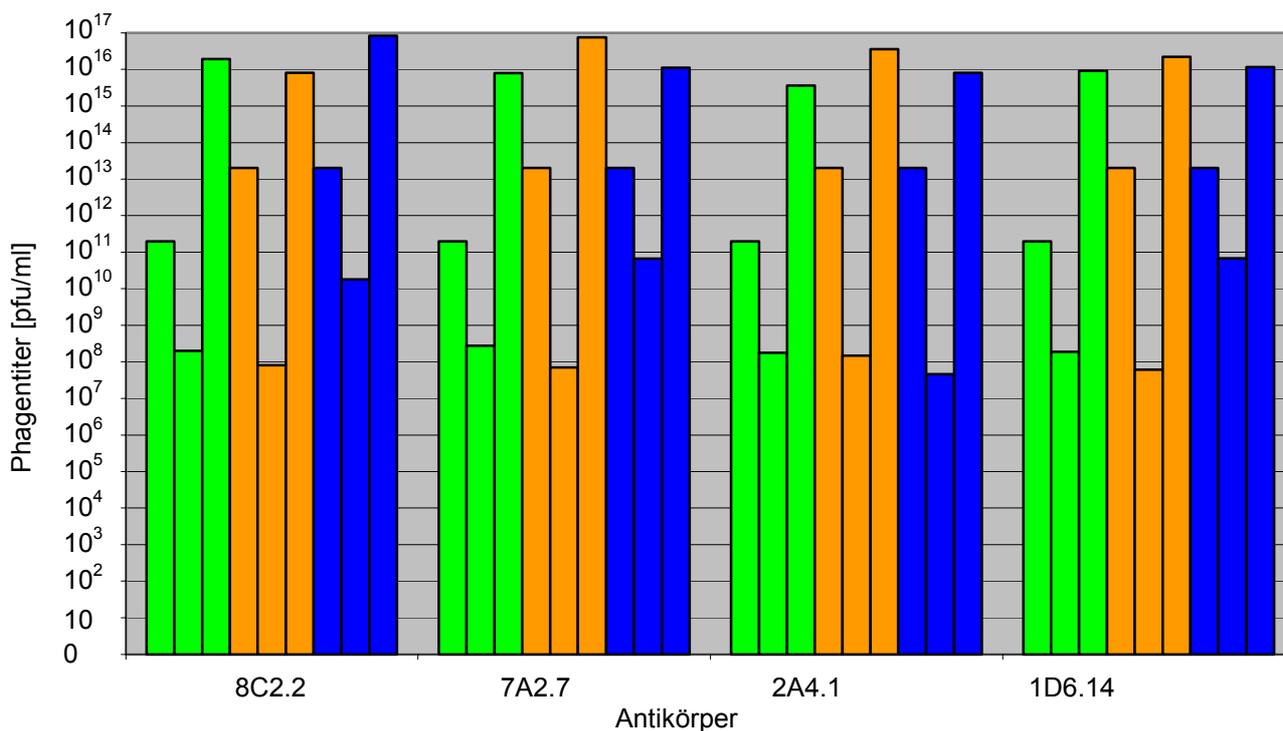


Abbildung 15. Titer der einzelnen Panningrunden mit der Ph.D.-C7C Bibliothek

Gezeigt sind jeweils drei Panningrunden (grün (1), orange (2), blau (3)). Der erste Balken in jeder Panningrunde zeigt den Inputtiter, der zweite den Outputtiter und der dritte den amplifizierten Outputtiter an.

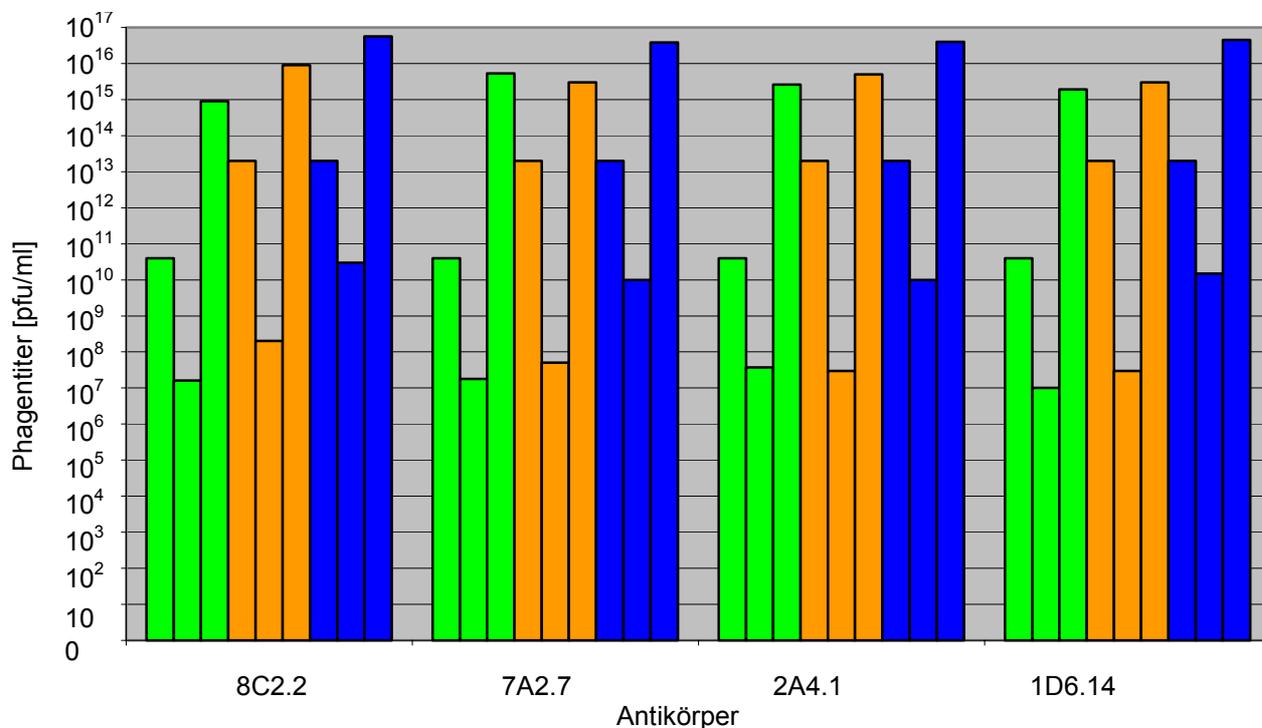


Abbildung 16. Titer der einzelnen Panningrunden mit der Ph.D.-12 Bibliothek

Gezeigt sind jeweils drei Panningrunden (grün (1), orange (2), blau (3)). Der erste Balken in jeder Panningrunde zeigt den Inputtiter, der zweite den Outputtiter und der dritte den amplifizierten Outputtiter an.

Bei beiden Bibliotheken wurden in den Panningrunden 2 und 3 gleichviele Phagen eingesetzt. Der Outputtiter stieg nach der 2. Panningrunde bei nahezu allen Antikörpern in

unterschiedlichem Ausmaß an. Einzige Ausnahme bildet 2A4.1 mit der Ph.D.-C7C Bibliothek; hier nahm der Outputtiter etwas ab.

Um die Anreicherung einfacher zu sehen, wurde der Quotient aus Output- und Inputtiter gebildet. Je höher der Balken im resultierenden Histogramm ist, desto mehr Phagen haben gebunden und konnten wieder eluiert werden (Abbildung 17, Abbildung 18). Der Maximalwert beträgt 1 und wird erreicht, wenn der Output- und der Inputtiter identisch sind.

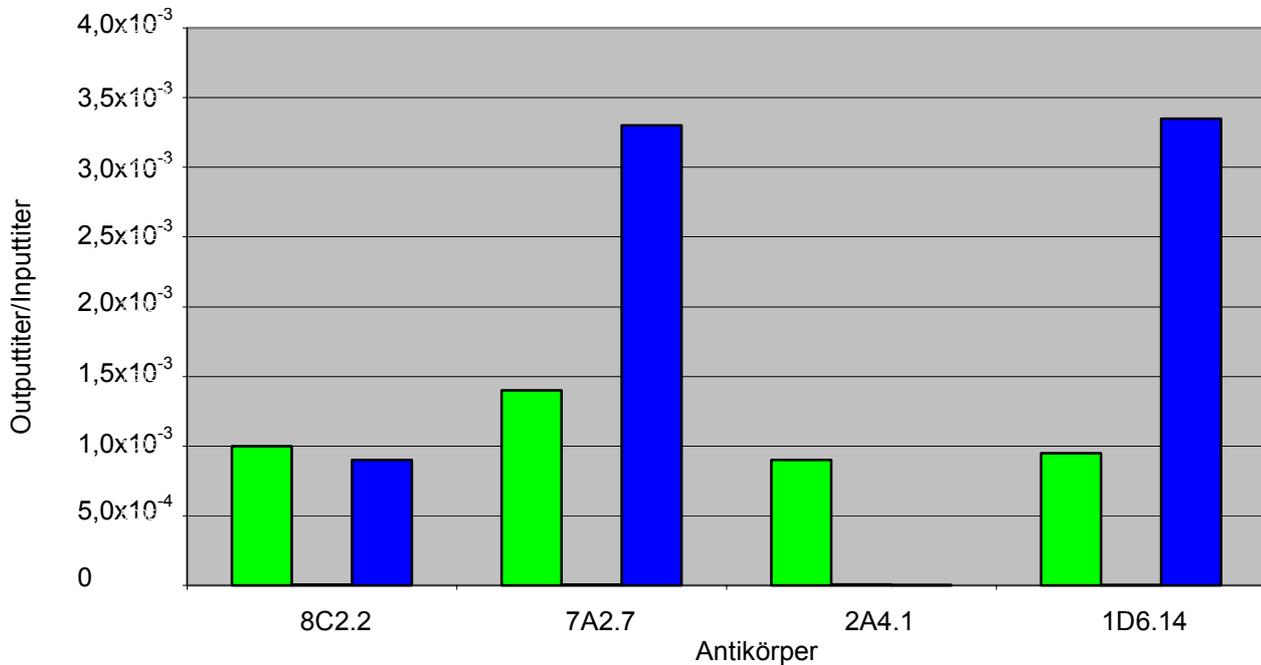


Abbildung 17. Verhältnis von Output zu Input für die einzelnen Panningrunden der Ph.D.-C7C Bibliothek. Gezeigt sind jeweils drei Panningrunden (grün (1), orange (2), blau (3)).

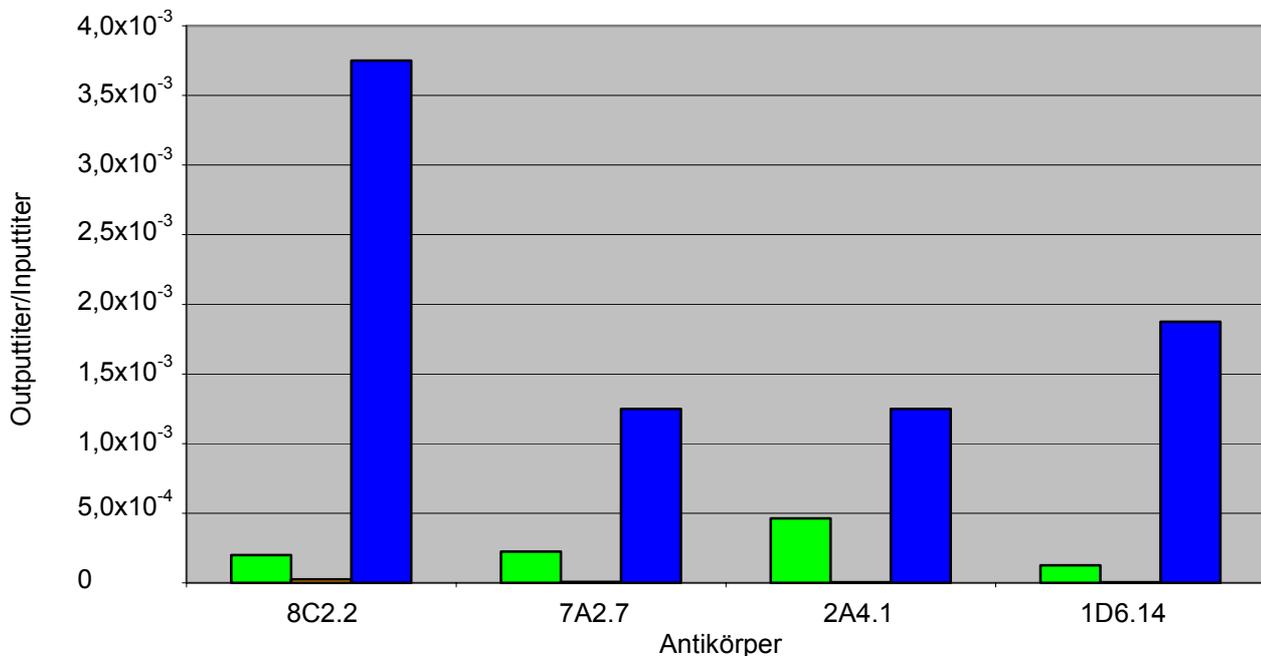


Abbildung 18. Verhältnis von Output zu Input für die einzelnen Panningrunden der Ph.D.-12 Bibliothek. Gezeigt sind jeweils drei Panningrunden (grün (1), orange (2), blau (3)).

In der zweiten Panningrunde haben relativ gesehen nur wenige Phagen gebunden und konnten wieder eluiert werden. Bei der Ph.D.-C7C Bibliothek zeigen die Antikörper 7A2.7 und

1D6.14, bei der Ph.D.-12 Bibliothek der Antikörper 8C2.2, einen starken Anstieg im Verhältnis Output zu Input. Ob dieser Anstieg auf eine Anreicherung von Bindern oder auf das Überwachsen der Phagenbibliothek mit einem schneller wachsenden und unspezifisch bindenden Phagenklon zurückzuführen ist bleibt zu überprüfen.

Im Screening der Ph.D.-C7C bzw. Ph.D.-12 Bibliothek nach Epitopsequenzen der monoklonalen Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1 und 1D6.14 wurden verschiedene Fusionsprotein-tragende Phagen in 3 Runden Biopanning angereichert (Tabelle 4, Tabelle 5). Diese Phagen wurden ansequenziert und in einem ELISA auf ihre Reaktivität bezüglich der monoklonalen Antikörper getestet. Hierzu wurden die Antikörper an die ELISA-Platte gebunden und mit den angereicherten Phagen inkubiert, welche dann über ein HRP/Anti-M13 Konjugat nachgewiesen wurden. Zusätzlich wurden die potentiellen Epitopsequenzen direkt auf Membranen synthetisiert und mit Anti-Knob Antikörpern inkubiert. Hiermit sollte überprüft werden, ob die angereicherten Sequenzen nur dann reaktiv sind, wenn sie in einer bestimmten Art und Weise auf Phagen präsentiert werden.

Erstantikörper	Häufigkeit [%]	Sequenz	ELISA Signal	Membranegebundenes Peptid reagiert mit	
				Erstantikörper	Zweitantikörper
8C2.2	11 (1/9)	~~FQDWLVK	+++	x	-
	11 (1/9)	~~QSDWLIH	+++	x	-
	11 (1/9)	~~MQDWLNR	+++	x	-
	11 (1/9)	~~LADWLHK	++	x	-
	11 (1/9)	~~KSDWLLK	++	x	-
	11 (1/9)	~~QADWLHT	+	x	-
	11 (1/9)	~~VETWLIK	+	x	-
	11 (1/9)	~NYCGWWG~	+/-	-	x
	11 (1/9)	HSTKAWF~~	+/-	-	x
8C2.2 Konsensus		^Q / _S DWL*K			
7A2.7	58 (15/26)	HTTSPLH	++	-	-
	12 (3/26)	HMTSPLL	+++	-	-
	12 (3/26)	HTLSPLH	+	-	-
	8 (2/26)	HTRSPLH	+	x	-
	4 (1/26)	H ^L TSPLH	+++	-	-
	4 (1/26)	H ^L LTPH	++	-	-
	4 (1/26)	HTSSPLH	+	-	-
7A2.7 Konsensus		HTTSPLH			
2A4.1	15 (3/20)	~TGPGPWF	++	x	-
	5 (1/20)	HSHWGPR~	++	x	-
	5 (1/20)	~TOYNQWS	++	x	-
	5 (1/20)	~SQYNLAM	++	-	-
	5 (1/20)	~SQYNPHQ	++	x	-
	5 (1/20)	~NQYNYHH	+	x	-
	5 (1/20)	~NQYNLFM	+	x	-
	5 (1/20)	~SQYNLHK	+	x	-
	5 (1/20)	~TOYNLHL	+	-	-
	5 (1/20)	~NTMRLIL	+	-	x
	5 (1/20)	~TOWNHYQ	+	x	-
	5 (1/20)	~TOYNQRF	+	x	-
	5 (1/20)	~EHQTIRG	+	x	-
	5 (1/20)	~SQFNMRA	+/-	x	-
	5 (1/20)	~NQNMHL	-	-	-
	5 (1/20)	~TOYNMLK	-	x	-
	5 (1/20)	~SQMNHKM	-	x	-
5 (1/20)	~SQYANHL	-	-	-	

2A4.1 Konsensus		^S/_TQYNLH			
1D6.14	33 (8/24)	HMTSPLL	+++	-	-
	25 (6/24)	HTTSPLH	++	x	-
	8 (2/24)	HTLSPLH	++	-	-
	8 (2/24)	HTKSPLH	+	-	-
	4 (1/24)	HTQSPLY	++	-	-
	4 (1/24)	HTTSPLQ	++	-	-
	4 (1/24)	HTKTPLH	++	-	-
	4 (1/24)	HTTSPLL	++	x	-
	4 (1/24)	HTSSPLH	++	x	-
	4 (1/24)	HTLTPLH	+	x	-
1D6.14 Konsensus		HTTSPLH			

Tabelle 4. Screening der Ph.D. -C7C Bibliothek nach Epitopsequenzen der monoklonalen Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1 und 1D6.14. (ELISA Signal +/-: > 0,0, +: > 0,1, ++: > 0,2, +++: > 0,3)

Die erhaltenen Insertsequenzen wurden mit CLUSTALW aligniert. Blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch, Rot: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte sind identisch, Gelb: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte sind ähnlich. Die Konsensussequenzen wurden mit dem Programm PRETTY bestimmt.

Erstantikörper	Häufigkeit [%]	Sequenz	ELISA Signal	Membranebundenes Peptid reagiert mit	
				Erstantikörper	Zweitantikörper
8C2.2	55 (12/22)	QH...DYIWRPHSLI	+/-	-	x
	27 (6/22)	HHMPDDLQTYGR~	+/-	-	x
	9 (2/22)	~SSARCDWLCAL~	++	-	x
	5 (1/22)	SHALQTPRAAGV~	+/-	x	-
	5 (1/22)	HHILLDAWLTPS~	n.d.	-	x
8C2.2 Konsensus		QH**D**W***S			
7A2.7					
	39 (9/23)	YIGELHPPHAVLL~	+++	-	x
	13 (3/23)	NFVRPYPSQMPP~	n.d.	x	-
	9 (2/23)	VSFELHPIHVKP~	n.d.	x	-
	4 (1/23)	~VWPAPPYGYPPY	+/-	-	x
	4 (1/23)	~SHPLYPSPWGI	-	x	-
	4 (1/23)	THFPSHFYQGR~	-	x	-
	4 (1/23)	YIGELHPPHAVHL~	n.d.	-	-
	4 (1/23)	DHTPMYSLTSTP~	n.d.	-	x
	4 (1/23)	~QMMKLPCYPCMV	n.d.	x	-
	4 (1/23)	~FHPYYPAPPPAS	n.d.	-	-
	4 (1/23)	SNYQQHPISRIQ~	n.d.	-	x
	4 (1/23)	~HHPYYPSPRLLP	n.d.	x	-
7A2.7 Konsensus		H/_yP			
2A4.1	56 (10/18)	DHWPSSNPRATL~	-	x	-
	33 (6/18)	NHCLDLNCSNLY~	-	-	x
	6 (1/18)	~TSVTMRDPWPTHF	-	x	-
	6 (1/18)	~HSPHPSPTPTDS	-	x	-
2A4.1 Konsensus		H***NP**T			

1D6.14	47 (7/15)	THF PSHF FWY QGR~	-	x	-
	13 (2/15)	I A WELDD T SLPR~	+++	x	-
	13 (2/15)	YIGEL HP HAVLL~	++	-	x
	7 (1/15)	V S EL HP I H VK P ~	+	x	-
	7 (1/15)	~ HH D Y PSR P LL P	+/-	x	-
	7 (1/15)	~ F H D Y Y PA H PP A S	n.d.	-	-
	7 (1/15)	M H K P N Y PS Q GPL~	n.d.	-	-
1D6.14 Konsensus		HFP*HPSH			

Tabelle 5. Screening der Ph.D. -12 Bibliothek nach Epitopsequenzen der monoklonalen Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1 und 1D6.14 (ELISA Signal +/-: > 0,0, +: > 0,1, ++: > 0,2, +++: > 0,3)

Die erhaltenen Insertsequenzen wurden mit CLUSTALW aligniert. Blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch, Rot: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte sind identisch, Gelb: mehr als 50% der Aminosäuren einer Spalte sind ähnlich. Die Konsensussequenzen wurden mit dem Programm PRETTY bestimmt.

Betrachtet man zunächst die **Ph.D.-C7C Bibliothek**, so zeigt sich für den Antikörper 8C2.2 kein Unterschied zwischen phagen- und membrangebundenem Peptid. Auch für den Antikörper 2A4.1 stimmten die Reaktionen grösstenteils überein. Für den Antikörper 8C2.2 kristallisierte sich ein $^Q_{S}DWL*K$, für den Antikörper 2A4.1 ein $^S_{T}QYNLH$ Konsensusmotiv heraus. Für den Antikörper 7A2.7 wurde dieselbe Konsensussequenz, **HTTSPLH**, wie für den Antikörper 1D6.14 erhalten. Ohne den Phagen wurde diese Sequenz nicht mehr von den Antikörpern erkannt. Das kann an einer bestimmten Konformation dieser Peptide liegen, welche nur beim Phage Display gegeben ist. Nahezu alle angereicherten Sequenzen zeigen hohe ELISA-Signale und eine Reaktion mit dem jeweiligen Erstantikörper. Dies spricht für eine selektive Anreicherung von Bindern.

Anhaltspunkte für die Lokalisation der Aminosäuren der Konsensussequenzen auf der Oberfläche des Knob ergaben sich aus einem multiplen Alignment verschiedener CAR-bindender und CAR-nicht-bindender adenoviraler Serotypen (Abbildung 19). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten monoklonalen Antikörper sind als neutralisierend und für Ad5 Knob spezifisch charakterisiert worden (Douglas *et al.*, 1999, Douglas persönliche Mitteilung). Binden diese Antikörper direkt an der Kontaktstelle Knob-CAR, so kann über das angesprochene Alignment nachvollzogen werden, ob die Konsensussequenz als lineare Abfolge von Aminosäuren in einem für Ad5 spezifischen Bereich liegt, welcher mehr Ähnlichkeit zu CAR-Bindern als zu CAR-Nichtbindern hat. In dieser Überlegung sind natürlich konformationelle Epitope nicht berücksichtigt.

			A				B		C		
C Ad2	386	SGAITIG...	NKNDDK LT LW	TT PDP.SPNC	RIHS...DN.	DCK F TLV L TK	CG S QV	LATVA		437	
C Ad5	386	TG A IT V G...	NKNNDK L T L W	TT PAP.SPNC	RLNA...EK.	DA K L T L V L T K	CG S Q	I L AT V S		437	
A Ad12	394	N I AL G SS S	N T PY D P L T L W	TT PDP.PPNC	SLIQ...EL.	DA K L T L C L T K	N G S	I V NG I V S		446	
B Ad3	123	S NS I AL....	... K N N T L W	T G P K P . E ANC	I I E Y G K .QNP	D S K L T L I L V K	N G G	I V NG Y V T		172	
B Ad7	140	S NN I CI....	... D D N I N T L W	T G V N P T T ANC	Q I M A S S ES N .	D C K L I L T L V K	T G G	L V T A F V Y		192	
		*	***	*	*	**	*	*	*	*	
			C		D		E		F		
C Ad2	438	AL A V S G D L S S	..MT G T V A S V	S I F L R E D Q NG	V L M E N S . S L K	. K H. Y W N F R N	G N S T	N A N P Y T		492	
C Ad5	438	V L A V K G S L A P	..I S G T V Q S A	H L I I R E D E NG	V L L N S. F L D	. P E. Y W N F R N	G DL T E	G T A Y T		492	
A Ad12	447	L V G V K G N L L N	..I Q S T T T T V	G V H L V E D E Q G	R L I T S T P T A L	V P Q A S W G Y R O	G QS	V S T N T V T		504	
B Ad3	173	L M G A S D Y V N T	L F K N K N V.	S I N V E L Y F D A T G	H I L P D S S S L K	. T D.. L E L K Y	K QT A D	... F S		224	
B Ad7	193	V I G V S N D F N M	L T H K N I .	N F T A E L F F D S T G	N L L T S L S S L K	. T P.. L N H K S	G QN	M A T G A L T		248	
				**	*						

C Ad2	493	NAVGFMPNLL	AYPKTQSQT.	..AKN	NIVSQ	VY	LHG.DKTK	.P	MILTITLN	GTSESTETSE	547
C Ad5	493	NAVGFMPNLS	AYPKSHGKT.	..AKS	NIVSQ	VY	LNG.DKTK	.P	VTLTITLN	GTQETGDTT.	546
A Ad12	505	NGLGFMPNVS	AYPRPNASE.	..AKS	QMVSL	TY	LOG.DTSK	.P	ITMKVAFN	GITSL.....	553
B Ad3	225	.ARGFMPSTT	AYPFVLPNAG	THNEN	YIFGQ	CY	YKASDGAL	F	PLEVTVMLN	KRLPDS....	280
B Ad7	249	NAKFMPSTT	AYPFNVNSRE	..KEN	YIYGT	CY	TASDHTA	F	PIDISVMLN	QRALNNE...	303
		****	***			*		*		*	
C Ad2	548	VST	YSMSFTW	S	WESGKYTTE	TFATN	S	YTFSYIAQE	.	582
C Ad5	547	PSA	YSMSFSW	D	WSGHNYINE	IFATS	S	YTFSYIAQE	.	581
A Ad12	554	.NG	YSLTFMW	S	GL.SNYINQ	PFSTP	S	CSFSYITQE	.	587
B Ad3	281	RTS	YVMTFLW	S	LNAGLAPET	TQA.	TLITS	P	FTFSYIRED	D	319
B Ad7	304	.TS	YCIQRTW	S	WNTGVAVEV	QTSAT	TLVTS	P	FTFYIRED	D	343
		*	*			*		*	*	*	

Abbildung 19. Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3, Ad7), C (Ad2, Ad5). Die Subgruppen A und C binden an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Aminosäuren, welche innerhalb CAR-bindender oder CAR-nicht-bindender Subgruppen identisch sind, sind fett gedruckt. Spalten, in denen alle Aminosäuren identisch sind, sind zusätzlich mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Alle am Konsensusmotiv beteiligten Aminosäuren wurden in der Sequenz des Knob rot markiert.

8C2.2	386	TGAI	TVG...	NKN	DKLTLW	TTPAP.SPNC	RLNA...EK.	DAK	LTLVLTK	CGS	QILATVS	437		
7A2.7	386	TGAI	TVG...	NKN	DKLTLW	TTPAP.SPNC	RLNA...EK.	DAK	LTLVLTK	CGS	QILATVS	437		
2A4.1	386	TGAI	TVG...	NKN	DKLTLW	TTPAP.SPNC	RLNA...EK.	DAK	LTLVLTK	CGS	QILATVS	437		
1D6.14	386	TGAI	TVG...	NKN	DKLTLW	TTPAP.SPNC	RLNA...EK.	DAK	LTLVLTK	CGS	QILATVS	437		
		*		***	*	*	**	*	*	*	*			
8C2.2	438	VLAV	KGSLAP	..IS	GTVQSA	HLI	IRFDENG	VLL	NNS.FLD	.PE.	YWNFRN	GDL	TEGTAYT	492
7A2.7	438	VLAV	KGSLAP	..IS	GTVQSA	HLI	IRFDENG	VLL	NNS.FLD	.PE.	YWNFRN	GDL	TEGTAYT	492
2A4.1	438	VLAV	KGSLAP	..IS	GTVQSA	HLI	IRFDENG	VLL	NNS.FLD	.PE.	YWNFRN	GDL	TEGTAYT	492
1D6.14	438	VLAV	KGSLAP	..IS	GTVQSA	HLI	IRFDENG	VLL	NNS.FLD	.PE.	YWNFRN	GDL	TEGTAYT	492
						**	*							
8C2.2	493	NAVGF	MPNLS	AYP	KSHGKT.	..AKS	NIVSQ	VY	LNG.DKTK	.P	VTLTITLN	GTQETGDTT.	546	
7A2.7	493	NAVGF	MPNLS	AYP	KSHGKT.	..AKS	NIVSQ	VY	LNG.DKTK	.P	VTLTITLN	GTQETGDTT.	546	
2A4.1	493	NAVGF	MPNLS	AYP	KSHGKT.	..AKS	NIVSQ	VY	LNG.DKTK	.P	VTLTITLN	GTQETGDTT.	546	
1D6.14	493	NAVGF	MPNLS	AYP	KSHGKT.	..AKS	NIVSQ	VY	LNG.DKTK	.P	VTLTITLN	GTQETGDTT.	546	
		****	***				*			*	*			
8C2.2	547	PSA	YSMSFSW	D	WSGHNYINE	IFATS	S	YTFSYIAQE			581		
7A2.7	547	PSA	YSMSFSW	D	WSGHNYINE	IFATS	S	YTFSYIAQE			581		
2A4.1	547	PSA	YSMSFSW	D	WSGHNYINE	IFATS	S	YTFSYIAQE			581		
1D6.14	547	PSA	YSMSFSW	D	WSGHNYINE	IFATS	S	YTFSYIAQE			581		
		*	*			*		*	*	*				

Abbildung 20. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fibernobregion des adenoviralen Serotyps 5, identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek.

An einem Konsensusmotiv beteiligte Aminosäuren sind rot gedruckt (für den Antikörper 8C2.2 QSDWLK, für 7A2.7 HTSPL, für 2A4.1 SQYNL, für 1D6.14 HTSPLH). Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Ausgehend von einem Alignment verschiedener adenoviraler Serotypen (Abbildung 19) wurden Aminosäuren, welche innerhalb CAR-bindender Subgruppen identisch sind, sind fett gedruckt. Mit einem Sternchen sind Positionen gekennzeichnet, an denen im Alignment innerhalb einer Spalte alle Aminosäuren identisch waren.

Da es sich offensichtlich nicht um lineare Epitope handelt wurde auf die bekannte 3D-Struktur des Knob-Proteins zurückgegriffen. Auch hier wurden alle am Konsensusmotiv beteiligten Aminosäuren markiert, um zu überprüfen, ob das Konsensusmotiv ein konformationelles Epitop auf der Oberfläche des Knob darstellt. Aminosäuren, welche diese Bedingung erfüllen sind in Abbildung 21 markiert.

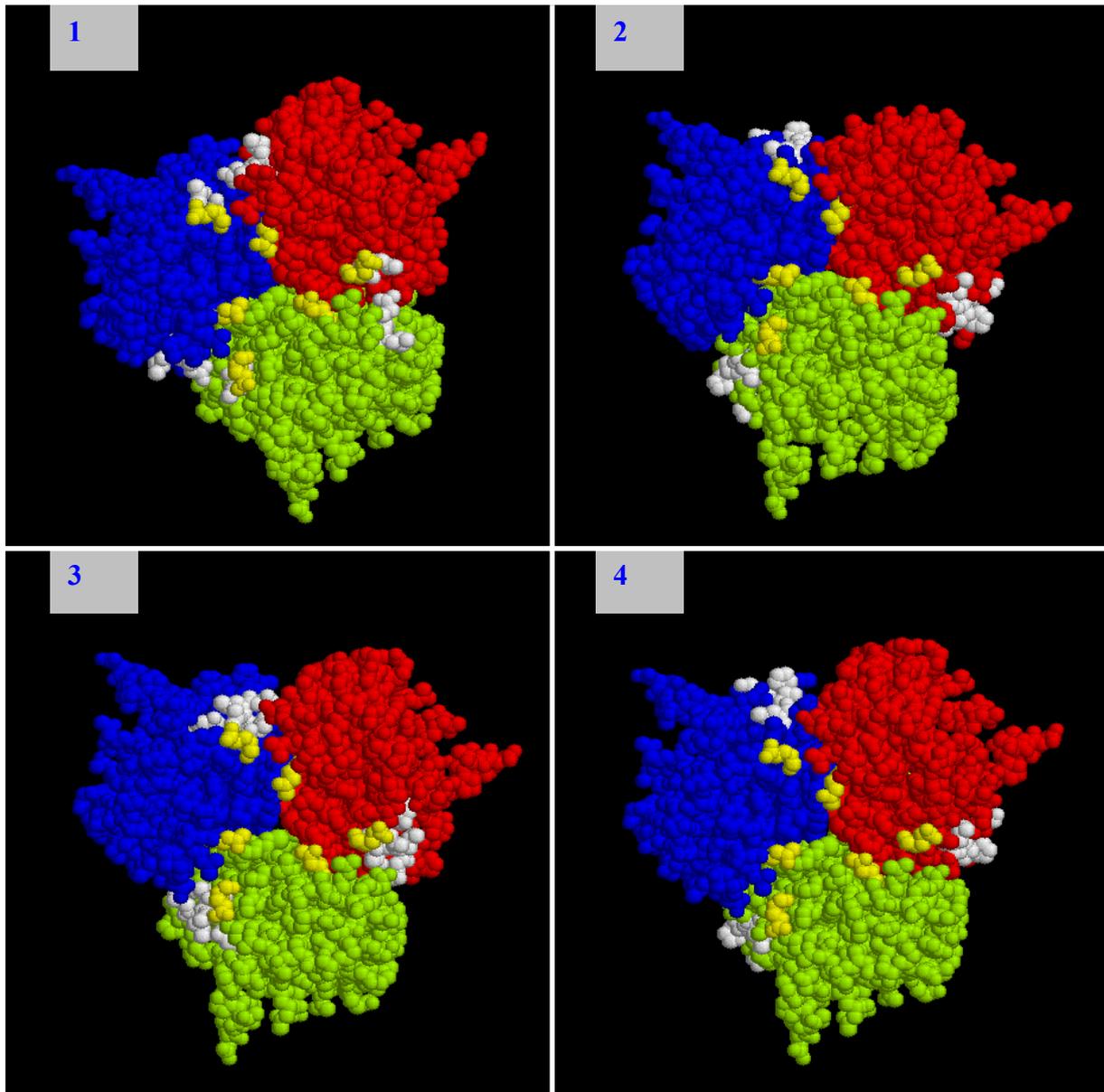


Abbildung 21. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fibernobregion des adenoviralen Serotyps 5 identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek.

Die Darstellung basiert auf dem Datenbankeintrag PDB:1KNB. Die drei monomeren Untereinheiten sind blau, rot und grün gefärbt. Die Amino- bzw. Carboxytermini sind gelb gefärbt. Die Darstellung ist raumfüllend ohne Wasserstoff- und Heteroatome.

- 1) Antikörper 8C2.2. In weiss markiert wurden **D484, W402, L485, Q580**.
- 2) Antikörper 7A2.7. In weiss markiert wurden **S507, P505, L501, T511, H508**.
- 3) Antikörper 2A4.1. In weiss markiert wurden **Q580, Y550, N500, S502, L501**.
- 4) Antikörper 1D6.14. In weiss markiert wurden **S507, P505, L501, T511, H508**.

Für den Antikörper 8C2.2 kämen die Aminosäuren D484, W402, L485, Q580, für den Antikörper 7A2.7 S507, P505, L501, T511, H508, für den Antikörper 2A4.1 Q580, Y550, N500 S502, L501 und für den Antikörper 1D6.14 die Aminosäuren S507, P505, L501, T511, H508 als Epitop in Frage. Hier liegen die Aminosäuren dieses Konsensusmotivs eng beieinander auf der Oberfläche des Knob. Für die Antikörper 7A2.7 und 1D6.14 sind das aufgrund desselben Konsensusmotivs auch dieselben Aminosäuren.

Betrachtet man nun die **Ph.D. -12 Bibliothek**, so wurde bei den Antikörpern 8C2.2 und 2A4.1 nur ein vages Motiv in den angereicherten Phagen gefunden. Der Einfluß der Phagen auf angereicherte Sequenzen zeigte sich bei 8C2.2 recht deutlich. Die ELISA-Signale und die

Reaktion mit dem membrangebundenen Peptid stimmen nicht überein (z.B. reagiert die ELISA-positive Sequenz SSARCDWLCSAL als membrangebundenen Peptid unspezifisch mit dem Zweitantikörper und überhaupt nicht mit dem Erstantikörper). Beim Antikörper 2A4.1 konnte die stark angereicherte Sequenz DHWPSSNPRATL nicht als lineare Abfolge von Aminosäuren der Sequenz des Knob identifiziert werden. Für eine Lokalisation auf der Oberfläche des Knob-Proteins sind zuviele unterschiedliche Aminosäuren beteiligt. Alles deutet auf die Anreicherung unspezifischer Binder hin, welche einen Wachstumsvorteil besitzen.

