

Induktion und Charakterisierung von
Antikörpern gegen das transmembrane
Hüllprotein von HIV und Gammaretroviren

Diplomarbeit

Universität Potsdam

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie

vorgelegt von Corinna Schnöller
Matrikelnummer 713453

Berlin,
Dezember 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Kurth,
Präsident des Robert Koch-Instituts

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Micheel,
Universität Potsdam, Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	S.I
II	Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen.....	S.III

1 Einleitung

1.1.	Retroviren.....	S.1
1.1.1	Biologische Eigenschaften.....	S.1
1.1.2.	Transmembrane Hüllproteine.....	S.2
1.1.3	Immunologische Abwehr von Viren.....	S.4
1.1.4	Felines Leukämievirus (FeLV).....	S.4
1.1.5	Humanes Immundefizienz Virus (HIV).....	S.5
1.2.	Antikörper.....	S.7
1.2.1.	Aufbau und Funktion.....	S.7
1.2.2	Gewinnung und Anwendung.....	S.8
1.2.3	Grundlagen der Hybridomtechnik.....	S.9
1.2.4	Virusneutralisierende Antikörper gegen HIV.....	S.10
1.3.	Retrovirusinduzierte Immunsuppression und ISU-Peptide.....	S.13
1.4.	Zielstellung.....	S.15

2. Material und Methoden

2.1	Material.....	S.17
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	S.19
2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	S.19
2.2.2.	Real-Time-PCR.....	S.22
2.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	S.22
2.2.4.	Gelextraktion.....	S.23

2.2.5	Restriktionsverdau.....	S.23
2.2.6	Ligation.....	S.25
2.2.7	Transformation kompetenter Bakterien.....	S.26
2.2.8.	Kolonie-PCR.....	S.27
2.2.9	Minipräparation:Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab	S.28
2.2.10	DNS-Konzentrationsbestimmung.....	S.28
2.2.11	DNS-Sequenzierung.....	S.28
2.2.12	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien.....	S.29
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	S.30
2.3.1	Affinitätschromatographie.....	S.30
2.3.1.1.	CBP-Affinitätschromatographie.....	S.30
2.3.1.2.	Affinitätschromatographie mit p15E gekoppelt an Sepharose 4B.....	S.31
2.3.1.3.	Antikörperaufreinigung über ProteinG.....	S.31
2.3.1.4.	IgM- Aufreinigung über BakerBond AB ^x -Säulen.....	S.32
2.3.2.	Bradford-Test.....	S.32
2.3.3.	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	S.33
2.4.	Hybridomtechnik.....	S.34
2.4.1.	Immunisierung von Balb/c-Mäusen.....	S.34
2.4.2.	Gewinnung von Feederzellen (Ammenzellen).....	S.35
2.4.3.	Präparation der Milzzellen.....	S.35
2.4.4.	Gewinnung der Myelomzellen.....	S.36
2.4.5.	Elektrofusion.....	S.36
2.4.6.	Reklonierung.....	S.37
2.4.7.	Einfrieren und Auftauen muriner Hybridome.....	S.37
2.5.	Immunologische Methoden.....	S.38
2.5.1.	Enzymimmuntests (ELISA=Enzyme-linked immunosorbent assay).....	S.38
2.5.1.1.	HIV-Enzymimmuntest.....	S.38
2.5.1.2.	FeLV-Enzymimmuntest.....	S.39
2.5.1.3.	Subklassentest.....	S.40
2.5.1.4.	Kompetitions-ELISA.....	S.40
2.5.2.	Western Blot.....	S.41

2.5.3. Epitopkartierung.....	S.42
2.5.4. Immunfluoreszenz.....	S.43
2.6. Zellkultur.....	S.44
2.6.1. Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblaufärbung.....	S.44
2.6.2. Suspensionszellen und adhärenente Zellen.....	S.44
2.7 Virologische Methoden.....	S.46
2.7.1. FeLV-Neutralisationstest.....	S.46
2.7.2. HIV-Neutralisationstests.....	S.47
2.7.2.1. Real-Time-PCR-Neutralisationstest.....	S.47
2.7.2.2. CEM-SEAP-Test.....	S.48
3. Ergebnisse	
3.1. Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV.....	S.50
3.1.1. Charakterisierung der Antikörper im Serum und in Überständen von Milzkulturen.....	S.50
3.1.1.1. Nachweis von bindenden Antikörpern in Enzymimmuntests.....	S.50
3.1.1.2. Epitopkartierung.....	S.51
3.1.1.3. Nachweis neutralisierender Antikörper im Infektionsversuch.....	S.52
3.1.2. Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die Peptide E1 und E2 von HIV.....	S.53
3.1.2.1. Gewinnung monoklonaler Antikörper.....	S.53
3.1.2.2. Charakterisierung der Bindungseigenschaften.....	S.54
3.1.2.3. Analyse der Subklassenzugehörigkeit der monoklonalen Antikörper....	S.55
3.1.2.4. Aufreinigung der IgM.....	S.56
3.1.2.5. Aktivitätstest der aufgereinigten IgM.....	S.58
3.1.2.6. Nachweis der Spezifität der monoklonalen Antikörper in Wettbewerbsversuchen.....	S.58
3.1.2.7. Epitopkartierung der monoklonalen Antikörper.....	S.60
3.1.2.8. Analyse der monoklonalen Antikörper im Western Blot.....	S.61

3.1.2.9. Neutralisationseigenschaften der Kulturüberstände von HIV- Antikörperproduzierenden Hybridomen.....	S.62
3.1.2.10. Neutralisationsanalyse der IgM aufgereinigter Kulturüberstände.....	S.64
3.1.2.11. Analyse des monoklonalen Antikörpers 1A10 in der Immunfluoreszenz.....	S.67
3.2. Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von FeLV.....	S.70
3.2.1. Charakterisierung der Antikörper im Serum und in Milzkulturüberstand.....	S.70
3.2.1.1. Nachweis bindender FeLV-Antikörper im Enzymimmuntest.....	S.70
3.2.1.2. Kartierung der Epitope.....	S.72
3.2.2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper.....	S.73
3.2.2.1. Charakterisierung der Bindungseigenschaften.....	S.73
3.2.2.2. Subklassentest.....	S.74
3.3. Klonierung und Expression des transmembranen Hüllproteins p15E von FeLV mit deletierter isu-Domäne (p15E Δ isu).....	S.75
3.3.1. Gradienten-PCR zur Gewinnung des Inserts.....	S.76
3.3.2. Restriktionsverdau des Vektors pCAL-n und des Inserts.....	S.76
3.3.3. Transformation und Kolonie-PCR.....	S.78
3.3.4. Expression und Charakterisierung des p15E Δ isu.....	S.79
4. Diskussion.....	S.81
5. Zusammenfassung.....	S.93
6. Anhang.....	S.94
7. Literaturverzeichnis.....	S.99

Abkürzungsverzeichnis

µg: Mikrogramm

µl: Mikroliter

AEBSF: (4-(2-Aminoethyl-)benzylsulfonylfluorid Hydrochlorid (Pefabloc SC))

AIDS: Erworbenes Immundefizienzsyndrom (acquired immunodeficiency syndrom)

AS: Aminosäure

BSA: Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)

CBP: Calmodulin-Bindeprotein

CCR: Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)

CHR: C-terminale Helixregion

CXCR: Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)

Cys: Cystein

DAB: 3, 3'-Diaminobenzidin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNS: Desoxyribonukleinsäure

ds DNS: doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure

E.coli: Escherichia coli

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

FeLV: Felines Leukämievirus

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

FKS: fetales Kälberserum

gp: Glykoprotein

HAT: Hypoxanthin, Azaserin, Thymidin

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HERV-K: Humanes endogenes Retrovirus-K

HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

HIV: Humanes Immundefizienzvirus

IFN: Interferon

Ig: Immunglobulin

isu: immunsuppressiv

kDa: Kilodalton

KLH: Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin)

Kü: Kulturüberstand

LTR: *long terminal repeat*

M: molar

MCS: *multiple cloning site*

MES: *Morpholinoethanosulfonsäure*

mg: Milligramm

MHC: major histocompatibility complex

ml: Milliliter

ng: Nanogramm

OPD: o-Phenylendiamin

PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)

PEG: Polyethylenglykol

PERV: Porzines endogenes Retrovirus

POD: Meerrettichperoxidase
RNS: Ribonukleinsäure
RPMI1640: Zellkulturmedium für Säugerzellen (RPMI = Roswell Park Memorial Institut)
SDS: Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SIV: simianes Immundefizienzvirus
TEMED: N,N,N',N'-tetra-Methylethyldiamin
TMB: tetra-Methylbenzidin
Tris: tris(Hydroxymethyl-)aminomethan
U/min: Umdrehungen pro Minute
ZAMAK: Ziege-anti-Mauslg-Antikörper

Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt:

A: Alanin
C: Cystein
D: Asparaginsäure
E: Glutaminsäure
F: Phenylalanin
G: Glycin
H: Histidin
I: Isoleucin
K: Lysin
L: Leucin
M: Methionin
N: Asparagin
P: Prolin
Q: Glutamin
R: Arginin
S: Serin
T: Threonin
V: Valin
W: Tryptophan
X: beliebige Aminosäure
Y: Tyrosin

Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Nr.:	Titel	Seite
1	Schematischer Aufbau eines Retrovirus	S.1
2	Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von gp41	S.3
3	Prävalenz der HIV-Infektionen in verschiedenen Teilen der Welt	S.6
4	Schematische Darstellung von IgG- und IgM-Molekülen	S.7
5	Theorie der Hybridomtechnik	S.9
6	Schematische Darstellung der Lage der Primer und der PCR	S.20
7	Multiple Cloning Site des Vektors pCAL-n	S.24
8	Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pCAL-n	S.25
9	ELISA des Serums von Maus 1.1	S.50
10	ELISA der Milzkulturüberstände von Maus 1.3 und Maus 1.1	S.51
11	Epitopkartierung der Seren der HIV-Mäuse	S.52
12	Real-Time-PCR-Neutralisationstest des Mausserums nach dem ersten Boost	S.53
13	Enzymimmuntest der Kulturüberstände der Hybridome	S.54
14	Subklassentest von Kulturüberständen der Hybridomklone	S.55
15	SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus Kulturüberständen der Klone 1A10 und 3C12	S.56
16a	SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus Kulturüberstand des Klons 8B4	S.57
16b	SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus Kulturüberstand des Klons 2A11	S.57
17	Aktivitätstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM	S.58
18	Titration der Kulturüberstände 1A10, 3C12 und 8B4	S.59
19	Kompetition des Kulturüberstandes 1A10	S.59
20	Kompetitions-ELISA der Kulturüberstände 8B4 und 3C12	S.60
21	Epitopkartierung der aufgereinigten IgM	S.61
22	Western Blot Analyse der Kulturüberstände 2A11 und 8B4 mit Protein Hybrid II(gp41)	S.62
23	CEM-Neutralisationsassay der Kulturüberstände 8B4 und 2A11	S.63
24	CEM-SEAP-Neutralisationstest der Kulturüberstände 8B4 und 2A11	S.64
25	CEM-SEAP-Neutralisationstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten monoklonalen Antikörper (12 Min)	S.65
26	CEM-SEAP-Neutralisationstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten monoklonalen Antikörper (30 Min)	S.66
27	Real-Time-PCR der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM	S.66
28	Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit dem monoklonalen Mausantikörper 1A10 (1:20) und FITC-markiertem Sekundärantikörper	S.68
29	Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit dem humanen monoklonalen Antikörper 2F5 (1:30000) und FITC-markiertem Sekundärantikörper	S.69