Beim Antikörper 7A2.7 kristallisierte sich mit ^H/_YP ein Teilmotiv der Konsensussequenz **HFP*HPSH** des Antikörpers 1D6.14 heraus. Das angereicherte Phagenspektrum entsprach sich weitestgehend. Unterschiede gab es im Anreicherungsgrad einzelner Phagen. Im Falle von 7A2.7 wurde ein Phage (YIGELHPPHAVLL) stark angereichert. Er zeigte im ELISA ein starkes Signal, das membrangebundene Peptid reagierte aber nur unspezifisch mit dem Zweitantikörper, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Binder mit einem starken Wachstumsvorteil handelt. Im Falle von 1D6.14 wurde ebenfalls ein Phage (THFPSHFWYQGR) stark angereichert. Er zeigte im ELISA kein Signal, das membrangebundene Peptid reagierte aber spezifisch mit dem Erstantikörper, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Binder mit einem starken Wachstumsvorteil handelt. Hierbei scheint es bei beiden Antikörpern (7A2.7 und 1D6.14) so zu sein, dass die Reaktivität in ELISA und membrangebundenem Peptid immer dann übereinstimmt, wenn in der Sequenz „PS“ vorkommt. Dieses Aminosäurepaar kommt an Position 507, 508 des Knob vor und liegt in einem konservierten Bereich.

Alle am Konsensusmotiv beteiligten Aminosäuren wurden in der Sequenz des Knob rot markiert.

				A				B	C		
8C2.2	386	TGAI TVG ...	NKN NDKLT TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DA KLTLV LTK	CG SQ ILATVS			437	
7A2.7	386	TGAI TVG ...	NKN NDKLT TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DA KLTLV LTK	CG SQ ILATVS			437	
2A4.1	386	TGAI TVG...	NKN NDKLT TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DA KLTLV LTK	CG SQ ILATVS			437	
1D6.14	386	TGAI TVG ...	NKN NDKLT TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DA KLTLV LTK	CG SQ ILATVS			437	
		*	***	*	*	**		*	*		
				C	D		E	F			
8C2.2	438	VLAVK GS LAP	..ISG T VQ SA	HLIIR F DENG	VLLN S .FLD	.PE.Y WN FRN	GD L TEGTAYT			492	
7A2.7	438	VLAVK GS LAP	..ISG T VQ SA	HLIIR F DENG	VLLN S .FLD	.PE.Y WN FRN	GD L TEGTAYT			492	
2A4.1	438	VLAVK GS LAP	..ISG T VQ SA	HLIIR F DENG	VLLN S .FLD	.PE.Y WN FRN	GD L TEGTAYT			492	
1D6.14	438	VLAVK GS LAP	..ISG T VQ SA	HLIIR F DENG	VLLN S .FLD	.PE.Y WN FRN	GD L TEGTAYT			492	
				**	*						
				G		H					
8C2.2	493	NAV G F M PNLS	AY P K S HGKT	..AK S N I V S Q	VY L NG.D K TK	.P V TL T IT L N	GT Q ET G DTT			546	
7A2.7	493	NAV G F M PNLS	AY P K S HGKT	..AK S N I V S Q	VY L NG.D K TK	.P V TL T IT L N	GT Q ET G DTT			546	
2A4.1	493	NAV G F M P NLS	AY P K S H G K T	..AK S N I V S Q	VY L NG.D K TK	.P V TL T IT L N	GT Q ET G DTT			546	
1D6.14	493	NAV G F M PNLS	AY P K S HGKT	..AK S N I V S Q	VY L NG.D K TK	.P V TL T IT L N	GT Q ET G DTT			546	
		****	***		*	*	*				
				I		J					
8C2.2	547	PSA Y S M S F S W	D W SG H NYINEIF A T S	S Y T F S Y I A Q E					581	
7A2.7	547	PSA Y S M S F S W	D W SG H NYINEIF A T S	S Y T F S Y I A Q E					581	
2A4.1	547	PSA Y S M S F S W	D W SG H NYINEIF A T S	S Y T F S Y I A Q E					581	
1D6.14	547	PSA Y S M S F S W	D W SG H NYINEIF A T S	S Y T F S Y I A Q E					581	
		*	*		*	* * *					

Abbildung 22. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fiberknobregion des adenoviralen Serotyps 5, identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek. An einem Konsensusmotiv beteiligte Aminosäuren sind rot gedruckt (für den Antikörper 8C2.2 QHDWS, für 7A2.7 HYP, für 2A4.1 HNPT, für 1D6.14 FHPS). Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Ausgehend von einem Alignment verschiedener adenoviraler Serotypen (Abbildung 19) wurden Aminosäuren, welche innerhalb CAR-bindender Subgruppen identisch sind, sind fett gedruckt. Mit einem Sternchen sind Positionen gekennzeichnet, an denen im Alignment innerhalb einer Spalte alle Aminosäuren identisch waren.

Da es sich auch hier nicht um lineare Epitope handelt wurde auf die bekannte 3D-Struktur des Knob-Proteins zurückgegriffen und alle am Konsensusmotiv beteiligten Aminosäuren markiert, um zu überprüfen, ob das Konsensusmotiv ein konformationelles Epitop auf der Oberfläche des Knob darstellt. Aminosäuren, welche diese Bedingung erfüllen sind in Abbildung 23 markiert.

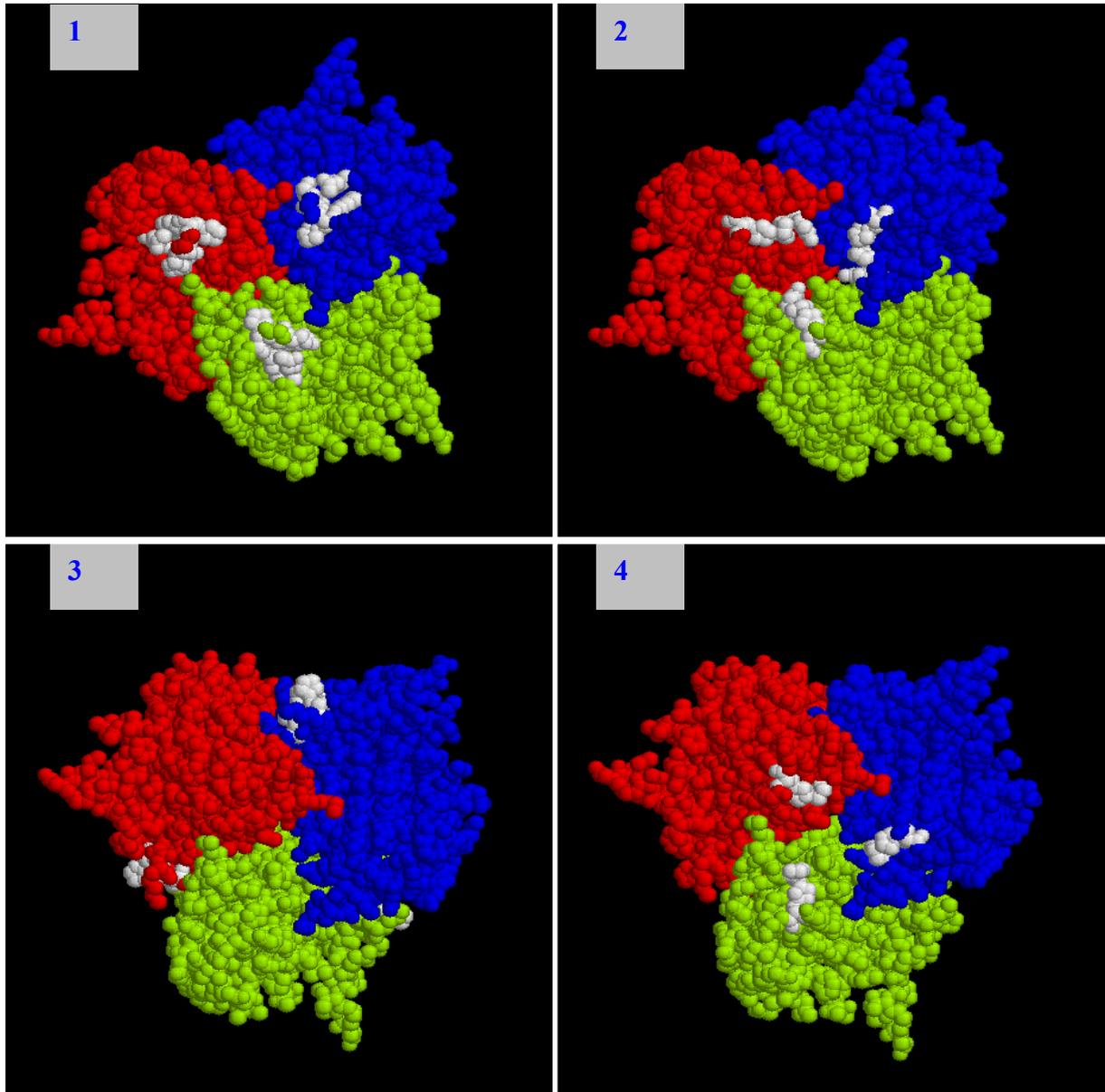


Abbildung 23. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fiberknobregion des adenoviralen Serotyps 5 identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek.

Die Darstellung basiert auf dem Datenbankeintrag PDB:1KNB. Die drei monomeren Untereinheiten sind blau, rot und grün gefärbt. Die Amino- bzw. Carboxytermini sind gelb gefärbt. Die Darstellung ist raumfüllend ohne Wasserstoff- und Heteroatome.

- 1) Antikörper 8C2.2. In weiss markiert wurden **Q453, H561, D557, W558, S559**.
- 2) Antikörper 7A2.7. In weiss markiert wurden **Y521, P529, H561**.
- 3) Antikörper 2A4.1. In weiss markiert wurden **T511, H508, P505**.
- 4) Antikörper 1D6.14. In weiss markiert wurden **H561, P529**.

Für den Antikörper 8C2.2 kämen die Aminosäuren Q453, H561, D557, W558, S59 für den Antikörper 7A2.7 H561, Y521, P529, für den Antikörper 2A4.1 T511, H508, P505 und für den Antikörper 1D6.14 die Aminosäuren H561, P529 als Epitop in Frage. Hier liegen die

Aminosäuren dieses Konsensusmotivs eng beieinander auf der Oberfläche des Knob. Für die Antikörper 7A2.7 und 1D6.14 sind das aufgrund ähnlicher Konsensusmotivs z.T. dieselben Aminosäuren. Bei allen Antikörpern fällt auf, dass sich die in Frage kommenden Epitope auf der, der Virusoberfläche abgewandten Seite des Knob (also gegenüber dem Amino- bzw. Carboxyterminus) befinden.

Vergleicht man die Konsensussequenzen aus der 7mer und 12mer Bibliothek, so stellt man fest, dass in den meisten Fällen bei der 12mer Bibliothek mehr Diversität erhalten wurde. Ob dies auf eine ungenügende Anreicherung spezifischer Binder, oder auf erhöhte Flexibilität in der Konformation zurückzuführen ist bleibt zunächst unklar. Nimmt man die beiden für einen Antikörper erhaltenen Konsensussequenzen zusammen, so steigt das Abstraktionsniveau nochmals an. Zusammenfassend lassen sich für die untersuchten Antikörper die folgenden Konsensussequenzen festhalten:

Antikörper	Konsensus (7mer Bibliothek)	Konsensus (12mer Bibliothek)	Gemeinsamer Konsensus
8C2.2	^Q / _S DWL*K	QH**D**W*S	QDW (polar)
7A2.7	HTTSPLH	^H / _Y P	HP
2A4.1	^S / _T QYNLH	H****NP*AT	(polar) N (polar)
1D6.14	HTTSPLH	HFP*HPSH	H (hydrophob) PSH

Tabelle 6. Ergebnis des Screenings mit Phage Display Bibliotheken

Um herauszufinden ob sich die im Panning gegen die untersuchten Antikörper angereicherten Phagenklone in ihrer Reaktivität unterscheiden wurden insgesamt 12 Phagenklone ausgewählt. Diese wurden in jeweils drei Konzentrationen gegen die untersuchten Antikörper getestet (Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Der Nachweis der Phagen wurde über ein anti-M13 HRP-Konjugat geführt. Zwischen den Phagenklonen aus dem Panning gegen den Antikörper 2A2.7 bzw. 1D6.14 wurde nicht differenziert, weil es sich um dieselben Klone handelt.

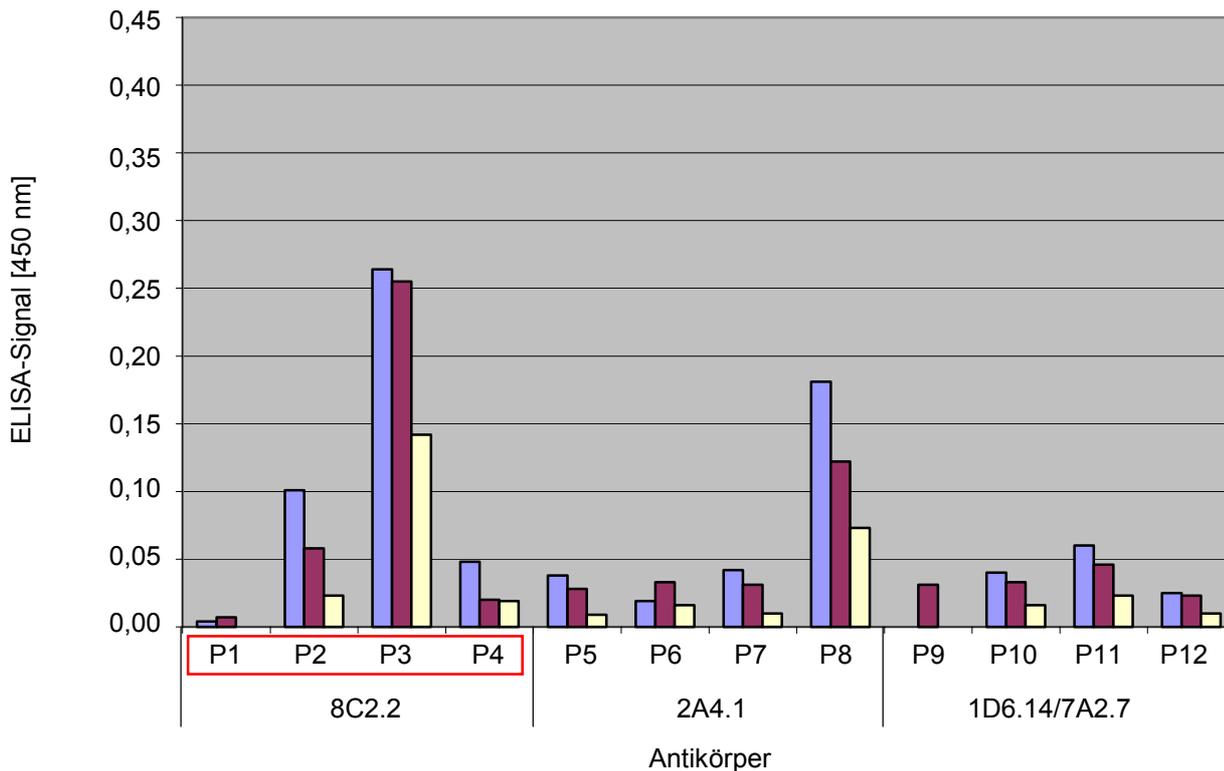


Abbildung 24. ELISA mit gecoatetem 8C2.2 Antikörper

Der Titer beträgt 1×10^9 (blau), 5×10^8 (rot), 1×10^8 (gelb)

P1-P4) Phagen aus dem Panning gegen 8C2.2,

P5-P8) Phagen aus dem Panning gegen 2A4.1,

P9-P12) Phagen aus dem Panning gegen 1D6.14/7A2.7

Neben den Klonen aus dem Panning gegen den Antikörper 8C2.2 reagierte Klon P8 (NHCLDLNCSNLY) aus dem Panning gegen den Antikörper 2A4.1. Dieser Klon enthält auch eine Reihe von Asparaginsäure- und Leucinresten (D bzw. L). Die Korrelation zwischen der enthaltenen Konsensussequenz (aus dem Phage Display) und den ELISA-Signalen ist undeutlich (Tabelle 7). Das Signalmaximum beträgt 0,3.

Klon #	Sequenz	Häufigkeit [%]	ELISA
P1	QSDWLIH	5 (1/22)	+/-
P2	QHDYIWRPHSLI	55 (12/22)	+
P3	HHMPDDLQTYGR	27 (6/22)	++
P4	SSARCDWLCSAL	9 (2/22)	+/-

Tabelle 7. Ausgewählte Klone aus dem Panning gegen den Antikörper 8C2.2

(Konsensussequenz QDW(polar) rot gedruckt)

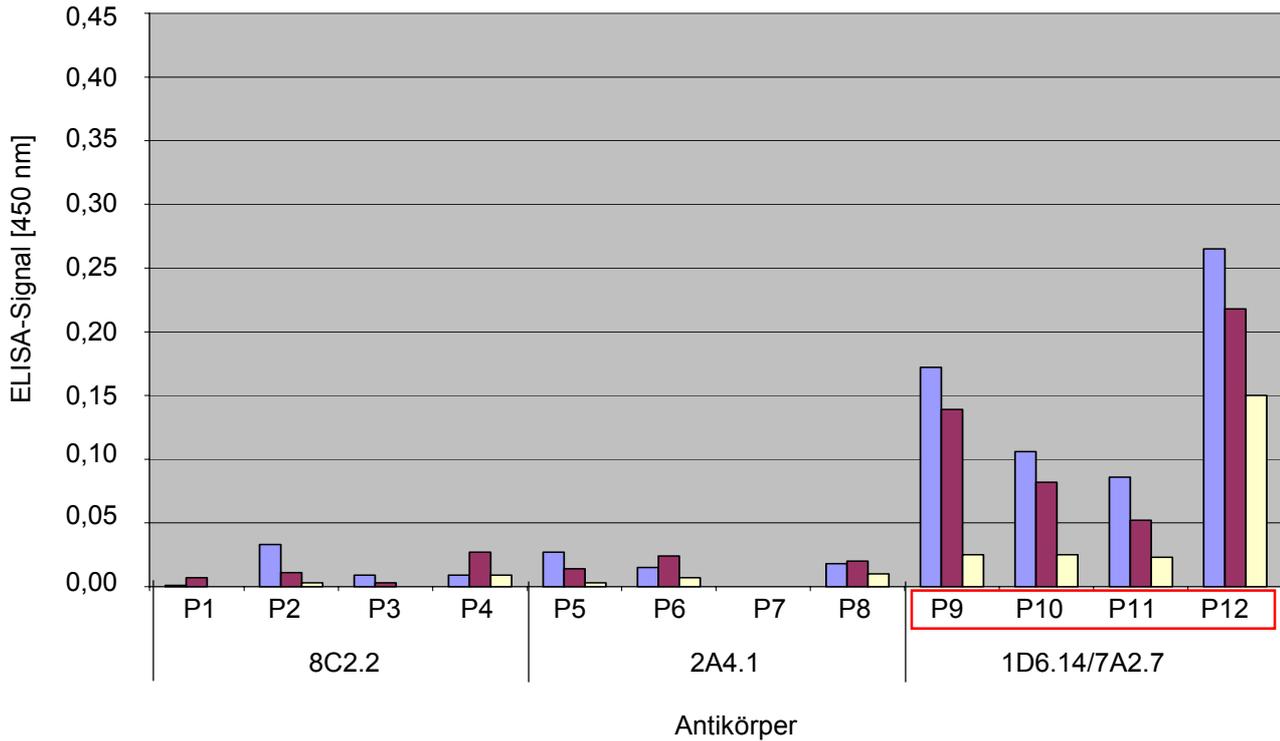


Abbildung 25. ELISA mit gecoatetem 7A2.7 Antikörper

Der Titer beträgt 1×10^9 (blau), 5×10^8 (rot), 1×10^8 (gelb)

P1-P4) Phagen aus dem Panning gegen 8C2.2

P5-P8) Phagen aus dem Panning gegen 2A4.1

P9-P12) Phagen aus dem Panning gegen 1D6.14/7A2.7

Die Klone P9, P10, P11, P12 sind mit den Klonen aus dem Panning gegen den Antikörper 7A2.7 identisch und reagieren spezifisch, was im Widerspruch zur Anreicherung unspezifisch bindender Phagenklone steht. Die Korrelation zwischen der enthaltenen Konsensussequenz (aus dem Phage Display) und den ELISA-Signalen ist undeutlich (Tabelle 8). Das Signalmaximum beträgt 0,3.

Klon #	Sequenz	Häufigkeit [%]	ELISA
P9	HMT S PLL	33 (8/24)	++
P10	HTT S PLH	25 (6/24)	+
P11	TH F PSHFWYQGR	47 (7/15)	+
P12	YIGEL H PHAVLL	13 (2/15)	++

Tabelle 8. Ausgewählte Klone aus dem Panning gegen den Antikörper 1D6.14
(Konsensussequenz H(hydrophob)PSH rot gedruckt)

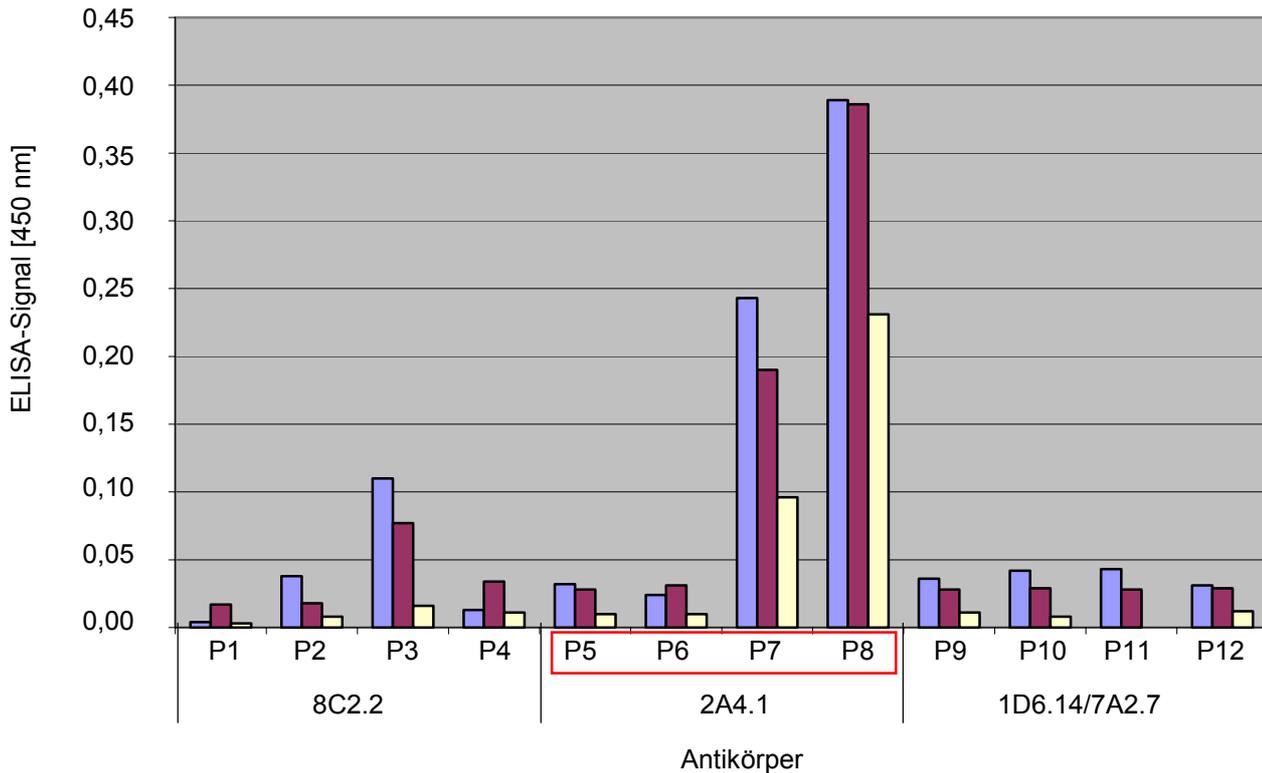


Abbildung 26. ELISA mit gecoatetem 2A4.1 Antikörper

Der Titer beträgt 1×10^9 (blau), 5×10^8 (rot), 1×10^8 (gelb)

1-4) Phagen aus dem Panning gegen 8C2.2

5-8) Phagen aus dem Panning gegen 2A4.1

9-12) Phagen aus dem Panning gegen 1D6.14/7A2.7

Die Klone P7, P8 aus dem Panning gegen den Antikörper 2A4.1 reagieren am stärksten. Mit Klon P3 (8C2.2, HHMPDDLQTYGR) kommt es zu einer leichten Kreuzreaktion. Kommt die Konsensussequenz (polar)N(polar) vor, so werden auch höhere ELISA-Signale erzielt (Tabelle 9). Das Signalmaximum beträgt 0,4.

Klon #	Sequenz	Häufigkeit [%]	ELISA
P5	TGPGPWF	15 (3/20)	+/-
P6	SQ ^{YN} LAM	5 (1/20)	+/-
P7	DHWPS ^{SN} PRATL	56 (10/18)	++
P8	NHCL ^{DLN} C ^S NLY	33 (6/18)	+++

Tabelle 9. Ausgewählte Klone aus dem Panning gegen den Antikörper 2A4.1

(Konsensussequenz (polar)N(polar) rot gedruckt)

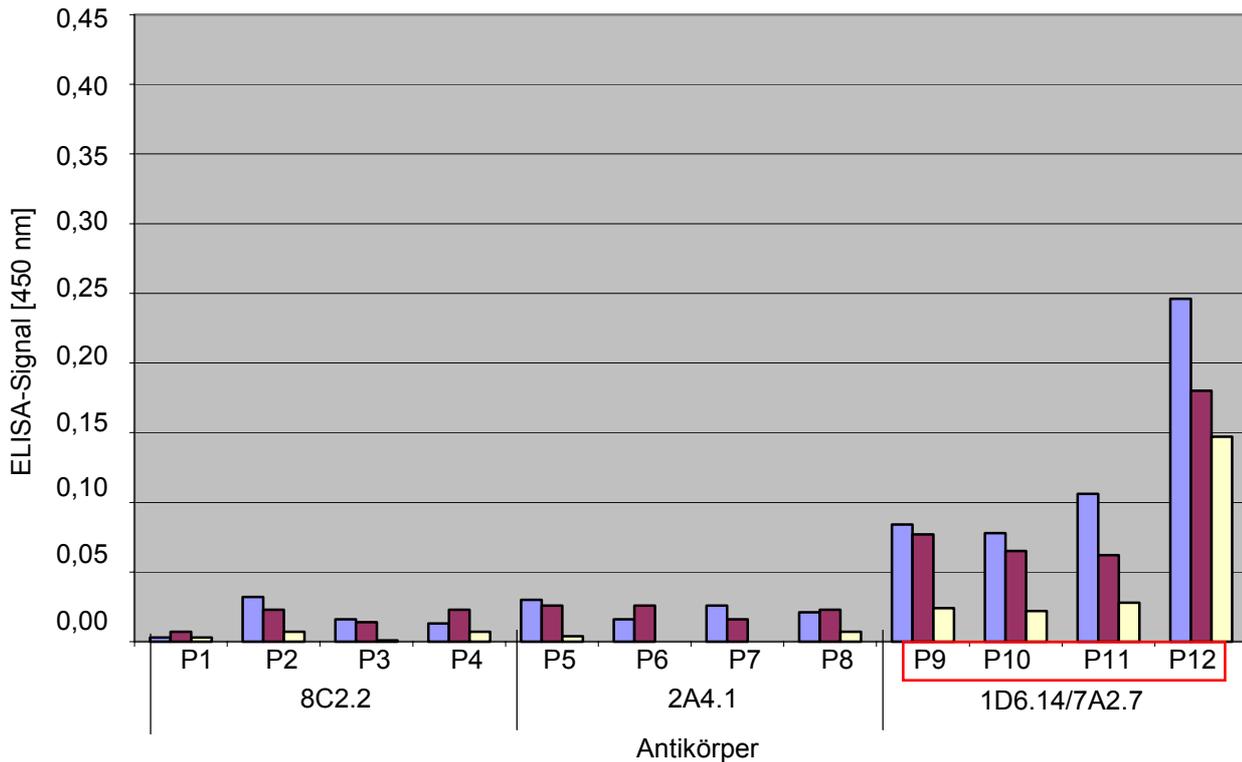


Abbildung 27. ELISA mit gecoatetem 1D6.14 Antikörper

Der Titer beträgt 1×10^9 (blau), 5×10^8 (rot), 1×10^8 (gelb)

P1-P4) Phagen aus dem Panning gegen 8C2.2

P5-P8) Phagen aus dem Panning gegen 2A4.1

P9-P12) Phagen aus dem Panning gegen 1D6.14/7A2.7

Wie beim ELISA mit gecoatetem 7A2.7 Antikörper reagieren die Klone P9, P10, P11, P12 spezifisch, was im Widerspruch zur Anreicherung unspezifisch bindender Phagenklone steht. Die Korrelation zwischen der enthaltenen Konsensussequenz (aus dem Phage Display) und den ELISA-Signalen ist undeutlich (Tabelle 10). Das Signalmaximum beträgt 0,25.

Klon #	Sequenz	Häufigkeit [%]	ELISA
P9	HMTSP LL	33 (8/24)	+/-
P10	HTTSP LH	25 (6/24)	+/-
P11	THF PSH FWYQGR	47 (7/15)	+
P12	YIGEL HPH AVLL	13 (2/15)	++

Tabelle 10. Ausgewählte Klone aus dem Panning gegen den Antikörper 1D6.14

(Konsensussequenz H(hydrophob)PSH rot gedruckt)

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die angereicherten Klone spezifisch für den im jeweiligen Panning verwendeten Antikörper sind und dass es sehr wohl Unterschiede in der Reaktivität der einzelnen Klone gibt. Auffällig ist, dass die Phagen, deren Insertsequenz am nächsten an der Konsensussequenz sind, nicht unbedingt die höchsten ELISA-Signale erzeugen.

ELISA (trimeres Knob gecoatet)

Der Empfindlichkeitsbereich der monoklonalen Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14 für trimeres Knob wurde bestimmt, um zu sehen, ob die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu Knob haben. Außerdem sollten Anhaltspunkte für die Lokalisation der Bindestelle der Antikörper an trimeres Knob gewonnen werden. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des Knobs aus drei identischen Untereinheiten gibt es eigentlich nur zwei Möglichkeiten, wie die Antikörper an Knob binden können:

- A) zentrale Bindung an ein Epitop, welches sich aus Anteilen der Untereinheiten zusammensetzt. In diesem Fall bindet ein Antikörper pro trimerem Knob.
- B) dezentrale/seitliche Bindung an je ein Epitop pro Untereinheit. Hier binden also drei Antikörper pro trimerem Knob. Bisher nicht zu beantworten ist, ob Antikörper an den einzelnen monomeren Untereinheiten des Knob binden, oder ob vielmehr die Übergänge von einer Untereinheit zur nächsten erkannt werden.

Das Größenverhältnis von Antigen zu Antikörper beträgt ungefähr 1 : 2,5 (trimeres Knob, 63 kDa und Antikörper, 150-200 kDa). Das heißt, es ist eine 2,5 mal so große Masse an Antikörper erforderlich, um dieselbe Menge an Teilchen zu haben. 100 ng Knob und 250 ng Antikörper stehen also teilchenmässig in einem 1:1 Verhältnis (Tabelle 11). Binden mehrere Antikörper an ein Knob-Molekül, benötigt man entsprechend mehr Antikörper. Für die jeweils eingesetzten Knob-Konzentrationen lassen sich Antikörperkonzentrationen angeben, ab denen Knob abgesättigt ist (im Diagramm durch Erreichen eines Plateaus ersichtlich). Vorausgesetzt, die Zugänglichkeit der Epitope ändert sich bei unterschiedlichen Knob-Konzentrationen nicht, sollten Rückschlüsse auf die Anzahl von Antikörpern, die an ein Knob-Molekül gebunden haben, möglich sein.

Knob [ng/100µl]	400	100	25	6,25	1,6
1:1 (Knob:mAb)	1000	250	62,5	15,6	3,9
1:3 (Knob:mAb)	3000	750	187,5	46,9	11,7

Tabelle 11. Massenverhältnis von Antikörper zu Knob

Nimmt man alle Konzentrationen zusammen, so zeigt sich in Abbildung 28 bei einem 1:1 Verhältnis ein beginnendes Plateau, während beim 1:3 Verhältnis das Plateau erreicht ist. 8C2.2 scheint also drei Bindestellen auf einem Knob-Trimer bzw. je eine Bindestelle auf jeder Untereinheit zu besitzen.

Für 7A2.7 sieht das Bild je nach eingesetzter Knobmenge unterschiedlich aus (Abbildung 29). Bei 400 ng ist ein Plateau bei einem 1:1 Verhältnis schon lange erreicht, bei 100 ng folgt auf ein Plateau ein erneuter Anstieg, welcher auch bei einem 1:3 Verhältnis noch nicht beendet ist, für 25 ng ist bei einem 1:1 Verhältnis schon das Plateau erreicht. Wahrscheinlich ist dieses unterschiedliche Verhalten auf Messfehler zurückzuführen.

Für 2A4.1 sieht das Bild je nach eingesetzter Knobmenge unterschiedlich aus (Abbildung 30). Bei 400 ng ist auch bei einem 3:1 Verhältnis noch kein Plateau erreicht, während bei 100 ng mit einem 3:1 Verhältnis ein Plateau erreicht wird. Wahrscheinlich ist dieses unterschiedliche Verhalten auf Messfehler zurückzuführen.

Nimmt man alle Konzentrationen zusammen, so zeigt sich in Abbildung 31 bei einem 1:1 Verhältnis ein beginnendes Plateau bzw. schon erreichtes Plateau. 1D6.14 scheint also eine Bindestellen auf einem Knob-Trimer zu besitzen. Im Vergleich mit 7A2.7 (Abbildung 29), welcher bei den vorhergegangenen Versuchen ein nahezu identisches Verhalten gezeigt hatte, tritt dieser Befund hier deutlicher zu Tage.

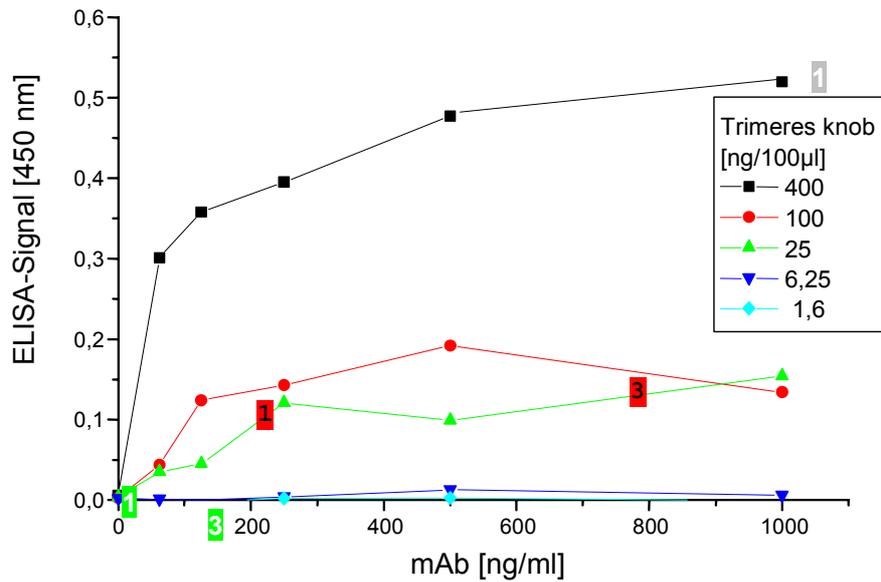


Abbildung 28. Empfindlichkeitsbereich für den Antikörper 8C2.2 (ELISA mit trimerem Knob gecoatet)
 Die Zahlen 1 und 3 kennzeichnen die Absättigung aller Bindestellen auf Knob durch Antikörper bei einer Bindestelle (1) bzw. drei Bindestellen (3) pro Knob.

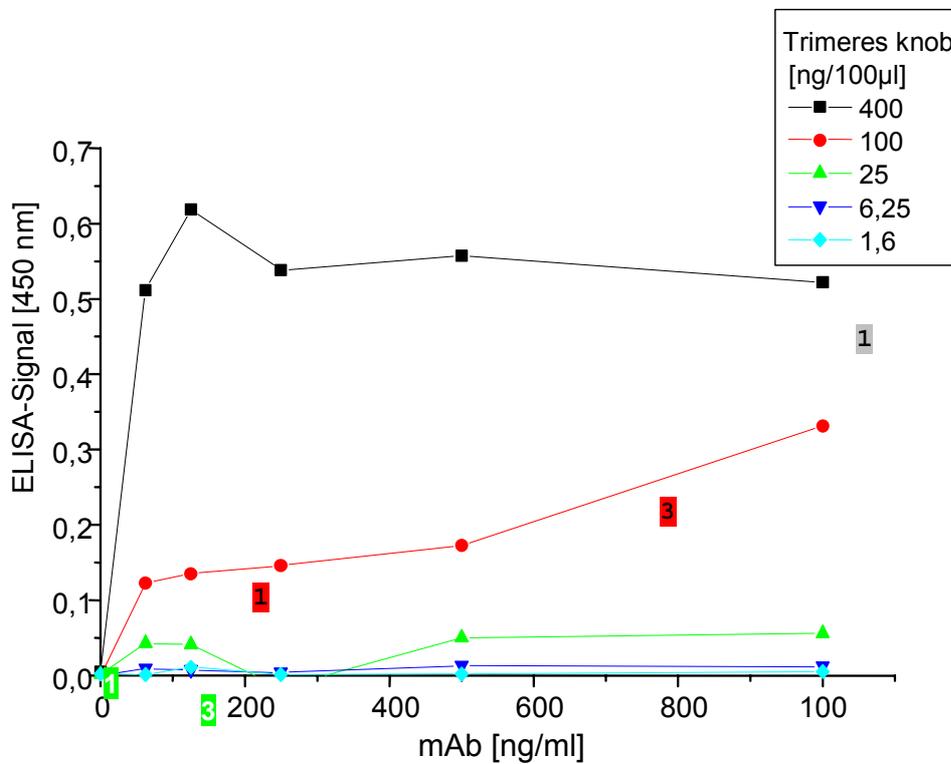


Abbildung 29. Empfindlichkeitsbereich für den Antikörper 7A2.7 (ELISA mit trimerem Knob gecoatet)
 Die Zahlen 1 und 3 kennzeichnen die Absättigung aller Bindestellen auf Knob durch Antikörper bei einer Bindestelle (1) bzw. drei Bindestellen (3) pro Knob.

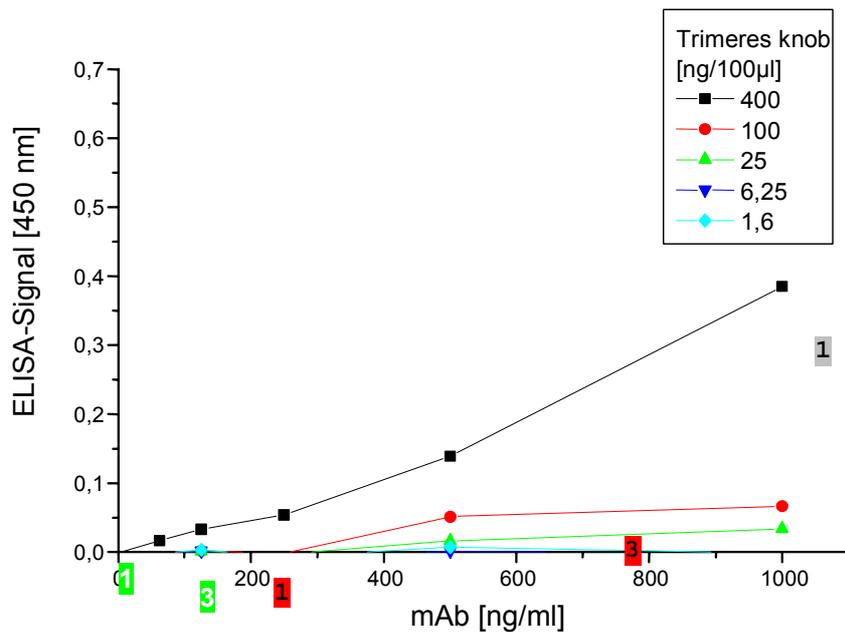


Abbildung 30. Empfindlichkeitsbereich für den Antikörper 2A4.1 (ELISA mit trimerem Knob gecoatet)
Die Zahlen 1 und 3 kennzeichnen die Absättigung aller Bindestellen auf Knob durch Antikörper bei einer Bindestelle (1) bzw. drei Bindestellen (3) pro Knob.

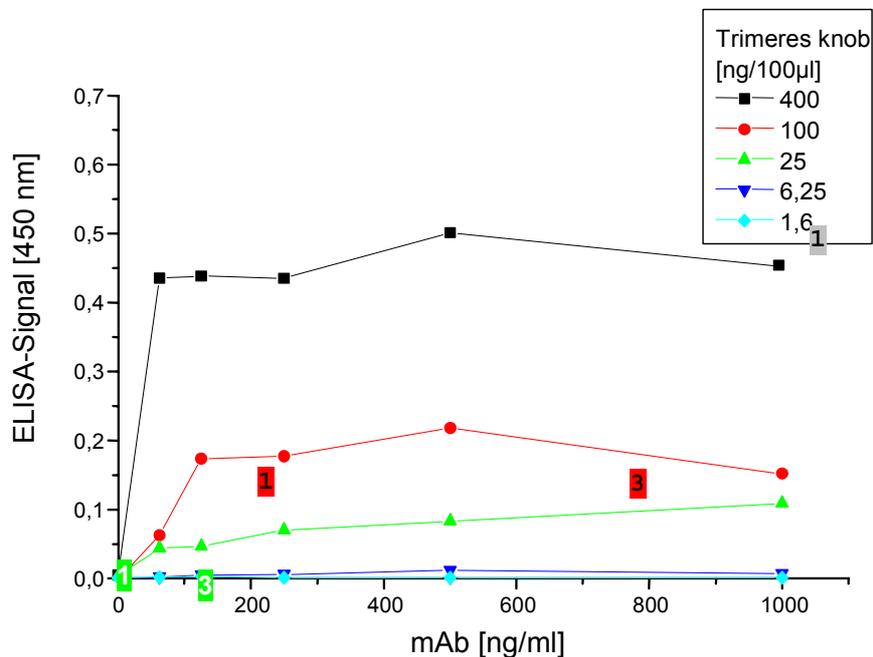


Abbildung 31. Empfindlichkeitsbereich für den Antikörper 1D6.14 (ELISA mit trimerem Knob gecoatet)
Die Zahlen 1 und 3 kennzeichnen die Absättigung aller Bindestellen auf Knob durch Antikörper bei einer Bindestelle (1) bzw. drei Bindestellen (3) pro Knob.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass obwohl für jeden Antikörper dieselbe Antikörper - und Antigenkonzentration benutzt wurde, sich doch deutliche Unterschiede in der Signalintensität zeigen. Offensichtlich besitzen die untersuchten Antikörper unterschiedlich

hohe Affinität zu Knob. Der Antikörper 2A4.1 zeigt zum Beispiel kein Plateau. Hier wird offensichtlich weniger Knob gebunden, weil die Intensitäten viel niedriger sind als bei den anderen Antikörpern. Generell bringt eine geringere Menge von Knob das Signal schneller auf ein niedrigeres Plateau. In allen Versuchen zeigte sich eine hohe Spezifität für Knob und keine Kreuzreaktion mit BSA.

Setzt man mehr trimeres Knob ein, so erhält man folgendes Bild:

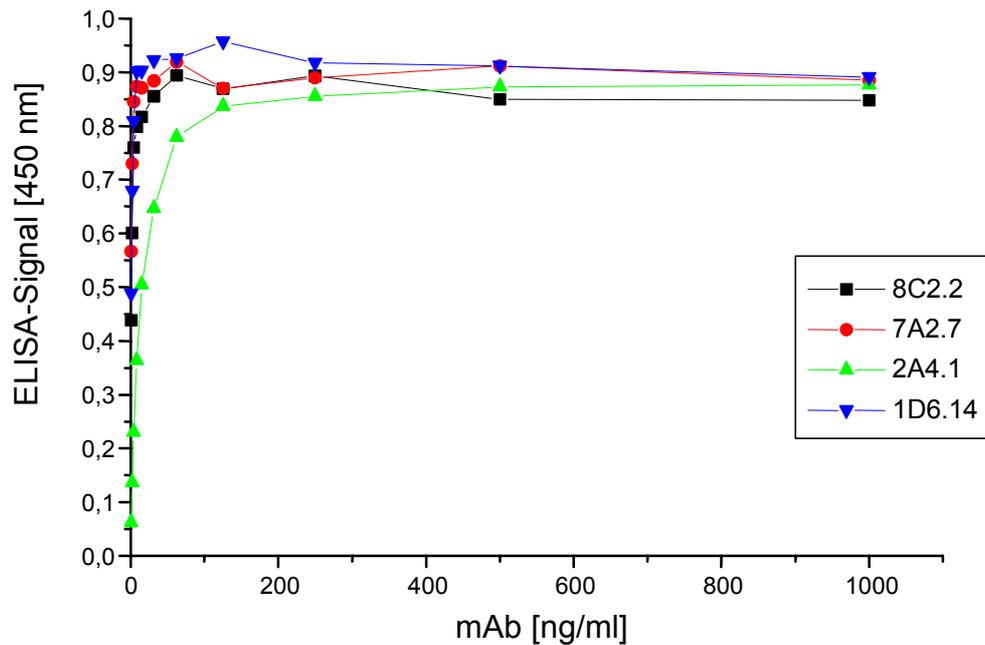


Abbildung 32. Empfindlichkeitsbereich für die Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14.
(ELISA mit 1 µg trimerem Knob gecoatet)

Im direkten Vergleich aller zu analysierender Antikörper zeigte sich in Abbildung 32 eine unterschiedliche Reaktivität derselben. Diese nahm von 2A4.1 über 8C2.2 und 7A2.7 zu 1D6.14 zu. Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen, bei denen maximal 400 ng trimeres Knob pro well gecoatet wurden, zeigte sich bei der Verwendung von 1 µg trimerem Knob pro well, dass einerseits höhere Signale erreicht wurden und andererseits die Plateauphase früher erreicht wurde.

Je größer die Menge an trimerem Knob ist, mit der eine feste Menge an Antikörper vorinkubiert wird, desto mehr Bindestellen der Antikörper werden belegt stehen in der Folge nicht mehr für die Bindung von gecoatetem trimerem Knob zur Verfügung. Wie Abbildung 33 zeigt ist dieses Verhalten für alle getesteten Antikörper gleich.

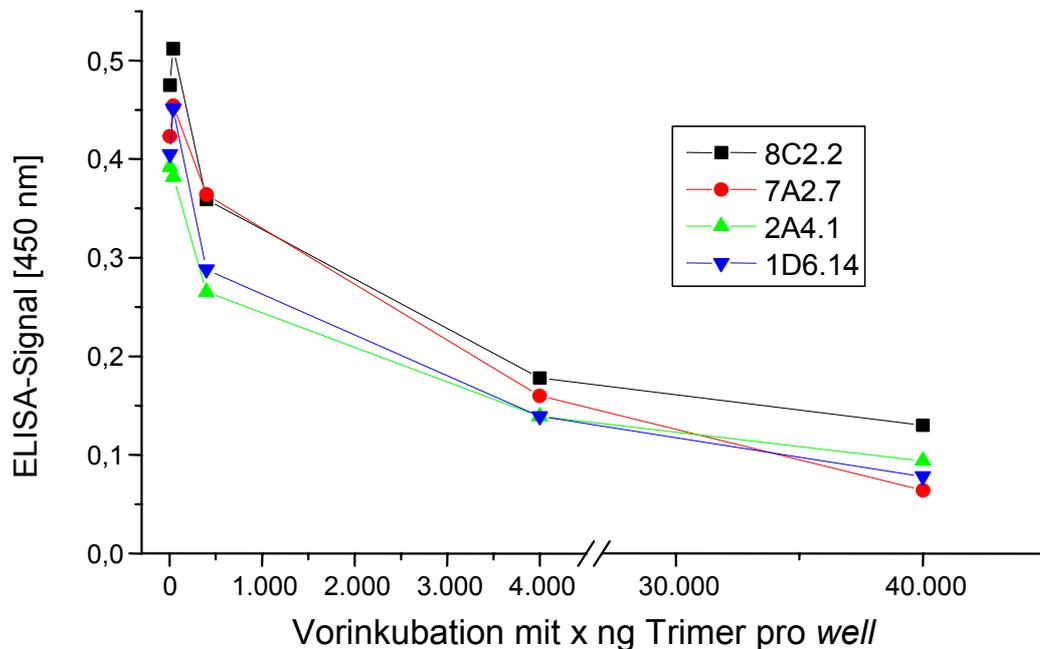


Abbildung 33. Blocken von Bindestellen der Antikörper

Mit trimerem Knob gecoatete wells wurden mit einem Vorinkubat (Antikörper plus trimeres Knob) inkubiert. Die eingesetzte Menge an Antikörpern [ng/ml] betrug: 8C2.2 1.000 ng/ml, 7A2.7 62,5 ng/ml, 2A4.1 1.000 ng/ml, 1D6.14 62,5 ng/ml. Als Kontrolle wurden mit trimerem Knob gecoatete wells mit einem „Vorinkubat“ (nur Antikörper, kein trimeres Knob) inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die Antikörper konformationelle Epitope erkennen, welche nur in nativem trimerem Knob vorkommen, wurde monomeres Knob (Knob ohne Trimerisierungsdomäne, vgl. 4.3) zur Vorinkubation mit den Antikörpern verwendet (Abbildung 34).

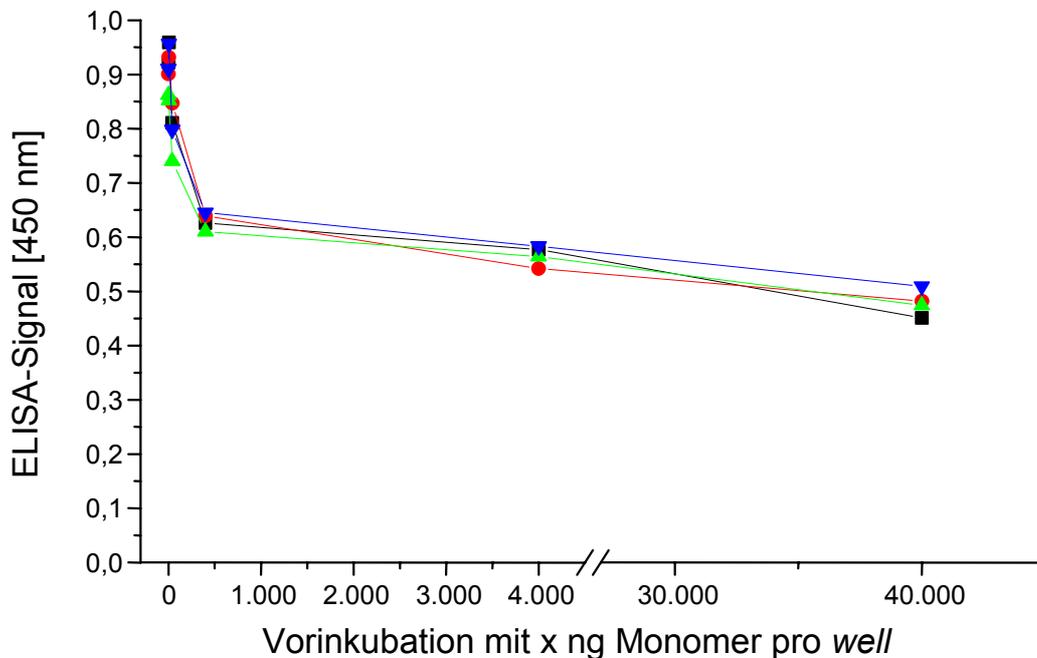


Abbildung 34. Spezifität der Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14 für monomeres Knob

Mit trimerem Knob gecoatete wells wurden mit einem Vorinkubat (Antikörper plus monomeres Knob) inkubiert. Die eingesetzte Menge an Antikörpern [ng/ml] betrug: 8C2.2 1.000 ng/ml, 7A2.7 62,5 ng/ml, 2A4.1 1.000 ng/ml, 1D6.14 62,5 ng/ml. Als Kontrolle wurden mit trimerem Knob gecoatete wells mit einem „Vorinkubat“ (nur Antikörper, kein monomeres Knob) inkubiert.

Es zeigt sich exakt dasselbe Verhalten wie bei der Vorinkubation mit trimerem Knob: Je mehr monomeres Knob mit einer festen Menge an Antikörper vorinkubiert wird, desto mehr Bindestellen der Antikörper sind belegt und folglich können immer weniger Antikörper an gecoatetes trimeres Knob binden. Dieses Verhalten ist für alle getesteten Antikörper gleich. Offensichtlich sind sie unter diesen Bedingungen in der Lage monomeres Knob zu binden. Im Vergleich zu Abbildung 33 sind die Kurven um 0,5 nach oben verschoben. Das heisst, bei Verwendung monomeren Knobs zur Vorinkubation hat man es mit einem höheren Hintergrundsignal zu tun.

Anschließend wurde anstelle trimerem Knobs monomeres Knob zum Coaten verwendet und mit steigenden Konzentrationen an Antikörpern inkubiert (Abbildung 35). Selbst mit der niedrigsten Menge an Antikörper (31 ng/ml) werden schon sehr hohe ELISA-Signale erzielt. Es sieht so aus, als ob man hier schon auf einem Plateau wäre. Um dies zu überprüfen wurde die doppelte Menge monomeres Knob gecoatet und mit derselben Menge an Antikörpern inkubiert (Abbildung 36).

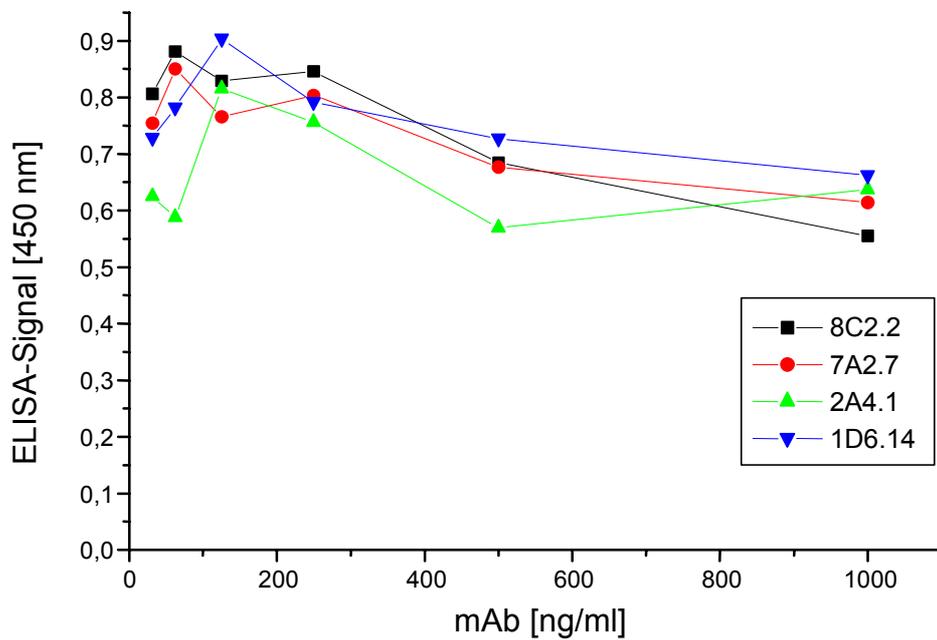


Abbildung 35. Spezifität der Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14 für monomeres Knob (400 ng gecoatet)

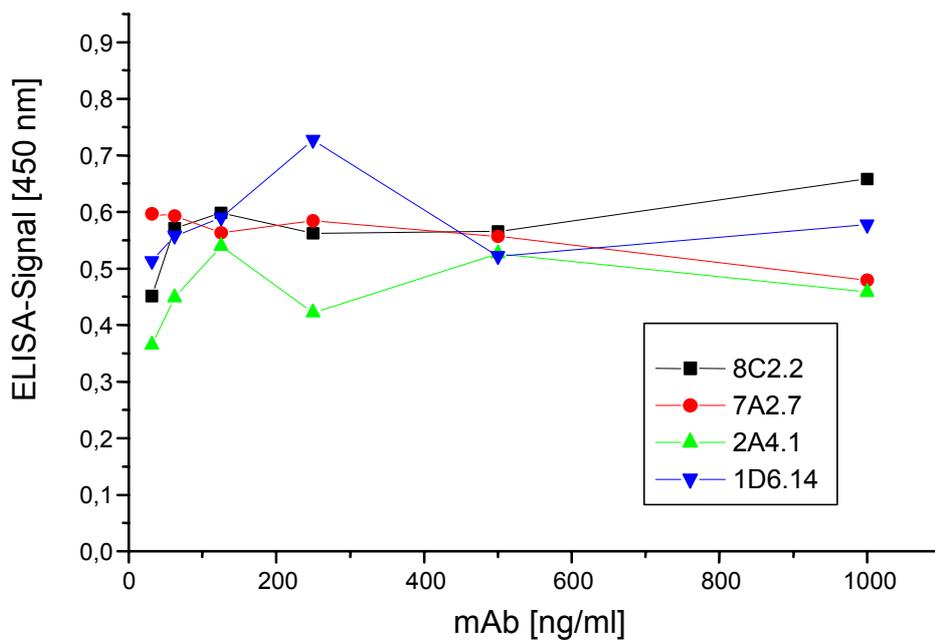


Abbildung 36. Spezifität der Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14 für monomeres Knob (800 ng gecoatet)

Auch hier werden mit der niedrigsten Menge an Antikörper (31 ng/ml) hohe ELISA-Signale erzielt. Es sieht aber so aus, als ob man hier noch in der Steigung und ab 125 ng/ml auf einem Plateau wäre. Im Vergleich mit Abbildung 35 ist also für die doppelte Menge Antigen auch die doppelte Menge Antikörper erforderlich. Die Signalintensität ist interessanterweise bei 800 ng monomerem Knob um 0,2 geringer als bei 400 ng. Eventuell behindern zu viele Monomere die freie Bindung von Antikörpern. Im Vergleich mit Abbildung 32 bleibt festzuhalten, dass Intensität und Verlauf der Signalintensitäten für dieselbe Menge an Antikörpern und für ungefähr dieselbe Menge an Antigen (Trimer bzw. Monomer) ziemlich ähnlich sind. Das würde darauf hindeuten, dass sich Trimer und Monomer, sobald sie einmal gecoatet sind, nicht mehr bezüglich ihrer zugänglichen Bindungsstellen unterscheiden. Eventuell bindet das Monomer nicht so gut oder nicht so günstig ausgerichtet an die *wells*, so dass nicht alle Bindungsorte für die Antikörper zur Verfügung stehen.

4.2 Peptide Scan

Optimieren der Parameter für die Verwendung membrangebundener Peptide

Vor der Inkubation mit dem potentiellen Interaktionspartner müssen unspezifische Bindestellen durch Inkubation mit Blocklösungen, wie in anderen gebräuchlichen Immunoassays, geblockt werden. Die empfohlenen Blocking-Agenzien können grundsätzlich in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe benutzt nicht-ionische Detergenzien wie Tween-20 oder Triton X-100 um ladungsspezifische Interaktionen zu reduzieren und Proteine zu renaturieren. Eine weitere Gruppe besteht aus verschiedenen protein-basierten Blocking-Agenzien, wie bovines Serumalbumin, Milch-Casein (Trockenmilchpulver), Gelatine oder sogar Seren unterschiedlicher Spezies (Vogt *et al.*, 1987, Peterfi und Kocsis, 2000). Eine dritte Gruppe von Blocklösungen kombiniert nicht-ionische und protein-basierte Systeme. Empfehlungen, die in publizierten Protokollen gegeben werden sind oft widersprüchlich und in hohem Maße vom Untersuchungsobjekt abhängig. Tween-20 zeigte in Westernblots eine Reduktion der unspezifischen Bindung und des Hintergrunds, falls es bei 4°C (Thean und Toh, 1989) benutzt wurde. In anderen Versuchen jedoch führte Tween-20 zu erhöhter unspezifischer Bindung (Kenna *et al.*, 1985). oder verminderte die Bindung spezifischer Autoantikörper (Zampieri *et al.*, 2000). Einige Autoren warnten vor dem Gebrauch von Tween-20, weil es Proteine von Nitrocellulosemembranen entfernte (Hoffmann und Jump, 1986).

Was ELISAs angeht, so zeigten BSA und Casein in einer Studie eine größere Effizienz als andere häufig empfohlene Blocking-Agentien (Kenna *et al.*, 1985, Pruslin *et al.*, 1991), wohingegen in anderen Experimenten der Gebrauch von Protein-basierten Agentien sogar die Reaktivität zwischen Antikörper und Antigen im Vergleich zu Tween-20 herabsetzte (Mohammad und Esen, 1989). Neuere Untersuchungen zeigen, dass generell Tween-20 die erste Wahl sein sollte um Hintergrundrauschen in ELISAs zu vermeiden (Steinitz, 2000).

Die durchgeführten Experimente zielten darauf ab, das Signal-Rausch-Verhältnis für cellulose-gebundene Peptidarrays zu optimieren. Unterschiedliche Blocklösungen und unterschiedliche Verdünnungen für einen monoklonalen Antikörper und ein polyklonales humanes Serum wurden in gut charakterisierten Modellsystemen verglichen.

Ausgewählt wurde der monoklonale Mausantikörper Bp53-11, gerichtet gegen das humane tumorsupprimierende Protein p53. Mit random peptide Phage Display Bibliotheken und immobilisierten Peptiden konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsstelle, welche von diesem Antikörper erkannt wird, aus dem N-terminalen Kern-Epitope-Motiv FSDLWKL (AS 19-25) (Fack *et al.*, 1997) zusammensetzt.

Weiterhin wurde ein humanes polyklonales Autoimmunserum ausgewählt, welches von einem Patienten stammt, welcher an systemischer Sklerose litt. Dieses Serum enthält hohe Titer an anti-Centromer-Antikörpern, darunter auch Antikörper spezifisch für CENP-A. Ein

gut definiertes Epitop liegt in der N-terminalen Domäne des Centromer-Proteins A (Mahler *et al.*, 2000).

Vergleich unterschiedlicher Membranen und Blocks

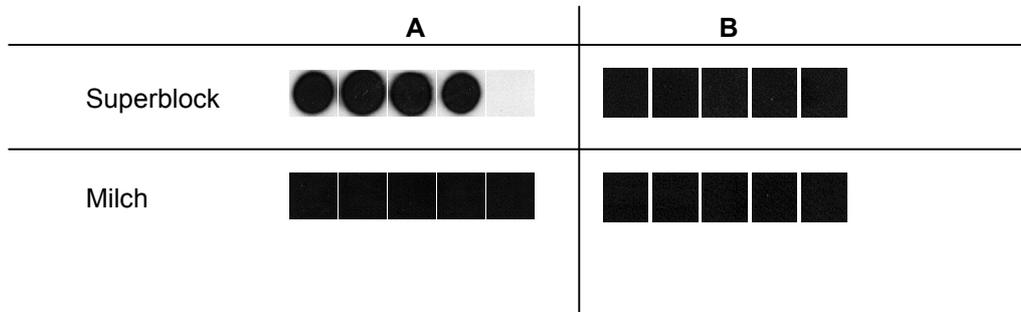


Abbildung 37. Unterschiedliche Membranen und Blocks (Strips 10 min entwickelt)

A) GenoSys-Membran, B) Abimed-Membran

Gespottetes Peptid:

P53 (TFSDLWKL^{LP}, FSDLWKL^{LPE}, SDLWKL^{LPEN}, DLWKL^{LPENN}, LWKL^{LPENNV})

Die Zellulosemembranen zweier Hersteller (GenoSys, Abimed) wurden miteinander verglichen. Gleichzeitig wurde überprüft, ob der Milch-Block oder der Superblock zu besseren Ergebnissen führt. Hierzu wurde das Epitope des anti-p53 Antikörpers von Hand auf die Membranen synthetisiert.

Die Abimed-Membranen lieferten generell weniger Hintergrund als die GenoSys-Membranen. Bei dem verwendeten, starken, Antikörper empfiehlt sich die Verwendung des stärkeren Blocksystems (Superblock).

Vergleich verschiedener Blocksysteme mit verschiedenen Antikörpern in unterschiedlichen Konzentrationen

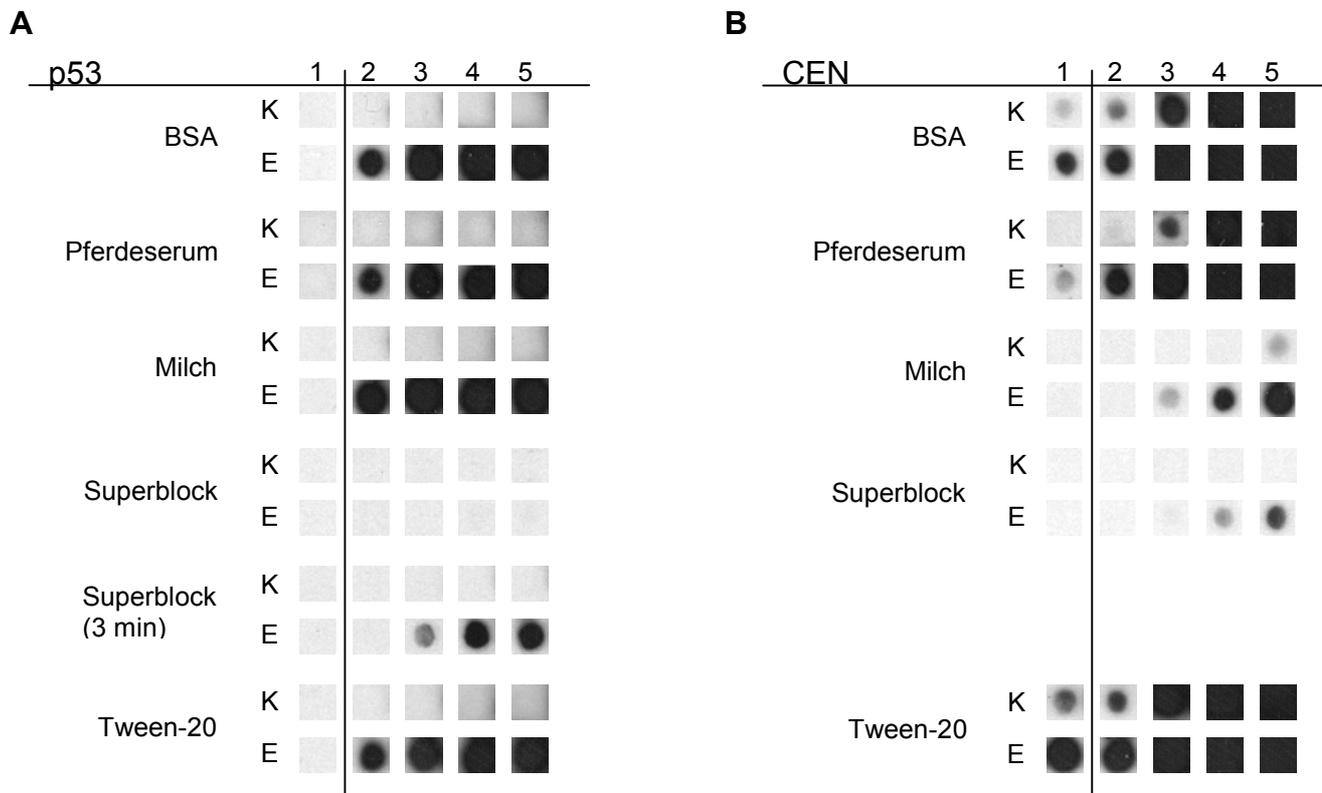


Abbildung 38. Vergleich unterschiedlicher Blocksysteme für BP53-11 und CEN

K: Kontrollpeptid, E:Epitop

A) Als Kontrolle wurde kein BP53-11 verwendet (1). BP53-11 wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 8 ng/ml (2), 40 ng/ml (3), 200 ng/ml (4), 1.000 ng/ml (5). Die Expositionszeit betrug 3 sec. Im Falle des Superblock-Systems ist zusätzlich eine Expositionszeit von 3min gezeigt.

B) Das polyklonale Serum wurde 1:800 (2), 1:400 (3), 1:200 (4), 1:100 (5) verdünnt und enthielt anfänglich ungefähr 15µg Antikörper pro µl Lösung. Wiederum wurde zur Kontrolle kein Serum eingesetzt (1). Die Expositionszeit betrug 10sec.

Antikörper	Epitop	Kontrolle
Bp53-11	QET FSDLWKL (p53 AS 19-25)	LSQET FSDLW (p53 AS 17-23)
CEN-0010	KPEAPRRRS (CENP-A AS 9-16)	PRRRSP SPTP (CENP-A AS 13-20)

Tabelle 12. Eingesetzte Peptide (Kernepitope in rot)

Der monoklonale Antikörper BP53-11 erkannte spezifisch den Spot, welcher sein Epitop enthielt. Ein Kontrollpeptid aus benachbarten Aminosäuren zeigte hingegen keine Reaktion. Eine Inkubation mit dem sekundären Ziege-anti-Maus Antikörper alleine zeigte, dass dieser Antikörper mit diesen Peptiden in Abwesenheit des Erstantikörpers nicht reagiert. Nach 3 Sekunden Exposition zeigten alle Antikörperkonzentrationen starke Signale auf den Epitopspots der mit den Puffern I-IV (BSA, Pferdeserum, Milch, Tween-20) geblockten Membranen, wohingegen mit Superblock geblockte Membranen mindestens 3 Minuten exponiert werden mussten. Selbst dann noch waren die Signalintensitäten viel geringer. Mit einer Antikörperkonzentration von 8 ng/ml konnte kein Signal festgestellt werden und mit der höchsten Antikörperkonzentration erhielt man Ergebnisse, die zu denen der niedrigsten Antikörperkonzentrationen bei Verwendung anderer Block-Puffer vergleichbar waren.

Verlängerte Exposition zeigte, dass höhere Antikörperkonzentrationen, mit der Ausnahme des Superblocks, zu erhöhter Hintergrundmarkierung der Membranen führte.

Wenn ein unbekanntes Epitop gemappt wird, wird die relevante Proteinsequenz in überlappende Peptide gesplittet. Deshalb werden, abhängig von der Länge des Epitops und der synthetisierten Peptide, mehrere benachbarte Spots mit dem benutzten Antikörper reagieren. Beim Gebrauch der Block-Puffer I-IV wurde es schwierig, einzelne benachbarte reaktive Spots nach einer Expositionszeit von 3 Sekunden anzusprechen, wenn die Antikörperkonzentration höher als 40 ng/ml war. Wurden die Membranen mit Tween-20 oder, noch deutlicher, mit Pferdeserum geblockt, so führten längere Expositionszeiten dazu, dass man keine einzelnen Spots mehr unterscheiden konnte, sondern alles, unabhängig von der benutzten Antikörperkonzentration, tiefschwarz gefärbt wurde. Der Peroxidasegekoppelte Maus-anti-Mensch Antikörper reagierte in Abwesenheit des primären Serums sowohl stark mit Kontrollpeptiden, als auch mit anderen Peptiden. Diese unspezifische Reaktion wurde komplett unterbunden, wenn die Versuche in Superblock durchgeführt wurden. Der Milchblock war ausreichend, wenn höhere Serumverdünnungen eingesetzt wurden. Andere Blocksysteme erwiesen sich hierbei als ineffizient.

Für meine Zwecke erwies sich Superblock als effektivstes Blocksystem. Milch ist nicht so stark aber wahrscheinlich gut genug für die meisten Versuche. Pferdeserum, BSA und insbesondere Tween-20 hingegen sind nicht sehr effektiv was die Reduktion unspezifischer Reaktionen bei Peptid-Immunoassays anbelangt. Moderates Blocken ist ausreichend, speziell wenn niedrige Affinitäten erwartet werden und niedrige Mengen an Interaktionspartnern verwendet werden. Tabelle 13 fasst diese Ergebnisse allgemein zusammen.

Antikörper	Block I (BSA)	Block II (Pferdeserum)	Block III (Milch)	Block IV (Tween-20)	Block V (Superblock)
anti-p53	+/-	-	++	+	+/-
CEN-0010	-	+/-	+/-	++	--

Tabelle 13. Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich unterschiedlicher Blockbedingungen

Die Ergebnisse des Phage Display deuteten auf konformationelle Epitope. Analog zu Hong, 1997 war die Hypothese, dass sich konformationelle Epitope aus kleinen linearen Teilepitopen zusammensetzen. Dementsprechend kann man Wechselwirkungen dieser Teilepitope mit Antikörpern in der linearen Aminosäuresequenz bei entsprechender Sensitivität des Untersuchungssystems detektieren. Die Aminosäuresequenz des Knob (Knob-Domäne plus letzter Schaftrepeat) wurde in eine Abfolge von 10mer Peptiden zerlegt und auf Zellulosemembranen synthetisiert, wobei eine Sequenz jeweils um 8 Aminosäuren mit der nachfolgenden Sequenz überlappte. Nach Inkubation mit den zu analysierenden Antikörpern wurden gebundene Antikörper direkt auf der Zellulosemembran mittels Standard-ELISA-Reaktionen detektiert. Zur Kontrolle der Peptidsynthese wurde das Epitop des Bp53-11 Antikörpers gespottet. Um das Detektionssystem zu überprüfen, wurde die Membran ohne Erstantikörper nur mit dem Detektionssystem getestet. Bei Peptidarrays werden auf Spots Peptide synthetisiert. Diese sind über einen Spacer an die Zellulosemembran gekoppelt. Beim Phage Display werden die Peptide als Fusionsproteine auf der Oberfläche von Phagen präsentiert. Bei Verwendung cysteinflankierter Inserts kann die präsentierte Aminosäuresequenz in eine Schleife gezwungen werden. Diese Einschränkungen in Bezug auf die Konformation sind zu beachten.

Um einen Überblick über die Reaktion der zu testenden Antikörper mit den gespotteten Peptiden zu bekommen wurde zunächst eine Membran nacheinander mit diesen Antikörpern

					G			H	
C Ad2	495	VGFM ^P NLLAY	PKTQSQT...	AKM ^N IVSQVY	LHG.DKTK.	P	MILTTI ^L NGT	SESTETSEVS	549
C Ad5	495	VGFM ^P NLSAY	PKSHGKT...	AKS ^N IVSQVY	LNG.DKTK.	P	VTLTIT ^L NGT	QETGDT ^T .PS	548
A Ad12	507	LGFM ^P NVSAY	PRPNASE...	AKS ^Q MVSLTY	LQG.DTSK.	P	ITMKVAF ^N GI	TSL.....N	555
B Ad3	227	RGFM ^P STTAY	PFVLPNAGTH	NENY ^I FGQCY	YKASDGALF	P	LEVTVM ^L NKR	LPDS....RT	280
					I		J		
C Ad2	550	T ^Y SMS ^F TWS	W ESGKYTTE..	.TFATNS ^Y TF	SY ^I LAQE.				582
C Ad5	549	A ^Y SMS ^F SWDW	SGHNYINE..	.IFATSS ^Y TF	SY ^I LAQE.				581
A Ad12	556	G ^Y SLTFMWSG	L.SNYINQ..	.PFSTPS ^C SF	SY ^I TQE.				587
B Ad3	283	SYVMT ^F LW ^S L	NAGLAPETTQ	ATLITSP ^F TF	SY ^I REDD				319

Abbildung 40. Ausgewählte Sequenzabschnitte des Ad5 Knobs

Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3), C (Ad2, Ad5). Die Subgruppen A und C binden an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Blau gedruckt sind Sequenzabschnitte, welche als sehr antigen beschrieben wurden (Ad2: Fender *et al.*, 1995, Ad3: Liebermann *et al.*, 1998). Die aufgrund des Peptide Scans ausgewählten Sequenzen sind rot markiert.