30	Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit FITC-markiertem Sekundärantikörper.....	S.69
31	Enzymimmuntests der Seren der Tiere 1.8 und 1.9.....	S.70
32	Enzymimmuntest der Milzkulturüberstände der Mäuse 1.8 und 1.9.....	S.71
33	Epitopkartierung des Serums der Mäuse 1.7, 1.8 und 1.9.....	S.72
34	Enzymimmuntest der Kulturüberstände von Klonen der Maus 1.9.....	S.73
35	Subklassentest von Hybridom- Kulturüberständen der Maus 1.9.....	S.74
36	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie.....	S.75
37	Gradienten PCR.....	S.76
38	Ligation der Fragmente p4 und p5 nach PCR.....	S.77
39	Agarosegelelektrophorese des pCALn- Vektors.....	S.77
40	Kolonie-PCR gepickter p15E Δ isu-Klone.....	S.78
41	PCR mit den FeLV forward und reverse Primern.....	S.79
42	SDS-Gelanalyse der Δ isu Expression.....	S.79
43	Neutralisationstest der AG Norley.....	S.88
44	Schematische Darstellung der Lage der Epitope von 2F5, 4E10 und 8B4.....	S.89
45	Vergleich der Epitopkartierung von Ziegen-, Ratten-, und Mausseren gegen FeLVp15E.....	S.90

Tabellen:

1	Versuche zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1.....	S.11
2	Ursprung und Sequenz der eingesetzten Antigene und Anzahl der Versuchstiere.....	S.34
3	Übersicht über positive Testergebnisse der eingesetzten Kulturüberstände (HIV).....	S.54
4	Übersicht über positive Testergebnisse der eingesetzten Kulturüberstände (FeLV).....	S.73

1. Einleitung

1.1. Retroviren

1.1.1 Biologische Eigenschaften

Retroviren wurden 1908 und 1911 erstmals von Ellerman und Bang bzw. Rous beschrieben. Ihnen war es gelungen, Tumorerkrankungen mittels Ultrafiltrat zu übertragen (Modrow, 2003). Die Familie der Retroviridae unterteilt sich in 7 Genera, die sich durch Besonderheiten während der Infektion und der Erkrankungsformen sowie in morphologischen und genetischen Eigenschaften unterscheiden. Sie werden als α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, Lentiviren und Spumaviren bezeichnet. Weiterhin wird unterschieden zwischen exogenen Retroviren, die eigenständig vorliegen und horizontal übertragen werden (z.B. HIV, FeLV) und endogenen Retroviren (z.B. HERV-K, PERV), die in allen Zellen eines Organismus ins Genom integriert sind und vertikal über die Keimbahnzellen übertragen werden.

Retroviren besitzen ein einzelsträngiges RNS-Genom positiver Polarität. Beide RNS-Stränge sind nicht miteinander verbunden und mit Nukleokapsidproteinen (NC) komplexiert. Zusammen mit den Kapsidproteinen (CA) werden sie als Kapsid bezeichnet (bei HIV konisch, bei γ -Retroviren sphärisch-ikosaedrisch). Im

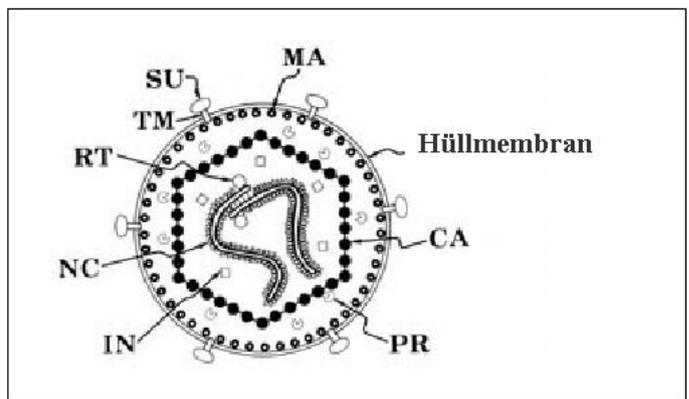


Abb.1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus, verändert nach Coffin, 1997, MA=Matrix-Proteine, SU=Surface Unit, TM= Transmembranes Hüllprotein, CA= Kapsidprotein, NC= Nukleokapsidprotein, RT=Reverse Transkriptase, PR=Protease, IN=Integrase

Viruspartikel liegen zudem die essentiellen viruskodierten Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) vor.

Infektiöse Retroviruspartikel sind von einer Hüllmembran (Envelope) umgeben, die von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Die Hüllmembran wird über einen Bereich von circa 20 hydrophoben Aminosäuren vom transmembranen Hüllprotein (TM-Protein) durchlaufen. An den extraviralen Bereich des TM-Proteins ist nichtkovalent ein Glykoprotein (Surface Unit, SU-Protein) gebunden. TM und SU liegen als trimere Komplexe in der Hüllmembran vor. Diese Komplexe spielen bei der Infektion und Pathogenese eine wichtige Rolle. Im Inneren an die Membran angelagert, befinden sich netzartig miteinander verbundene Matrix-Proteine (MA), die

über aminoternale Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind.

Das RNS-Genom wird unter Umkehrung des normalen Informationsflusses (von DNS zu RNS) durch das virale Protein reverse Transkriptase (RT; eine RNS-abhängige DNS-Polymerase) zu DNS umgeschrieben, welche als Provirus in die Zelle integriert wird. (Baltimore et al., 1970). Die RNS-Polymerase des Wirtes transkribiert dann die virale DNS in RNS-Moleküle, die sowohl als mRNA für die Synthese viraler Proteine als auch als neue Genome für die Nachkommenschaft, die aus der Zelle freigesetzt wird, fungieren können.

Im Genom aller Retroviren befindet sich die kodierende Sequenz für das gruppenspezifische Antigen (*gag*), für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase (*pol*) bzw. Protease (*prt*) und die Oberflächen- und Transmembranhüllproteine (*env*). Im HIV-1-Genom finden sich außerdem die regulatorischen und akzessorischen Gene *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* und *vpu*.

1.1.2. Transmembrane Hüllproteine

Alle Retroviren enthalten zwei unterschiedliche Env-Proteine, die als gemeinsames Vorläuferprotein (gp160 bei HIV) von einer einfach gespleißten mRNA translatiert werden. Das Env-Vorläuferprotein wird aufgrund einer aminoterminalen Signalsequenz in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. Dort erfolgt bei fast allen Retroviren eine N-Glykosylierung an mehreren Stellen und es bilden sich bereits hier die reifen Oligomere. Im Golgi-Apparat wird das Env-Vorläuferprotein durch zelluläre Proteasen (z. B. Furin) gespalten, so dass die reifen Proteine TM und SU gebildet werden. Beide Proteine bleiben über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden.

Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 weist den typischen Aufbau und die Funktion retroviraler TM-Proteine auf. Es wird zusammen mit dem hochglykosylierten SU-Protein gp120 aus dem Vorläuferprotein gp160 prozessiert und besteht aus einer extraviralen Ektodomäne und einer Endodomäne im Inneren des Viruspartikels. Für die Infektion ist besonders die 175 AS große Ektodomäne wichtig. Sie unterteilt sich in die zwei funktionellen Regionen der aminoterminalen und carboxyterminalen Subdomäne, die durch einen Cys-Cys-Loop getrennt sind. In der aminoterminalen Subdomäne befindet sich das glycinreiche, hydrophobe Fusionspeptid (FP) und ein α -helikaler Leucin-/Isoleucin-Zipper, der sogenannte N-terminale Heptad Repeat

(NHR). Dem folgt eine Schleifenstruktur die von einer Cysteinbrücke verknüpft wird und an die sich die C-terminalen Heptad Repeats (CHR) anschließen (Caffrey, M., 2001; siehe Abb.2).

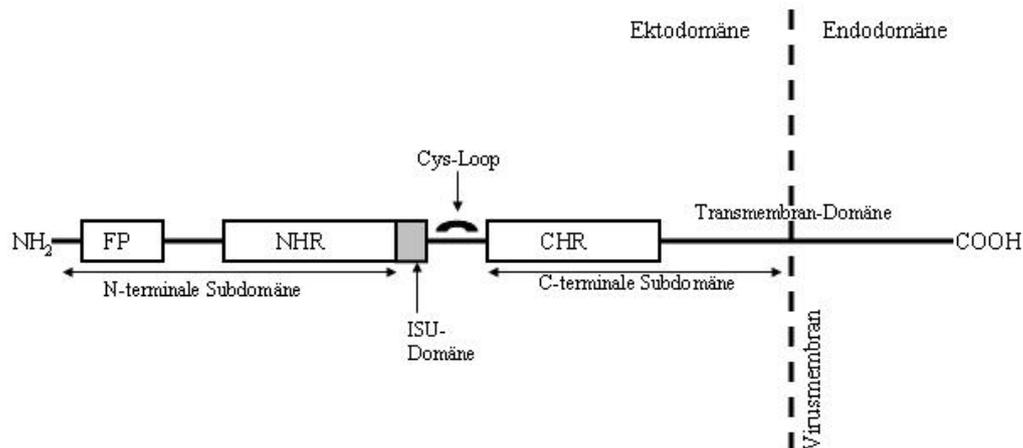


Abb2.: Aufbau retroviraler TM-Proteine am Beispiel von gp41

Schematische Struktur des TM-Proteins gp41 von HIV-1, modifiziert nach Schnaper, et al., 2004
 FP= Fusionspeptid, NHR= aminoterminaler Heptad Repeat Region, CHR= carboxyterminale Heptad Repeat Region, ISU-Domäne= immunsuppressive Domäne, Cys-Loop= Cystein-Schleife

Im nichtaktivierten Zustand bilden je drei gp41-Moleküle einen inneren Kern aus den parallel angeordneten α -helikalen NHR. Die drei CHR bilden schräg dazu eine äußeren Ring, so dass sich ein 6-Helix-Bündel ergibt (Weissenhorn, et al., 1997). Das Fusionspeptid lagert sich nach der Aktivierung direkt in der Zellmembran ein und bringt den Fusionsprozess in Gang. Es wird davon ausgegangen, dass die NHR- und CHR-Regionen durch konformationelle Umlagerungen der Helices hin zu einer trimeren Haarnadelanordnung einen aktiven Einfluss auf die Membranfusion ausüben. Die Umlagerung der gp41-Trimere führt zu einer Annäherung und schließlich zur Fusion von Wirtszell- und Virusmembran (Gallo, et al., 2001 und 2003). Dieses Strukturmotiv ist bei mehreren Viren (wie Influenza-, Ebola- und Coronaviren) hochkonserviert und man geht davon aus, dass noch weitere Viren diesen Mechanismus nutzen (Colman et al., 2003)

1.1.3 Immunologische Abwehr von Viren

Bei der immunologischen Abwehr von Viren spielen sowohl spezifische als auch unspezifische Mechanismen eine Rolle. Zu Beginn der Abwehr sind die Interferone und die „Natürlichen Killer-Zellen“ (NK) als Teil der unspezifischen Abwehr von großer Bedeutung. Später steigt auch die Zahl der cytotoxischen Zellen an, die für eine Virusabwehr am wichtigsten sind (zelluläre Immunantwort). Etwa zeitgleich werden Antikörper gebildet (humorale Immunreaktion).

Es gibt mehrere antivirale Effekte von Antikörpern: Sie können das freie Virus binden und so am Eindringen in die Wirtszelle hindern (Virusneutralisation) und es dem Komplementsystem opsonieren (Phagozyten). Weiterhin können sie aber auch infizierte Zellen binden und sie somit für den Abbau kennzeichnen (Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität mit Hilfe von Makrophagen oder Komplementaktivierung).

1.1.4 Felines Leukämie-Virus (FeLV)

Infektionen mit felinen Leukämieviren sind eine der Haupttodesursache bei Katzen. Das γ -Retrovirus befällt außer Hauskatzen auch einige Wildkatzenarten und wird horizontal übertragen (Hardy et al, 1973).

FeLV tritt in 3 Subtypen auf: FeLV-A, FeLV-B und FeLV-C. Dabei können infizierte Tiere einen, zwei oder alle drei Typen in sich tragen. FeLV-A kann in infizierten Katzen (durch Nachweis von FeLV-Antikörpern im Blut und Nachweis des Virus über PCR oder Immunfluoreszenz) immer nachgewiesen werden und verursacht Immunsuppressionen. Typ-B-Infektionen äußern sich in vermehrtem Auftreten von neoplastischen Krankheiten wie Tumoren und sind in 50% der erkrankten Tiere zu finden. Katzen mit einer FeLV-C-Infektion leiden an schwerer Anämie, dieser Virustyp tritt jedoch recht selten auf (in 1% der infizierten Katzen).

Die unterschiedlichen Typen können untereinander rekombinieren, so dass auch nicht-infektiöse Partikel wieder Infektiosität erreichen können. Im Genom von Katzen finden sich außerdem endogene Sequenzen, die exogenem FeLV sehr ähnlich sind (FERV: felines endogenes Retrovirus). Das transmembrane Hüllprotein des FeLV enthält eine immunsuppressive Domäne, die bei allen Retroviren konserviert ist (siehe 1.3. isu-Peptide) (Denner et al., 1998).

Feline Retrovirusinfektionen werden schon seit über 30 Jahren als Modell für von Retroviren ausgelöste persistierende Infektionen und deren Pathogenese genutzt. Bei natürlicher Infektion entwickeln Katzen entweder eine transiente oder eine persistierende Infektion. In transient infizierten Tiere wird teilweise eine protektive Immunität entwickelt, persistierend infizierte Katzen zeigen dagegen eine erhöhte Anfälligkeit für degenerative, proliferative oder neoplastische Veränderungen von Zellen des hämatopoetischen Systems, was zu Immunsuppression, Leukämien oder in seltenen Fällen zu Fibrosarkomen führt (Pedersen et al, 1977; Snyder et al, 1969). Da auch humane T-lymphotrope Retroviren (HTLV-I und -II) mit verschiedenen humanen Leukämien und Lymphomen assoziiert werden, ist FeLV als Tiermodell von großem Interesse. Zudem sind die vorhandenen Impfstoffe für Katzen bisher nur zu 80% wirksam. Es besteht also Bedarf an einem noch effektiveren Impfstoff.

1.1.5 Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

Allein im Jahr 2003 infizierten sich weltweit bis zu 5,8 Millionen Menschen mit HIV und bis zu 3,5 Millionen starben als Folge der Erkrankung. Insgesamt sind weltweit etwa 46 Millionen Menschen von der HIV-Epidemie betroffen.

HIV gehört zum Genus der Lentiviren, die der Familie der Retroviren zugeordnet werden (van Regenmortel et al., 2000) und verursacht AIDS (acquired immunodeficiency syndrome).

HI-Viren infizieren Zellen, die CD4-Moleküle tragen, also vor allem T-Helferzellen, aber auch Makrophagen oder dendritische Zellen. Das Virus dockt über das glykosylierte Hüllprotein gp120 an CD4 an und durch die Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4 wird gp41 freigelegt und darüber die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran ermöglicht. Infizierte T-Helferzellen sterben zwar nach einiger Zeit ab (durch das Virus oder Apoptose), produzieren zuvor jedoch große Virusmengen. Zudem ist das Immunsystem in fast allen Fällen nicht dazu in der Lage, die Infektion komplett zu eliminieren. Dies liegt zum einen daran, das HI-Viren lange Zeit unentdeckt im Körper persistieren können (wie z.B. auch Herpes simplex), zum anderen an der abfallenden Zahl der CD4⁺-Zellen. Da CD4⁺-Zellen sowohl in der humoralen als auch in der zellulären Immunantwort eine zentrale Rolle spielen, bewirkt ihr Fehlen eine deutliche Schwächung des Immunsystems: diese Stufe des Krankheitsverlaufs wird als AIDS bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch das gehäufte Auftreten sogenannter opportunistischer Krankheiten (wie Kaposi-

Sarkom oder auch Candidosen), die schließlich zum Tod führen.

Die Forschung hat bisher drei Gruppen von HIV-Therapeutika entwickelt: Reverse Transkriptase/ Polymerase-Hemmer, Protease-Hemmer und Fusionshemmer wie das Medikament T20 (Fuzeon, Enfuvirtide). T20 ist ein von gp41 abgeleitetes Peptid, das den Fusionsprozess effektiv unterbindet. Für alle bisherigen Medikamente, auch wenn sie in Kombination eingesetzt wurden, sind Resistenzbildungen beschrieben worden und sie verursachen zum Teil massive Nebenwirkungen. Außerdem war, trotz aller Bemühungen, kein Therapieansatz in der Lage, das Virus vollständig aus dem Infizierten zu entfernen.

Erstrebenswert ist deshalb ein präventiver Impfstoff gegen HIV, wobei jedoch sehr umstritten ist, ob eine humorale, eine zelluläre oder beide Immunantworten induziert werden müssen. Für die Induktion der humoralen Immunantwort sprechen hochgradig HIV-exponierte, uninfizierte Personen (HEPS) bei denen neutralisierende Antikörper gefunden werden konnten. Zudem könnten neutralisierende Antikörper eine Primärinfektion vorbeugen und sind in den Schleimhäuten (über die die meisten HIV-Transmissionen stattfinden) schnell verfügbar.

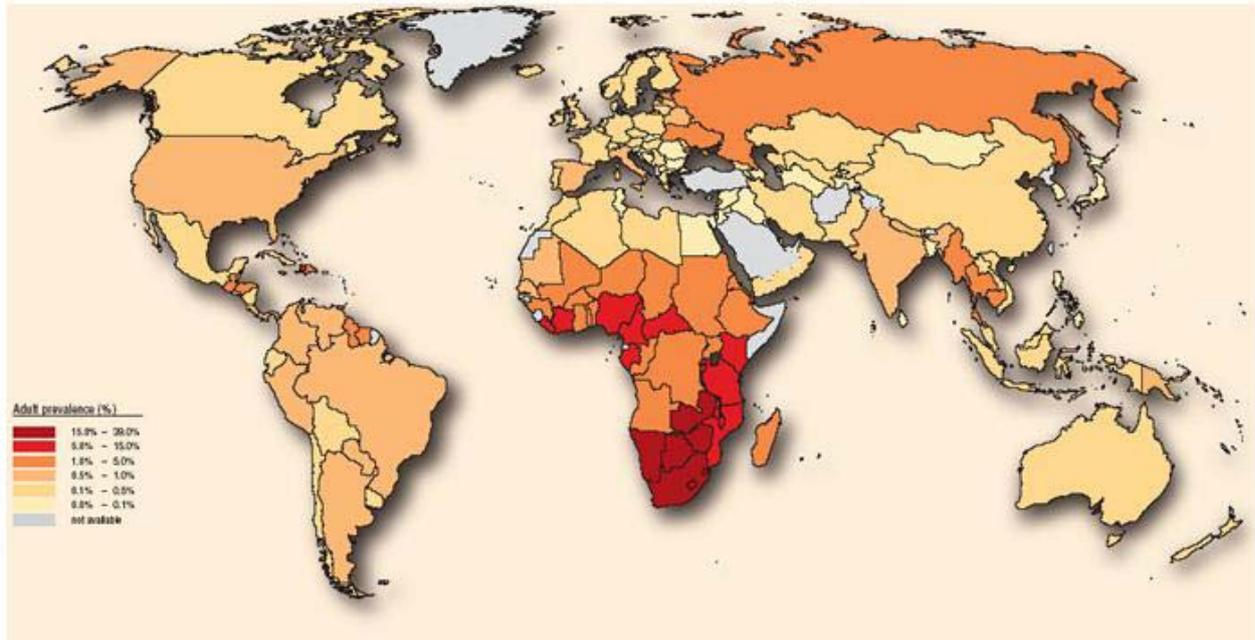


Abb.3: Prävalenz der HIV-Infektion in verschiedenen Teilen der Welt

Erwachsene HIV-Infizierte 2003 in % (WHO)

Farbskala von dunkelrot nach hellgelb:15-39%, 5-15%, 1-5%, 0,5-1%, 0,1-0,5%, 0-0,1%, nicht verfügbar

1.2. Antikörper

Das Immunsystem ist dazu in der Lage, Pathogene und körperfremde Moleküle zu erkennen und zu eliminieren. Da es dabei nicht bestimmen kann, ob ein Fremdkörper den Organismus positiv oder negativ beeinflusst, sondern lediglich nach "fremd" und "selbst" unterschieden wird, wird gegen alles „fremde“ eine Immunantwort eingeleitet. Die Immunantwort beinhaltet bei Wirbeltieren neben der angeborenen Abwehr auch eine adaptive Reaktion, die in zelluläre und humorale Antwort eingeteilt wird. Antikörper werden im Zuge der humoralen Immunantwort gebildet und können gegen fast jede, nicht natürlich im Wirt vorkommende, Substanz gebildet werden. Diese Fähigkeit zur spezifischen Antikörperbildung wird bei der Herstellung monoklonaler Antikörper genutzt.

1.2.1 Aufbau, Funktion

Antikörper sind von B-Lymphozyten produzierte, y-förmige, antigenbindende Immunglobuline (Ig) die als Effektor bei der Immunantwort wirken (Campell, 1997). Die Grundstruktur aller Antikörper besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Peptidketten die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ihr Molekulargewicht beträgt etwa 150 kDa.

Schwere und leichte Ketten besitzen am N-Terminus variable Regionen (v-Teil) die zusammen die Antigen-Bindungsregionen bilden, welche spezifisch an Antigene bzw. Epitope bindet. Am carboxyterminalen Ende befinden sich konstante Regionen (Fc oder C-Teil) die verschiedene biologische Funktionen von Antikörpern vermitteln. Dazu gehört die Aktivierung des Komplementsystems und Makrophagen binden zur Phagozytose an den Fc-Teil opsonierender Antikörper.

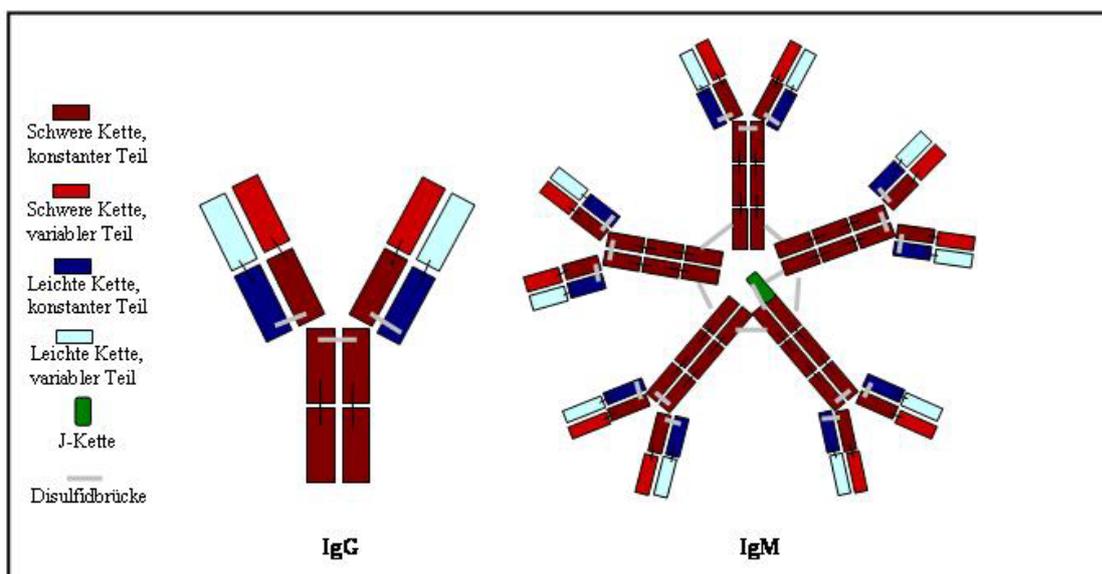


Abb.4: Schematische Darstellung von IgG- und IgM-Molekülen

Beim Menschen und der Maus treten 5 verschiedene Antikörperklassen auf: IgM, IgG, IgD, IgA und IgE. Durch die Hybridomtechnik (Punkt 2.3.) erhält man hauptsächlich IgM und IgG. Antikörper produzierende Zellen bilden als erstes Immunglobuline der Klasse M. Diese liegen als Pentamere vor und haben somit zehn statt zwei gleiche Antigen-Bindungsregionen. Für eine dauerhafte Bindung an das Antigen wird auf diese Weise die meist geringe Affinität durch erhöhte Avidität ausgeglichen.