Das Peptid I liegt v.a. in der DE-Schleife und somit zwischen antigenen Abschnitten. Die Peptide II, III, IV liegen alle in einem antigenen Bereich. Peptid II liegt auf dem beta-Faltblatt B. Peptid III liegt in der AB-Schleife. Peptid IV liegt in der HI-Schleife, welche als variabel beschrieben wird (Xia *et al.*, 1994).

Für alle Peptide zeigt sich in der dreidimensionalen Darstellung des Knob, dass diese Aminosäurereste an der Oberfläche liegen und zusammenhängen (Abbildung 41). Im Falle des Peptids IV fällt auf, dass hier die beteiligten Aminosäuren nahezu komplett in der variablen HI-Schleife liegen. Wie eingangs erwähnt, schlägt Xia 1994 unter anderem eine Bindung des Knob über die HI-Schleife vor. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies unzutreffend sein könnte. Stimmt das Antikörperepitop mit der Bindestelle des Knob an CAR überein, so handelt es sich bei der HI-Schleife nicht um die Bindestelle, weil ansonsten die Antikörper das Peptid IV erkennen sollten.

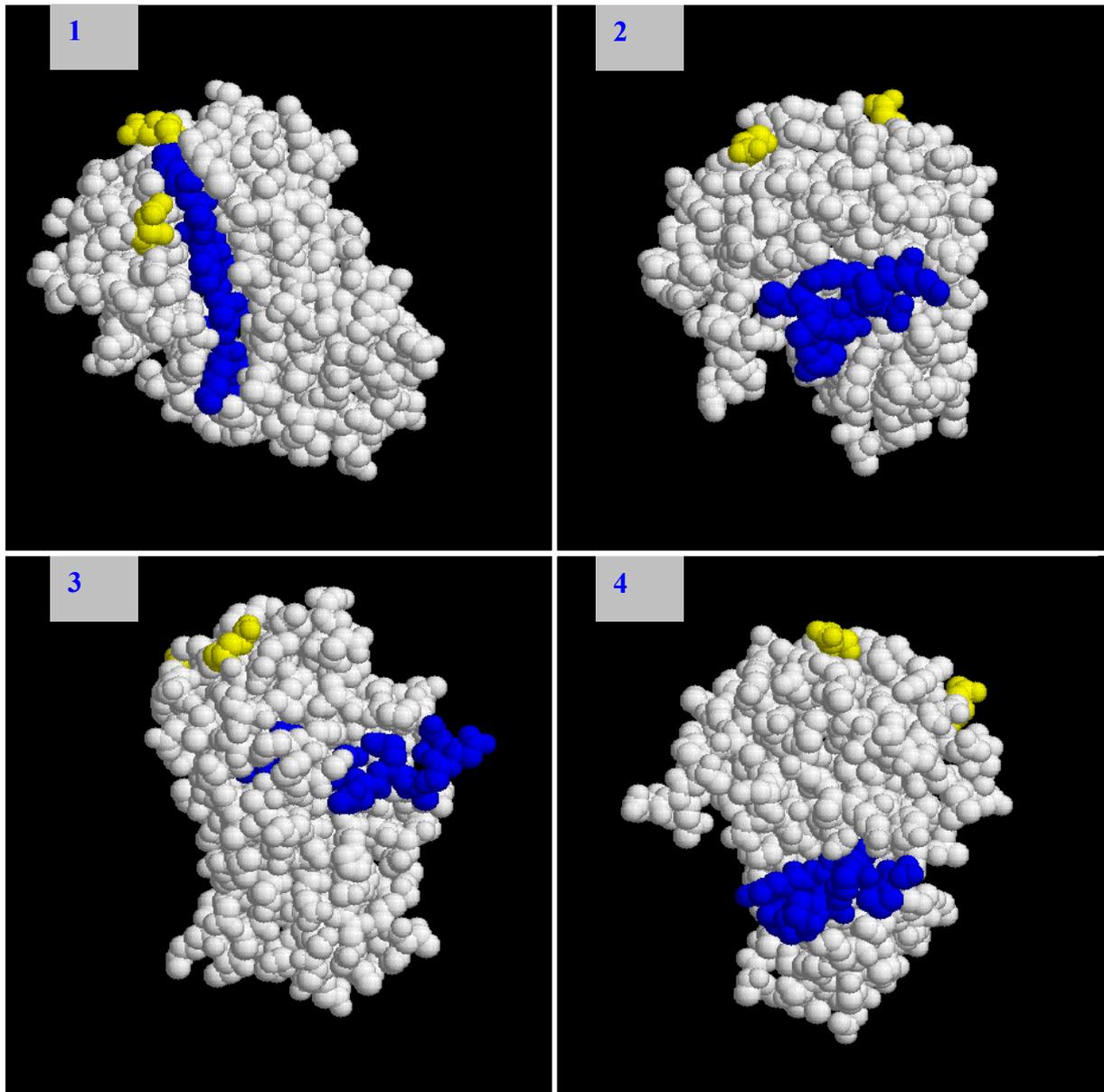


Abbildung 41. Ausgewählte Sequenzbereiche des Ad5 Knob (PDB: 1KNB ist weiss gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend ohne Wasserstoff- und Heteroatome.)

1) DAKLTLVLTK (blau, AS 418-427), 2) FLDPEYWNFR (blau, AS 467-476),
 3) LNGTQETGDT (blau, AS 536-545), 4) SPNCRLNAEK (blau, AS 408-417)

In der quartanären Struktur des Knob (Abbildung 42) zeigt sich, dass die Aminosäurereste der Peptide I-IV weiterhin frei zugänglich sind. Peptid II liegt an der Kontaktstelle zweier Monomere.

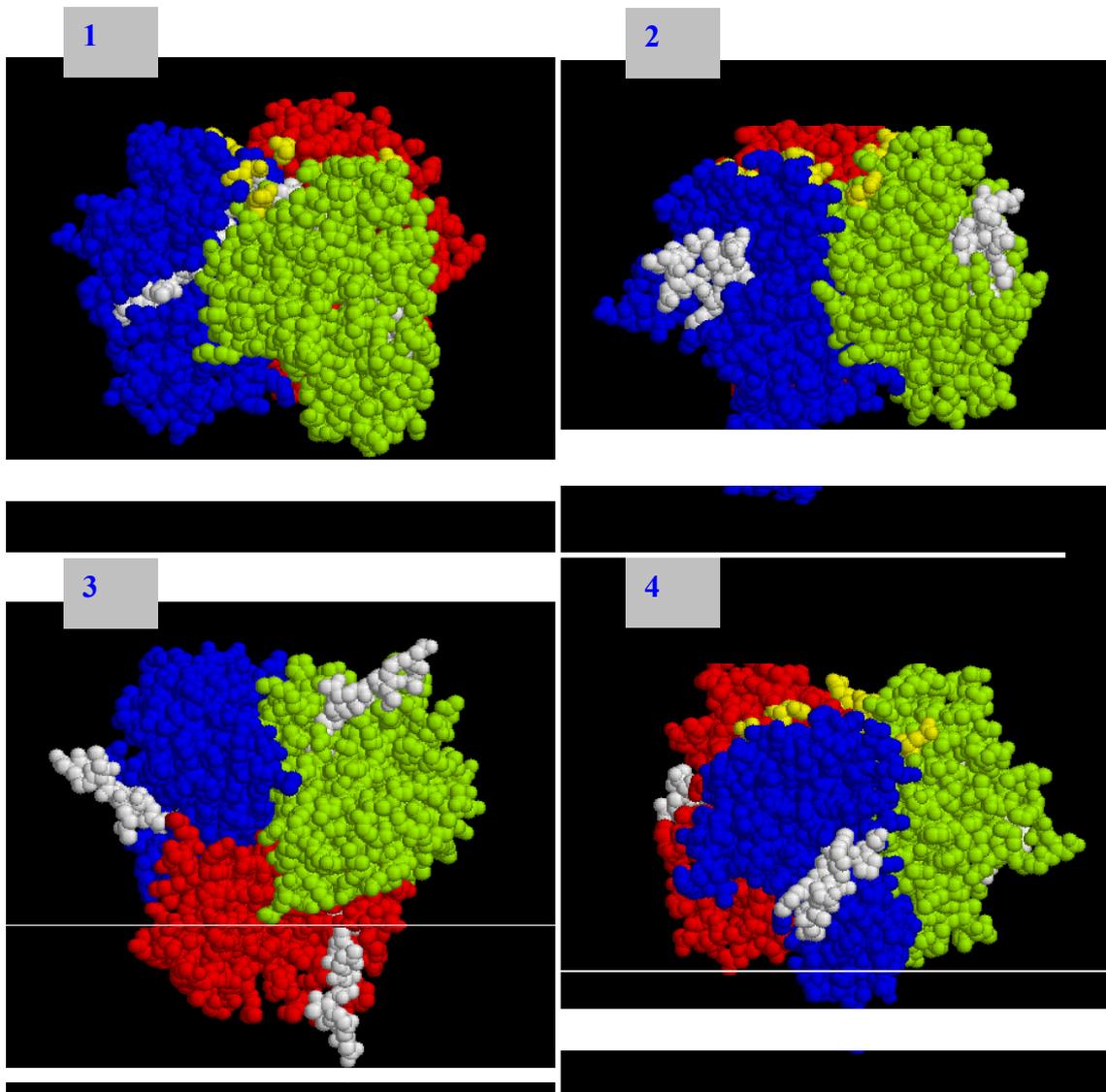


Abbildung 42. Ausgewählte Sequenzbereiche des Ad5 Knob (Die monomeren Untereinheiten des Knob sind blau, rot, grün gefärbt. Die Amino- bzw. Carboxytermini (ASN396, GLU581) sind gelb gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend ohne Wasserstoff- und Heteroatome.)

1) DAKLTLVLTK (blau, AS 418-427), 2) FLDPEYWNFR (blau, AS 467-476),
3) LNGTQETGDT (blau, AS 536-545), 4) SPNCRLNAEK (blau, AS 408-417)

Zusammenfassend geht aus den Strukturdaten des Knob hervor, dass alle im Peptide Scan des Knob spezifisch reagierenden Peptide auch im trimeren Knob zugänglich sein sollten.

Um das beste Detektionssystem herauszufinden, wurden die oben angeführten Peptide der vier Gruppen einmal mit dem Ziege-anti-Maus Zweitantikörper und einmal mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex inkubiert (Abbildung 43).

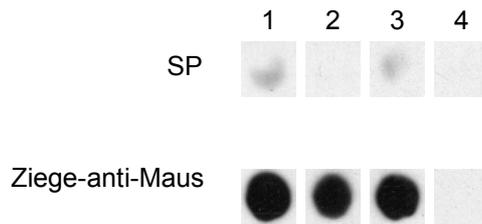


Abbildung 43. Spezifität des Detektionssystems. (Strips 1 min entwickelt.)

1) FLDPEYWNFR, 2) SPNCRLNAEK, 3) DAWKLTlVLTK, 4) LNGTQETGDT

Der Ziege-anti-Maus Zweitantikörper reagierte unspezifisch, deshalb wurde, wenn möglich, im weiteren der Streptavidin-Peroxidase-Komplex benutzt. Hierzu wurden die zu analysierenden Antikörper biotinyliert um sie später über eine Bindung des Streptavidins aus dem SP-Komplex an das Biotin nachweisen zu können.

Eine Überprüfung der Reaktivität dieser biotinylierten Antikörper bezüglich der Testpeptide ergab unterschiedlich starke Reaktionen bei ähnlichem Muster (Abbildung 44).

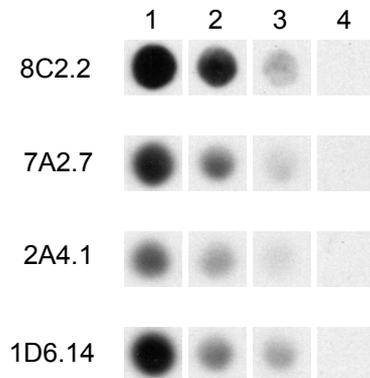


Abbildung 44. Reaktivität biotinylierter Antikörper. (Strips 10 sec entwickelt)

1) FLDPEYWNFR, 2) SPNCRLNAEK, 3) DAWKLTlVLTK, 4) LNGTQETGDT

Die Reaktivität der Antikörper bezüglich der ausgewählten Sequenzen steigt für 1D6.14 über 8C2.2 und 7A2.7 zu 2A4.1 an.

Um die Spezifität noch weiter zu steigern und zu verhindern, dass auf der Membran hängengebliebene Streptavidin-Peroxidase-Komplexe zu falschpositiven Signale führen, wurde die Membran mit Biotin geblockt. Biotin bindet an das Streptavidin und verhindert so, dass biotinylierte Antikörper an den SP-Komplex binden um ihrerseits wieder vom SP-Komplex detektiert zu werden. Die erhoffte Steigerung der Spezifität blieb aus (Daten nicht gezeigt).

Nach Wechsel auf einen Syntheseroboter und auf Membranen eines anderen Herstellers wurde nochmals mit dem Ziege-anti-Maus Zweitantikörper detektiert. Der Hintergrund der Membran war jetzt sehr schwach. Allerdings lieferte die Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern und dem Zweitantikörper auch nur schwache Signale für die Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1. Um die vorhandenen Signale spezifisch zu verstärken wurde der Ziege-anti-Maus Zweitantikörper mit einem Drittantikörper (Kaninchen-anti-Ziege HRP-konjugiert) detektiert. Dies ergab eine deutliche Signalverstärkung.

Spot #	Sequenz	8C2.2	7A2.7	2A4.1	1D6.14	Reaktive Aminosäuren	mAb
1	TG AITVGNKNNDKLT						
2	AITVGNKNNDKLTLW						
3	TVGNKNNDKLTLWTT						
4	GNKNNDKLTLWTTPA						
5	KNNDKLTLWTT PAPS						
6	NDKLTLWTT PAPSPN						
7	KLTLWTT PAPSPNCR						
8	TLWTT PAPSPNCR LN						
9	WTT PAPSPNCR LNAE						
10	TPAPSPNCR LNAEKD						
11	APSPNCR LNAEKDAK						
12	SPNCR LNAEKDAKLT						
13	NCRLNAEKDAKLTLV					NCRLNAEKDAKLTLV	
14	RLNAEKDAKLTLVLT					RLNAEKDAKLTLVLT	8C2.2
15	NAEKDAKLTLVLT KC					NAEKDAKLTLVLT KC	8C2.2
16	EKDAKLTLVLT KCGS					EKDAKLTLVLT KCGS	8C2.2, 1D6.14
17	DAKLTLVLT KCGSQI					DAKLTLVLT KCGSQI	8C2.2, 1D6.14
18	KLTLVLT KCGSQILA					KLTLVLT KCGSQILA	
19	TLVLT KCGSQILATV						
20	VLTKCGSQILATVSV						
21	TKCGSQILATVSVLA						
22	CGSQILATVSVLAVK						
23	SQILATVSVLAVKGS						
24	ILATVSVLAVKGS LA						
25	ATVSVLAVKGS LAP I						
26	VSVLAVKGS LAP I S						
27	VLAVKGS LAP I SGT V						
28	AVKGS LAP I SGT V QS						
29	KGS LAP I SGT V QS AH						
30	SLAP I SGT V QS AH LI						
31	AP I SGT V QS AH LI IR						
32	ISGT V QS AH LI IR FD						
33	GT V QS AH LI IR FD EN						
34	VQSAH LI IRFDENG V						
35	SAH LI IRFDENG V LL						
36	HLI IRFDENG V LL NN						
37	IIRFDENG V LL NNS F						

Spot #	Sequenz	8C2.2	7A2.7	2A4.1	1D6.14	Reaktive Aminosäuren	mAb
38	RFDENGVLNNSFLD						
39	DENGVLNNSFLDPE						
40	NGVLNNSFLDPEYW						
41	VLLNNSFLDPEYWNF						
42	LNNSFLDPEYWNFRN						
43	NSFLDPEYWNFRNGD						
44	FLDPEYWNFRNGDLT						
45	DPEYWNFRNGDLTEG						
46	EYWNFRNGDLTEGTA						
47	WNFRNGDLTEGTAYT						
48	FRNGDLTEGTAYTNA						
49	NGDLTEGTAYTNAVG						
50	DLTEGTAYTNAVGF					DLTEGTAYTNAVGF	
51	TEGTAYTNAVGFMPN					TEGTAYTNAVGFMPN	7A2.7
52	GTAYTNAVGFMPNLS					GTAYTNAVGFMPNLS	8C2.2, 7A2.7
53	AYTNAVGFMPNLSAY					AYTNAVGFMPNLSAY	8C2.2
54	TNAVGFMPNLSAYPK					TNAVGFMPNLSAYPK	
55	AVGFMPNLSAYPKSH						
56	GFMPNLSAYPKSHGK						
57	MPNLSAYPKSHGKTA						
58	NLSAYPKSHGKTAKS						
59	SAYPKSHGKTAKSNI						
60	YPKSHGKTAKSNIVS						
61	KSHGKTAKSNIVSQV						
62	HGKTAKSNIVSQVYL						
63	KTAKSNIVSQVYLN						
64	AKSNIVSQVYLN						
65	SNIVSQVYLN						
66	IVSQVYLN						
67	SQVYLN						
68	VYLN					VYLN	
69	LNGDKTKPVTLTITL					LNGDKTKPVTLTITL	8C2.2, 1D6.14
70	GDKTKPVTLTITLNG					GDKTKPVTLTITLNG	8C2.2, 1D6.14
71	KTKPVTLTITLNGTQ					KTKPVTLTITLNGTQ	
72	KPVTLTITLNGTQET						
73	VTLTITLNGTQETGD						
74	LTITLNGTQETGDTT						
75	ITLNGTQETGDTTPS						
76	LNGTQETGDTTPSAY						
77	GTQETGDTTPSAYSM						
78	QETGDTTPSAYSMSF						
79	TGDTTPSAYSMSFSW						
80	DTTPSAYSMSFSWDW						
81	TPSAYSMSFSWDWSG						
82	SAYSMSFSWDWSGHN						
83	YSMSFSWDWSGHNYI						
84	MSFSWDWSGHNYINE						
85	FSDWSGHNYINEIF						
86	WDWSGHNYINEIFAT						
87	WSGHNYINEIFATSS						
88	GHNYINEIFATSSYT						
89	NYINEIFATSSYTF						
90	INEIFATSSYTF						
91	EIFATSSYTF						
92	IFATSSYTF						

Abbildung 45. Peptide Scan des Knob (15mere mit 13er Überlapp)

Die Inkubation erfolgte mit den Erstantikörpern 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14.

Reaktive Reste, sowie deren überlappende Sequenzbereiche sind angegeben. Isolierte Einzelspots blieben unberücksichtigt.

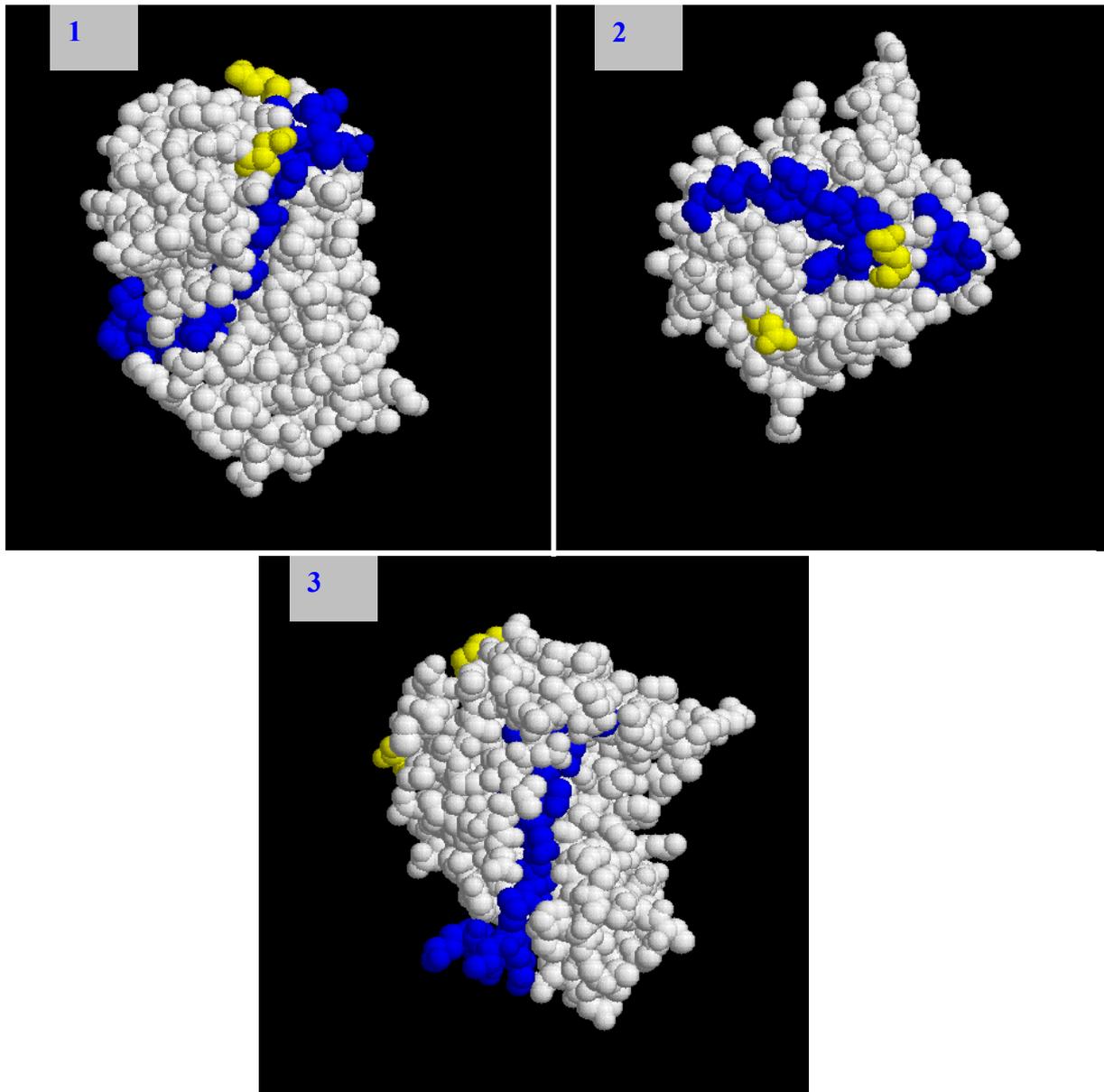


Abbildung 47. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 8C2.2 (PDB:1KNB ist weiss gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.
 1) AS 412-432, 2) AS 488-504, 3) AS 522-538

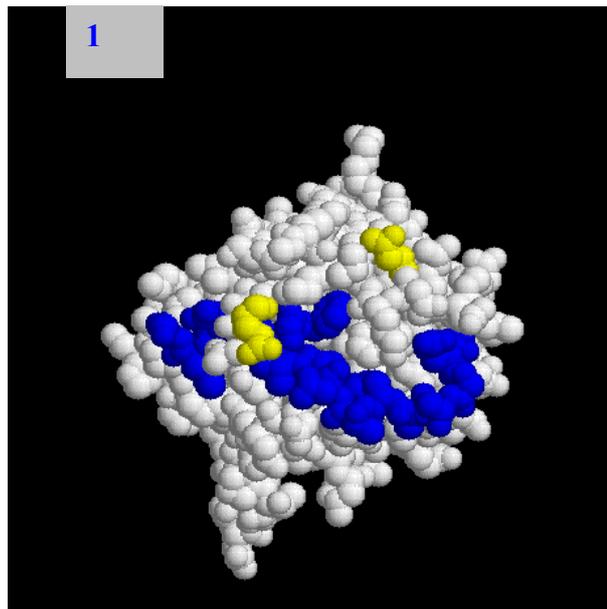


Abbildung 48. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 7A2.7 (PDB:1KNB ist weiss gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.
1) AS 486-502

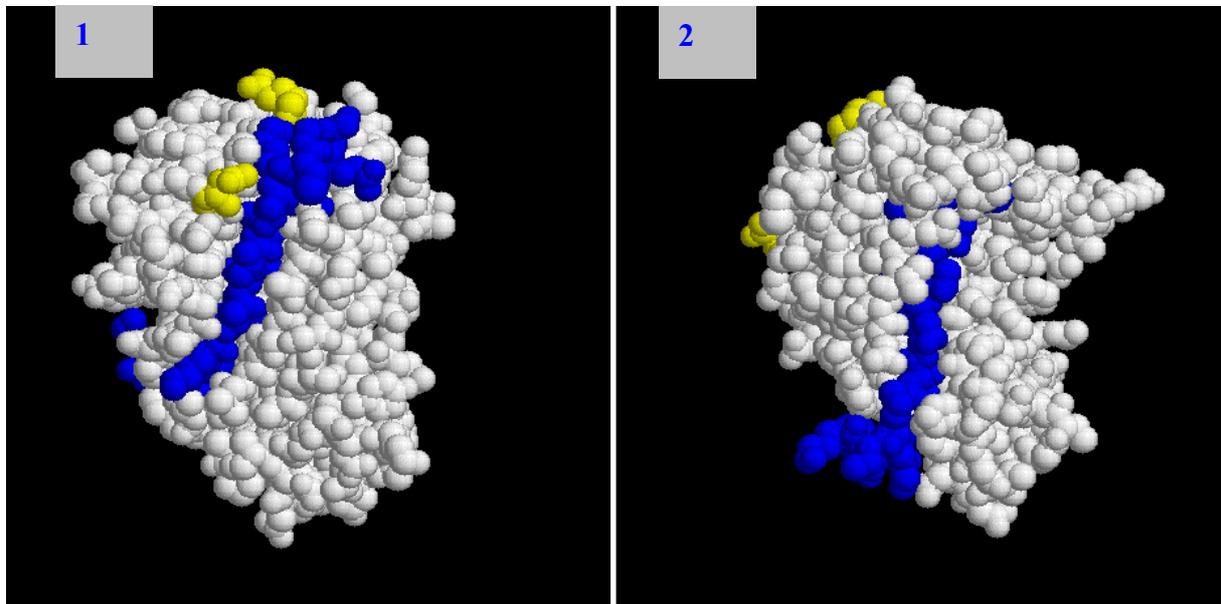


Abbildung 49. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 1D6.14 (PDB:1KNB ist weiss gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.
1) AS 416-432, 2) AS 522-538

In der quartanären Struktur des Knob (Abbildung 50-52) zeigen sich für die verschiedenen Antikörper und Peptidsequenzen unterschiedliche Zugänglichkeiten.

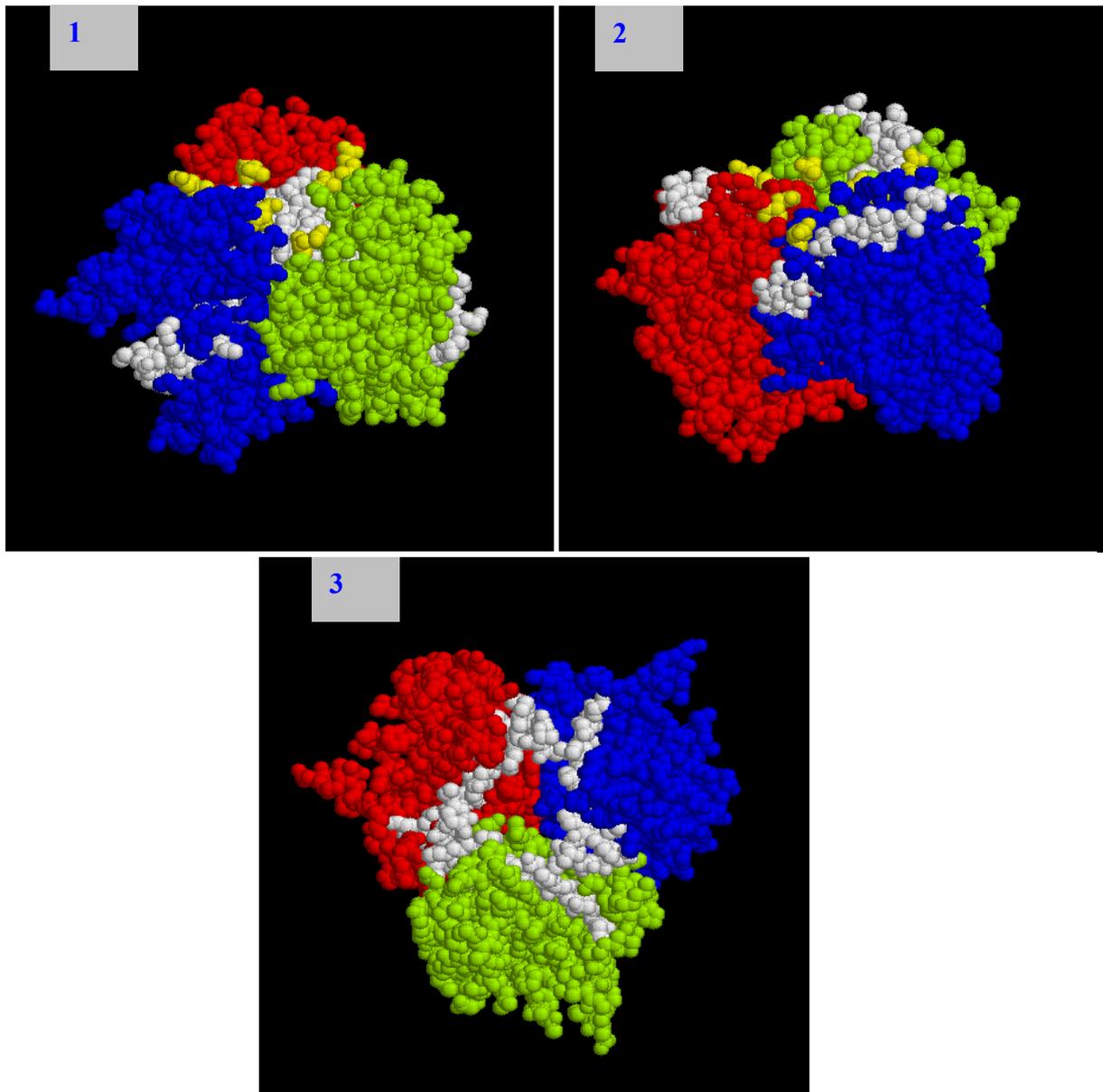


Abbildung 50. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 8C2.2 (Die monomeren Untereinheiten des Knob sind rot, blau und grün gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind weiss gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.

1) AS 412-432, 2) AS 488-504, 3) AS 522-538

Die Aminosäuren 412-432 (1) umfassen sowohl seitlich als auch zentral auf der Unterseite des Knob gelegene Aminosäuren. Die nahe der Amino- bzw. Carboxytermini gelegenen Aminosäuren scheiden als natives Antikörperepitop aus, da hier die Fiber ansetzt. Die Aminosäuren 488-504 (2) liegen nahe der Fiberansatzstelle seitlich am Knob. Die Aminosäuren 522-538 (3) stellen drei mögliche Epitope auf der Oberseite des Knob dar.

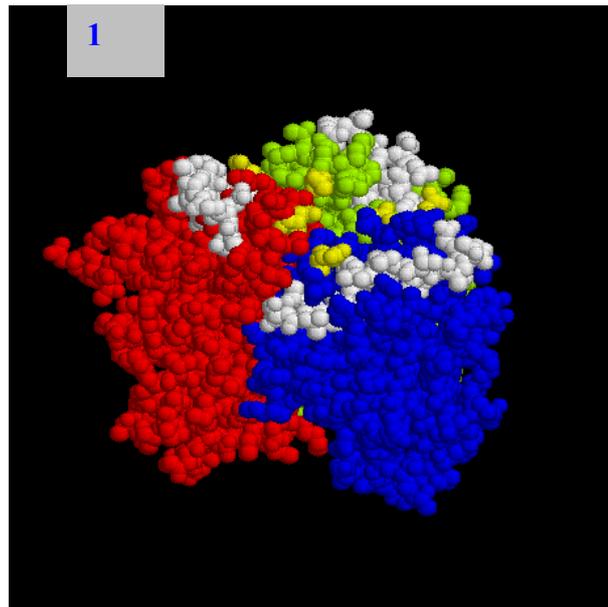


Abbildung 51. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 7A2.7 (Die monomeren Untereinheiten des Knob sind rot, blau und grün gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind weiss gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.

1) AS 486-502

Die Aminosäuren 486-502 (2) liegen nahe der Fiberansatzstelle seitlich am Knob.

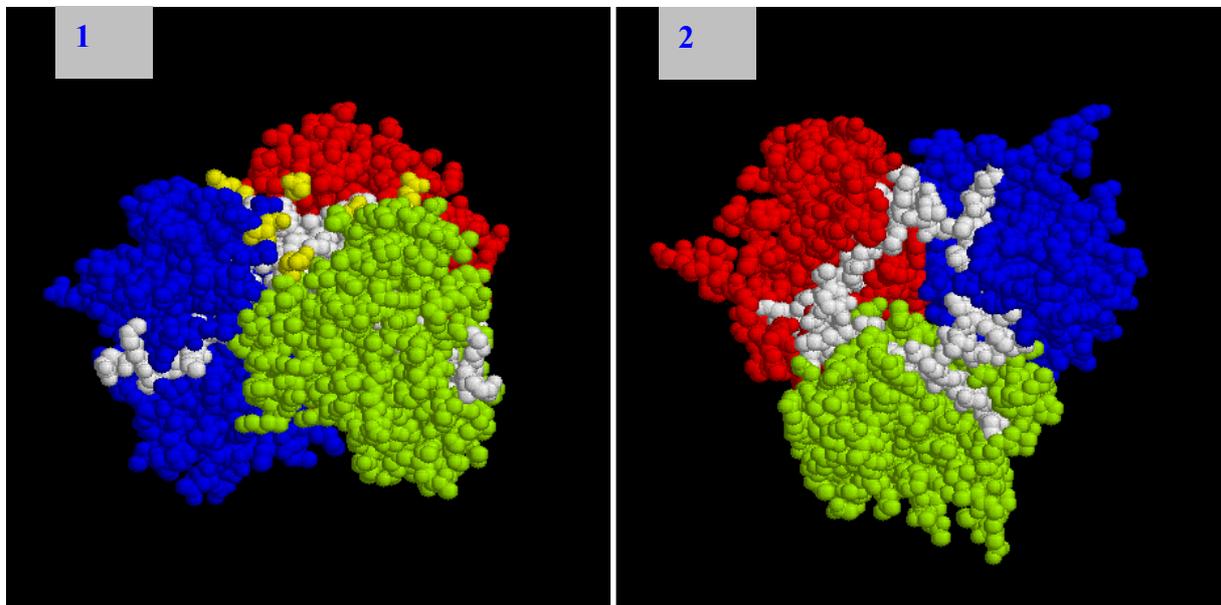


Abbildung 52. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 1D6.14 (Die monomeren Untereinheiten des Knob sind rot, blau und grün gefärbt. Der Aminoterminus (ASN396) und der Carboxyterminus (GLU581) sind gelb gefärbt. Reaktive Aminosäuren sind weiss gekennzeichnet. Die Darstellung ist raumfüllend erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome.

1) AS 416-432, 2) AS 522-538

Die Aminosäuren 416-432 (1) umfassen sowohl seitlich als auch zentral auf der Unterseite des Knob gelegene Aminosäuren. Die nahe der Amino- bzw. Carboxytermini gelegenen

Aminosäuren scheiden als natives Antikörperepitop aus, da hier die Fiber ansetzt. Die Aminosäuren 522-538 (3) stellen drei mögliche Epitope auf der Oberseite des Knob dar.

Festzuhalten bleibt, dass man es mit einem sehr empfindlichen System zu tun hat, bei dem man sich ständig an der Nachweisgrenze bewegt. Generell scheint es so zu sein, dass sich die Stärke der Wechselwirkung zwischen den untersuchten Antikörpern und den gespotteten Peptiden auf einem sehr niedrigen Niveau bewegt. Aus diesem Grunde bekommt man bei Verwendung sehr stringenter Bedingungen keine Signale mehr, bei Verwendung wenig stringenter Bedingungen hingegen viele falschpositive Signale.

4.3 Monomeres Knob

Um die eingangs des Peptide Scans aufgeführte Hypothese, dass man konformationelle Epitope als mehrere lineare Subepitope detektieren kann, zu verifizieren wurde Knob-mono (Abbildung 53), ein Knob-Konstrukt ohne das 22. *repeat* des Ad5 fiber Schafts, welches als Trimerisierungsdomäne dient, hergestellt. Dieses Konstrukt erlaubt die Bindung der verwendeten Antikörper an einzelne monomere Untereinheiten des Knobs zu untersuchen.

LSFDSTGAI T VGNKNNDKL T LWTTPAPSPN CRLNAEKDAK LTLVLTKCGS QILATVSVLA VKGSLAPISG
TVQSAHLIIR FDENGVLN SFLDPEYWNF RINGDLTEGTA YTNVAVGFMPN LSAYPKSHGK TAKSNIVSQV
YLNGDKTKPV LLTITLNGTQ ETGDTTPSAY SMSFSWDWSG HNYINEIFAT SSYTFSYIAQ E

Abbildung 53. Aminosäure-Sequenz von Knob (Aminosäuren, von Knob-mono sind rot markiert)

Knob-mono wurde in *E. coli* mit einem N-terminalen Tag von 6 Histidinresten exprimiert, was eine Reinigung mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie erlaubte (Abbildung 54).