IgG-Monomere sind wesentlich stabiler und affiner und spielen deshalb in der Analytik eine wichtigere Rolle.

1.2.2 Gewinnung und Anwendung

Zur Gewinnung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern müssen Versuchstiere mit dem entsprechenden Antigen mehrfach immunisiert werden. Im Blut dieser Tiere ist am Höhepunkt der sekundären Immunantwort (der Immunreaktion beim zweiten Kontakt mit einem Antigen) ein hoher Antikörper-Titer vorhanden. Bis zu 10% der vorhandenen Antikörper sind in der Lage, das eingesetzte Antigen zu binden. Polyklonale Antikörper enthalten Antikörper unterschiedlicher Bindungsspezifität gegen das Antigen, sind jedoch schlecht reproduzierbar und die Seren haben einen hohen Anteil Antikörper gegen andere Antigene, als das gewünschte.

Monoklonale Antikörper werden durch die Verschmelzung von Milzzellen eines immunisierten Versuchstiers mit Myelomzellen gewonnen. Es handelt sich dabei um identische Antikörpermoleküle, da jede Hybridomzelle genau eine Spezies von Antikörpern bildet. Sie reagieren einheitlich und spezifisch gegen ein bestimmtes Epitop eines Antigens. Monoklonale Antikörper sind unendlich reproduzierbar, da die Produzenten (Hybridomzellen) potentiell unsterblich sind. Nachteilig ist der große Aufwand, der für ihre Erzeugung nötig ist.

Polyklonale Immunsere wurden schon Ende des 19. Jahrhunderts von Emil von Behring zur passiven Immunisierung von Patienten benutzt. Es traten dabei jedoch teils sehr starke unerwünschte Nebenwirkungen auf. Deshalb wird versucht, die Bildung spezifischer Antikörper durch Immunisierung mit Antigen zu induzieren, zumal dann durch die Bildung von Gedächtniszellen ein langfristiger Schutz gegen das Pathogen besteht.

1.2.3 Grundlagen der Hybridomtechnik

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern wird ein B-Lymphozyt (Antikörper–Produktion) mit einer Myelomzelle (unbegrenzt Wachstum) verschmolzen, wobei sich beide Eigenschaften in der entstehenden Hybridomzelle vereinigen und man so eine unbegrenzte Antikörper–Produktion erreicht.

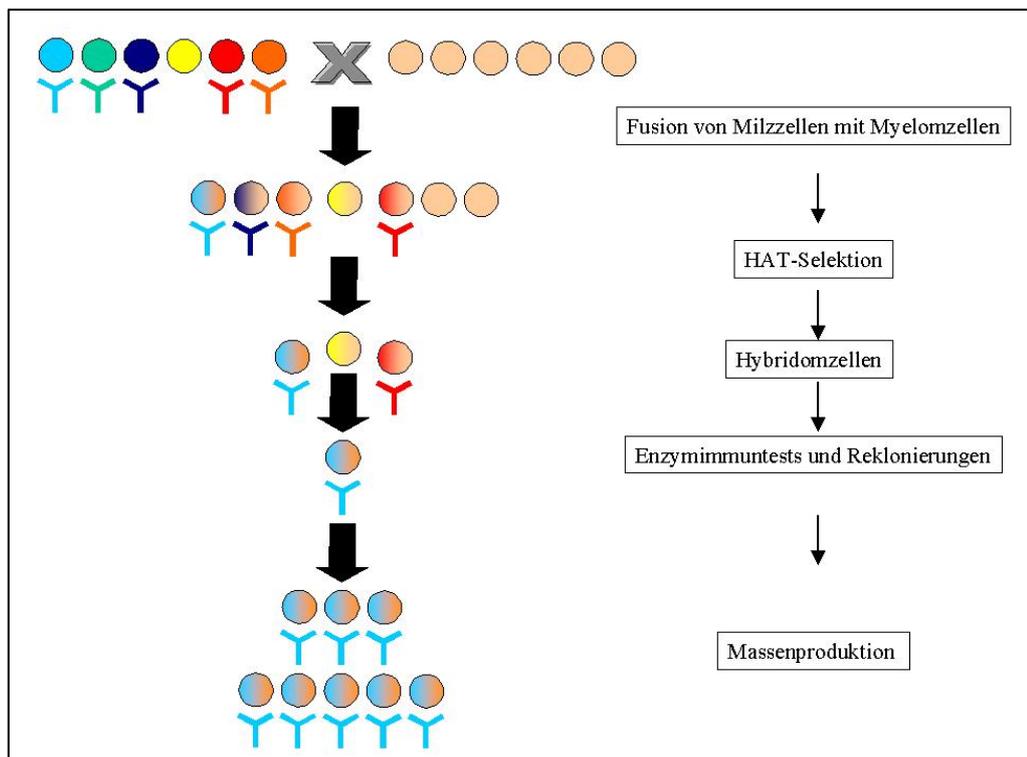


Abb.5: Theorie der Hybridomtechnik (verändert nach Micheel, 2003)

HAT: H= Hypoxanthin, A= Azaserin, T= Thymidin

Die B-Lymphozyten stammen aus der Milz mehrfach immunisierter Tiere (sekundäre Immunantwort) und es wird eine B-Zelltumormlinie ausgewählt, die selbst keine Antikörper produziert und in einem Gen (der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase =HGPRT) mutiert ist. Dies ist für die nach der Fusion erfolgende HAT-Selektion erforderlich, die ausnutzt, dass nur Zellen mit einem intakten HGPRT-Gen in Gegenwart des Zellgiftes Azaserin wachsen können. Nicht fusionierte Milzzellen können zwar noch in HAT wachsen, haben jedoch *in vitro* nur eine Lebensdauer von 14 Tagen.

1.2.4 Virusneutralisierende Antikörper gegen HIV

Virusneutralisierende Antikörper binden hoch averse an Strukturen, die für den Infektionsweg des Pathogens essentiell sind. Bei HIV-1 sind das, wie bei allen Retroviren, die Proteine des Oberflächen-Transmembran-Komplexes gp120 und gp41. Die wenigen konservierten Strukturen sind das Ziel von neuen Therapien und Impfstoffkonzepten.

In HIV-1 positiven Patienten liegen nicht ausreichend Antikörper vor, um die Infektion unter Kontrolle zu bringen (Ruppach et al., 2000). Das liegt zum einen an der geringen Antigenität des Oberflächenhüllkomplexes, zum anderen an der hohen genetischen Variabilität von HIV-1 (Wei et al., 2003). Dennoch weisen verschiedene Studien darauf hin, dass hohe Titer von neutralisierenden Antikörpern im Serum der Patienten eine Verzögerung der HIV-Pathogenese unterstützen (Reitz et al., 1988, Nara et al., 1990, Watkins et al., 1996, Parren et al., 1999, Dianzani et al., 2002). Außerdem konnte in HIV-positiven Patienten durch die Injektion hoher Dosen verschiedener neutralisierender Antikörper die Viruslast deutlich abgesenkt werden, zum Teil unter die Nachweisgrenze (Stiegler et al., 2002, Armbruster et al., 2002).

Bis heute sind nur vier monoklonale, subtypenübergreifend neutralisierende Antikörper aus HIV-1-positiven Patienten isoliert worden. Zwei davon binden an gp120 (IgG1 2G12 und IgG1b12), die zwei anderen, IgG1 2F5 und IgG1 4E10, an die Ektodomäne von gp41.

Gp41 ist bei einer Großzahl von HIV-Stämmen stark konserviert und bietet deshalb einen guten Ansatzpunkt. Das Virus kann in diesem Bereich nicht stark mutieren ohne seine Infektiosität zu verlieren, es ist also mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für produktive Fluchtmutanten zu rechnen.

2F5 wird in einer Hybridoma-Zelllinie exprimiert, die durch die Verschmelzung von B-Lymphozyten eines HIV-positiven Spenders mit einer humanen Krebszelllinie entstand (Buchacher et al., 1994). Der Antikörper bindet an die lineare Sequenz ELDKWA (AS 662-667, HIV-Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner et al., 1985) wobei die zentralen drei bis vier Aminosäuren (L)DKW für die Bindung und Neutralisation unerlässlich sind (Muster et al., 1993, McGaughey et al., 2003). Das 2F5-Epitop liegt am C-terminalen Ende der Ektodomäne von gp41, im Übergang von der C-terminalen Helix zum tryptophan-reichen Abschnitt, kurz vor dem Transmembrandurchgang. Dieser Bereich von gp41 ist bei allen Subtypen der Gruppe M stark konserviert (Zwick et al., 2001), wodurch das breite

Neutralisationsspektrum von 2F5 zu erklären ist. In etlichen Studien wurde versucht, Impfstoffe mit dem Epitop ELDKWA zu entwickeln. Bisher konnten jedoch sowohl Immunisierungsversuche mit kurzen Peptidvakzinen, als auch mit längeren, rekombinanten Proteinkonstrukten oder rekombinanten Viren, die alle als Träger für die ELDKWA-Sequenz dienten, lediglich bindende Antikörper ohne subtypübergreifende Neutralisationswirkung induzieren (Tab.1).

Rekombinantes Hepatitis-B Oberflächenantigen in 22nm Lipoproteinpartikeln mit der HIV-Sequenz ELDKWA, Tiermodell: BALB/c-Mäuse; Induktion bindender Antikörper, keine Neutralisation (Eckhart et al., 1996)
Modifiziertes DP178 (Modifikationen steigern die α -Helikalität und damit die Affinität zu 2F5) HIV-Sequenzen: -HLENEVARLKKLVGEYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF -VARLKKLVGEYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF -WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF -YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF -LESLIESLKEEIEENLKEKIEQLKLELDKWASLWMWF Tiermodell: Meerschweinchen; Induktion bindender Antikörper, keine Neutralisation (Joyce et al., 2002)
Anti-HLA(DR)-Antikörper mit rekombinant eingefügter HIV-Sequenz ELDKWAS an unterschiedlichen Positionen Induktion bindender Antikörper, keine Angaben zur Neutralisation (Ho et al., 2002)
ELDKWA-Pan DR Epitop über Disulfidbrücke gekoppelt an Tetanus-Toxin mit der HIV-Sequenz ELDKWASLW Tiermodell: BALB/c-Mäuse; Induktion bindender Antikörper (IgA), keine Angaben zur Neutralisation (Decroix et al., 2003)

Tabelle1: Versuche zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen HIV-1

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe konnten durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein p15E des γ -Retrovirus PERV (porzines endogenes Retrovirus) neutralisierende Antikörper induziert werden. Bei der Epitopkartierung neutralisierender Ziegenserum wurden dabei zwei immundominante Bereiche entdeckt, gegen welche die Antikörper aller neutralisierenden Seren gerichtet waren. Diese Domänen, E1 und E2, wurden in Western Blot- und ELISA-Bindungsstudien untersucht und aufgrund der Ergebnisse ein Modell aufgestellt, das in der Ektodomäne ein Konformationsepitop postulierte, an das neutralisierende Antikörper binden. Es wurde festgestellt, dass die kombinierten Domänen E1 und E2 zu synergistischen Bindungswerten führten und für eine effektive Neutralisation beide erkannt werden müssen (Fiebig et al., 2003).