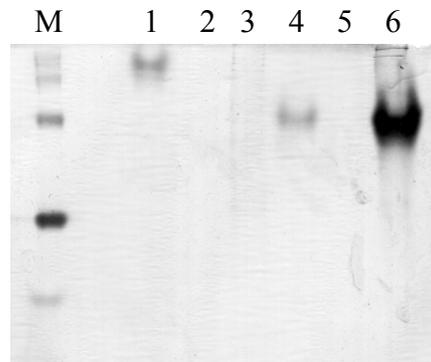


Abbildung 54. Aufreinigung von Knob-mono.

M Marker (BSA, RNase A, Trypsininhibitor), 1 Knob-mono, 2 Durchfluß, 3 Wash, 4 Eluat, 5 Centricon Durchfluß, 6 Centricon-Retentat

Knob und Knob-mono wurden nach unterschiedlicher Bedingungen auf ein Gel aufgetragen (Abbildung 55).

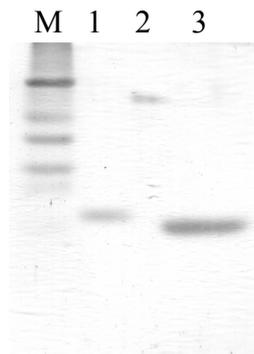


Abbildung 55. Vergleich Knob/Knob-mono

SDS PAGE. M Sigma Low, 1 Knob (denat. Puffer, gekocht), 2 Knob (nat. Puffer), 3 Knob-mono (denat. Puffer, gekocht)

Deutlich ist ein Größenunterschied zwischen denaturiertem Knob und denaturiertem Knob-mono zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob Knob-mono noch in der Lage ist zu trimerisieren wurde dieses Konstrukt, und im Vergleich dazu Knob, unter komplett nativen Bedingungen (Abbildung 56) im Gel analysiert.

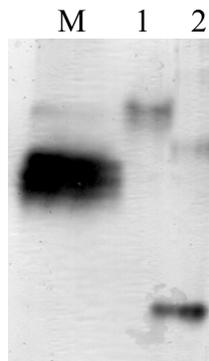


Abbildung 56. Knob/Knob-mono unter komplett nativen Bedingungen

10% SDS PAGE. M Marker (BSA, RNase A, Trypsininhibitor) (M), 1 Knob, 2 Knob-mono

Bei Gelen, die unter komplett nativen Bedingungen gefahren wurden (Abbildung 56), ist zu beachten, dass die Proteine hier nicht nur nach Größe, sondern vor allem nach ihrer Nettoladung, aufgetrennt werden.

Mit einem Westernblot dieser nativen und denaturierenden Gele wurde zunächst eine Negativkontrolle, der Ziege-anti-Maus Zweitantikörper alleine, durchgeführt. Dies zeigte keine unspezifischen Reaktionen. Die Positivkontrolle, der anti-penta-His Antikörper, reagierte, wie erwartet mit dem His-tag von Knob und Knob-mono, allerdings auch mit nativem Marker, nicht aber mit denaturiertem Marker (Tabelle 14).

Bedingung	Protein	Reaktion mit			
		8C2.2	7A2.7	2A4.1	1D6.14
denaturiert	Marker	x	x	x	x
	Knob	-	-	-	-
	Knob-mono	-	-	-	-
Nativ	Marker	x	x	x	x
	Knob	x	x	x	x
	Knob-mono	-	-	-	-

Tabelle 14. Ergebnis des Westernblots für Knob/Knob-mono

Knob-mono wird von den benutzten Antikörpern nicht erkannt. Um auszuschließen, dass die Proteine im Gel in einer Form vorliegen, die von den Antikörpern nicht erkannt wird, wurde das Experiment nochmals in einem Dotblot durchgeführt.

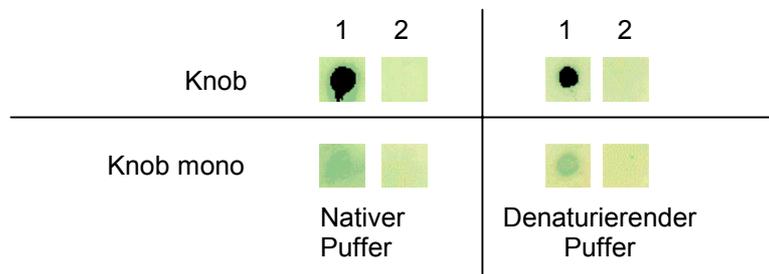


Abbildung 57. Vergleich von Knob/Knob-mono im Dotblot (ungekocht (1), gekocht (2))

Benutzt wurde der Antikörper 8C2.2, detektiert wurde er mit dem Ziege-anti-Maus Zweitantikörper.

In ungekochtem Zustand wird Knob (Trimer) besser als Knob-mono (Monomer) erkannt, unabhängig davon, ob Knob in nativem oder denaturierendem Puffer vorliegt. Knob-mono, ungekocht in denaturierendem Puffer aufgenommen, ergibt ein schwaches, aber deutliches, Signal. Eventuell trimerisieren monomere Knobs in geringem Ausmaß oder die verwendeten Antikörper erkennen Knob-mono partiell, schließlich reagieren sie auch mit Peptiden. Diese Befunde zeigen, dass man auch Teile von konformationellen Epitopen detektieren kann, wenn man dafür schwächere Signale in Kauf nimmt.

Tabelle 15 fasst nochmals die wichtigsten Ergebnisse zusammen:

Bedingung	Knob	Analyse				
		Proteingel		ELISA	Dotblot	
		anti-His	anti-Knob	anti-Knob	anti-Knob	
		TMB	ECL	ECL	TMB	TMB
denaturierend	Knob	x	x	-	n.d.	x ^a
	Knob-mono	x	x	-	n.d.	x ^a
nativ	Knob	x	x	x	x	x ^a
	Knob-mono	x	-	-	x	x ^a

Tabelle 15. Zusammenfassung der Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen Ad5 Knob unter unterschiedlichen Bedingungen

^a falls Knob oder Knob-mono gekocht wurden geht die Reaktivität der Antikörper für diese Proteine verloren

4.4 Erweiterung des Phage Display

Um nach natürlichen Liganden von CAR zu suchen, wurde das Potential von cDNA Phage Display bezüglich p53 evaluiert. Das Problem konformationeller Epitope soll über eine Gesamtpräsentation des Bindungspartners von CAR - und nicht nur des Epitops – umgangen werden. Es soll zunächst der Bindungspartner bestimmt werden und dann in einem Folgeschritt die Bindungsstelle einer Feinanalyse unterzogen werden.

4.4.1 T7Select human brain

Für das cDNA Phage Display wurde die kommerziell erhältliche cDNA Bibliothek T7select human brain (novagen) benutzt. Bei dieser Bibliothek ist aus menschlichem Gehirn cDNA gewonnen und in T7 Phagen verpackt worden. Um die Qualität der Bibliothek beurteilen zu können, wurden zufällig ausgewählte Phagen, welche keinem Screening unterworfen waren, ansequenziert. Dabei wurden Übereinstimmungen mit humanen ESTs zu 100%, wie erwartet,

gefunden. Die Insertlänge auf DNA-Ebene betrug ca. 300 bp, somit sollte die durchschnittliche Insertlänge auf AS-Ebene 100 AS betragen. Tatsächlich betrug die Insertgröße aber nur 26 AS. Nach durchschnittlich 26 AS trifft man also auf das erste Stopcodon. In manchen Fällen ist dies, das auch *in vivo* auftretende Stopcodon, in anderen Fällen befindet man sich einfach in einem falschen Leserahmen. 2 Klone enthielten kein Insert. Die Übereinstimmungen auf DNA-Ebene zeigen, dass 7 von 48 Inserts im Vergleich zur Datenbanksequenz falsch herum inseriert waren. 9 von 48 Klonen wiesen ein Polyadenylierungssignal auf. 3 zusätzliche Klone trugen den Poly(A)-Schwanz. 19 von 48 Klonen wiesen nur schlechte Homologien zu Datenbanksequenzen auf.

Klon-Nummer	Identität	Beschreibung	Bereich [nt]	Ergebnis
8	406/408 (99%) +/+	<i>Homo sapiens ribosomal protein L23 (RPL23) mRNA</i>	52-459 von 490	im falschen Leserahmen
37	386/392 (98%) +/+	<i>cytochrome P450 reductase [human, placenta, mRNA]</i>	1506-1895 von 2403	im falschen Leserahmen
32	382/388 (98%) +/+	<i>Human prot-oncogene (BMI-1) mRNA</i>	892-1280 von 3203	im falschen Leserahmen
6	376/387 (97%) +/+	<i>human cell division control-related protein 2b (hcdcrel2b) mRNA</i>	834-1215 von 1617	im falschen Leserahmen
24	373/389 (95%) +/+	<i>Homo sapiens PAC clone</i>	110813-111198 von 121166	falsche Orientierung
38	346/358 (96%) +/+	<i>Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit mRNA</i>	1024-1381 von 1544	3'UTR
34	338/342 (98%) +/+	<i>Homo sapiens aminoacylase 1 (ACY1) mRNA</i>	978-1319 von 1415	im falschen Leserahmen aber C-Terminus des Proteins
30	339/358 (94%) +/+	<i>Homo sapiens core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 mRNA</i>	1633-1989 von 3435	im falschen Leserahmen
25	316/318 (99%) +/+	<i>Homo sapiens heat shock 70kD protein 10 (HSC71) (HSPA10) mRNA</i>	1707-2024 von 2024	C-Terminus des Proteins
12	336/373 (90%) +/+	<i>Human natural killer cell enhancing factor (NKEFB) mRNA</i>	66-429 von 1008	im falschen Leserahmen aber am N-Terminus des Proteins
5	227/246 (92%) +/+	<i>H. sapiens GLAST1 gene for gliial glutamate transporter</i>	686-930 von 3234	Intron
1	184/196 (93%) +/+	<i>Homo sapiens Tubulin, alpha, brain-specific (TUBA3), mRNA</i>	1032-1222 von 1356	im falschen Leserahmen
35	123/133 (92%) +/+	<i>Homo sapiens apoptosis-associated tyrosine kinase (AATK).mRNA</i>	4351-4476 von 5140	3'UTR
26	66/66 (100%) +/+	<i>Homo sapiens QUAKING isoform 6 mRNA</i>	3-68 von 1137	5'UTR und N-Terminus des Proteins
4	48/48 (100%) +/+	<i>Human amyloid precursor-like protein 1 mRNA</i>	2290-2337 von 2354	3'UTR
14	364/372 (97%) +/-	<i>Homo sapiens calcium channel alpha1E subunit (CACNA1E)</i>	184246-183875 von 316704	Intron in umgekehrter Orientierung
16	356/366 (97%) +/-	<i>Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit mRNA</i>	2131-1770 von 2177	3'UTR in umgekehrter Orientierung
21	345/352 (98%) +/-	<i>Homo sapiens KIAA1073 protein mRNA</i>	4423-4074 von 4680	3'UTR
44	345/349 (98%) +/-	<i>Human fatty acid binding protein FABP gene</i>	3905-3558 von 9170	Intron
20	346/384 (90%) +/-	<i>Homo sapiens heat shock 70 kD protein 10 (HSC71) (HSPA10) mRNA</i>	1698-1319 von 2024	im falschen Leserahmen
23	54/54 (100%) +/-	<i>Homo sapiens mRNA for KIAA0861 protein</i>	1617-1564 von 4282	in falscher Orientierung

Tabelle 16. Ansequenzierte Klone (Anordnung nach Qualität)

Angegeben ist die Anzahl der übereinstimmenden Nukleotide, der Prozentsatz, die Orientierung, die Beschreibung aus der Datenbank, die Lage des homologen Bereiche, sowie ein Kurzergebnis

Klon 25 soll exemplarisch betrachtet werden:

Aus dem DNA-Gel der amplifizierten Inserts geht eine Größe von ca. 800 bp hervor. Abziehen sind 140 bp (Sequenz von der Primingsite bis zum Anfang des Inserts); übrig bleiben 660 bp. Durch Ansequenzieren und Datenbankvergleich wurde die Homologie zum

letzten Exon des HSC71 gefunden. Die restlichen Basen des Inserts wurden aufgrund der beschränkten Leseweite des Sequenzierers nicht erfasst. Von den 660 bp liegen 310 bp im letzten Exon, gefolgt von 350 bp 3'UTR und Poly(A).

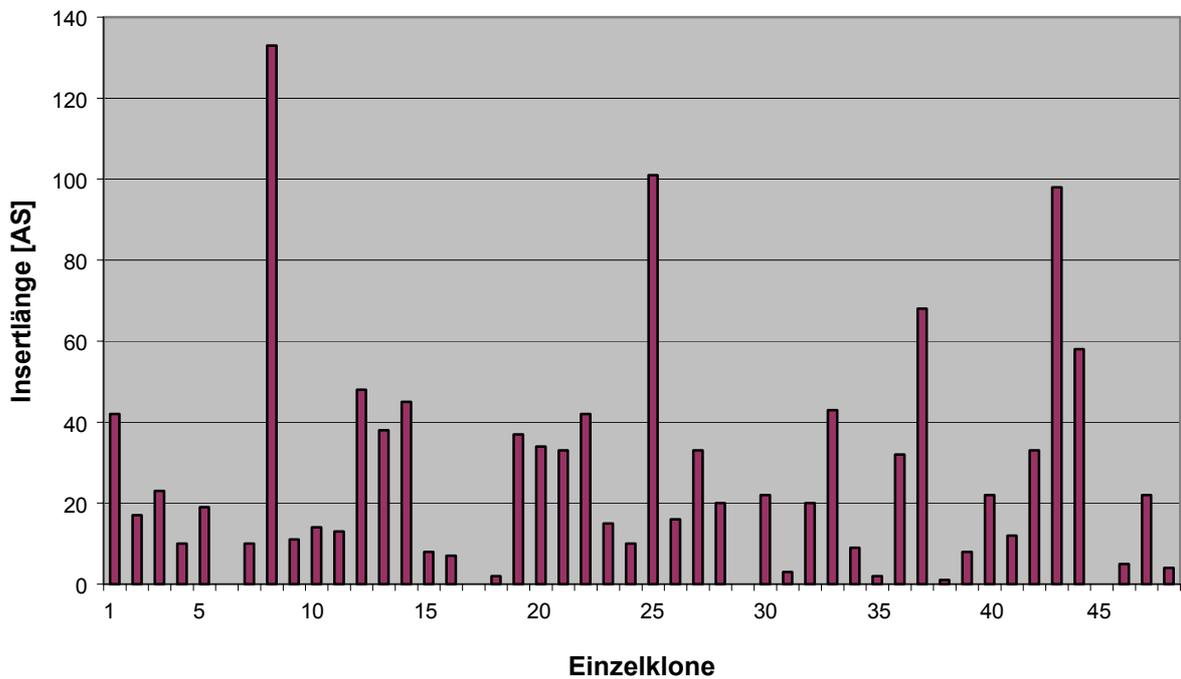


Abbildung 58. Länge der unselektierten Inserts auf Aminosäureebene

Die Überprüfung der T7Select human brain cDNA Bibliothek hat ergeben, dass die Insertlängen nicht den Angaben der Hersteller (novagen) entsprechen, sondern sehr viel kürzer waren. Weiterhin war der Titer weit niedriger als angegeben. Nur wenige Phagen enthielten *in frame* Insertionen von Sequenzabschnitten, welche aus dem kodierenden Bereich eines Proteins stammten.

Kontrolle p53

Ein Biopanning erfolgte gegen Bp53-11. Gebundene Phagen wurden mit Bakterien „eluiert“. Im folgenden ist der Verlauf des Titers über die einzelnen Panningrunden hinweg aufgeführt.

T7 select brain	
1. Panning	
Input	4.0×10^7
Output	6.0×10^5
amplifizierter Output	2.2×10^{13}
positive Klone [%]	n.d.
2. Panning	
Input	4.5×10^{10}
Output	1.2×10^4
amplifizierter Output	1.0×10^{15}
positive Klone [%]	2
3. Panning	
Input	2.0×10^{12}
Output	4.6×10^5
amplifizierter Output	n.d.
positive Klone [%]	30

Tabelle 17. Titer der einzelnen Panningrunden gegen p53 mit der T7Select Bibliothek

Dieselben Zahlen in grafischer Form:

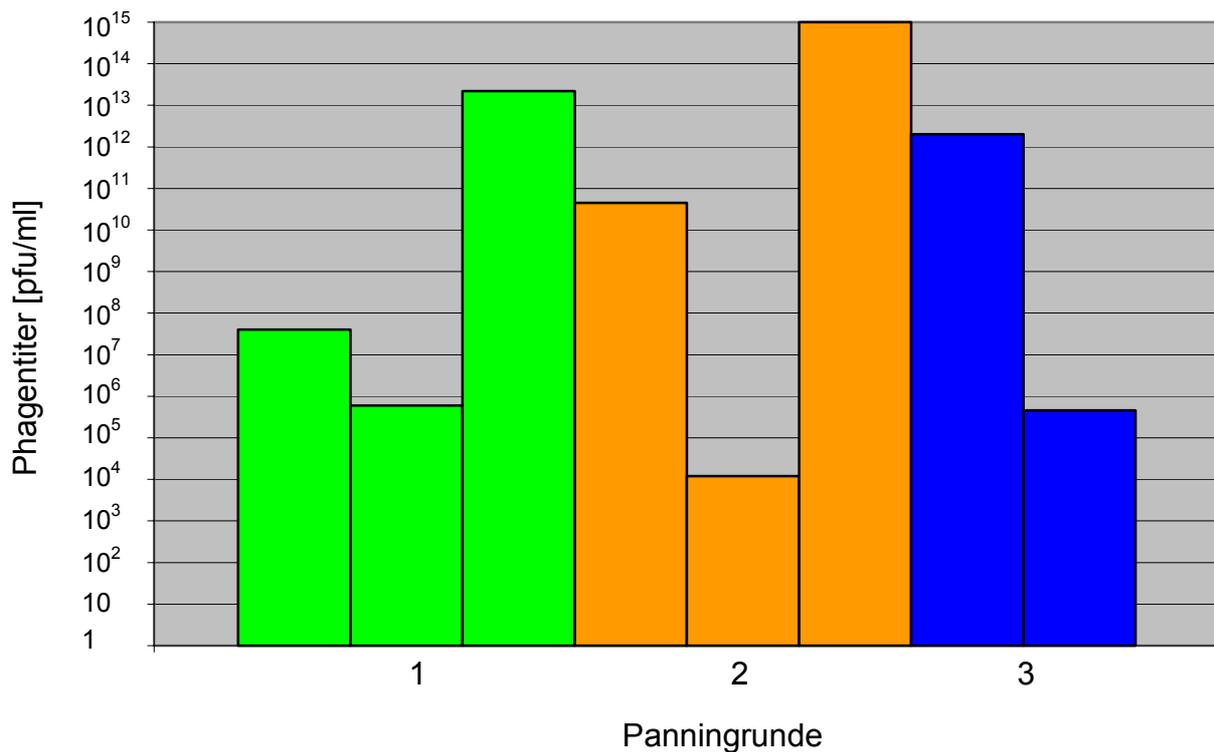


Abbildung 59. Titer der einzelnen Panningrunden gegen p53 mit der T7Select Bibliothek
Gezeigt sind jeweils drei Panningrunden (grün (1), orange (2), blau (3)). Der erste Balken in jeder Panningrunde zeigt den Inputtiter, der zweite den Outputtiter und der dritte den amplifizierten Outputtiter an.

Wie man deutlich sieht, steigt nach der 2. Panningrunde der Outputtiter signifikant um den Faktor >30 an.

Die Detektion positiver Klone geschah über einen Plaquelift (Abbildung 60) und Inkubation mit dem Bp53-11 Antikörper.

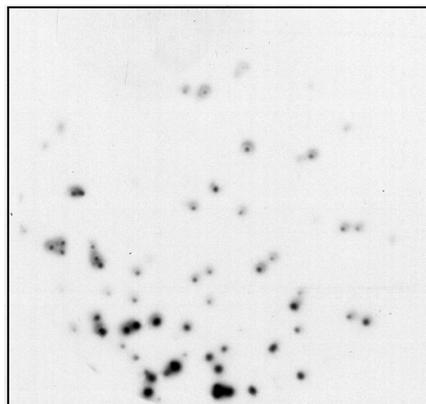


Abbildung 60. Plaquelift der angereicherten Klone aus dem Panning gegen p53
Detektion mit dem Bp53-11 Antikörper

Das Sequenzieren von sechs positiven Klonen führte in allen 6 Fällen zu demselben, 217 Aminosäuren umfassenden, Insert:

```

SLYRRQTELQ DKSEFSDVDK LAFKDNEEFE SSFESAGNMP RQLEMGGLSP AGDMSHVDA
AAAVPLSYQH PSVDQKQIEE QKEEEKIREQ QVKERRQREE RRQSNLQEV L ERERRELEKL
YQERKMIEES LKIKIKKELE MENELEMSNQ EIKDKSAHSE NPLEKYMKII QQEQDQESAD
KSSKMMVQEG SLVDTLQSSD KVESLTGFSSH EELDDSW

```

Dieses zeigte eine hohe Homologie zum p53 Epitop (FSDVDKL statt FSDLWKL). Das Epitop liegt am N-Terminus (AS 14) des 216 AS umfassenden Inserts. Es handelt sich um das vollständige C-terminale Ende (AS 797-1011) des vorhergesagten Proteins Cxorf5-1. Ein BLAST gegen die Nukleinsäuredatenbank HONEST (EMBL + Genbank - ESTs) lieferte alternativ gespleistes cxorf5, bei welchem der homologe Bereich im untranslatierten Sequenzbereich der cDNA zu finden ist. Dieser Bereich ist sehr lang ohne Stopcodon, was ungewöhnlich ist. de Conciliis *et al.* fanden 1998 dass cxorf5 in 2 Varianten vorkommt: cxorf5-2 ist 4288 bp lang (an Position 1368 sind 663 zusätzliche Nukleotide im Vergleich zu cxorf5-1 inseriert, was zu einem inframe Stopcodon an Position 1413 und damit zu einem 367 AS langen Protein führt, dessen erste 353 AS mit cxorf5-1 (3.600 bp) identisch sind.)

4.4.2 T7Select human lung

Aus dem kommerziell verfügbaren, auf T7 Phagen basierenden, T7Select-System wurde eine cDNA Bibliothek humanen Lungengewebes ausgewählt. Um die Qualität der Bibliothek beurteilen zu können wurden zufällig ausgewählte Phagen, welche keinem Screening unterworfen waren, ansequenziert. Dabei wurden Übereinstimmungen mit humanen ESTs zu 100%, wie erwartet, gefunden. Die Insertlänge auf DNA-Ebene betrug ca. 210 bp, somit sollte die durchschnittliche Insertlänge auf AS-Ebene 70 AS betragen. Tatsächlich betrug die Insertgröße aber nur 15 AS. Nach durchschnittlich 15 AS trifft man also auf das erste Stopcodon. In manchen Fällen ist das, das auch *in vivo* auftretende Stopcodon, in anderen Fällen befindet man sich einfach in einem falschen Leserahmen. 2 Klone enthielten kein Insert. Die Übereinstimmungen auf DNA-Ebene zeigten, dass 2 von 13 Inserts im Vergleich zur Datenbanksequenz falsch herum inseriert sind. 3 von 13 Klonen wiesen ein Polyadenylierungssignal auf.

Die einzigen Homologien bestehen zu folgenden Proteinen:

Klon-Nummer	Identität	Beschreibung	Bereich [nt]	Bemerkung
8	164/166 (98%) +/-	<i>Homo sapiens proteasome subunit HSPC mRNA</i>	321-484 von 969	im falschen Leserahmen
32	90/91 (98%) +/-	<i>Homo sapiens ficolin (collagen/fibrinogen domain-containing) mRNA</i>	1190-1280 von 1292	3'UTR

Tabelle 18. Ansequenzierte Klone (Anordnung nach Qualität)

Angegeben ist die Anzahl der übereinstimmenden Nukleotide, der Prozentsatz, die Orientierung, die Beschreibung aus der Datenbank, die Lage des homologen Bereiche, sowie ein Kurzergebnis

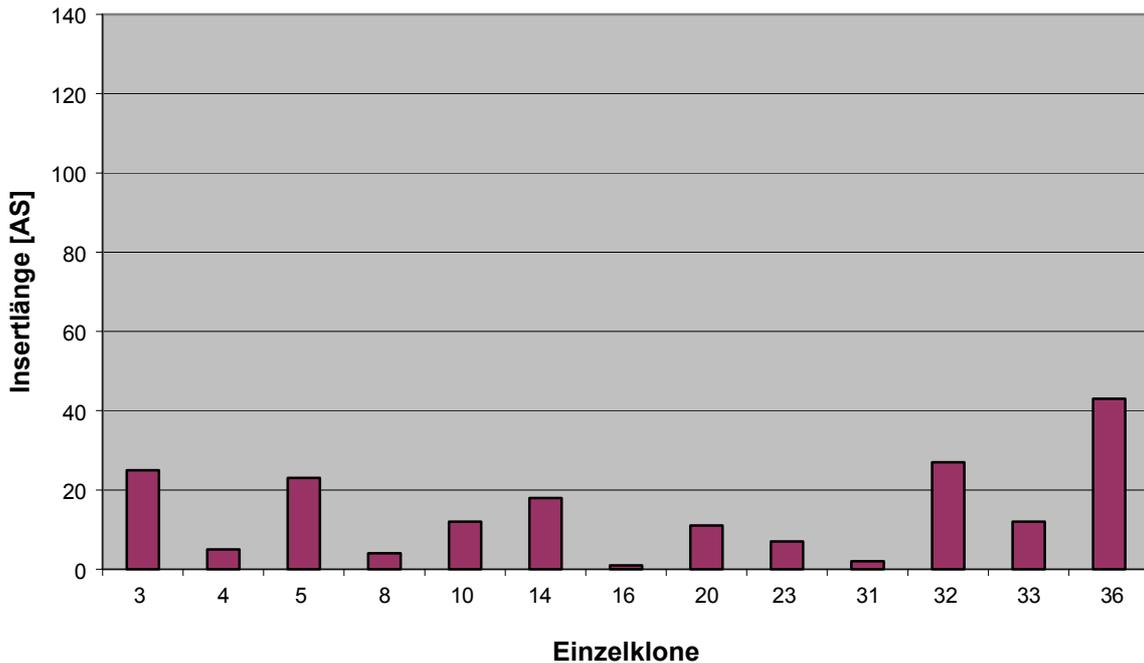


Abbildung 61. Länge der unselektierten Inserts auf Aminosäureebene

Die Überprüfung der T7Select human lung cDNA Bibliothek hat ergeben, dass die Insertlängen nicht den Angaben des Herstellers (novagen, USA) entsprachen, sondern sehr viel kürzer waren. Weiterhin war der Titer weit niedriger als angegeben. Nur wenige Phagen enthielten in frame Insertionen von Sequenzabschnitten, welche aus dem kodierenden Bereich eines Proteins stammen.

4.4.3 Optimieren des Systems

T7 Phagen vermehren sich sehr schnell. Aus diesem Grunde sollte der Frage nachgegangen werden, ob sie sich auch während der Elution noch weiter vermehren und somit der Titer beeinflusst wird. Hierzu wurde eine Versuchsreihe durchgeführt.

Inkubationszeit [min]	Verdünnungsstufen			
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
5	n.d.	85	12	0
10	n.d.	106	8	0
20	viele	104	10	1
30	viele	89	7	1
60	viele	70	6	1

Tabelle 19. Erhaltene Plaques in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe und der Inkubationszeit

Trägt man diese Daten in grafischer Form auf, so erhält man folgendes:

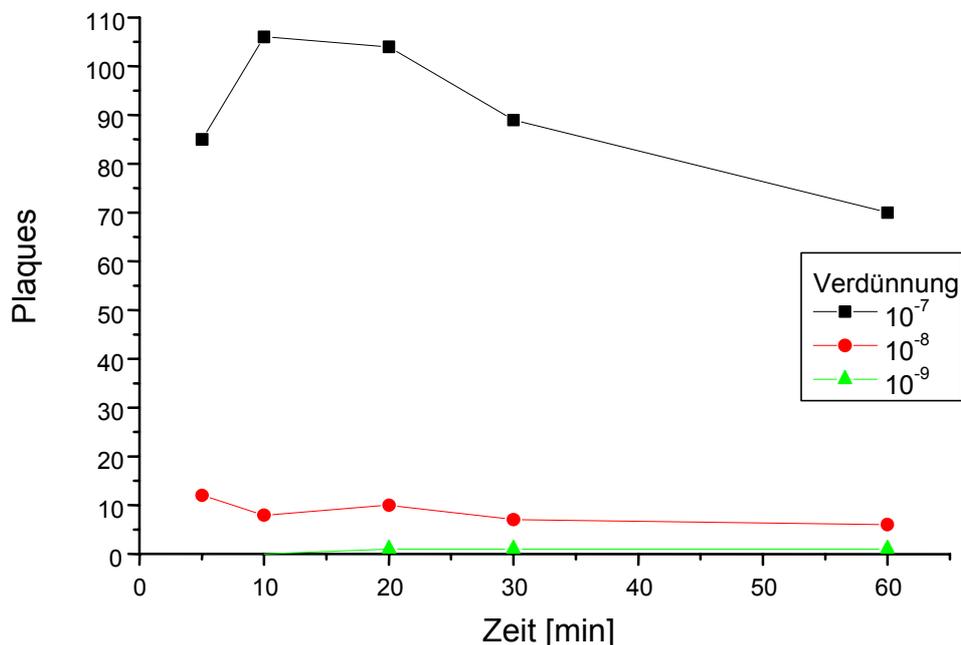


Abbildung 62. Erhaltene Plaques in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe und der Inkubationszeit

Die Schwankungen in der Anzahl der Plaques sind marginal. Die Inkubationszeit hat offensichtlich keinen Effekt auf die Anzahl der Plaques.

Konsequentes Panning

Es sollte getestet werden, ob man im T7-System ohne eine Amplifikation der eluierten Phagen auskommen kann. Hierzu wurden die Phagen, welche im Biopanning an ein Zielprotein gebunden hatten, mit NaHCO₃ (pH 9,5) eluiert und direkt, ohne Amplifikation, für das nächste Panning eingesetzt. Bei der ersten Panningrunde blieben praktisch keine Phagen hängen, deren Anzahl in den folgenden Panningrunden natürlicherweise noch weiter abnahm. Durch solch ein konsekutives Panning wird also die Zahl der Nichtbinder stark reduziert und man hantiert mit immer geringeren Phagenkonzentrationen. Allerdings ist man auf ein sehr effektives Panning angewiesen um die wenigen positiven Klone nicht schon in der ersten Panningrunde zu verlieren.

cDNA Banken

Das T7 Phage Display System ist aufgrund C-terminaler Fusion und der Möglichkeit größere Proteine zu präsentieren insbesondere für die Erstellung von cDNA Bibliotheken geeignet. Auftretende stop-codons verursachen, da C-terminal gelegen, keinen Abbruch der Translation.

Ein wichtiger Punkt beim Erstellen von cDNA-Banken ist die Wahl der richtigen Primer um die Boten-RNA in cDNA umzuschreiben. Die kommerziell erhältlichen T7select cDNA-Banken werden nach der reversen Transkription mit Oligonukleotidlinkern versehen, welche ein gerichtetes Klonieren und Exprimieren erlauben (siehe Abbildung 63). Bei der Analyse dieser Banken wurde jedoch offensichtlich, dass ein überproportional hoher Anteil an Klonen generiert wurde, in denen ausgehend vom poly(A)-Ende der mRNAs die untranslatierten 3'-Regionen inseriert waren. Entsprechend der in höheren Eukaryonten häufig extrem langen

untranslatierten Bereichen, beinhalten die exprimierten Fusionsproteine – wenn überhaupt – nur eine geringe Zahl an N-terminalen Aminosäuren.

Wir haben deswegen ein neues 'Priming-System' entwickelt, welches ebenfalls über zwei 3' gelegene Thymidine das gerichtete Klonieren erlaubt, jedoch den variablen Teil des Primers auf die Basen Adenin, Guanin und Cytosin beschränkt.

Die Evaluation zweier, mit diesem 'Priming-System' erstellter, Banken demonstrierte eindeutig die Überlegenheit des neuen Systems verglichen mit dem kommerziell erhältlichen (Daten nicht gezeigt).

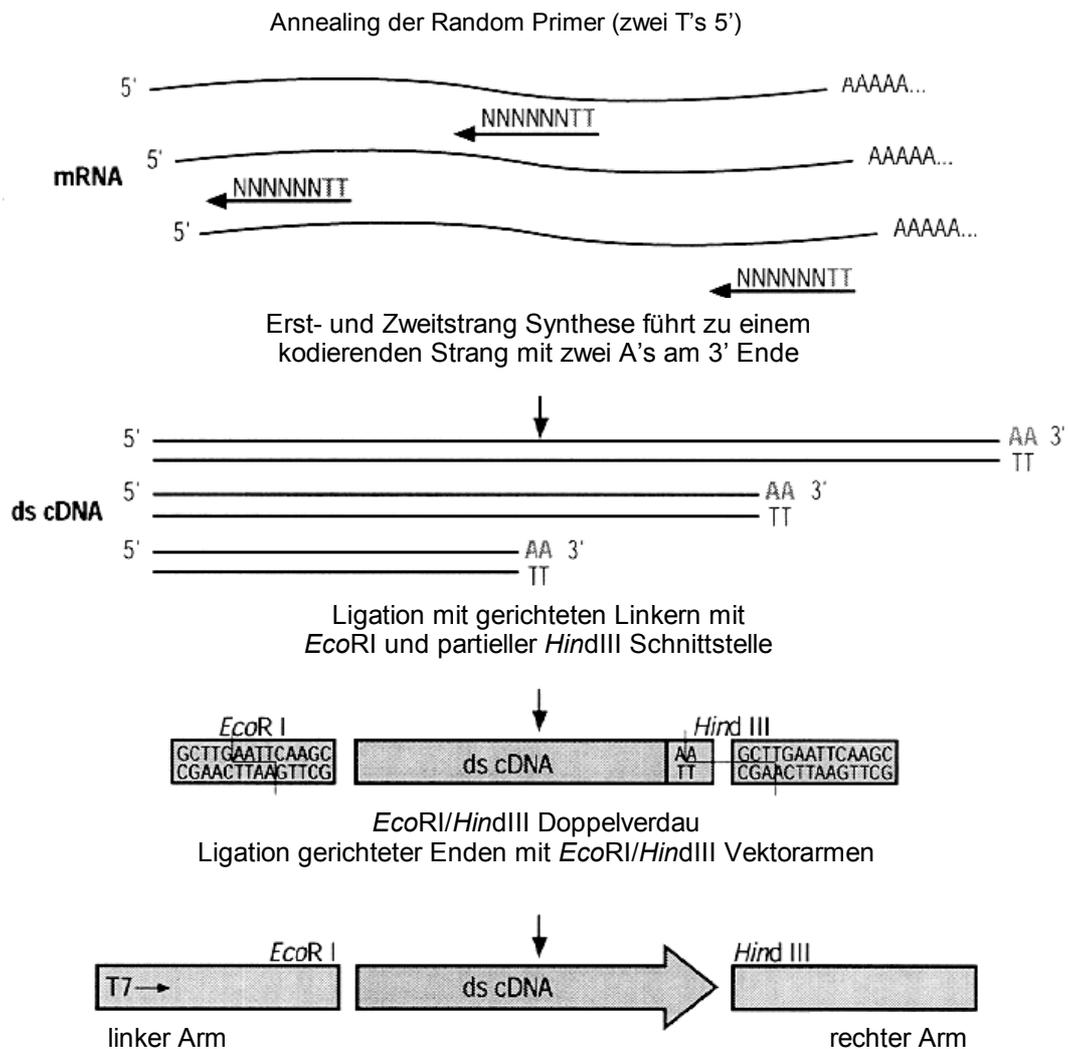


Abbildung 63. Strategie zur Erstellung von random primed cDNA Banken (novagen, USA)

4.4.4 Lambda foo

Um zu überprüfen, welchen Einsatzbereich ein weiteres, auf lytischen Phagen beruhendes, Display System bietet, wurde getestet, wie groß die Inserts für lambda Phagen sein dürfen. Hierzu wurden äquimolare Mengen an unterschiedlich großen Fragmenten (aus einem DNase-Verdau) eingesetzt. Die Primärbank ergab für die unterschiedlichen Größen folgende Verhältnisse von Phagen mit und ohne Insert:

Fragmentgröße	Fragmentmenge	Verhältnis von Phagen ohne Insert zu Phagen mit Insert
80 – 300 bp	100 ng	5 : 1 (2.5×10^7 : 5×10^6)
300 – 1.500 bp	500 ng	10 : 1 (2.0×10^7 : 2×10^6)
600 – 3.000 bp	750 ng	1.000 : 1 (1.5×10^7 : wenig)

Tabelle 20. Tolerierbare Insertgrößen für das Lambda foo System

Mit zunehmender Insertgröße nimmt also die Verpackungseffizienz der lambda Phagen rapide ab. Um auszuschließen, dass dieser Effekt allein aufgrund einer ungünstigen Größenverteilung der Fragmente zustande kam wurden zusätzlich Fragmente definierter Größe (630 bp, 1.510 bp, 2.050 bp) benutzt. Hierbei erhielt man schon für das 630 bp Fragment ein Verhältnis von 1 Phagen mit Insert auf 100 Phagen ohne Insert. Bei den größeren Fragmenten war das Verhältnis von Insert-tragenden Klonen zu leeren Klonen noch schlechter (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Adenoviren verschiedener Serotypen wurden auf antigene Bereiche untersucht. Fender *et al.* fand 1995 für Ad2, dass manche Antikörper das Trimer erkennen, im ELISA bzw. im Westernblot gegen das Monomer aber versagen, was darauf hindeutet, dass diese Antikörper diskontinuierliche Epitope erkennen oder die Konformation in Monomeren ganz anders ist. 4 von 5 neutralisierenden Antikörpern erkannten nur Trimere, kein einziger erkannte ein lineares Epitop, was andeutet, dass das Trimer für den Kontakt zum Rezeptor notwendig ist und dass diskontinuierliche Epitope auf Knob bei der Interaktion Knob-Rezeptor involviert sind. Im Peptide Scan erfolgte ein Feinmapping polyklonaler Antikörper gegen denaturiertes Ad2 Knob und ergab : CRIHSDND, FDQNGVLM, YTN~~AVGFM~~, VSQVYL, ST~~YSMSFT~~, TNSYTF (konservierte AS). Gegen native Ad2 Fiber ergab sich: LRFDQNGV, YTN~~AVGFM~~, NIVS~~QVYL~~, T~~LNGT~~SESTETSEV. Es wurden monoklonale Antikörper beschrieben, welche Monomer und Trimer gleich gut erkannten, diese hatten alle ein lineares Epitop. Einige monoklonale Antikörper erkannten auch synthetische Peptide: FDQN, AXGFMP, GVL~~MEN~~. Monoklonale Antikörper, welche nur Trimer erkannten, reagierten mit keinem der Testpeptide besonders stark.