Aufbauend auf diese Daten und der Ähnlichkeiten zwischen den Retroviren HIV und PERV wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass 2F5-ähnliche Antikörper erst durch Bindung an ein zweites Epitop eine so stabile Bindung eingehen, dass die Infektion mit HIV verhindert werden kann (Konformationsepitop). Dieses zweite Epitop könnte das im N-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41 liegende

Peptid E1 (AASVTLTVQARQLLS AS532-546) tragen. Peptid E1 verbesserte in ELISA-Studien die Bindungsaffinität des Antikörpers 2F5 (synergistischer Effekt). Es wurde postuliert, dass durch Faltung des gp41 die beiden Epitope so in räumliche Nähe gebracht werden, dass ein erst schwach gebundener Antikörper stabilisiert wird und somit die Bildung einer Infusionspore verhindert werden kann (Schmolke, 2004).

Auch gegen das Katzen-Leukämie-Virus FeLV konnten nach Immunisierung einer Ziege mit der rekombinant exprimierten Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E virusneutralisierende Antikörper induziert werden, die Epitope im tryptophanreichen, membranproximalen Bereich der Ektodomäne und im Bereich C-terminal des Fusionspeptids binden (Langhammer et al., eingereicht). Um sicherzugehen, dass es sich hier um Epitope handelt, die bei allen Retroviren exponiert vorliegen und nach Bindung durch Antikörper zur Inhibierung der Infektion führen, sind weitere Vergleichsstudien notwendig. Es besteht aber die Möglichkeit, dass es aufgrund der gemeinsamen Funktion der transmembranen Hüllproteine dieser Viren, konservierte Strukturen gibt, die bei hochaffiner Bindung durch Antikörper zur Neutralisation des Virus führen.

1.3. Retrovirusinduzierte Immunsuppression und ISU-Peptide

Bereits in den 60er Jahren zeigten erste Untersuchungen, dass Retroviren neben onkogenen auch immunsuppressive Eigenschaften besitzen. Als Immunsuppression wird dabei die Unterdrückung einer regulären Immunantwort bezeichnet. Man stellte fest, dass man mit verschiedenen Leukämieviren eine stark reduzierte Immunantwort in Mäusen hervorrufen konnte, die sowohl die Antikörperbildung als auch die T-Zell-Reaktionen umfasste (Dent et al., 1965, Peterson et al., 1963). Zudem konnte bei Katzen, die mit felinem Leukämievirus (FeLV) infiziert waren, eine Immunsuppression bereits vor der Tumorigenese nachgewiesen werden (Cotter et al., 1975). Auch durch Inkubation mit inaktiviertem FeLV konnte eine große Zahl an immunsuppressiven Reaktionen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich unter anderem um die Inhibition der Blastenbildung bei Lymphozyten (Hebebrand et al., 1977 und 1979), die *in vitro* Hemmung der Mitogen-induzierten Proliferation feliner Lymphozyten, der gemischten Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR), der IL-2-induzierte Proliferation von T-Zellen und der Stimulierung von B-Zellen (Oostendorp et al., 1993). Auch die Produktion von IFN- α und IFN- γ und die Antikörperproduktion humaner peripherer Blutlymphozyten konnten *in vitro* unterdrückt werden (Engelman et al., 1985, Liu et al., 1984). *In vivo* konnte durch inaktiviertes FeLV die Makrophageninfiltration und die Antikörperantwort gegen Zelloberflächenantigene gehemmt und die Tumorprogression nach Infektion mit einem Sarkom-Virus stimuliert werden (Oostendorp et al., 1993). Für inaktiviertes HIV-1 konnte *in vitro* ein ähnlicher immunsuppressiver Effekt induziert werden (Denner et al., 1994).

Für FeLV konnte erstmals gezeigt werden, dass das aufgereinigte Hüllprotein (p15E, 15kDa) in Katzen Suszeptibilität für FeSV (felines Sarkomavirus) hervorrufen und wichtige immunologische Funktionen hemmen kann (Haraguchi et al., 1997, Mathes et al., 1978 und 1979). Auch die transmembranen Hüllproteine von MuLV (murines Leukämievirus) und PMFV (permanentes humanes Fibroblastenvirus) zeigten *in vitro* eine hemmende Wirkung (Denner et al., 1986, Ikeda et al., 1975). Es konnte außerdem eine Interspezies-Reaktivität beobachtet werden: RLV (Rauscher Leukämievirus) und PMFV konnten murine und humane Lymphozyten hemmen, FeLV hemmte außer Lymphozyten der Katze auch die des Menschen und der Maus. Bei dem Versuch, die minimale Sequenz immunsuppressiver Peptide zu bestimmen, identifizierte man ein 17 Aminosäuren langes Peptid (CKS-17) mit starker immu-

suppressiver Wirkung (Cianciolo et al., 1985). Dieses Peptid liegt in einer 26 Aminosäure langen Sequenz des FeLV p15E, die in den Transmembranproteinen feliner, muriner, boviner und simianer Retroviren hochkonserviert vorliegt. Auch bei den HIV-1 Proteinen HIV-nef (Collette et al., 1996) und gp41 zeigt sich eine, wenn auch etwas geringere, Homologie (Cianciolo et al., 1984, Denner et al., 1994, Patarca et al., 1984). Synthetische Peptide, die von gp41 abgeleitet wurden, unterdrückten die T-Zellproliferation (Ruegg et al., 1989 und 1991, Wang et al., 1995, Denner et al., 1996). Die ISU-Domäne von HIV-gp41 liegt in direkter Nachbarschaft der immundominanten Region (AS 583-599) und somit am Ende der aminoterminalen helikalen Region in der Nähe der Loop-Struktur (Wain-Hobson et al., 1985; siehe 1.1.2). Alle ISU-Peptide haben jedoch nur dann immun-suppressive Wirkung, wenn sie an Trägermoleküle wie BSA oder KLH gekoppelt oder als Polymere vorliegen. Größe und Art des Trägerproteins spielen dabei keine Rolle (Denner et al., 1994).

Zielsetzung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, monoklonale Antikörper gegen die transmembranen Hüllproteine der Retroviren HIV und FeLV zu gewinnen. Dazu sollten Mäuse mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein p15E von FeLV und zwei synthetischen Peptiden, E1 und E2, die vom transmembranen Hüllprotein gp41 von HIV-1 abgeleitet wurden, immunisiert werden. Mittels Hybridomtechnik sollten monoklonale Antikörper gegen diese Antigene gewonnen und charakterisiert werden.

Da in vorausgehenden Immunisierungsstudien mit porzinen endogenen Retroviren (PERV) und feline Leukämievirus (FeLV) neutralisierende Antikörper gewonnen wurden, die gegen je zwei distinkte Epitopregionen im transmembranen Hüllproteinbereich gerichtet sind, sollten die monoklonalen Antikörper zum Verständnis des Mechanismus der Neutralisierung beitragen. Es ist noch offen, ob die E1- und E2-Regionen als Konformationsepitop erkannt werden, deshalb sollten Antikörper selektiert werden, die gegen E1, E2 und E1 und E2 gerichtet sind.

Die Klone sollten mittels ELISA mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein p15E von FeLV bzw. im Fall von HIV mit den gp41-abgeleiteten Peptiden E1 und E2 selektiert werden und auf neutralisierende Eigenschaften getestet werden.

Zum Nachweis neutralisierender FeLV-Antikörper sollte ein Real-Time-PCR-Test mit feline embryonalen Zellen (FEA) durchgeführt werden. Zusätzlich sollten Epitopkartierungen der Seren immunisierter Tiere und gegebenenfalls der monoklonalen Antikörper, mit überlappenden Peptiden durchgeführt werden.

Da das transmembrane Hüllprotein von gp41 in wässriger Lösung nicht löslich ist, sollten zur Induktion der Anti-gp41-Antikörper Peptide verwendet werden, die den Domänen E1 und E2 entsprechen. Die Domäne E2 enthält die Sequenz ELDKWAS, die das Epitop für den bei HIV-Infizierten gewonnenen neutralisierenden Antikörper 2F5 darstellt. Weltweit hat man bisher ohne Erfolg mit verschiedenen Strategien versucht, 2F5-ähnliche HIV-neutralisierende Antikörper zu induzieren. Ziel der Diplomarbeit war es deshalb auch, zu untersuchen, ob man durch Immunisierung mit den Peptiden E1 und E2 neutralisierende Antikörper induzieren kann. Das transmembrane Hüllprotein gp41 ist hochkonserviert, da viele Domänen eine wichtige Funktion bei der Infektion spielen, und stellt deshalb möglicherweise ein potentes Antigen für einen Impfstoff dar. Zur Charakterisierung gewonnener Antikörper aus Seren bzw. der Hybridomtechnik sollten Enzymimmuntests, Epitopkartierungen, Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenz durchgeführt

werden. Weiterhin sollte über Provirusnachweis in der Real-Time-PCR und Lumineszenzmessung von sekretierter alkalischer Phosphatase, die in CEMx174-SEAP-Zellen unter Einfluss eines SIV-Promotors steht und durch das virale Protein Tat transaktiviert wird, die Neutralisationseigenschaften etablierter Hybridome untersucht werden.

Im zweiten Teil der Diplomarbeit sollte ein rekombinantes Protein P15E von FeLV gewonnen werden, in dem die sogenannte immunsuppressive Domäne, der eine Funktion bei der Induktion der Immunsuppression zugeschrieben wird, deletiert ist. Dazu sollten mittels PCR der isu-Bereich und ein äquivalenter Bereich, der in der Konformation wahrscheinlich symmetrisch zur isu-Domäne angeordnet ist, deletiert werden. Das erhaltene Konstrukt sollte in das pCAL-n-Vektorsystem kloniert werden und im *E.coli*-System exprimiert werden. Danach sollte das Protein aufgereinigt und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Antikörper:

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin/FITC (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
 Ziege-Anti-Maus-Ig/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
 Ziege-Anti-Maus-IgM/Biotin (SBA=Southern Biotechnology Associates, Inc.,
 Birmingham, USA)
 Ziege-Anti-Maus-IgG1/Biotin (SBA)
 Ziege-Anti-Maus-IgG2a/Biotin (SBA)
 Ziege-Anti-Maus-IgG2b/Biotin (SBA)
 Ziege-Anti-Maus-IgG3/Biotin (SBA)
 Ziege-Anti-Maus-IgA/Biotin (SBA)

Kaninchen-Anti-Human Polyvalent Immunglobulin (whole molecule)-POD (Sigma-
 Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Ziege-Anti-Human-IgG (Fc specific) FITC Conjugate (Sigma, Taufkirchen,
 Deutschland)

2F5: Zur Verfügung gestellt durch das AIDS Research and Reference Reagent
 Program, Division of AIDS, NIAD, NIH: HIV gp41monoklonaler Antikörper (2F5) von
 Dr. H. Katinger) (Muster, et al., 1993)

Andere Materialien:

100bp DNA Ladder (Fa. Gibco BRL)
 1kbPlus Ladder (Fa. Gibco BRL, Großbritannien)
 BAKERBOND Abx 40 μ (Baker Chemikalien, Gross-Gerau, Deutschland)
*Bam*HI, *Eco*RI, *Not*I (New England Biolabs=NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
 BigDye-Mastermix (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Darmstadt,
 Deutschland)
 BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, LaJolla, USA)
 Bradford-Lösung (Bio-Rad, München, Deutschland))
 BSA (Serva, Heidelberg, Deutschland)
 DAB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
 DMEM (Invitrogen, Leek, Niederlande)
 dNTP Mix 10mM (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
E.coli B F⁻dcm ompT hsdS(rB⁻mB⁻) gal λ (DE3) OneShot[®] TOP10 (Invitrogen,
 Karlsruhe, Deutschland)
 ECL[™]Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience,
 Buckinghamshire, England)
 EGTA Ethylen-Glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N', -Tetraacetic acid (Sigma-
 Aldrich, Steinheim, Deutschland)
 Ethidiumbromidlösung (Sigma, Steinheim, Deutschland)
 Filme: CL-XPosure[™]Film (PIERCE, Illinois, USA)
 FKS (Hyclone /Perbio, Bonn, Deutschland)
 G418 /Genitacin(Invitrogen, Leek, Niederlande)
 Gentamycin (BioChrom, Berlin, Deutschland)
 HIV RTQ Taqman-Universal Mastermix (Applied Biosystems)
 Imject[®] Freund's adjuvans (PIERCE, Illinois, USA)
 IPTG (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Luminometerplatten (Optiplate™-96, Packard)
 NE-Puffer (NEB)
 Nunclon™ Surface Flachbodenplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
 Nunclon™ Surface Rundbodenplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
 OPD (o-Phenylenediamine Dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
 pCAL-n-Vektor (Stratagene, LaJolla, USA)
 PCR-Puffer (10fach mit MgCl₂) (Applied Biosystems, New Jersey, USA)
 Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin(10mg/ml) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
 Pepsot-Membran (Jerini, Berlin, Deutschland)
 Proteinase K (Invitrogen, Leek, Niederlande)
 RPMI (Invitrogen, Leek, Niederlande)
 SAP (Shrimp alkaline phosphatase) (usb, Cleveland, USA)
 SAP-Puffer (usb)
 T4-Ligase (NEB)
 T4-Puffer (NEB)
 Taq Polymerase AmpliTaq® Gold (Applied Biosystems, New Jersey, USA)
 Triton X-100 (Sigma, Steinheim)
 Trockenmilch (Fa. Sucofin, Zeven)
 Trypanblau 0,4% (Sigma, Steinheim)
 Trypsin (0,25%, Invitrogen, Leek, Niederlande)
 Zellkulturflaschen T25, T75 und T175, (TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA)

Kommerzielle Kits:

JetQuick-PCR-Purification-Kit (GENOMED GmbH, Bad Oeyenhausen, Deutschland)
 Phosphalight®-Kit (Tropix, Bedford, Massachusetts)
 ProLong® Antifade Kit (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
 QIAquick® Gel Extraction Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
 Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs)

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion liefert die Möglichkeit, spezifische DNS-Fragmente, ausgehend von geringen DNS-Ausgangsmengen, exponentiell zu vermehren. (Mullis, et al., 1986). Es findet eine zyklische Reaktion statt, die die DNS-Denaturierung, die Hybridisierung der Primer (Annealing) und die Kettenverlängerung (Elongation) umfasst.

Zunächst wird die Doppelhelix der Ausgangs-DNS (template) bei 95°C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Durch Absenken der Temperatur auf 45-60°C (primerabhängig) können dann kurze komplementäre Oligonukleotide (Primer), die 5' und 3' den zu amplifizierenden DNS-Bereich flankieren, an die Template-DNS binden. Eine thermostabile DNS-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert bei 72°C die Primer am 3'-OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Nukleosidtriphosphat (dNTP), unter Abspaltung von Pyrophosphat. So können große Mengen an gewünschter doppelsträngiger (ds) DNS hergestellt werden. Es können mittels PCR auch spezifische Restriktionsstellen für Endonukleasen an die zu amplifizierende Sequenz angefügt werden. Dies ist die Voraussetzung für das gerichtete Einbringen eines Amplifikats in ein Plasmid (siehe 3.3 Klonierung von p15E Δ isu).

Gradienten- PCR:

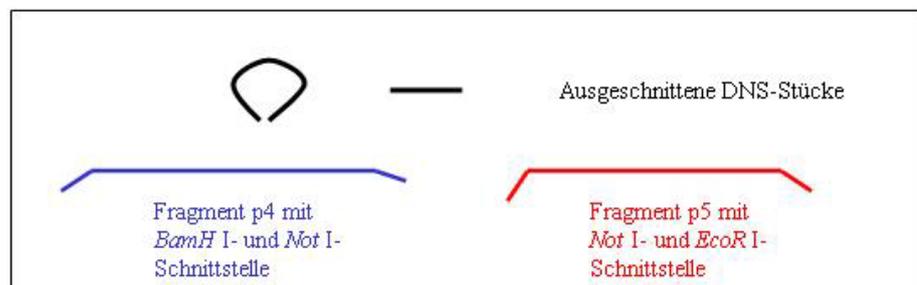
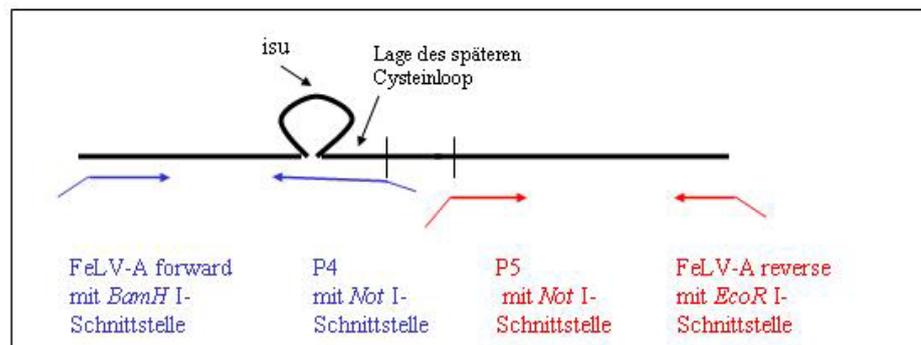
Für die Klonierung von p15E Δ isu wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimale Annealingtemperatur herauszufinden, die Fragmente 1 und 2 zu amplifizieren und Restriktionsstellen an diese anzufügen. Dazu wurden mehrere Ansätze mit demselben Template (pCAL-n p15E FeLV-A 1:10 -Verdünnung in Aqua bidest) bei verschiedenen Annealingtemperaturen amplifiziert.

Für Fragment 1 wurden als Primer1 FeLV-A forward (5'-GCGGATCCCTTGAAACAGCCCAGTTCAGACAA-3') und Primer2 p4 (5'-ATGCGGCCGCGCAACATTCTTCTTCAATGCGGCACAGAGTTCAGAAAGGGAGGT-3') eingesetzt (deshalb weiterhin als Fragment p4 bezeichnet). Für Fragment 2 wurde FeLV-A reverse (5'-CGGAATTCCCAGGGGGACTTGTTGAACCATCC-3') als Primer1 und als Primer2 p5 (5'-GCGCGGCCGCGCAACTAAACAGCGGCAACA-3') verwendet (deshalb Fragment p5).

Die Primer für Fragment p4 waren so ausgewählt, dass der FeLV forward Primer zu Amplifikation ab Basenpaar 94 führte und am Anfang des Fragments eine *BamH* I-Schnittstelle anhängte. Der p4-Primer setzte bei Basenpaar 288 an. Da hier „von hinten“ also in 3′-5′-Richtung amplifiziert werden musste, handelte es sich um einen „reverse complement“ Primer (d.h. die Sequenz liegt rückwärts und komplementär vor). Der Primer war weiterhin so entworfen, dass die Sequenz der p15E-Ektodomäne zwischen Basenpaar 258 und 205 nicht überdeckt wurde. Die DNS bildete hier bei der Amplifikation eine Schleife, so dass von Basenpaar 204 bis 190

weiter amplifiziert werden konnte. Auf diese Weise wurde die *isu* Sequenz (205-258) ausgeschnitten, der Cysteinloop

jedoch erhalten. Außerdem fügte Primer p4 eine *Not* I – Schnittstelle ein. Das Fragment hatte eine dementsprechende



Größe von 138 bp. **Abb.6 Schematische Darstellung der Lage der Primer und der PCR**

Für Fragment p5 war der Primer so ausgewählt, dass 3′ von der zu deletierenden Sequenz, also ab bp 342, amplifiziert wurde und am 5′-Ende eine *Not* I-Schnittstelle angehängt wurde. Der FeLV reverse Primer hybridisierte am 3′-Ende der p15E-Sequenz und war wieder ein „reverse complement“ Primer. Er fügte zudem eine *EcoR* I-Schnittstelle an.

Die Ansätze bestanden aus den folgenden Komponenten:

3µl Template
5µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂
1µl dNTPs
10 pmol Primer 1
10 pmol Primer 2
1µl Gold Taq-Polymerase
38 µl nukleasefreies Wasser

Für jedes Fragment durchliefen 8 Ansätze 45 mal die Polymerase- Ketten- Reaktion mit den folgenden Einstellungen :

12 Min. 95°C
01 Min. 95°C
01 Min. Gradient :50,8°C - 59,3°C
30 Sek. 72°C
07 Min. 72°C
bis zur Weiterverarbeitung 4°C

Der Gradient verlief dabei folgendermaßen:

50,8°C – 51,7°C – 52,4°C – 54,3°C – 56°C – 57,4°C – 58,5°C – 59,3°C

PCR zur Amplifikation von ligiertem p4-p5-Insert und zur Überprüfung von Minipräparationen

Um größere Mengen an Insert zu erhalten, wurde eine PCR durchgeführt, die das Insert als Template nutzte und so amplifizierte.

Ansatz:

3µl Template
5µl 10xPCR-Puffer (mit MgCl₂)
1µl dNTPs
10pmol FeLV forward Primer
10pmol FeLV reverse Primer
1µl Gold Taq
38µl H₂O bidest

PCR-Cycler Einstellungen:

12 min 95°C
1 min 95°C
1min 55°C
30sec 72°C
7min 72°C
bis zur Weiterverarbeitung 4°C

Aus Minipräparationen gewonnene DNS wurde nochmals in einer PCR mit den FeLV reverse und forward Primern eingesetzt, um die richtige Größe im Agarosegel ablesen zu können. Dabei wurden folgende Ansätze verwendet:

Mastermix:

2µl Template

2,5µl 10xPCR-Puffer (mit MgCl₂)

1µl dNTP

5pmol FeLV forward Primer

5pmol FeLV reverse Primer

0,5µl Taq Pol gold

18,5µl H₂O bidest

Die 25µl-Ansätze durchliefen nach 10 Min 95°C 45 mal den Zyklus 30 sec 95°C, 1 min 55°C, 30 sec 72°C. Zum Abschluss weitere 7 min bei 72°C und dann bis zur weiteren Verarbeitung 4°C.

2.2.2. Real-Time-PCR (RTQ-PCR)

Die Real-Time-PCR (quantitative Echtzeit-PCR) ermöglicht es, die PCR-Reaktion in allen Zyklen zu verfolgen. Die vorher beschriebene Polymerase-Kettenreaktion findet auch hier statt, es wird jedoch dem Reaktionsansatz zusätzlich eine fluoreszierende Hybridisierungssonde zugesetzt, die in diesem Fall aus einem Fluorochrom (5'-FAM-Reporter) und einem Quencher (3'-Dabcyl-Quencher) besteht. In ungebundenem Zustand erfolgt der Energietransfer vom Fluorochrom zum Quencher, der diese als Wärme abgibt bzw. wird die Fluoreszenz des Reporters durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Die Sonde hat eine höhere Schmelztemperatur als die Primer und bindet deshalb vorher an die Template-DNS. Wird die Polymerase aktiv, baut sie durch ihre 3'-5' -Exonucleaseaktivität die Sonde ab und setzt somit das Fluorochrom frei bzw. vergrößert den Abstand von Quencher und Fluorochrom so weit, dass die UV-Anregung nicht mehr unterdrückt wird und direkt durch den Deckel des Reaktionsgefäßes gemessen werden kann (Lee, et al. 1993). Die Fluoreszenz korreliert in beiden Fällen mit der Menge an ds DNS, die Zunahme an ds DNS kann also über die Fluoreszenzzunahme verfolgt werden.