Im Peptide Scan mit Ad3 Peptiden fanden Liebermann *et al.* 1998 folgende reaktive Peptide: KNVSINVELYFDAT, RTSYVM~~TFLWSLNA~~, GTHNENYIFGNCY, NCIIEYGKQNPDSKL, DSKLTLILVKNGGIV, TTQATLITSPFTFSYIREDD

Die antigenen Peptide aus beiden Quellen sind in folgendem Alignment eingezeichnet:

				A		B	C				
C Ad2	386	SGAITIG...	NKNDDK	TLW	TTDPD SPNCR	IHS..DN.D	C	KFTLV LTKCG	SQVLATVAAL	439	
C Ad5	386	TGAITVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP SPNCR	LNA..EK.DA	DA	KLTLV LTKCG	SQILATVSVL	439	
A Ad12	394	NIALGSSS	NTPYDPL	TLW	TTDPD PPNCS	LIQ..EL.DA	DA	KLTLCL TKN	SIVNGIVSLV	448	
B Ad3	123	SNSIAL....	...KNN	TLW	TGPKPEANCI	IEYKQNPDS		KLTLIL VKNG	GIVNGYVTLM	174	
		C		D		E	F				
C Ad2	440	AVSGDLSS..	MTGTVASVSI	FLR	FDQNGV L	MENS.SLK.K	H.YWNFR	NGN	STINAN PYTNA	494	
C Ad5	440	AVKGS LAP..	ISGTVQSAHL	IIR	FDEN GV	LNNS.FLD.P	E.YWNFR	NGD	LTEGT AYTNA	494	
A Ad12	449	GVKGNLLN..	IQSTTTIVGV	HLV	FD EQGRL	ITSTPTALVP	QASWGYR	QGG	SVSTNT VTNG	506	
B Ad3	175	GASDYVNTLF	KNKNV.SIN	EL	YFDAT GHI	LPDSSSLK.T	D..LELKY	KQ	TAD... FS.A	226	
				G		H					
C Ad2	495	VG FMPNLLAY	PKTQSQT...	AKM	NIVS	QVY	LHG.DKTK.P	MILTIT	LNGT	SESTETSEVS	549
C Ad5	495	VG FMPNLSAY	PKSHGKT...	AKS	NIVS	QVY	LNG.DKTK.P	VTLTIT	LNGT	QETGDTT.PS	548
A Ad12	507	LG FMPNV SAY	PRPNASE...	AKS	QMV	SLTY	LQG.DTSK.P	ITMKVA	FN GI	TSL.....N	555
B Ad3	227	RG FMPSTTAY	PFVLPNAGTH	NENY	I	FGQCY	YKASDGALFP	LEVTVM	L NKR	LPDS....RT	280
		I		J							
C Ad2	550	IY SMSFTWSW	ESGKYTTE..	.TF	ATNS	YTF	SYIAQE.			582	
C Ad5	549	AY SMSFSDW	SGHNYINE..	.I	FATSS	YTF	SYIAQE.			581	
A Ad12	556	GY SLTFMWSG	L.SNYINQ..	.P	FSTPS	CSF	SYITQE.			587	
B Ad3	283	SY VM TFLWSL	NAGLAPETTQ	ATL	ITSP	PFTF	SY IREDD			319	

Abbildung 64. Antigene Sequenzabschnitte des Ad2 und Ad3 Knobs

Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3), C (Ad2, Ad5). Hierbei binden die Subgruppen A und C an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. In grau markiert sind Sequenzabschnitte, welche als sehr antigen beschrieben wurden (Ad2: Fender *et al.*, 1995, Ad3: Liebermann *et al.*, 1998).

Versuche von Zinn *et al.* zeigten 1998, dass ein Knob-Protein gleichzeitig einen Antikörper und einen Rezeptor binden kann, weil beim Einsatz von zwei Knobmolekülen pro Antikörper, Knob immer noch an seinen zellulären Rezeptor binden kann.

Die Epitope der untersuchten monoklonalen Antikörper können mit der Knob-CAR-Interaktionsstelle identisch sein, müssen es aber nicht. Für eine Neutralisation der Bindung reicht es aus, diese sterisch zu behindern (z.B: durch Bindung in unmittelbarer Nähe).

Hong führte 1997 Pannings gegen neutralisierende anti-Ad5 Antikörper (u.a. 7A2.7) durch. Hongs Hypothese: Obwohl es sich um konformationsabhängige Epitope handelt, können ausreichend lange lineare AS-Sequenzen gefunden und der Sequenz zugeordnet werden. Die Alignments der Phagotopie aus dem Panning gegen die neutralisierenden Antikörper sind:

1D6.3 (438-465, Kernmotiv 445-462)
VLAVKGS**LAPIS**GT**VQSA**HLIIR**FD**ENG

VF-VK--L-P
P-DVAP-S
LIPFNS
LS-N-QSG
SGVGQA
SVGD-YG
G-I-S-HTG
G-I-S-HTG
G-A-S-HTV
HFQYRM
RRIFR-D

7A2.7 (470-486, Kernmotiv 473-486)
NSFLDPEYWN**FR**NGDL**T**

MQPVYF
LGP-V-NS
AL-P--HIV
A-P--HELR
MNVGAH
VTSTYH
LQKVH--R
DLWSVL
FWLAVR
WALFRS
YLGFFK
IAR--LIS
RNYTLT
RDAVMI
SRPTML

Für 7A2.7 konnte ich zwei Konsensusmotive aus Phage Display Bibliotheken identifiziert werden:

aus der 7mer Bibliothek **HTTSPLH**
aus der 12mer Bibliothek **^H/yP**

				A					B	C	
1	Ad5	386	TGAI TVG ...	NKNNDK LTLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DAK LTLVLTK	CGS	QILAT VS		437
2	Ad5	386	TGAI TVG ...	NKNNDK LTLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DAK LTLVLTK	CGS	QILAT VS		437
3	Ad5	386	TGAI TVG ...	NKNNDK LTLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.	DAK LTLVLTK	CGS	QILAT VS		437
				C		D		E	F		
1	Ad5	438	VLAVKGS LAP ..	ISG TVQSA	HLIIR FD ENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWN FRN	GDL TEG TAY T			492
2	Ad5	438	VLAVKGS LAP ..	ISG TVQSA	HLIIR FD ENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWN FRN	GDL TEG TAY T			492
3	Ad5	438	VLAVKGS LAP ..	ISG TVQSA	HLIIR FD ENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWN FRN	GDL TEG TAY T			492
					G		H				
1	Ad5	493	NAVGF MPNLS	AY PKSHGKT ..	AKSNIV SQ	VY LNG .DKTK	PVTL TITLN	GTQ ETG D TT ..			546
2	Ad5	493	NAVGF MPNLS	AY PKSHGKT ..	AKSNIV SQ	VY LNG .DKTK	PVTL TITLN	GTQ ETG D TT ..			546
3	Ad5	495	NAVGF MPNLS	AY PKSHGKT ..	AKSNIV SQ	VY LNG .DKTK	PVTL TITLN	GTQ ETG D TT ..			546
				I		J					
1	Ad5	547	PSA YSMSFSW	DWSGH NYINEIFAT S	SY TFSY I AQE					581
2	Ad5	547	PSA YSMSFSW	DWSGH NYINEIFAT S	SY TFSY I AQE					581
3	Ad5	547	PSA YSMSFSW	DWSGH NYINEIFAT S	SY TFSY I AQE					581

Abbildung 65. Vergleich der Phage Display Ergebnisse für 7A2.7

Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3), C (Ad2, Ad5). Hierbei binden die Subgruppen A und C an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Aminosäuren des Konsensusmotivs sind rot gedruckt. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob als bindungsg geeignet gezeigt haben, grau unterlegt.

1) Ergebnisse aus dem Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek, 2) Ergebnisse aus dem Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek, 3) Ergebnisse von Hong (Hong *et al.*, 1997)

Wie deutlich zu sehen ist, unterscheiden sich die Sequenzbereiche die ich als Antikörperepitope vorschlagen würde von denen die Hong vorschlägt. Er hat angereicherte random Insertsequenzen direkt mit der Sequenz des Knob aligniert während ich versucht habe aus den angereicherten Insertsequenzen ein Konsensusmotiv zu extrahieren. Dieses wurde dann in der Knobsequenz markiert, was meiner Meinung nach konformationellen Epitopen eher Rechnung trägt, weil neben Teilepitopen auch einzelne Aminosäuren markiert werden.

5.1 Monomeres Knob

Novelli und Boulanger stellten 1991 fest, dass Fibermonomere im Cytoplasma trimerisieren und als Trimer mit der Pentonbasis verbunden werden. Monomere Fiberproteine werden nicht in die Pentonbasis eingebaut. Die Effizienz der Trimerisierung liegt in einem zellfreien System bei 30 %, was die Autoren auf fehlende Glykosilierung zurückführen. Hong und Engler lokalisierten 1996 die Glykosilierungsstellen im Schaft. Für die Trimerisierung fanden sie Knob (AS 400-582), sowie die letzten 15 AS des Schafts erforderlich. Monomere erwiesen sich als instabiler als Trimere. Fiber und Knob dissoziieren nicht wenn sie bei moderaten Temperaturen mit SDS inkubiert werden.

5.2 Adenovirale Fiber und zellulärer Rezeptor

Während dieser Doktorarbeit gab es neben viele Publikationen auch Patentierungen (**United States Patent 6,210,921** von Finberg *et al.*, April 3, 2001: CAR: a novel coxsackievirus and adenovirus receptor; **Internationales Patent WO0015823** von Wickham *et al.*, April 23, 2001: Alternatively targeted adenovirus).

Van Raaij veröffentlichte 1999 ein Modell der Fiberstruktur.

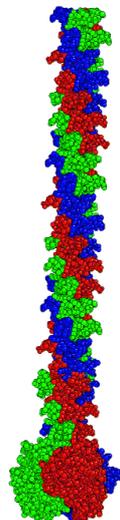


Abbildung 66. Struktur der adenoviralen Fiber (nach van Raaij, 1999)

Die Adenovirus-Bindestelle liegt in der aminoterminalen IgV-verwandten Domäne des CAR (Freimuth, 1999). Für die adenovirale Infektion sind nur die extrazellulären Anteile von CAR wichtig (Wang und Bergelson, 1999). Verschiedene Deletionen im Ad5-Fiberprotein zeigten, dass der letzte Schaftrepeat, der größte Teil des V-Faltblatts, die Stränge D, G, H, I sowie die DG- und HI-Schleife für lebensfähige Virionen benötigt werden. Auch monomere Fiberproteine werden von CAR erkannt, allerdings mit reduzierter Affinität (Santis *et al.*, 1999). Werden in der Aminosäuresequenz des Ad5-Knob zwischen AS 485 und AS 493 zwei beliebige, konsekutive, Aminosäuren deletiert, so geht die Affinität zu CAR verloren, ohne

dass sich die Konformation ändert (Kirby *et al.*, 1999). Eine Mutation von AS 492, AS 493 und AS 495 hat keinen Effekt auf die Bindung. Ein Austausch der AS 479-486 durch Ad3 Sequenz ändert an der Struktur nichts, unterbindet aber die Bindung, d.h. hier liegen relevante Reste. Roelvink *et al.* verglichen 1999 die Aminosäuresequenzen der Knobproteine von 14 Adenovirus-Serotypen, welche alle CAR erkennen. Hierbei wurde ein konserviertes, oberflächlich gelegenes Aminosäurecluster an der Seite des Knob gefunden, was als Grundlage zur Mutagenese der kompletten Oberfläche des Ad5-Knob diente. Die mutierten Knobproteine wurden exprimiert, auf Trimerbildung getestet und auf ihre inhibitorisches Potential bzgl. der Bindung an CAR getestet. 6 kritische Reste wurden gefunden: S408, P409, K417 (AB-Schleife), K420 (beta-Faltblatt B), Y477 (DE-Schleife), Y491 (FG-Schleife), alle auf einem Monomer.

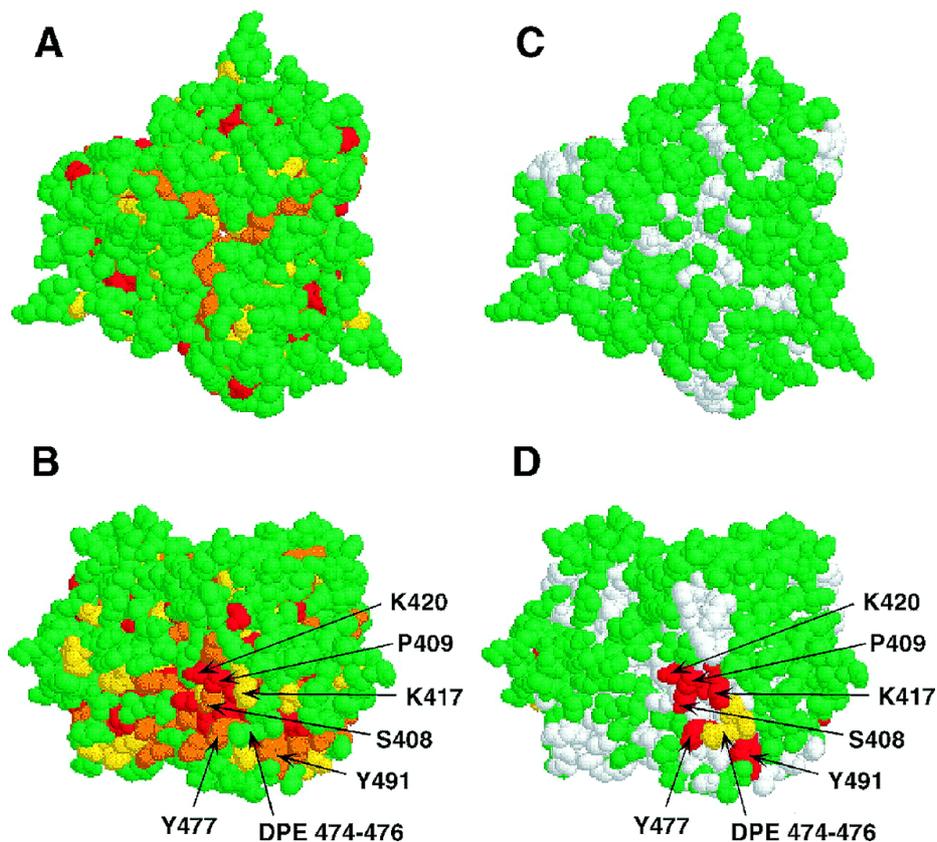


Abbildung 67. Übersicht über konservierte und mutierte Aminosäuren des Knob (nach Roelvink, 1999)

A und B) Variabilität und Konserviertheit von CAR-bindenden Fiber-Sequenzen. Die Aminosäuresequenzen von 14 Fiberknobs wurden aligniert. Auf der Basis des Sequenzidentitätswertes erfolgte die Colorierung (rot, 93-100%, orange 71-86%, gelb 57-64%, grün für niedrigere Werte). C und D) Mutanten in den Schleifen und beta-Faltblättern. Punktmutationen, welche die Fiber-CAR Interaktion um zwei bis drei Größenordnungen reduzieren sind rot dargestellt. Die Mutation r474-476, die die Interaktion um den Faktor fünf reduziert ist in gelb dargestellt. Mutationen, welche die CAR-Bindung nicht beeinträchtigen sind grün, nicht mutierte Reste grau dargestellt.

Bewley *et al.* zeigten 1999 in einer Kokristallisation für Ad12, dass drei CAR-D1-Monomere pro Knob-Trimer binden. CAR-D1 bindet an der Grenze zweier benachbarter Knob-Monomere, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass die meisten neutralisierenden Antikörper gegen das Trimer und nicht gegen die Monomere gerichtet sind. Die Kontaktfläche auf Seiten von Knob bilden die AB-Schleife (insbesondere P418), der Carboxyterminus der DE-Schleife, das kurze beta-Faltblatt F eines Knob-Monomers und die FG-Schleife des benachbarten Monomers (D415, P417, P418, L426, K429, V450, K451, Q487, Q494, S497, V498, P517, P519, N520, E523). Auf Seiten von CAR sind die beteiligten Reste: P33, E37, L39, V48, D49, V51, S56, Y61, D62, E63, Y64, K102, K104, A106, P107.

Die Struktur des Komplexes zeigt dass alle Aminosäurereste, welche in der Bindung von CAR involviert sind, seitlich am Knob-Protein liegen und dass die Mehrzahl der Kontaktreste in der AB-Schleife liegen. Die Wichtigkeit der AB-Schleife für die CAR-Bindung wird durch die Konserviertheit der Aminosäuren in dieser Schleife über alle CAR bindenden Serotypen hinweg und durch die breite Divergenz der AB-Schleifen-Sequenzen unter CAR-nicht-bindenden Serotypen unterstrichen.

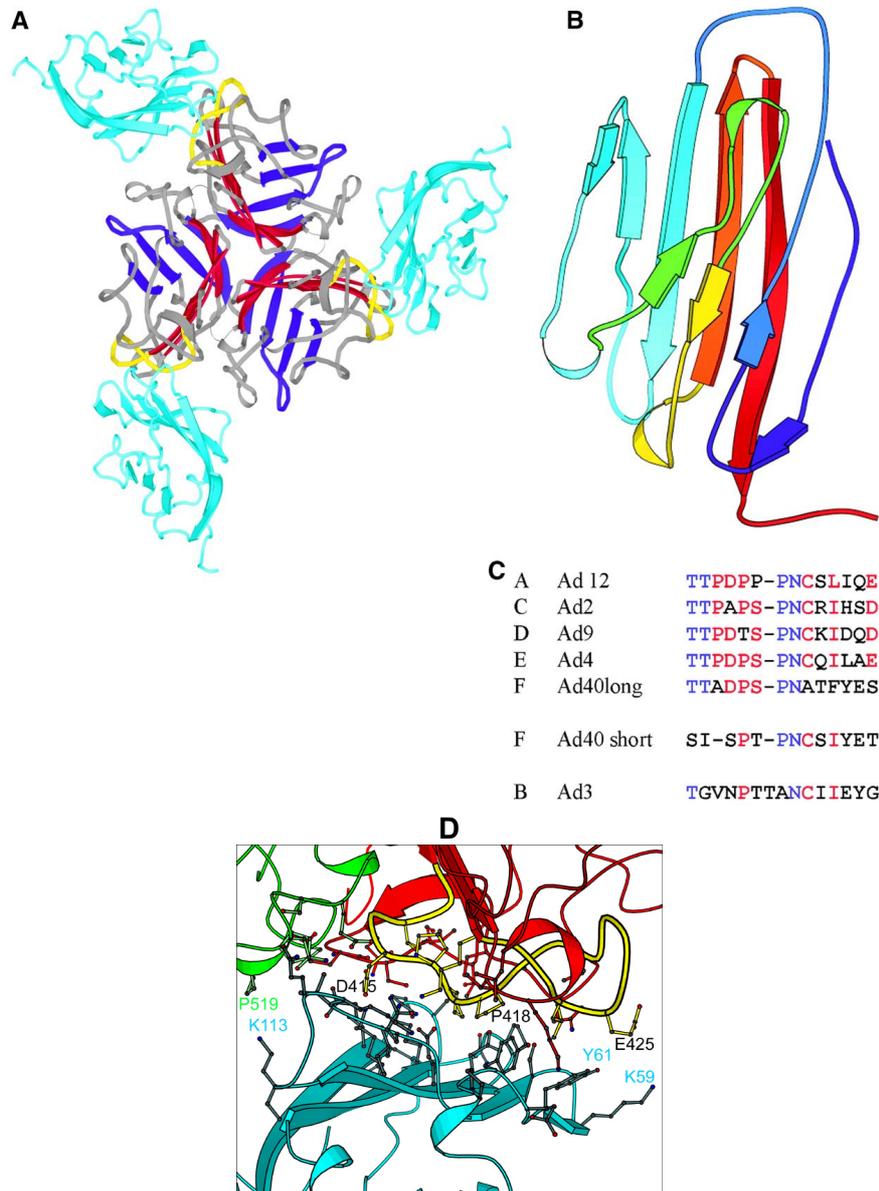


Abbildung 68. Der Ad12 Knob-CAR D1 Komplex und die Bedeutung der AB Schleife (nach Bewley *et al.*, 1999).

A) Ad12 Knob-CAR D1 Komplex, B) CAR D1, C) Sequenzalignment von Resten aus der AB Schleife. Ad12, Ad2, Ad9, Ad4, Ad40long binden CAR, Ad40short und Ad3 binden CAR nicht. Konservierte Reste (blau), Reste mit einer Aminosäure Unterschied (rot), D) Vergrößerter Ausschnitt von (A).

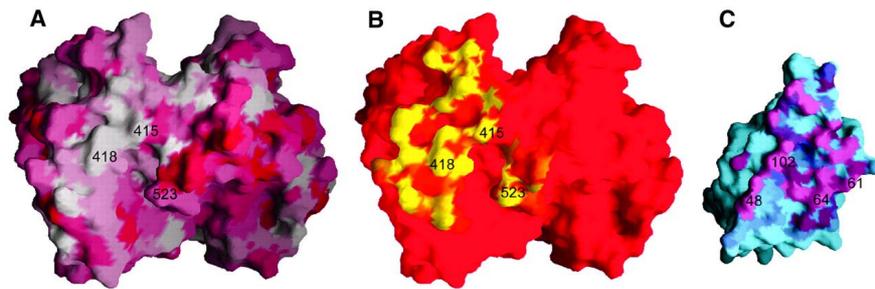


Abbildung 69. Darstellung der Kontaktstelle im Ad12Knob-CAR-D1 Komplex (nach Bewley *et al.*, 1999)

A) Sequenzkonserviertheit zweier Knob Monomere an ihrer CAR-Kontaktstelle. Die Farbskala läuft von weiß (konserviert) nach rot (nicht konserviert), B) Wie (A), allerdings läuft hier die Farbskala von gelb (Kontakt) nach rot (kein Kontakt). Die Kontaktstelle zu CAR wird von beiden Knob Monomeren gebildet, C) CAR D1. Die Farbskala läuft von magenta (Kontakt) zu cyan (kein Kontakt).

Kirby *et al.* zeigten 2000 über Surface-Plasmon-Resonanz, dass die IgG1-Domäne des CAR ausreichend und notwendig für die Bindung der Adenoviren an CAR ist. Vier Mutationen Ser408Glu (AB), Pro409Lys (AB), Tyr477Ala (DG), Leu485Lys (F-Strand) unterbanden die Knob-CAR Interaktion. Die Mutationen Ala406Lys (AB), Arg412Asp (AB), Arg481Glu (E-Strand) reduzierten die Bindung. Alle Mutationen ließen die Sekundärstruktur des Knob intakt. Weitere Mutagenesestudien legen nahe, dass sich die Bindestelle auf nur eine Untereinheit des Trimers erstreckt. Die Aminosäurereste Asn470-Asn474 (D-Strand) sowie Lys506-Lys510 (DG) interagierten nicht mit CAR. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die AB-Schleife einer monomeren Untereinheit des Knob die Hauptrolle bei der Interaktion mit CAR spielt. Die DG-Schleife scheint ebenfalls wichtig zu sein. Die benachbarte monomere Untereinheit des Knob trägt einen viel kleineren Teil zur Interaktion bei und Mutationen in diesem Bereich konnten die Bindung von Knob an CAR nicht unterbinden. Tomko konnte 2000 durch site-directed mutagenesis zweier Aminosäuren die Bindung des adenoviralen Knobs an CAR unterbinden, ohne die Bindung der Coxsackieviren B (CVB) an CAR zu beeinflussen. Anscheinend überlappen die Bindestellen dieser beiden Viren nicht. Vielmehr gibt es einen Antikörper der nur die CVB Bindung behindert und die innere IgG-Domäne (IgG2) von CAR erkennt. Dies deutet darauf hin, dass CVB (auch) an IgG2 bindet. Dockingstudien am Computer zeigten drei seitlich am Knob gelegene Epitope für die IgG1 Domäne des CAR. Van Raaij *et al.* konnten 2000 zeigen, dass CAR-D1 in Lösung als Dimer mit einer typischen Dissoziationskonstante von Zelladhäsionskomplexen vorkommt und die Bindestelle bei diesen CAR D1 Homodimeren größtenteils mit der Bindestelle des Knobs an CAR D1 überlappt. Die Dissoziationskonstante liegt 1.000 mal höher als die des Knob-CAR-Komplexes. Einmal tragen viele schwache Wechselwirkungen zu einer Zell-Zell-Wechselwirkung bei, einmal soll ein Virus möglichst gut an seine Wirtszelle binden. Honda *et al.* konnten 2000 zeigen, dass CAR physiologisch die Rolle eines homophilen Zelladhäsionsmoleküls in der Entwicklung des murinen Gehirns spielt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse schlägt van Raaij vor, dass sich die Adenoviren einer bestehenden, konservierten Bindestelle bedienen, was es der Zelle erschwert diese Bindestelle so zu mutieren, dass zwar Adenoviren nicht mehr andocken können, die natürliche Funktion als Zelladhäsionsmolekül aber nicht beeinträchtigt wird. Chiu *et al.* schlagen 2001 einen Bindemechanismus für Adenoviren vor. Für die CAR-bindenden adenoviralen Serotypen mit langen, flexiblen Fiberproteinen, ist die gleichzeitige Bindung der Pentonbasis an alphaV Integrin am selben Fortsatz möglich, falls maximal 4 Integrinbindestellen an der Pentonbasis belegt sind, so dass noch Platz für den gebogenen Fiberschaft bleibt. Für Ad37 und Ad2 ist dies nicht möglich. Beide haben kurze, steife Fiberproteine. Dies erklärt auch, warum man Knobproteine mit CAR-Bindesequenz finden kann, die CAR auf Zellen überhaupt nicht binden (können).

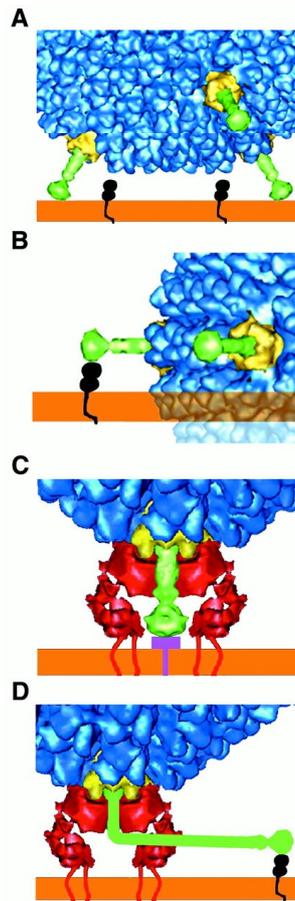


Abbildung 70. Modell für die Interaktion Knob/CAR (nach Chiu *et al.*, 2001)

A) Ad37 mit kurzen, steifen Fiberproteinen (grün) erlaubt keine seitliche Bindung des Fiberknobs an CAR (schwarz), B) Erforderliche, aus sterischen Gründen nicht mögliche, Anordnung von Ad37 Knob und CAR, C) Ad37 Penton-Basis (gelb) bindet an alpha-Integrin (rot), D) Adenoviren mit langen, gebogenen Fiberproteinen (grün), wie z.B. Ad5, binden CAR (schwarz) mit der Seite ihres Fiberknobs und können gleichzeitig mit ihrer Penton-Basis (gelb) an alpha-Integrin (rot) binden.

Douglas *et al.* beschrieben 1999 neue Vektoren bei denen in das Knobprotein ein Peptid eingebaut wird, für das es keinen natürlichen zellulären Rezeptor gibt (6 Histidine, welche an den Carboxyterminus der Fiber kloniert werden). Auf den Zielzellen muss dann nur noch ein anti-His Antikörper als neuer Rezeptor verankert werden. Legrand *et al.* untersuchten 1999 fiberlose Adenoviren. Die Fiber wird zur Partikelformation nicht benötigt, wohl aber zur Produktion voll infektiöser und korrekt zusammengebauter Viren: Fiberlose Viren werden zwar zusammengebaut, aber nur 1 in 10^5 ist infektiös (WT 1 in 10, transkomplementiert 1 in 10^3). Selbst bei der Infektion von Zellen ohne primären Andockrezeptor (CHO-Zellen) waren fiberlose Viren noch 100 mal weniger infektiös, d.h. die Pentonbasis-Integrin Wechselwirkung reicht nicht aus bzw. ist nicht ganz korrekt. Bei fiberlosen Viren sind nachfolgende Prozesse in der Aufnahme in die Zelle beeinträchtigt. D.h. die Fiberproteine haben neben der Andock- noch andere biologische Funktionen. Im Gegensatz zu fibertragenden Viren häuften sich fiberlose Viruspartikel im Cytoplasma an. Bei fiberlosen Viren ist die Prozessierung verschiedener viraler Proteine (pVI, pVII, pVIII) gestört. Von Seggern *et al.* kommen 1999 zu ähnlichen Ergebnissen. Lortat-Jacob *et al.* konnten 2001 zeigen, dass der Bindung Knob-CAR ein Aviditätsmechanismus zugrunde liegt. Drei identische Interaktionen mit hohen on/off Raten führen zu einer starken Bindung eines Knobs an drei CAR-Moleküle mit einer sehr niedrigen Gesamt-off-rate. Dieser Effekt verstärkt sich noch, wenn man anstelle einzelner Knobs ein gesamtes Virus betrachtet. Ad9 Knobs binden mit niedrigerer Affinität an CAR als Ad5 Knobs. Dies ist auf den Austausch einer einzigen Aminosäure (Asp222Lys in Ad9) zurückzuführen, was nochmals die wichtige Rolle des

Lys442 (Ad5) unterstreicht (Kirby *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen von Kirby deuten darauf hin, dass die Bindungsstellen von CAR und Knob verschiedener adenoviraler Serotypen zwar ähnlich aber nicht identisch sind. Als bindungsrelevante Reste auf Seiten von CAR identifizierte Kirby L73, K121, Y80, Y83. Die Bindung von CAR an Ad3 Knob wird vor allem durch den Aminosäurerest E140 unterbunden (Durmort *et al.*, 2001). Pereboev *et al.* zeigten 2001 die prinzipielle Anwendbarkeit des Jun-Fos Phage Display Systems für die Präsentation von adenoviralem trimeren Knob auf der Oberfläche von Phagen. Wider Erwarten stellten Alemany und Curiel 2001 fest, dass trotz Verwendung mutierter, nicht mehr an CAR bindender, adenoviraler Vektoren die Verteilung dieser Vektoren im Körper unverändert bleibt. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch mit anderen Vektorkonstrukten verifiziert werden. Die als bindungsrelevant beschriebenen Aminosäuren sind im nachfolgenden Alignment markiert (Abbildung 71).

				A				B		C		
C Ad2	386	SGAITIG...	NKNDDK	TLW	TTPDPS PNCR	IHS..DN.D	C	KFTLV LTCKG		SQL LATVAAL		439
C Ad5	386	TGAITVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP SPNCR	LNA..EK.DA		KLTLV LTCKG		SQL LATVSVL		439
A Ad12	394	NIALGSSS	NTPYDPL	TLW	TTPDPP PNCS	LIQ..EL.DA		KLTLCL TKNG		SIV NGIVSLV		448
B Ad3	123	SNSIAL....	...KNN	TLW	TGPKPEANCI	IEYKQNPDS		KLTLIL VKNG		GI VNGYVTLM		174
				C		D			E		F	
C Ad2	440	AVSG DLSS..	MTGTVASVSI	FLRE DQNGVL	MENS.SLK.K	H.YWNFRNGN		STN ANPYTNA				494
C Ad5	440	AVKGS LAP..	ISGTVQSAHL	IIRE DENGVL	LNNS.FLD.P	E.YWNFRNGD		LTEG TAYTNA				494
A Ad12	449	GVKGN LLN..	IQSTTTIVGV	HLVF DEQGRL	ITSTPTALVP	QASW GYRQGG		SVST NTVTNG				506
B Ad3	175	GASD VNTLF	KNKNV.SINV	ELYF DATGHI	LPDSSSLK.T	D..LELKYKQ		TAD ...FS.A				226
					G			H				
C Ad2	495	VGFM PNLLAY	PKTQ SQT...	AKNIVSQVY	LHG.DKTK.P	MILITITLNGT		SEST ETSEVS				549
C Ad5	495	VGFM PNLSAY	PKSH GKT...	AKSNIVSQVY	LNG.DKTK.P	VTLTITLNGT		QETG DDTT.PS				548
A Ad12	507	LGFM PNVSAY	PRPN ASE...	AKSQMVSLTY	LQG.DTSK.P	ITMKVAFNGI		TSLN				555
B Ad3	227	RGFM PSTTAY	PFVL PNAGTH	NENYIFGQCY	YKASDGALFP	LEVTVMILNKR		LPDS ...RT				282
				I		J						
C Ad2	550	TYSM SFTWSW	ESGKYTTE..	.TFATNS	YTF SYIAQE.							582
C Ad5	549	AYSM SFSWDW	SGHNYINE..	.IFATSS	YTF SYIAQE.							581
A Ad12	556	GYSL TFMWSG	L.SNYINQ..	.PFSTPS	CSF SYITQE.							587
B Ad3	283	SYVM TFLWSL	NAGLAPETTQ	ATLITSP	FTF SYIREDD							319

Abbildung 71. Bindungsrelevante Aminosäuren des Ad5 und Ad12 Knobs

Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3), C (Ad2, Ad5). Hierbei binden die Subgruppen A und C an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Als bindungsrelevant identifizierte Aminosäuren sind grau unterlegt.

Da für Ad12 Knob Kokristallisationsdaten mit CAR vorliegen sollte mit der Abbildung 72 herausgefunden werden, welchen Aminosäuren der Ad12 Knob Sequenz die Aminosäuren der Konsensusmotive der untersuchten Antikörper entsprechen. Dazu wurde das vorhergehende Alignment auf Ad5 und Ad12 beschränkt und die entsprechenden Aminosäuren markiert. Hierbei wurden zunächst die Konsensusmotive aus dem Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek (Abbildung 72), dann die aus dem Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek (Abbildung 73) betrachtet.

				A				B		C		
8C2.2	386	TGAITVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.		DAKL TLVLTCKG		SQL LATVSVL		437
7A2.7	386	TGAI TVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.		DAKL TLVLTCKG		SQL LATVSVL		437
2A4.1	386	TGAI TVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.		DAKL TLVLTCKG		SQL LATVSVL		437
1D6.14	386	TGAI TVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP .SPNC	RLNA...EK.		DAKL TLVLTCKG		SQL LATVSVL		437
Ad12	394	NIALGSSS	NTPYDPL	TLW	TTPD P.PNCS	.SLIQ...EL.		DAKL TLCLTK		NGS LIVNGIVS		446

		C	D	E	F		
8C2.2	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
7A2.7	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
2A4.1	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
1D6.14	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
Ad12	447	L V GVKGNLLN	..IQSTTT TV GVH L VF D EQG	RLITSTPTAL	VPQASW GYRQ	GO S VSTNTVT	504

		G	H		
8C2.2	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
7A2.7	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
2A4.1	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
1D6.14	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
Ad12	505	NGL G F M PN V S A Y PR P NA S E	..AK S OM V SL TY L Q G .D T SK	P I TM K V A FN GIT S L.....	554

		I	J	
8C2.2	547	PSA Y S M S F SW D W SGH N YINEIF A T S S Y T F S Y I A Q E	581
7A2.7	547	PSA Y S M S F SW D W SGH N YINEIF A T S S Y T F S Y I A Q E	581
2A4.1	547	PSA Y S M S F SW D W SGH N YINEIF A T S S Y T F S Y I A Q E	581
1D6.14	547	PSA Y S M S F SW D W SGH N YINEIF A T S S Y T F S Y I A Q E	581
Ad12	555	NG Y SL T FM W S G L.S N Y I N QP F ST P S C S F S Y I T Q E	587

Abbildung 72. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fiberknobregion des adenoviralen Serotyps 5, identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des Ad5 Knobs für die Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14, sowie die Sequenz des Ad12 Knobs. Beta-Stränge sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Aminosäuren des Konsensusmotivs sind rot gedruckt (für den Antikörper 8C2.2 QSDWLK, für 7A2.7 HTSPL, für 2A4.1 SQYNL, für 1D6.14 HTSPLH). Beschriebene bindungsrelevante Aminosäuren (Roelvink *et al.*, 1999, Bewley *et al.*, 1999) sind grau unterlegt. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob als bindungsgeeignet gezeigt haben, gelb markiert.

Für den Antikörper 8C2.2 gilt, dass die Aminosäure L485 aufgrund des Alignments an der Bindung Knob/CAR beteiligt sein könnte. Die restlichen Aminosäuren des Konsensusmotivs sind nicht direkt an dieser Interaktion beteiligt. Bei 7A2.7 und 1D6.14 könnten die Aminosäuren P505, S507, H508, T511 in der FG-Schleife aufgrund des Alignments an der Bindung Knob/CAR beteiligt sein. Bei 2A4.1 hingegen sind die Aminosäuren des Konsensusmotivs nicht direkt an der Bindung Knob/CAR beteiligt.

		A	B	C		
8C2.2	386	TG A IT V G... N K N N D K L T L W	T T P A P. S P N C	RL N A... E K.	D A K L T L V L T K C G S S I L A T V S	437
7A2.7	386	TG A IT V G... N K N N D K L T L W	T T P A P. S P N C	RL N A... E K.	D A K L T L V L T K C G S S I L A T V S	437
2A4.1	386	TG A IT V G... N K N N D K L T L W	T T P A P. S P N C	RL N A... E K.	D A K L T L V L T K C G S S I L A T V S	437
1D6.14	386	TG A IT V G... N K N N D K L T L W	T T P A P. S P N C	RL N A... E K.	D A K L T L V L T K C G S S I L A T V S	437
Ad12	394	N I A L G S S S N T P Y D P L T L W	T T P D P. P P N C	S L I Q ... E L.	D A K L T L C L T K N G S I V N G I V S	446

		C	D	E	F		
8C2.2	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
7A2.7	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
2A4.1	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
1D6.14	438	VLAVK Q SLAP	..ISGTVQ SA HLIIR F DENG	VLLNNS.FLD	.PE.YWNFRN	GD L TEGTAYT	492
Ad12	447	L V GVKGNLLN	..IQSTTT TV GVH L VF D EQG	RLITSTPTAL	VPQASW GYRQ	GO S VSTNTVT	504

		G	H		
8C2.2	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
7A2.7	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
2A4.1	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
1D6.14	493	NA V GF M PNLS A Y PK S HGKT	..AK S NIV SQ V Y L N G.D K TK	P V TL T IT L N GT Q ETG D TT	546
Ad12	505	NGL G F M PN V S A Y PR P NA S E	..AK S OM V SL TY L Q G .D T SK	P I TM K V A FN GIT S L.....	554

			I				J																													
8C2.2	547	PSA	Y S M S F SW	DWS	G	H	NYINE	IFATS	S	Y	T	F	S	Y	I	A	Q	E	581																
7A2.7	547	PSA	Y S M S F SW	DWS	G	H	NYINE	IFATS	S	Y	T	F	S	Y	I	A	Q	E	581																
2A4.1	547	PSA	Y S M S F SW	DWS	G	H	NYINE	IFATS	S	Y	T	F	S	Y	I	A	Q	E	581																
1D6.14	547	PSA	Y S M S F SW	DWS	G	H	NYINE	IFATS	S	Y	T	F	S	Y	I	A	Q	E	581																
Ad12	555	NG	Y	S	L	T	F	M	W	S	G	L	.	S	N	Y	I	N	Q	P	F	S	T	P	S	C	S	F	S	Y	I	T	Q	E	587

Abbildung 73. Potentielle Antikörper-Epitope in der Fiberknobregion des adenoviralen Serotyps 5, identifiziert nach Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des Ad5 Knobs für die Antikörper 8C2.2, 7A2.7, 2A4.1, 1D6.14, sowie die Sequenz des Ad12 Knobs. Beta-Stränge sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. Aminosäuren des Konsensusmotivs sind rot gedruckt. Beschriebene bindungsrelevante Aminosäuren (Roelvink *et al.*, 1999, Bewley *et al.*, 1999) sind grau unterlegt. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob als bindungsgeeignet gezeigt haben, gelb markiert.

Für den Antikörper 8C2.2 sind Aminosäuren des Konsensusmotivs nicht direkt an der Bindung Knob/CAR beteiligt. Gleiches gilt auch für 7A2.7 und 1D6.14. Bei 2A4.1 könnten die Aminosäuren P505, H508, T511 aufgrund des Alignments an der Bindung Knob/CAR beteiligt sein.

In wie fern die interessanten Positionen das Epitop eines neutralisierenden Antikörpers darstellen können wird am besten in der Tertiärstruktur deutlich.

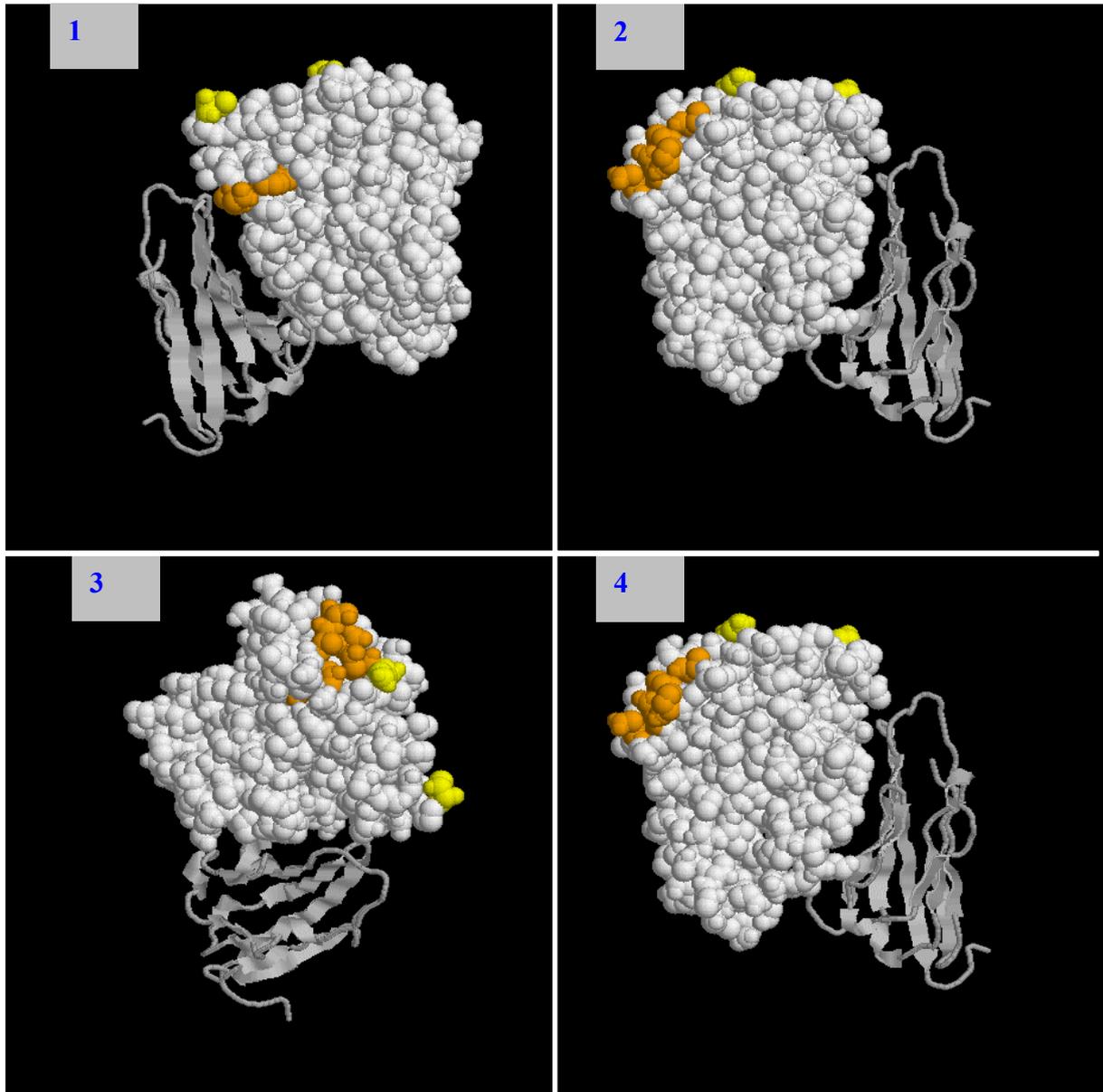


Abbildung 74. Konsensusmotive aus dem Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgeeignet gezeigt haben, orange gekennzeichnet.

1) 8C2.2: ^Q/_SDWL*K (W411, Q496, S497, Q586), 2) 7A2.7: HTTSPLH (V513, P517, P519, N520, E523), 3) 2A4.1: ^S/_TQYNLH (N512, V513, S514, Y557, Q586), 4) 1D6.14: HTTSPLH (V513, P517, P519, N520, E523)

Während beim Antikörper 8C2.2 die markierten Aminosäuren direkt an der Interaktionsstelle Knob-CAR liegen, befinden sie sich bei den anderen Antikörpern an der gegenüberliegenden Stelle (Abbildung 75).

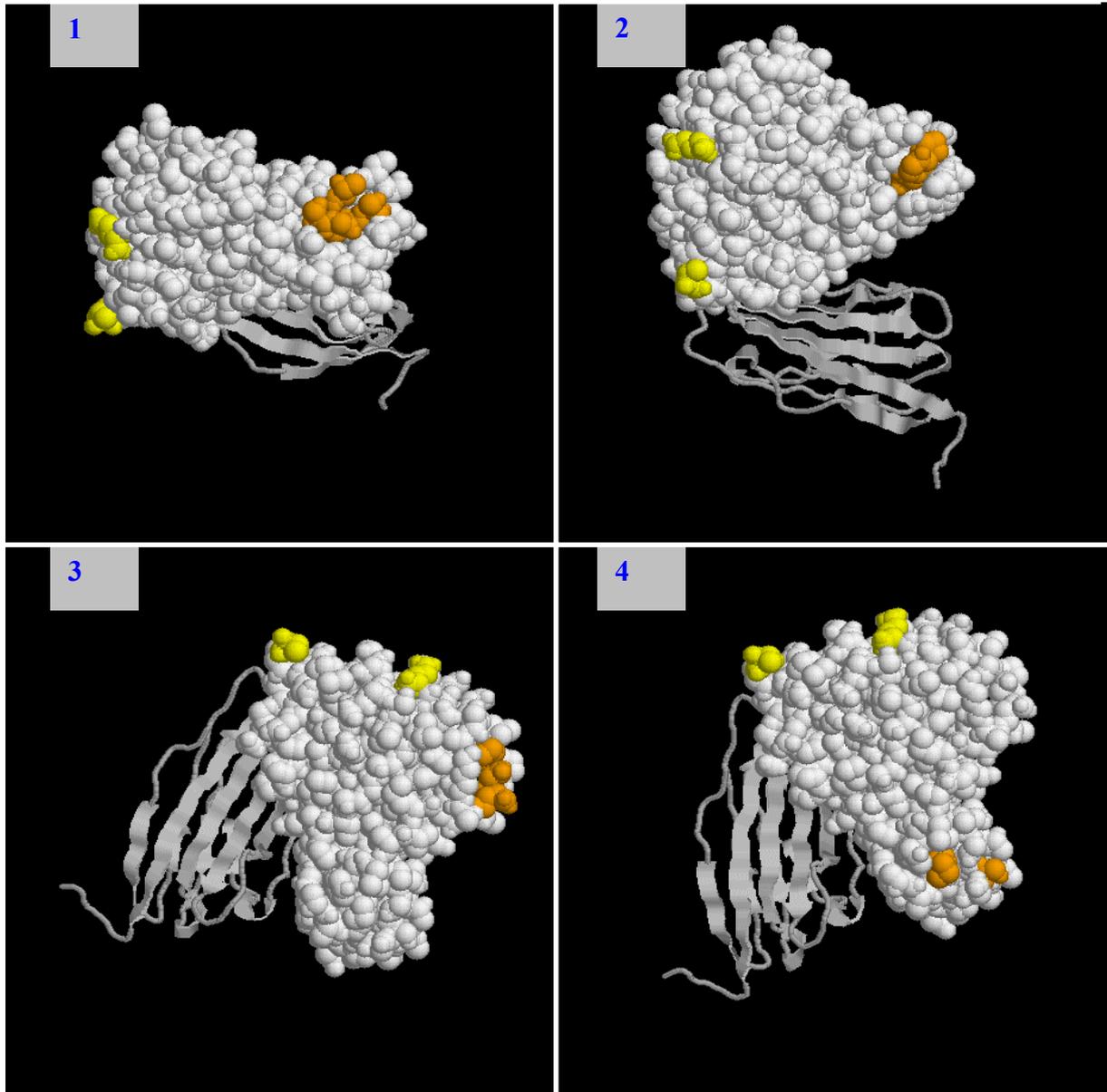


Abbildung 75. Konsensusmotive aus dem Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgünstig gezeigt haben, orange gekennzeichnet. 1) 8C2.2: QH**D**W*PGS (T462, S564, G565, L566, S567), 2) 7A2.7: ^H/_YP(Y533, P541), 3) 2A4.1: H****NP*AT(P517, N520, E523), 4) 1D6.14: HFP*HPSH (P541, S567)

Bei Verwendung der Ph.D.-12 Bibliothek liegen die Konsensusmotive für die Antikörper auf der, der Knob-CAR Interaktionsstelle abgewandten Seite.
 Die Betrachtung der Tertiärstruktur wurde durch die Quartärstruktur ergänzt, um zu sehen, ob sich eventuell ganz andere Zugänglichkeiten für die selektierten Aminosäuren ergeben.
 Hierbei zeigte sich, dass bei Bindung eines Antikörpers an eines der Konsensusmotive aus der Ph.D.-C7C Bibliothek die Bindung des Knob an CAR unterbunden wird (Abbildung 76).
 Bei den Konsensussequenzen der Ph.D.-12 Bibliothek gilt dies nur für den Antikörper 2A4.1 (Abbildung 77).

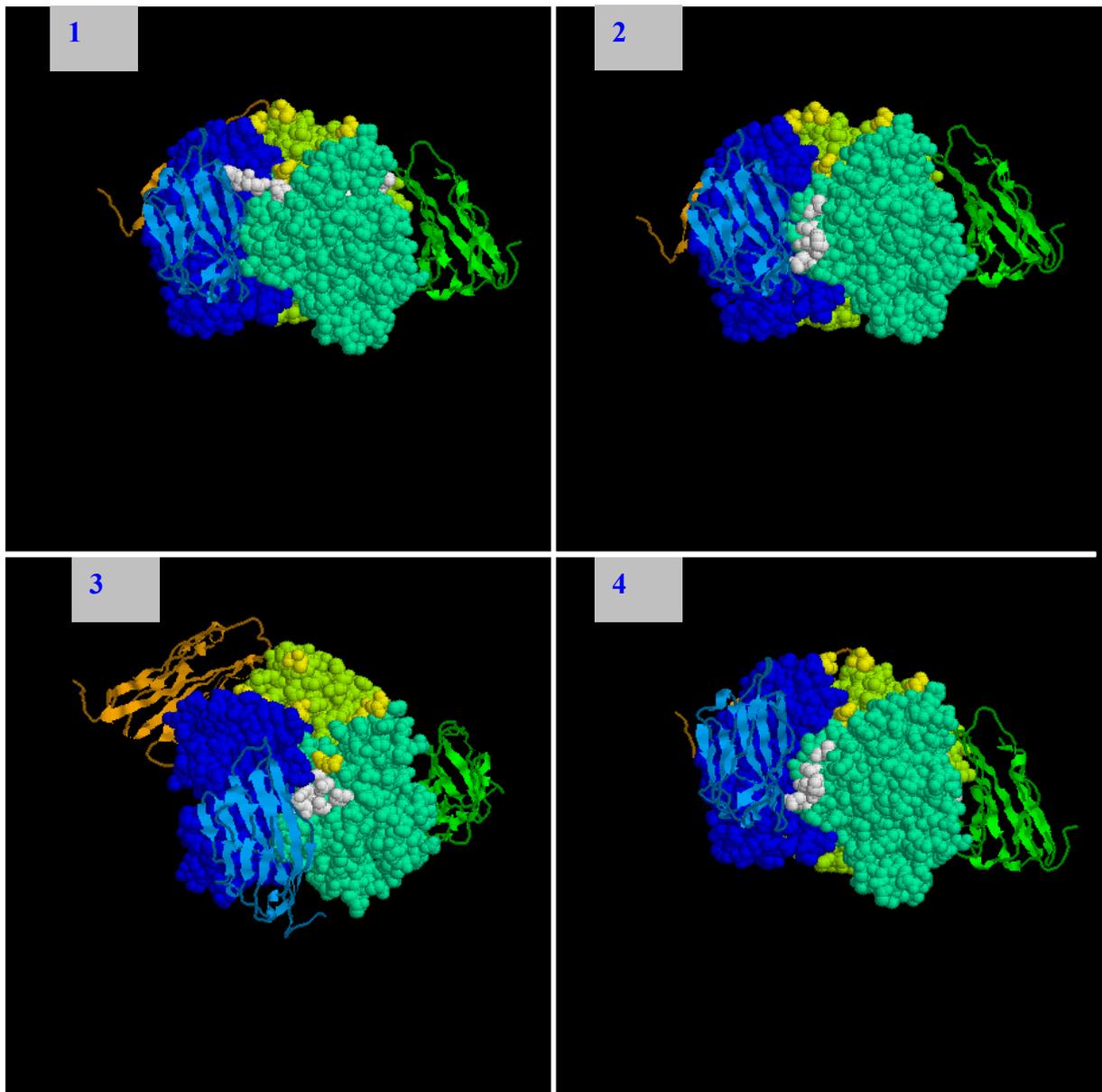


Abbildung 76. Konsensusmotive aus dem Panning mit der Ph.D.-C7C Bibliothek (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) 8C2.2:^Q/_SDWL*K (W411, Q496, S497, Q586), 2) 7A2.7: HTTSPLH (V513, P517, P519, N520, E523), 3) 2A4.1:^S/_TQYNLH (N512, V513, S514, Y557, Q586), 4) 1D6.14:HTTSPLH (V513, P517, P519, N520, E523)

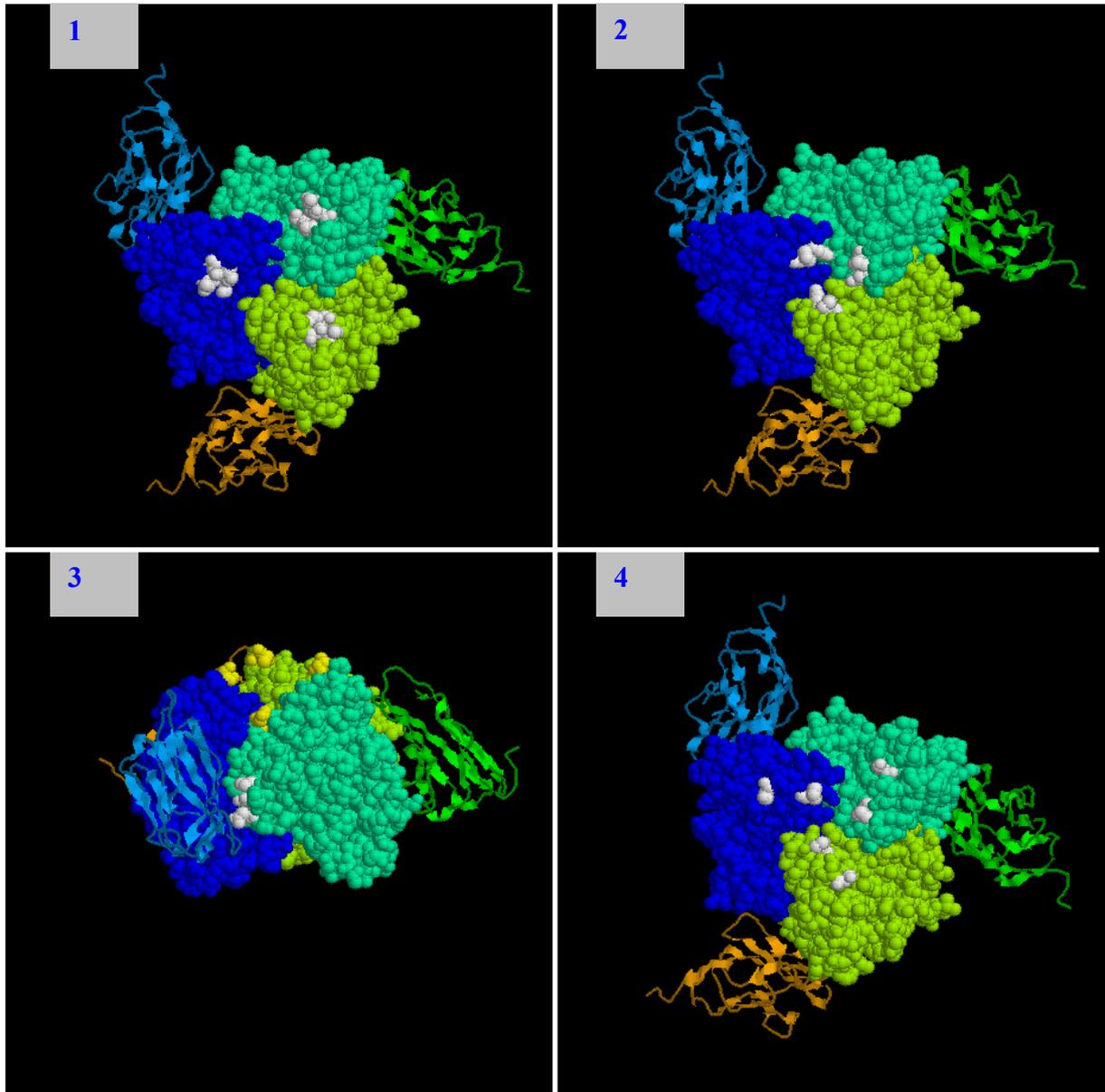


Abbildung 77. Konsensusmotive aus dem Panning mit der Ph.D.-12 Bibliothek (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) 8C2.2: QHD**W*PGS (T462, S564, G565, L566, S567), 2) 7A2.7: ^H/_VP (Y533, P541), 3) 2A4.1: H***NP*AT (P517, N520, E523), 4) 1D6.14: HFP*HPSH (P541, S567)**

Peptide Scan

- a) FLDPEYWNFR zeigte eine starke Reaktion des primären und des sekundären Antikörpers. Das Alignment zeigt, dass diese Aminosäuresequenz v.a. in der DE-Schleife und somit zwischen antigenen Abschnitten liegt und mit E476 einen bindungsrelevanten Rest enthält.
- b) DAKLTLVLTK zeigte eine starke Reaktion des primären Antikörpers und eine schwache Reaktion des sekundären Antikörpers. Aus dem Alignment geht hervor, dass diese Sequenz auf dem Faltblatt B und somit in einem antigenen Bereich liegt. Mit K420 ist ein an der Bindung von Knob an CAR beteiligter Aminosäurerest hier zu finden.
- c) SPNCRLNAEK zeigte mit dem Antikörper 1D6.14 eine spezifische Reaktion. Das Alignment zeigt, dass dieser Sequenzabschnitt in der AB-Schleife und somit in einem antigenen Bereich sowie dem Hauptbindungsbereich Knob-CAR liegt. Es sind dort mit S408, P409 und K417 drei bindungsrelevante Reste lokalisiert.
- d) LNGTQETGDT reagierte weder mit den primären, noch mit dem sekundären Antikörper. Aus dem Alignment geht hervor, dass diese Aminosäuresequenz in der HI-Schleife liegt, welche als variabel beschrieben wird (Xia *et al.*, 1994). Es handelt sich zwar um einen antigenen Bereich, allerdings hat dieser Bereich für neutralisierende Antikörper wenig Bedeutung.

Da für Ad12 Knob Kokristallisationsdaten mit CAR vorliegen, sollte mit der dem Alignment in Abbildung 78 herausgefunden werden, welchen Aminosäuren der Ad12 Knob Sequenz die ausgewählten Sequenzabschnitte des Ad5 Knobs entsprechen.

				A				B		C		
C Ad2	386	SGAITIG...	NKNDDK	TLW	TTPDPS	PNCR	IHS..DN.D	DC	KFTLVLT	KCG	SQVLATVAAL	439
C Ad5	386	TGAITVG...	NKNDDK	TLW	TTPAP	PNCR	LNA..E	DA	MLTLVLT	KCG	SQILATVSVL	439
A Ad12	394	NIALGSSS	NTPYDPL	TLW	TTPD	PNC	LIQ..E	DA	KLTLCLTK	NG	SIVNGIVSLV	448
B Ad3	123	SNSIAL....KNN	TLW	TGPKPEANCI	IEYGKQNPDS			KLTLILVK	NG	GIVNGYVTLM	174
		C		D				E		F		
C Ad2	440	AVSGDLSS..	MTGTVASVSI	FLRFDQNGVL	MENS.SLK.K	H.YWNFRNGN				STNANPYTNA		494
C Ad5	440	AVKGS LAP..	ISGTVQSAHL	IIRFDENGVL	LNNS.FLD.P	E.YWNFRNGD				LTEGTAYTNA		494
A Ad12	449	GVRGNLLN..	IQSTTTIVGV	HLVFDQGR	ITSTPTALVP	QASWGYRQGG				SVSTNTVTNG		506
B Ad3	175	GASDYVNTLF	KNKNV.SINV	ELYFDATGHI	LPDSSSLK.T	D..LELKYKQ				TAD...FS.A		226
				G				H				
C Ad2	495	VGFM	P LLAY	PKTQ SQT...	AKMNIVSQVY	LHG.DKTK.P	MILITITLNGT	SESTETSEVS				549
C Ad5	495	VGFM	P NLSAY	PKSHG KT...	AKSNIVSQVY	LNG.DKTK.P	VTLTITLNGT	QETGDTT.PS				549
A Ad12	507	LGFM	P NVSAY	PRPN ASE...	AKSQMVSLTY	LQG.DTSK.P	ITMKVAFNGI	TSL.....N				555
B Ad3	227	RGFM	P STTAY	PFVLP NAGTH	NENYIFGQCY	YKASDGALFP	LEVTVMLNKR	LPDS....RT				280
		I			J							
C Ad2	550	IYSMSFT WSW	ESGKYTTE..	.TFATNS	YTF	SYI AAQE.						582
C Ad5	550	IYSMSF SWDW	SGHNYINE..	.IFATSS	YTF	SYI AAQE.						581
A Ad12	556	GYSLTF MWSG	L.SNYINQ..	.PFSTPS	CSF	SYI TQE.						587
B Ad3	283	SYVMTF LWSL	NAGLAPETTOQ	ATLITSP	FTF	SYI REDD						319

Abbildung 78. Reaktive Peptide aus dem Peptide Scan.

Alignment der Fibernobregionen der adenoviralen Subgruppen A (Ad12), B (Ad3), C (Ad2, Ad5). Die Subgruppen A und C binden an CAR, wohingegen Subgruppe B nicht an CAR bindet. Beta-Faltblätter sind durch Boxen gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind fett gedruckt. In magenta markiert sind Aminosäuren, die als an der Bindung Knob-CAR beteiligt beschrieben wurden (Roelvink *et al.*, 1999, Bewley *et al.*, 1999). In grau markiert sind Sequenzabschnitte, welche als sehr antigen beschrieben wurden (Ad2: Fender *et al.*, 1995, Ad3: Liebermann *et al.*, 1998). Die aufgrund des Peptide Scans ausgewählten Sequenzen sind rot gedruckt.

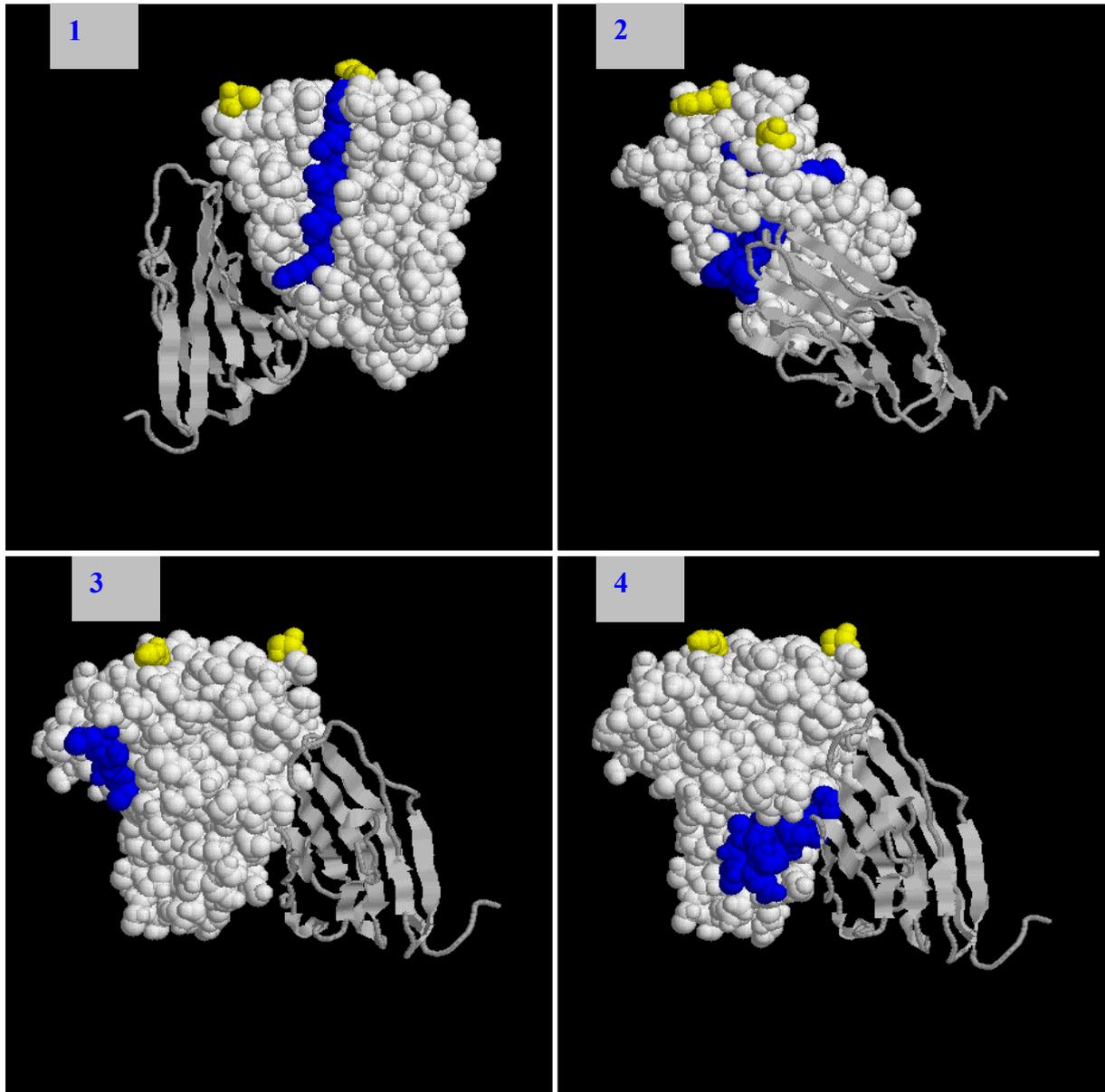


Abbildung 79. Reaktive Peptide aus dem Peptide Scan (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgünstig gezeigt haben, blau gekennzeichnet. 1) DAKLTLVLTK, 2) FLDPEYWNFR, 3) LNGTQETGDT, 4) SPNCRLNAEK

Aus der Tertiärstruktur (Abbildung 79) lässt sich ablesen, dass alle ausgewählten Sequenzabschnitte gut zugänglich sind und FLDPEYWNFR, sowie SPNCRLNAEK an der Bindungsstelle Knob-CAR liegen. Die Quartärstruktur (Abbildung 80) unterstützt diesen Befund. Hier sieht man ausserdem, dass DAKLTLVLTK auch an der Bindung beteiligt sein könnte und dass LNGTQETGDT genau zwischen zwei Interaktionsstellen liegt.

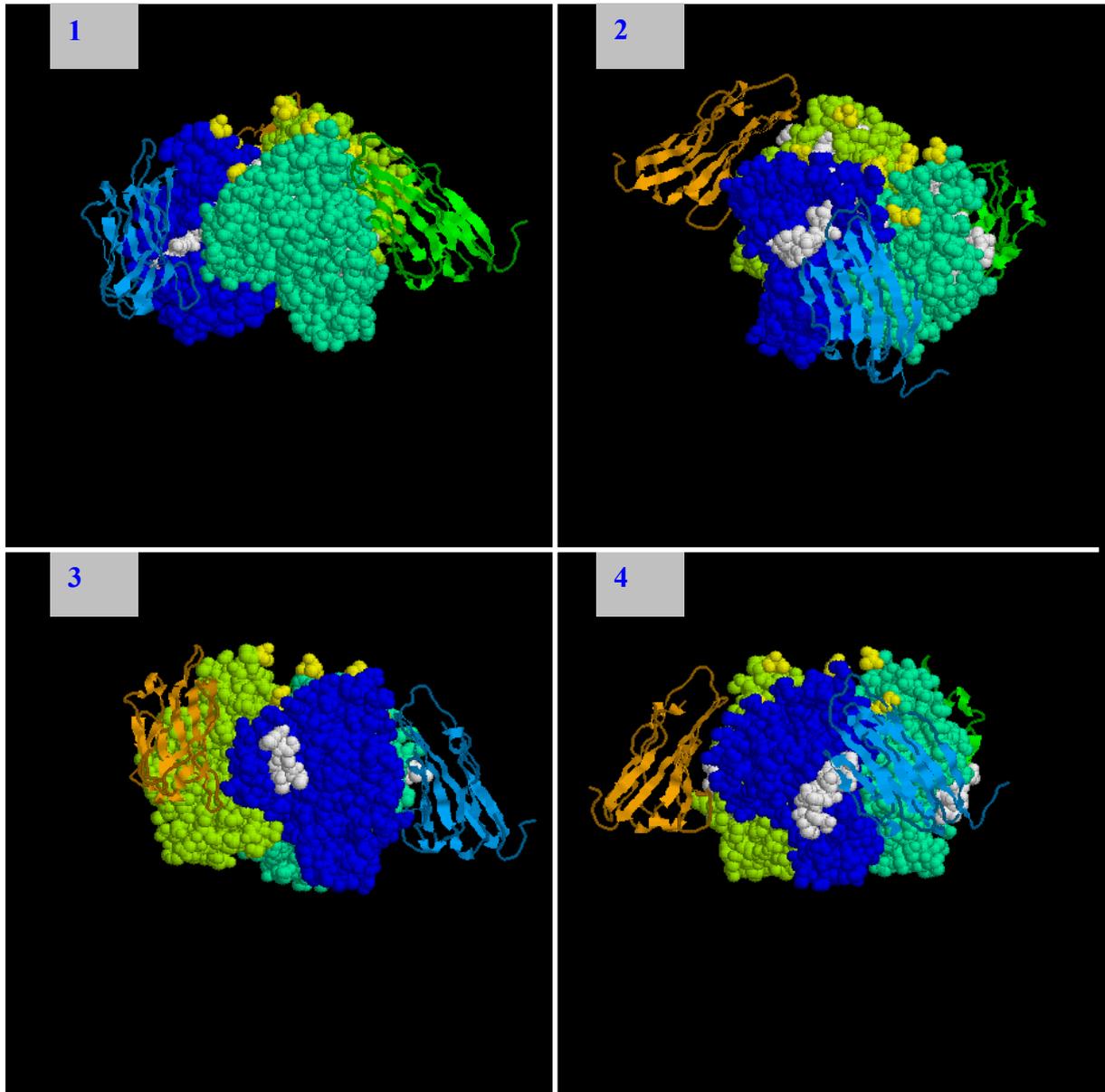


Abbildung 80. Reaktive Peptide aus dem Peptide Scan (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) DAKLTLVLTK, 2) FLDPEYWNFR, 3) LNGTQETGDT, 4) SPNCRLNAEK

Im folgenden ist nun das Ergebnis des zweiten Peptide Scans hinzugenommen (Abbildung 81).