Die Real-Time-PCR wurde bei den Neutralisationstests (2.5.3.) eingesetzt.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden Agarosegele verwendet. Es wurden je nach Größe der DNS-Fragmente 0,8 %ige (Fragmente über

1,5kb) bis 1,5%ige Gele (Fragmente unter 500bp) eingesetzt. Agarose wurde dazu in 1xTAE-Puffer gelöst, aufgeköcht und in eine Gelkammer gegossen. Die Proben wurden 1:10 mit 10x DNS-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Größe der Fragmente wurden 8µl 1kb⁺-Marker eingesetzt. Die Gele wurden einer gleichbleibenden Spannung von 5V/cm ausgesetzt.

Anschließend wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (5µg/ml) gefärbt. Der interkalierende Farbstoff lagerte sich in die DNS-Stränge ein und konnte unter UV-Licht bei 320 nm sichtbar gemacht werden.

Erfolgte danach eine Gelextraktion, wurde der gesamte Ansatz aufgetragen (Gradienten-PCR, PCR von p4+p5, Restriktion des pCaln-Vektors). Auch nach der Kolonie-PCR (2.2.8.) wurde der gesamte Ansatz aufgetragen, da er danach nicht mehr weiter benötigt wurde. Nach Minipräparationen (2.2.9.) wurde nur ein Aliquot eingesetzt, da der Ansatz ohne Gelelektrophorese weiterverwendet wurde.

2.2.4. Gelextraktion

Unter UV-Licht können DNS-Banden spezifischer Größen identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die DNS wurde dann aus dem Agarosegel mit dem QIA quick Extraction Kit extrahiert. Dazu wurde das Agarosegelstück in 3 Volumen QG-Puffer aufgenommen und bei 50°C und mehrmaligem Vortexen aufgelöst. Anschließend wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben und die Suspension auf eine QIAquick Spinsäule gegeben. Zum Beladen der Säule wurde eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Zum Waschen wurde mit 0,75ml PE-Puffer eine Minute bei der selben Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend die DNS durch Zentrifugation mit 30 bis 50 µl destilliertem Wasser eluiert.

Die Gelextraktion wurde zum einen verwendet, um die PCR-amplifizierten Fragmente von p4 und p5 bzw. die ligierten p4+p5-Fragmente wiederzugewinnen, zum anderen um den geschnittenen pCAL-n-Vektor von seinem ausgeschnittenen Insert zu trennen und wieder zu eluieren

2.2.5. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme erkennen spezifische DNS-Sequenzen an welchen sie die DNS zerschneiden. Es handelt sich dabei meist um palindromische Sequenzen und die hier ausgewählten Enzyme spalten diese Sequenz so, dass überhängende Enden (sticky ends) entstehen. Werden zwei DNS-Stücke mit dem selben

Restriktionsenzym verdaut, können sie an den klebrigen Enden hybridisieren und ligiert werden.

Der Vektor pCAL-n wurde hier mit den Enzymen *Bam*H I und *Eco*R I geschnitten. Die Inserts p4 und p5 wurden doppelt verdaut: Fragment p4 mit *Bam*H I und *Not* I und Fragment p5 mit *Eco*R I und *Not* I. So konnten die beiden Fragmente über die *Not* I-Schnittstelle in der richtigen Orientierung ligiert werden und dann wieder in definierter Richtung über *Bam*H I und *Eco*R I in den pCAL-n-Vektor ligiert werden.



Abb.7: Multiple Cloning Site des Vektors pCAL-n, eingezeichnet sind die verwendeten Restriktionsstellen *Bam*H I und *Eco*R I sowie die Lage des Calmodulin- Bindeproteins.

Für den Verdau der Fragmente wurden folgende Mengen eingesetzt:

- 1µl *Bam*H I bzw. *Eco*R I
- 1µl *Not* I
- 5µl 10fach NE-Puffer (mit *Bam*H I Puffer2, mit *Eco*R I Puffer3)
- 5µl BSA (10 fach konzentriert)
- 38µl extrahiertes Fragment 1 bzw. 2

Der Verdau erfolgte bei 37°C für 1 Stunde.

Der Verdau des FeLV-A pCAL-n-Vektors entsprach dem der Fragmentverdaue, es wurde jedoch 1µl *Bam*H I und 1µl *Eco*R I zugesetzt (kein *Not* I), der NE-Puffer2 wurde verwendet und 38µl des pCAL-n-Vektors wurden eingesetzt.

Aufreinigung von DNS mit dem PCR-Purification-Kit

Zum Aufreinigen von PCR-Produkten und restriktionsgeschnittenen Fragmenten wurde das auf Anionentauscher-Säulen chromatographie beruhende JetQuick-PCR-Purification-Kit verwendet. Zunächst wurden Lösung H1 und die DNS-Lösung 1:5 vermischt und zum Beladen auf einer JETQUICK Spinsäule für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Dann wurde die Säule mit der selben Menge Lösung H2 gewaschen, worauf die Elution der DNS mit 30 bis 50µl destilliertem Wasser durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 2 Minuten folgte.

SAP-Verdau:

Da bei einfach geschnittenen Vektoren eine große Wahrscheinlichkeit der Religation besteht, wurde ein Verdau mit dem Enzym SAP (shrimp alkaline phosphatase) durchgeführt. SAP entfernt die Phosphatgruppe am 5'-Ende des Vektors, eine Ligation ist dann nur noch mit den intakten Phosphatgruppen der Inserts möglich.

30 µl Ansatz
 20 µl verdauter und extrahierter pCAL-n-Vektor
 3µl 10fach SAP-Puffer
 2µl SAP
 5 µl H₂O bidest.

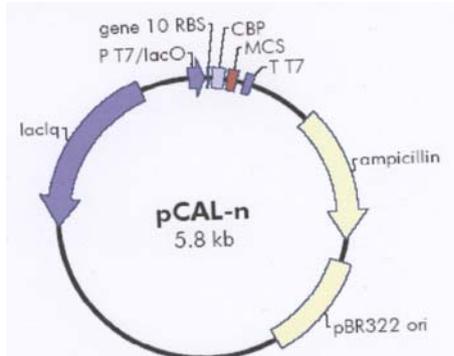
Der Verdau erfolgte 30 Minuten bei 37°C, danach wurde SAP durch 20 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.2.6. Ligation

Durch DNS-Ligasen wird ATP-abhängig eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet. Auf diese Weise können mit denselben Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren und Inserts zusammengefügt werden.

Für die Klonierung wurde der 5,8 kb große Vektor pCAL-n benutzt (Wyborski, et al, 1999). Auf diesem liegt der T7Gen10-Promotor unter Kontrolle des lac-Operators. Ohne Zugabe eines Induktors (wie IPTG) verhindert der Repressor des lac-Regulatorgens *lacI^q* die Transkription klonierter Gene, da die T7-RNA-Polymerase blockiert wird.

Außerdem enthält pCAL-n die ribosomale Bindestelle (RBS) des T7Gen10-Promotors, das Gen für das Calmodulin-Bindeprotein (CBP) und eine *multiple cloning site* (mcs) in die DNS-Stücke (Inserts) eingefügt werden können, da sie dazu



mehrere verschiedene Restriktionsschnittstellen enthält. Weitere Bestandteile des Vektors sind ein T7-Terminationssignal, ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien und pBR322 ori, der Startpunkt für die Replikation des Plasmids.

Abb.8: Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pCAL-n

Für die Ligation der Fragmente p4 und p5 und des pCAL-n -Vektors wurde entweder das Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs) verwendet oder eine Über-Nacht-Ligation durchgeführt. Zuerst wurden die Fragmente p4 und p5 ligiert. Erst danach wurde das komplette Insert (Δ isu FELV-A-Sequenz) mit dem pCAL-n-Vektor ligiert. Für die „schnelle Ligation“ wurden 50ng Vektor mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert versetzt.

Ligation der Fragmente:

20ng Fragment p4
20ng Fragment p5
11 μ l 2fach Quick-Ligation-Buffer
1 μ l Quick Ligase

Die Ligation erfolgte für 5 Min. bei Raumtemperatur, danach wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

Für die Über-Nacht Ligation bei 16°C für 16 Stunden wurde folgender Ansatz genutzt:

15ng Fragment p4
15ng Fragment p5
2 μ l 10fach T4-Puffer
1 μ l T4-Ligase
9,5 μ l H₂O bidest

Ligation von Vektor pCAL-n und Fragment p4+p5:

5 μ l Fragment p4+p5
1 μ l pCAL-n-Vektor
10 μ l 2xLigationspuffer
1 μ l Quick Ligase
3 μ l H₂O bidest

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bis zur Transformation auf Eis gelagert.

2.2.7. Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Plasmid-DNS in elektro- oder chemokompetente Bakterien. In diesem Fall wurden chemokompetente *E.coli* Top10 F' und BL21-CodonPlus(DE3)-RP- Zellen mit Plasmidvektoren transformiert.

Dazu wurden 2 bis 20 μ l des Ligationsansatzes, also Plasmid, mit 100 μ l auf Eis aufgetauten TopTen-Zellen vermischt und vorsichtig auf und ab pipettiert. Das Gemisch wurde 15 Min auf Eis gestellt und daraufhin für eine Minute einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Durch den Hitzeschock bilden sich Poren in der

Bakterienzellwand, durch welche die DNS aufgenommen werden konnte. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden 900µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Ampicillin) zugeben und der ganze Ansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, damit das durch das Plasmid eingebrachte Ampicillinresistenzgen abgelesen werden konnte. Die Kultur wurde dann für zwei Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und danach 900 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Das am Boden der Reaktionsgefäße befindliche Zellpellet wurde in den verbliebenen 100µl resuspendiert und mit einem Drigalskispatel auf Agarplatten mit Ampicillin (100mg/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.8. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente als erste Überprüfung, ob von den Agarplatten gepickte Klone das gewünschte Plasmid enthielten. Der initiale Denaturierungsschritt dauerte mindestens 10 Minuten, damit die Bakterienwand zerstört und die cytoplasmatische Plasmid-DNS freigelegt werden konnte.

Die PCR-Ansätze wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der DNA-Größe konnten positive Klone ausgewählt werden.

Für die Kolonie-PCR wurden Klone von den Ampicillin-Platten ausgewählt, mit einer sterilen Pipettenspitze angetupft und im fertigen PCR-Mastermix gedreht. Die Spitze wurde daraufhin in ein Kulturröhrchen mit 3ml LB-Amp-Medium (500µl von 100mg/ml Amp-Lösung in 500 ml LB-Medium) überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zusammensetzung des Mastermixes:

2,5µl 10fach PCR-Puffer (mit MgCl₂)

1µl dNTPs

1µl Primer FeLV-A forward

1µl Primer FeLV-A reverse

1µl Gold Taq Polymerase

18,5µl H₂O bidest.

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert:

12 Min. 95°C

1 Min. 95°C

1 Min. 55°C 40x

30 Sek. 72°C

7 Min. 72°C

bis zu Weiterverarbeitung 4°C

Im Agarosegel konnte anschließend ein erster Eindruck gewonnen werden, ob die Klone das gewünschte Plasmid enthielten. Für positive Klone wurde aus einer

angepflegten Über-Nacht-Kultur eine Minipräparation durchgeführt, um die DNA zu isolieren und dann in einen Expressionsstamm zu transformieren.