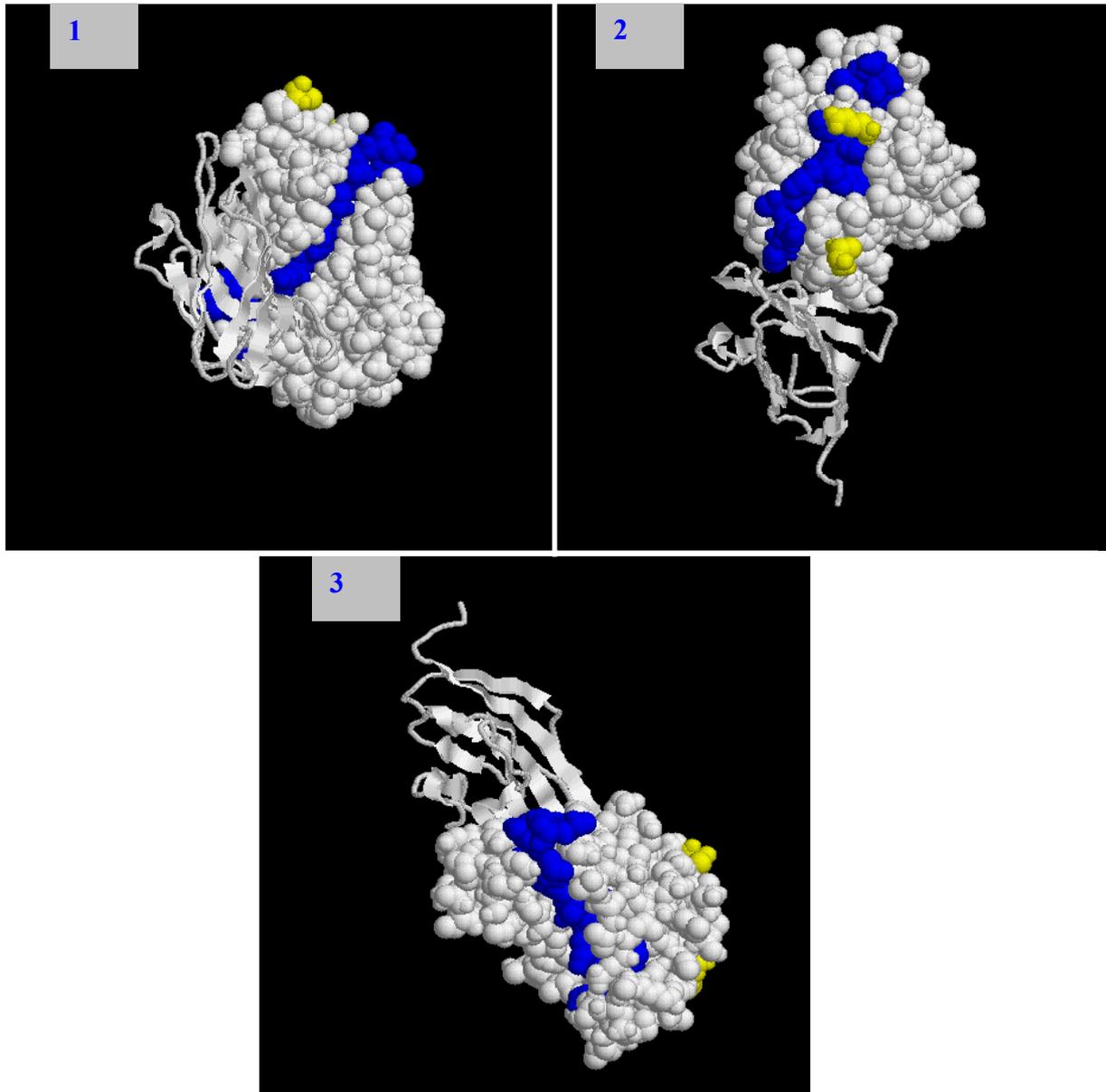


Abbildung 82. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 8C2.2 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgünstig gezeigt haben, blau gekennzeichnet. 1) AS 421-441, 2) 500-516, 3) 534-550

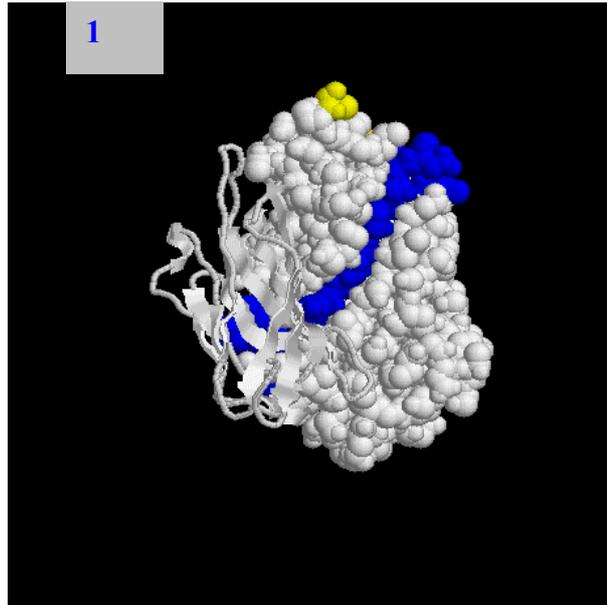


Abbildung 83. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 7A2.7 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgünstig gezeigt haben, blau gekennzeichnet. 1) AS 498-514

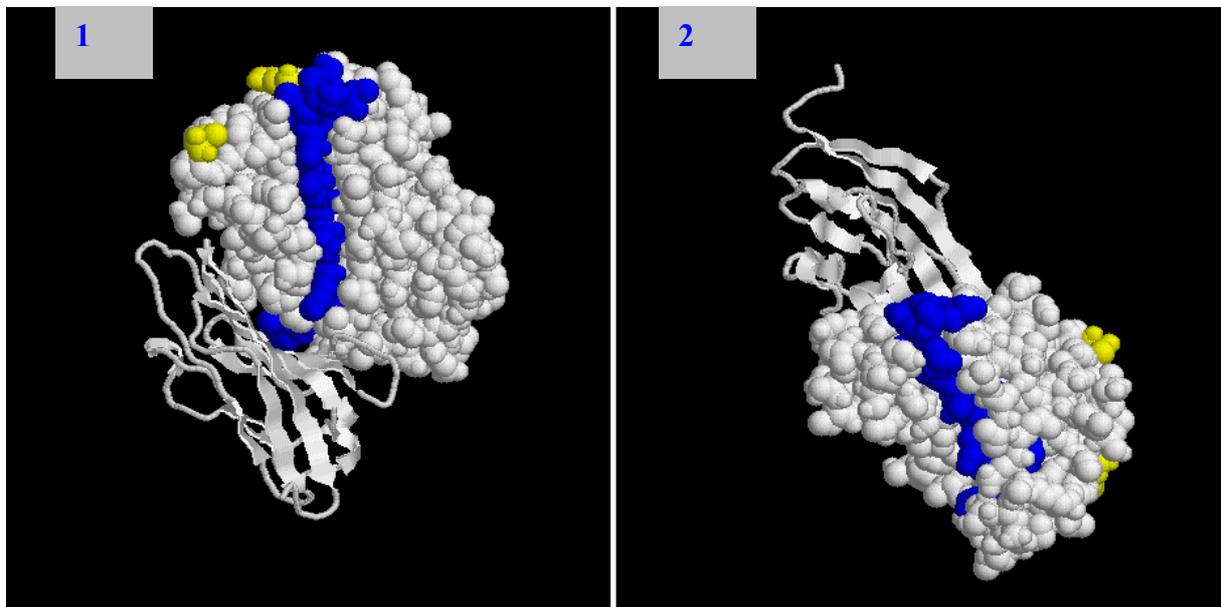


Abbildung 84. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 1D6.14 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Amino- und Carboxyterminus sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Zusätzlich sind diejenigen Aminosäuren, welche sich bereits in der dreidimensionalen Struktur des Knob alleine als bindungsgünstig gezeigt haben, blau gekennzeichnet. 1) AS 425-441, 2) AS 534-550

Die Hinzunahme der Quartärstruktur (Abbildungen 85-87) relativiert die Befunde aus der Tertiärstruktur. Bei den Antikörpern 8C2.2 und 7A2.7 liegen die Aminosäuren 500-516 bzw. 498-514 nahe der Ansatzstelle der adenoviralen Fiber. Von den Aminosäuren AS421-441

bzw. 425-441 (Antikörper 8C2.2 und 1D6.14) liegt ein Teil in der Interaktionsstelle Knob-CAR. Die Aminosäuren 534-550 (Antikörper 8C2.2 und 1D6.14) liegen komplett auf der Spitze des Knob und bieten auf jeder Knob-Untereinheit ein Epitop an, welches mit den benachbarten Untereinheiten eine Art Ring ergibt.

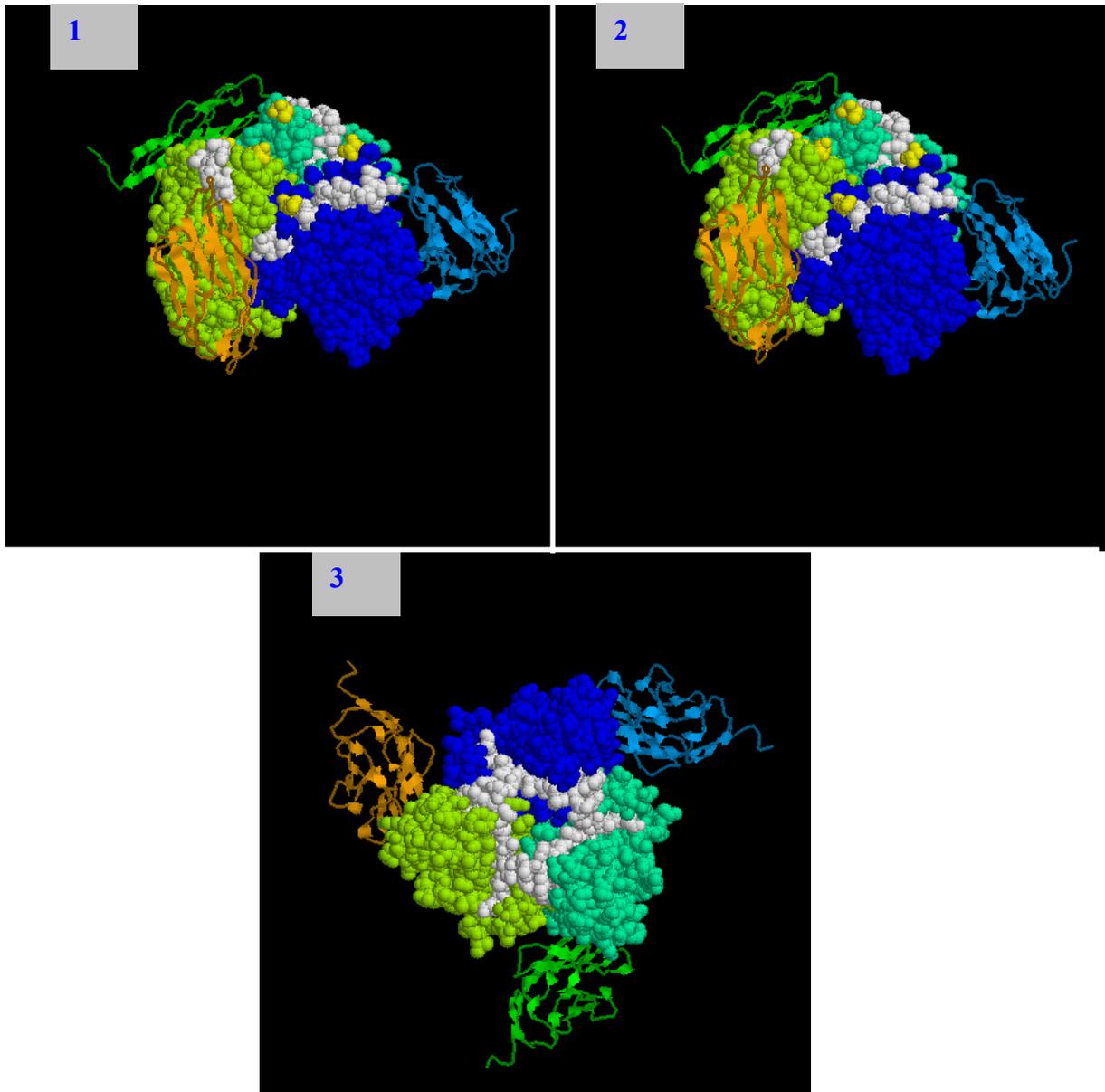


Abbildung 85. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 8C2.2 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) AS 421-441, 2) 500-516, 3) 534-550

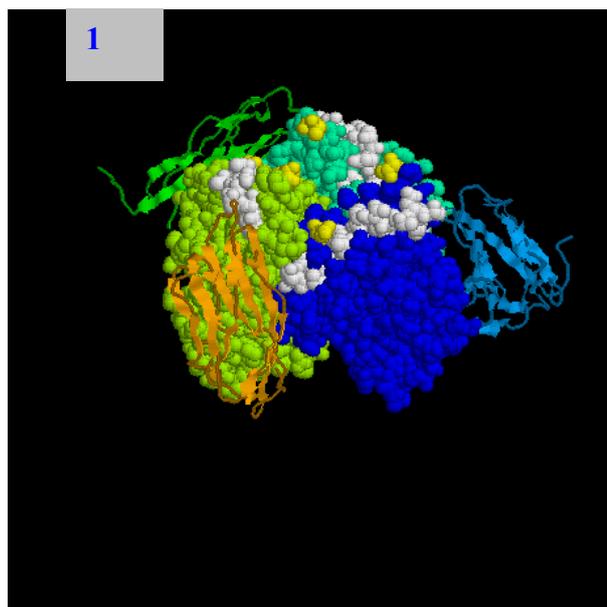


Abbildung 86. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 7A2.7 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) AS 498-514

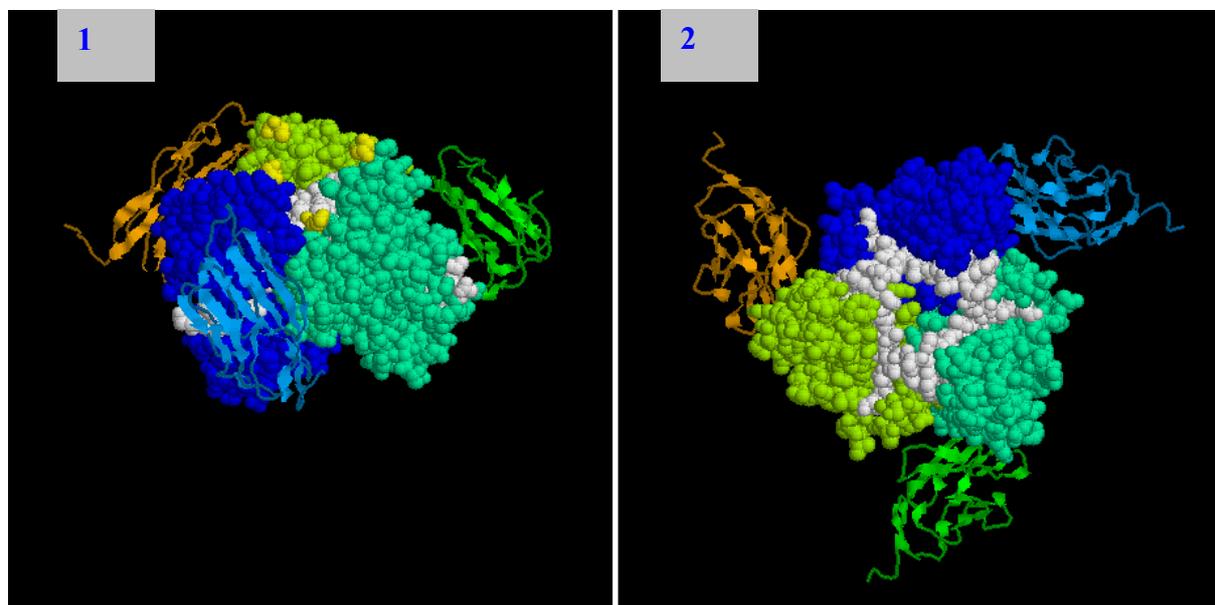


Abbildung 87. Reaktive Aminosäuren für den Antikörper 1D6.14 (PDB:1KAC. Die Knob-Domäne des adenoviralen Serotyps 12 im Komplex mit der Domäne 1 seines zellulären Rezeptors CAR) Knob ist raumfüllend dargestellt, CAR nur schematisch. Die drei monomeren Untereinheiten des Knob sind in blau, grün und türkis, die CAR-Domänen in orange grün und blau gezeichnet. Amino- und Carboxytermini sind gelb markiert. Die Darstellung erfolgt ohne Wasserstoff- und Heteroatome. Weiss markierte Konsensusmotive sind: 1) AS 425-441, 2) AS 534-550

5.3 Schlussfolgerungen

Alle untersuchten neutralisierenden Antikörper erkannten im Western-Blot ausschliesslich trimeres Knob. Im ELISA wird auch monomeres Knob erkannt und konkurriert mit trimerelem Knob um die Bindung an die Antikörper. Die Epitope der monoklonalen Antikörper, welche in dieser Arbeit verwandt wurden, können mit der Knob CAR Interaktionsstelle identisch sein, müssen es aber nicht. Für eine Neutralisation der Bindung reicht es aus, diese sterisch zu behindern (z.B: durch Bindung in unmittelbarer Nähe). Beide Möglichkeiten wurden gefunden. Für den Antikörper 1D6.14 war bereits bekannt, dass er spezifisch an trimeres Ad5 Knob, nicht aber an Ad2 Knob bindet, obwohl Ad2 Knob zur selben Serumgruppe gehört (Douglas *et al.*, 1999). Die exklusive Erkennung trimerelem Knobs durch die in dieser Studie benutzten Antikörper, impliziert, dass die dreidimensionale Struktur von Knob essentiell ist. Eine Erklärung ist, dass die zugehörigen nicht-linearen Epitope nur gebildet werden, wenn mehr als eine Polypeptidkette des Knob-Proteins an der Bindung beteiligt ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Trimerisierung zu konformationellen Änderungen in den monomeren Untereinheiten führt, welche dann die korrekte Präsentation der Aminosäuren des Epitops erlauben. Auch hier wurden wieder beide Möglichkeiten gefunden. Wie in den Ergebnissen des Biopannings mit 'random' peptide Bibliotheken bereits angedeutet, scheinen die Antikörper 7A2.7 und 1D6.14 dasselbe Epitop zu erkennen. Mit der Ph.D.-C7C Bibliothek konnte mit beiden Antikörpern die identische Konsensussequenzen (HTTSPHL) detektiert werden. Nach dem Biopanning mit der Ph.D.-12 Bibliothek, welche *per se* eine geringere Komplexität als die 7mer Bibliothek hat, wurden nur vage Motive für die Antikörper 8C2.2 und 2A4.1 gefunden. Die Intensität der ELISA-Signale und die Häufigkeit des Auftretens der Konsensussequenzen, die mit den unterschiedlichen Antikörpern erhalten wurden, korrelierte nicht in jedem Fall. Es zeigte sich vielmehr, dass aufgrund dieses Vergleichs erste Hinweise auf falschpositive Klone erhalten wurden und dass identifizierte Konsensussequenzen noch weiter analysiert und verifiziert werden müssen. Die im Panning erhaltenen Insertsequenzen konnten in der Aminosäuresequenz des Knob nicht als lineare Abfolge gefunden werden. Diese Sequenzen können einzelne Komponenten eines nicht-linearen Epitops oder eines Mimotops repräsentieren. Unter zu Hilfenahme der Kristallstruktur des Knob wurden Vorschläge für die Lokalisation der Antikörperepitope gemacht. Diese konnten durch die zwischenzeitlich verfügbaren Daten aus Kokristallisationsexperimenten (Knob-CAR) bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die untersuchten Antikörper Epitope vorgeschlagen und mit verschiedenen Methoden verifiziert wurden. Hierbei zeigte sich, dass nur die Kombination mehrerer Methoden erfolgversprechend ist. Um konformationelle Epitope in Zukunft besser charakterisieren zu können wurde die Methode des Peptide Scans etabliert und optimiert. Für die Suche nach unbekannte Bindungspartnern wurden die Möglichkeiten des Phage Displays überprüft und eine neue Primingstrategie für random primed cDNA Banken entwickelt.

5.4 Methodische Aspekte

Blockbedingungen

Aus der Optimierung der Block- und Detektionsbedingungen kann man einige generelle Schlußfolgerungen ziehen:

- Die Reaktivität des sekundären Detektionssystems sollte getestet werden.
- Für starke monoklonale Antikörper ist das Blocksystem unkritisch, falls die sekundäre Detektion nicht zu unspezifischer Markierung des Hintergrund führt.

- Aufgrund der hohen lokalen Peptidkonzentration in einem einzelnen Spot kann die Antikörperkonzentration sehr niedrig gehalten werden. Dies spart Material, falls die Antikörpermenge limitierend ist und größere Volumina für die Inkubation der Membranen erforderlich sind.
- Polyklonale Seren enthalten eine große Anzahl unterschiedlicher Antikörperspezifitäten, was ein stringentes Blocksystem erfordert. Deshalb kann es, aufgrund niedriger Affinitäten oder niedriger Titer eines einzelnen Antikörpers, unmöglich sein, einzelne Spezifitäten zu detektieren.
- Ein starkes Blocksystem kann neben unspezifischen auch spezifische Interaktionsstellen blockieren. Man kann diesem Problem entgegenwirken, indem man die eingesetzte Menge an Interaktionspartnern oder die Expositionszeiten bei der Chemilumineszenz erhöht.

Schwache Antikörper sind die größte Herausforderung an Blockbedingungen und können Signale unter der Nachweisgrenze liefern. In unserem Falle stellten wir fest, dass die Unterschiede zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung nicht groß genug waren (Daten nicht gezeigt). Wir reduzierten entweder unspezifische Reaktionen nicht genügend oder etwas zu viel.

Andere Experimente legten nahe, biotinylierte Erstantikörper zu benutzen, welche dann mittels SP (Streptavidin-Peroxidase Komplex) detektiert werden können, anstatt HRP gekoppelte Zweitantikörper zu verwenden, weil wir oft ziemlich starke unspezifische Bindung der Zweitantikörper an unsere Membranen feststellen mussten. Diese Antikörper konnten durch oben beschriebene Regenerationsmaßnahmen nicht entfernt werden, sie banden einfach zu fest an der Membran.

5.5 Auswahlkriterien für Phage Display Systeme

Was das Präsentieren von cDNA Bibliotheken auf Phagen anbelangt ist Lambda foo aufgrund seiner geringen Insertionskapazität nicht für die Präsentation von größeren Fusionsproteinen geeignet. Mit kommerziell erhältlichen T7 cDNA-Banken können aufgrund des „Priming Systems“ nur Interaktionspartner identifiziert werden, deren interagierende Domänen C-terminal gelegen sind. Über ein von uns neu entwickeltes, modifiziertes „Priming System“ können jetzt auch cDNA –Banken generiert werden, welche die Identifizierung von Interaktionspartnern über zentral oder N-terminal gelegene Domänen ermöglichen. Im folgenden sind Kriterien für die Wahl des Display-Systems aufgeführt:

			Phagen		
			filamentös	lytisch	
Art der Interaktion	Interaktion erfordert	Interagierende Domänen liegen		Lambda foo	T7
Lineares Epitop	Disulfid-brücken	C-terminal	X		
		zentral	X ^a		
		N-terminal	X ^a		
	Große Inserts	C-terminal			X
		zentral			X
		N-terminal			X
	Kleinere Inserts	C-terminal		X	
		zentral		X	
		N-terminal		X	

Konformationelles Epitop	Disulfid-brücken	C-terminal	X		
		zentral	X ^a		
		N-terminal	X ^a		
	Große Inserts	C-terminal			X
		zentral			X
		N-terminal			X
	Kleinere Inserts	C-terminal		X	
		zentral		X	
		N-terminal		X	
Protein-Protein Wechselwirkung	Disulfid-brücken	C-terminal	X		
		zentral	X ^a		
		N-terminal	X ^a		
	Große Inserts	C-terminal			X
		zentral			X
		N-terminal			X
	Kleinere Inserts	C-terminal		X	
		zentral		X	
		N-terminal		X	

Tabelle 21. Auswahlkriterien für verschiedene Phage Display Systeme

^a spezielles „Priming System“ erforderlich

Generell ist zu empfehlen, den kleinen Bindungspartner für ein großes Zielprotein anstatt das große Zielprotein für einen kleinen Bindungspartner zu suchen (hierbei würden zu große Anforderungen an die Präsentation bzgl. Größe und korrekter Faltung gestellt).

Natürlich stehen auch alternative Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Verfügung:

System	Eigenschaft
Two-hybrid	billig, einfach, in vivo, erfordert Fusionsproteine und Kernlokalisation
Pull-down	in vitro, semi-quantitativ
Immunpräzipitation	nativ, Antikörper erforderlich
Massenspektrometrie	nativ, gereinigte Komplexe, teuer, schwierig
Surface-plasmon Resonanz	quantitativ, teuer, gereinigtes Protein erforderlich

Tabelle 22. Alternative Analysemethoden

6 Literaturverzeichnis

- **Alemanly R, Curiel DT.** CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther.* 2001 Sep;8(17):1347-53.
- **Bailey A, Mautner V.** Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology.* 1994 Dec;205(2):438-52.
- **Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP.** Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer.* 1990 Nov 15;46(5):839-44.
- **Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW.** Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997 Feb 28;275(5304):1320-3.
- **Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM.** Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science.* 1999 Nov 19;286(5444):1579-83.
- **Bilbao G, Contreras JL, Gómez-Navarro J, Curiel DT.** Improving adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Tumor Targeting.* 1998;3:59-79.
- **Bluthner M, Mahler M, Muller DB, Dunzl H, Bautz FA.** Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/ScI-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides. *J Mol Med.* 2000;78(1):47-54.
- **Chiu CY, Wu E, Brown SL, Von Seggern DJ, Nemerow GR, Stewart PL.** Structural analysis of a fiber-pseudotyped adenovirus with ocular tropism suggests differential modes of cell receptor interactions. *J Virol.* 2001 Jun;75(11):5375-80.
- **Condron BG, Atkins JF, Gesteland RF.** Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *J Bacteriol.* 1991 Nov;173(21):6998-7003.
- **Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotten M.** Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 1;88(19):8850-4.
- **Davidson, E. H.** 1976. *Gene Activity in Early Development.* Academic Press, NY.
- **Davison E, Kirby I, Elliott T, Santis G.** The human HLA-A*0201 allele, expressed in hamster cells, is not a high-affinity receptor for adenovirus type 5 fiber. *J Virol.* 1999 May;73(5):4513-7.
- **de Conciliis L, Marchitello A, Wapenaar MC, Borsani G, Giglio S, Mariani M, Consalez GG, Zuffardi O, Franco B, Ballabio A, Banfi S.** Characterization of Cxorf5 (71-7A), a novel human cDNA mapping to Xp22 and encoding a protein containing coiled-coil alpha-helical domains. *Genomics.* 1998 Jul 15;51(2):243-50.
- **Defer C, Belin MT, Caillet-Boudin ML, Boulanger P.** Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J Virol.* 1990 Aug;64(8):3661-73.
- **Douglas JT, Miller CR, Kim M, Dmitriev I, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT.** A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol.* 1999 May;17(5):470-5.
- **Douglas JT, Rogers BE, Rosenfeld ME, Michael SI, Feng M, Curiel DT.** Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol.* 1996 Nov;14(11):1574-8.
- **Durmort C, Stehlin C, Schoehn G, Mitraki A, Drouet E, Cusack S, Burmeister WP.** Structure of the fiber head of ad3, a non-car-binding serotype of adenovirus. *Virology.* 2001 Jul 5;285(2):302-12.

- **Fack F, Hugle-Dorr B, Song D, Queitsch I, Petersen G, Bautz EK.** Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J Immunol Methods*. 1997 Aug 7;206(1-2):43-52.
- **Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J, Poller W.** Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther*. 1999 Sep;6(9):1520-35.
- **Fender P, Kidd AH, Brebant R, Oberg M, Drouet E, Chroboczek J.** Antigenic sites on the receptor-binding domain of human adenovirus type 2 fiber. *Virology*. 1995 Dec 1;214(1):110-7.
- **Feng M, Jackson WH Jr, Goldman CK, Rancourt C, Wang M, Dusing SK, Siegal G, Curiel DT.** Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol*. 1997 Sep;15(9):866-70.
- **Frank, R. 1992.** SPOT synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48:9217-9232.
- **Freimuth P, Springer K, Berard C, Hainfeld J, Bewley M, Flanagan J.** Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol*. 1999 Feb;73(2):1392-8.
- **Gao B, Esnouf MP.** Multiple interactive residues of recognition: elucidation of discontinuous epitopes with linear peptides. *J Immunol*. 1996 Jul 1;157(1):183-8.
- **Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ.** Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jul;81(13):3998-4002.
- **Greber UF, Suomalainen M, Stidwill RP, Boucke K, Ebersold MW, Helenius A.** The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J*. 1997 Oct 1;16(19):5998-6007.
- **Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A.** The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*. 1996 Apr 15;15(8):1766-77.
- **Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A.** Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):477-86.
- **Greenwood J, Willis AE, Perham RN.** Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol*. 1991 Aug 20;220(4):821-7.
- **Henry LJ, Xia D, Wilke ME, Deisenhofer J, Gerard RD.** Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5239-46.
- **Hoffmann WL, Jump.** Tween-20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *J Immunol Methods* 1986, 94:191-196.
- **Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S, Kuwano R.** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Apr 14;77(1):19-28.
- **Hong JS, Engler JA.** Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):7071-8.
- **Hong JS, Engler JA.** The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal. *Virology*. 1991 Dec;185(2):758-67.

- **Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA.** Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 1997 May 1;16(9):2294-306.
- **Jones S, Thornton JM.** Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):13-20.
- **Kay B, Winter J, McCafferty J (Ed.).** Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Academic Press, San Diego, California. 1996.
- **Kay MA, Liu D, Hoogerbrugge PM.** Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 25;94(24):12744-6.
- **Kenna JG, Major GN, Williams RS.** Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods.* 1985 Dec 27;85(2):409-19.
- **Kirby I, Davison E, Beavil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G.** Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol.* 2000 Mar;74(6):2804-13.
- **Kirby I, Davison E, Beavil AJ, Soh CP, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G.** Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. *J Virol.* 1999 Nov;73(11):9508-14.
- **Kirby I, Lord R, Davison E, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G.** Adenovirus Type 9 Fiber Knob Binds to the Coxsackie B Virus-Adenovirus Receptor (CAR) with Lower Affinity than Fiber Knobs of Other CAR-Binding Adenovirus Serotypes. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):7210-4.
- Klaus S, Krüger D, Meyer J (Ed.). *Bakterienviren.* Fischer-Verlag. 1992.
- **Koch J und Mahler M.** (Ed.), Peptide arrays on membrane supports – synthesis and applications, Springer-Verlag, Heidelberg, in press.
- **Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B.** Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):74-7.
- **Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N, Curiel DT.** Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):1844-52.
- **Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT.** Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):6839-46.
- **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(259):680-5.
- **Legrand V, Spehner D, Schlesinger Y, Settelen N, Pavirani A, Mehtali M.** Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):907-19.
- **Li M.** Applications of display technology in protein analysis. *Nat Biotechnol.* 2000 Dec;18(12):1251-6.
- **Liebermann H, Mentel R, Bauer U, Pring-Akerblom P, Dolling R, Modrow S, Seidel W.** Receptor binding sites and antigenic epitopes on the fiber knob of human adenovirus serotype 3. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):9121-30.
- **Lortat-Jacob H, Chouin E, Cusack S, van Raaij MJ.** Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23;276(12):9009-15.

- **Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J.** Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J Virol.* 1994 Jun;68(6):4104-6.
- **Lowry *et al.*,** *JBC* 193 (1951)
- **Mahler M, Mierau R, Bluthner M.** Fine-specificity of the anti-CENP-A B-cell autoimmune response. *J Mol Med.* 2000;78(8):460-7.
- **Maruyama IN, Maruyama HI, Brenner S.** Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 16;91(17):8273-7.
- **Marvin DA.** Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 1998 Apr;8(2):150-8.
- **Mathias P, Galleno M, Nemerow GR.** Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):8669-75.
- **Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G.** Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6811-4.
- **Mohammad K, Esen A.** A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blot. *J Immunol Methods.* 1989 Feb 8;117(1):141-5.
- **Novelli A, Boulanger PA.** Assembly of adenovirus type 2 fiber synthesized in cell-free translation system. *J Biol Chem.* 1991 May 15;266(14):9299-303.
- **Pereboev A, Pereboeva L, Curiel DT.** Phage display of adenovirus type 5 fiber knob as a tool for specific ligand selection and validation. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):7107-7113.
- **Peterfi Z, Kocsis B.** Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. *J Immunoassay.* 2000 Nov;21(4):341-54.
- **Petersen G, Song D, Hugle-Dorr B, Oldenburg I, Bautz EK.** Mapping of linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries. *Mol Gen Genet.* 1995 Dec 10;249(4):425-31.
- **Philipson L, Lonberg-Holm K, Pettersson U.** Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J Virol.* 1968 Oct;2(10):1064-75.
- **Piossek C, Schneider-Mergener J, Schirner M, Vakalopoulou E, Germeroth L, Thierauch KH.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor II-derived peptides inhibit VEGF. *J Biol Chem.* 1999 Feb 26;274(9):5612-9.
- **Pruslin FH, To SE, Winston R, Rodman TC.** Caveats and suggestions for the ELISA. *J Immunol Methods.* 1991 Mar 1;137(1):27-35.
- **Reineke U, Sabat R, Misselwitz R, Welfle H, Volk HD, Schneider-Mergener J.** A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nat Biotechnol.* 1999 Mar;17(3):271-5.
- **Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J.** Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Feb;12(1):59-64.
- **Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ.** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):7909-15.
- **Roelvink PW, Mi Lee G, Einfeld DA, Kovesdi I, Wickham TJ.** Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science.* 1999 Nov 19;286(5444):1568-71.
- **Rudiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B.** Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 1997 Apr 1;16(7):1501-7.

- **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- **Santis G, Legrand V, Hong SS, Davison E, Kirby I, Imler JL, Finberg RW, Bergelson JM, Mehtali M, Boulanger P.** Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR. *J Gen Virol.* 1999 Jun;80 (Pt 6):1519-27.
- **Seed, B, Parker RC, Davidson N.** Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene* 1982; 19(11):201-209.
- **Seth P.** Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein. *J Virol.* 1994 Feb;68(2):1204-6.
- **Smith GP.** Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-17.
- **Steinitz M.** Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. *Anal Biochem.* 2000 Jul 1;282(2):232-8.
- **Stephen CW, Helminen P, Lane DP.** Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol.* 1995 Apr 21;248(1):58-78.
- **Stevenson SC, Rollence M, White B, Weaver L, McClelland A.** Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol.* 1995 May;69(5):2850-7.
- **Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM.** Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2589-99.
- **Stouten PF, Sander C, Ruigrok RW, Cusack S.** New triple-helical model for the shaft of the adenovirus fibre. *J Mol Biol.* 1992 Aug 20;226(4):1073-84.
- **Thean ET, Toh BH.** Western immunoblotting: temperature-dependent reduction in background staining. *Anal Biochem.* 1989 Mar;177(2):256-8.
- **Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L.** Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res.* 2000 Feb 25;255(1):47-55.
- **Tomko RP, Xu R, Philipson L.** HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3352-6.
- **van Raaij MJ, Chouin E, van der Zandt H, Bergelson JM, Cusack S.** Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des.* 2000 Nov 15;8(11):1147-55.
- **van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, Cusack S.** A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature.* 1999 Oct 28;401(6756):935-8.
- **Vogt RF Jr, Phillips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierito FW.** Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods.* 1987 Jul 16;101(1):43-50.
- **von Seggern DJ, Chiu CY, Fleck SK, Stewart PL, Nemerow GR.** A helper-independent adenovirus vector with E1, E3, and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1601-8.
- **Wadell G, Hammarskjold ML, Winberg G, Varsanyi TM, Sundell G.** Genetic variability of adenoviruses. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;354:16-42.
- **Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G.** Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3455-8.

- **Wang X, Bergelson JM.** Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol.* 1999 Mar;73(3):2559-62.
- **Watkins SJ, Mesyanzhinov VV, Kurochkina LP, Hawkins RE.** The 'adenobody' approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene Ther.* 1997 Oct;4(10):1004-12.
- **Wickham TJ, Filardo EJ, Cheresch DA, Nemerow GR.** Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.* 1994 Oct;127(1):257-64.
- **Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR.** Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 1993 Apr 23;73(2):309-19.
- **Wickham TJ, Segal DM, Roelvink PW, Carrion ME, Lizonova A, Lee GM, Kovesdi I.** Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol.* 1996 Oct;70(10):6831-8.
- **Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL 2nd, Roelvink PW, Li Y, Lee GM, Brough DE, Lizonova A, Kovesdi I.** Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8221-9.
- **Wobus CE, Hugle-Dorr B, Girod A, Petersen G, Hallek M, Kleinschmidt JA.** Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol.* 2000 Oct;74(19):9281-93.
- **Wohlfart C.** Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. *J Virol.* 1988 Jul;62(7):2321-8.
- **Xia D, Henry LJ, Gerard RD, Deisenhofer J.** Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure.* 1994 Dec 15;2(12):1259-70.
- **Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, Gambari PF.** The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods.* 2000 May 26;239(1-2):1-11.
- **Zinn KR, Douglas JT, Smyth CA, Liu HG, Wu Q, Krasnykh VN, Mountz JD, Curiel DT, Mountz JM.** Imaging and tissue biodistribution of ^{99m}Tc-labeled adenovirus knob (serotype 5). *Gene Ther.* 1998 Jun;5(6):798-808.

Die vorliegende Arbeit wurde bei Prof. Dr. E. K. F. Bautz am Institut für Molekulare Genetik der Universität Heidelberg unter der wissenschaftlichen Anleitung von Priv. Doz. Dr. G. Petersen angefertigt. Herrn Prof. Dr. E. K. F. Bautz danke ich für seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. G. Petersen für die Überlassung des spannenden Themas, die fachliche Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft.

Allen Laborkolleginnen und –kollegen danke ich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. B. Hügler-Dörr für die hervorragende Zusammenarbeit und das Korrekturlesen des Manuskripts.

Besondere Anerkennung verdienen meine langjährigen Promotionskollegen, Herr Dr. A. Schmiel und Herr Dr. J. Koch.

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. T. Curiel und Frau Dr. J. T. Douglas von der University of Alabama, Birmingham, USA dafür, dass sie mir die monoklonalen Antikörper zur Verfügung gestellt haben.

Herrn Prof. M. Wink als Sprecher des Graduiertenkollegs Biotechnologie möchte ich herzlich für die Leitung desselben danken.

Bei Frau I. Höss, Frau I. Kohlhaas und Frau I. Hoffmann bedanke ich mich für die freundliche und rasche Hilfe in verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Zum Schluß möchte ich mich noch bei meinem derzeitigen Chef, Herrn Prof. Dr. S. Suhai und meinen Kollegen aus der Biocomputing Service Group des DKFZ für ihr Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Insbesondere die Motivation durch Herrn Dr. M. van der Linden und Frau Dr. C. del Val hat mir sehr geholfen.

DANKE.