2.2.9. Minipräparation: Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab

Zur Plasmid-DNS Isolation wurde das Jetquick-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) eingesetzt. Zunächst wurde die Über-Nacht-Kultur eines gepickten Klons fünf Minuten bei 6000U/min zentrifugiert und das Medium verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 250µl Lösung G1 aufgenommen. Um die Zellen zu lysieren wurden 250µl Lösung G2 zugegeben und das Reaktionsgefäß 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Neutralisieren wurden 350µl Lösung G3 hinzupipettiert, das ganze bis zum Erreichen der Homogenität vermischt und dann 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde auf eine JETQUICK Spinsäule pipettiert und durch einminütige Zentrifugation auf diese geladen. Es folgte ein Waschschriff mit 500µl der Lösung G4 und anschließend konnte die Plasmid-DNS in 50 bis 75µl destilliertem Wasser eluiert werden (2 Min. bei 13000rpm).

2.2.10. DNS-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde die Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1cm) bei den Wellenlängen $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ bestimmt. Eine Extinktion $E_{260}=1,0$ entspricht dabei einer Konzentration von 50µg/ml ds DNS. Mit dem Wert für 280nm wurde der Proteinanteil der Probe bestimmt. Bei einer Ratio von $260/280\text{nm} \geq 1,9$ liegt nahezu reine Nukleinsäurelösung vor.

Zur Messung des DNS-Gehalts von Minipräparationen wurde die Probe 1:40 in destilliertem Wasser verdünnt.

2.2.11. DNS-Sequenzierung:

Die DNS-Sequenzierung erfolgte hier nach dem Sanger-Prinzip (Sanger, et al., 1977) in dem eine PCR mit zusätzlichen veränderten Nukleotiden durchgeführt wird. Normalerweise werden zu einer PCR dNTPs zugesetzt (Desoxy-Nukleosidtriphosphate) die zur Elongation eines neuen DNS-Strangs eingebaut werden. Die veränderten ddNTPs (Dideoxy-Nucleosidtriphosphate) besitzen kein

freies 3'OH-Ende, das als Ansatzstelle für die Verlängerung dient, sondern ein Wasserstoffatom. Deshalb wird, wann immer ein ddNTP eingebaut wird, die Polymerase-Kettenreaktion abgebrochen. Statistisch gesehen liegt am Ende der PCR für jede Base ein entsprechend gekürztes DNA-Stück vor. Die vier unterschiedlichen ddNTPs (entsprechend der vier Nukleotide Adenosin, Guanosen, Thymin und Cytosin) werden mit verschiedenfarbig fluoreszierenden Farbstoffen markiert. So können in einem feinmaschigen Polyacrylamidgel die verschiedenen PCR-Abbruchprodukte aufgetrennt werden und die Sequenz abgelesen werden. In diesem Fall wurden markierte ddNTPs im ABI BigDye 3.1-Mastermix verwendet.

Durch die Sequenzierung konnte überprüft werden, ob von transformierten Zellen aufgenommene Plasmide die richtigen Inserts tragen.

Reaktionsansatz 10µl ½-Ansatz:

200ng Plasmid

5pmol Primer

2µl BigDye 3.1

1µl 5x Puffer

auf 10 µl mit HPCL-Grade H₂O auffüllen.

Es wurden jeweils zwei Ansätze hergestellt, von dem einer den T7-Terminator-Primer und einer den Primer T7-Promotor zugesetzt bekam. Die Ansätze wurden dann unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

2 Min 96°C

10 Sek 96°C

5 Sek 48°C

4 Min 60°C

∞ 4°C

2.2.12. Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Zum Immunisieren der Mäuse wurde rekombinantes FeLV p15E verwendet, das in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 kloniert worden war.

Die Expression des entsprechenden Gens wird durch einen Lactose-abhängigen Promotor gesteuert und ist folglich durch Lactose oder das Substratanalogon IPTG (Isopropylthiogalaktopyranosid) induzierbar.

Zur Expression von rekombinantem p15E Δ isu wurden 500 µl einer Über-Nacht-Kultur in 500 ml LB Medium überführt und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus 800 µl der Kultur und 200 µl Glycerol wurden Glycerolstocks angesetzt und bei – 80°C eingefroren.

Nach etwa 3 Stunden zeigte eine O.D. (600nm) von 0,5 Wachstum in der log-Phase, also exponentielles Wachstum, an. Es wurde 1mM 1000x IPTG zur Induktion der

Expression und 50 µg/ml Ampicillin zur Selektion zugegeben. Nach Inkubation für 2,5 Stunden bei 37°C im Schüttler wurde die Kultur 20 Minuten bei 4°C und 20.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ein Teil der Pellets wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20°C eingefroren.

Um das exprimierte rekombinante Protein zu reinigen, musste die gram negative Zellwand von *E.coli* zerstört werden. Dies wurde sowohl mechanisch durch Ultraschall als auch enzymatisch durch Lysozym erreicht (Jolles, 1969).

Entstandene Pellets wurden dazu in 40 ml CaCl₂-Bindepuffer resuspendiert und 20 min bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Zellsuspension wurde dann in ein Falconröhrchen überführt und 3 Minuten auf Eis mit Ultraschall behandelt (50% duty cycle, output control 5). Daraufhin wurde für 30 Minuten bei 20.000 U/min zentrifugiert und der Überstand über Nacht auf eine Calmodulinsäule geladen. Die affinitätschromatographische Auftrennung erfolgte wie in Punkt 2.3.1.1 beschrieben.

Lag das rekombinante Protein in unlöslicher Form vor, wurde das Pellet fünfmal mit 40ml PBS gewaschen um lösliche *E.coli*-Proteine zu entfernen. Dann wurde das Pellet auf einer Glasplatte getrocknet und zu feinem Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde mit PBS in Suspension gebracht und auf SDS-Gele aufgetragen.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Affinitätschromatographie

2.3.1.1. CBP-Affinitätschromatographie

Wird die DNS rekombinanter Proteine in ein Plasmid, das auch für das Calmodulin-Bindeprotein (CBP) kodiert, kloniert (siehe Ligation Abschnitt 2.2.6.), so entstehen nach der Expression Fusionspeptide, die über eine Calmodulinsäule aufgereinigt werden können. Als Säulenmaterial wurde in diesem Fall eine Sepharosematrix verwendet, an die kovalent Calmodulin (Stratagene) gebunden wurde. In Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen verbleibt das Fusionsprotein durch Bindung des N-terminalen CBP-Tags an Calmodulin (Stofko-Hahn, et al., 1992, Carr, et al., 1991) in der Säule, während andere Proteine ausgewaschen werden können. Durch Zugabe von EGTA wird Ca²⁺ chelatisiert, die Bindung zwischen CBP und Calmodulin löst sich

und das rekombinante Protein wird eluiert. Zur Regeneration wurde die Säule mit je 100ml Regenerationspuffer I – III gespült und danach in CaCl_2 -Puffer gelagert. Eine regenerierte Calmodulinsäule wurde über Nacht mit Proteinlysat beladen. Am nächsten Tag wurde mit 10 Säulenvolumen CaCl_2 -Bindepuffer gewaschen und schließlich mit Elutionspuffer das rekombinante Protein von der Säule gelöst. Es wurden 20 1ml-Fractionen gesammelt und auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Fractionen, die im Bradford-Test positiv reagierten, wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und daraufhin wurde der Proteingehalt der Gesamtlösung gemessen.

2.3.1.2. Affinitätschromatographie mit p15E gekoppelt an Sepharose 4B

Für die Affinitätschromatographie von p15E-bindenden Antikörpern aus Serum wurde rekombinantes p15E an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) gekoppelt und in eine Säule gefüllt. Das aufzureinigende Serum wurde über Nacht im geschlossenen Kreislauf auf die Säule geladen. Antikörper aus dem Serum, die p15E binden, verbleiben in der Säule, alle anderen Antikörper und Proteine wurden am nächsten Tag durch Spülen mit 5 Säulenvolumen PBS ausgewaschen. Mit einem Gradienten von 150mM bis 2M NaCl in PBS wurden die Antikörper eluiert und in 15 1ml-Fractionen gesammelt. Zur Bestimmung der Konzentration erfolgte ein Bradford-Test (siehe 2.3.2.).

Die p15E-Sepharosesäule wurde zur Regeneration dreimal alternierend mit Regenerationspuffer I und II gespült und danach in PBS mit 250 μM AEBSF (Pefabloc SC) äquilibriert.

2.3.1.3. Antikörperaufreinigung über ProteinG

Protein G ist ein Zellwandprotein von Streptococcus mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. Im Montage Antibody Purification_{PROSEP-G} Kit ist rekombinantes Protein G, von dem die Albuminbinderegion entfernt wurde, an porösem Glas immobilisiert. Protein G bindet spezifisch an die Fc-Region der Antikörper vieler Säuger, so auch an Maus IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ und Ziegen IgG.

Antikörperhaltige Seren wurden direkt vor der Aufreinigung sterilfiltriert (0,22 μm Filter) und 1:1 v/v mit Bindepuffer A verdünnt. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 126xg (=1ml/Min) wurde die Protein G-Säule beladen. Immunglobuline wurden von Protein G gebunden und in der Säule zurückgehalten. Alle anderen Proteine sammelten sich im Durchlauf und konnten verworfen werden. Nach einem

Waschschrift (5 min bei 500xg mit Bindepuffer A) wurden die Antikörpermoleküle mittels erniedrigtem pH eluiert (10 ml Elutionspuffer B2 (pH2,5) 10 min bei 500xg). Um eine Denaturierung der Antikörpermoleküle zu vermeiden, wurden die IgG direkt in 1,3ml Neutralisationspuffer C aufgefangen. Da die Säule mehrmals vor dem Eluieren beladen wurde, erfolgte schon hierdurch eine Aufkonzentration. Zusätzlich wurden gesammelte Eluate in Centricon®Plus-80 (Amicon Bioseparations, Millipore) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert.

2.3.1.4. IgM-Aufreinigung über BAKER Bond Ab^x-Säulen

Immunglobuline der Klasse M liegen als Pentamere vor und denaturieren leicht. Sie binden nicht an ProteinG oder ProteinA, das zur Aufreinigung von IgG ein gut etabliertes System bietet. Deshalb wurde eine Bakerbond ABxTM Plus-Säule verwendet. Es handelt sich hierbei um einen gemischten Kationentauscher auf Silikatbasis. An diesen Tauscher binden nicht nur Immunglobuline, sondern auch andere Proteine, IgM wird jedoch bevorzugt gebunden und somit angereichert. Eluiert wurde mittels Schockelution (hohe Salzkonzentration).

Zunächst wurden 100 – 150ml Kulturüberstand 1:1 (v/v) mit MES-Puffer gemischt und filtriert. Danach wurde eine Bakerbond ABxTM –Säule bei einer Durchflussrate von 1ml/min beladen. Nach dem Beladen wurde die Säule mit 30ml MES-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde durch 1M NaAcetat die Salzkonzentration so verändert, dass sich die Bindung der IgM löste. Durch Messung der optischen Dichte bei 280nm konnten die proteinhaltigen Fraktionen schon während der Elution identifiziert werden und zwei 2ml-Fraktionen gesammelt werden. Anschließend wurde die Säule mit 2M NaAcetat regeneriert.

2.3.2. Bradford-Test

Der Bradford Test ermöglicht die Bestimmung der Proteinmenge einer Lösung. Bindet Coomassie brilliant blue G-250 an Seitenketten von Proteinen, induziert es einen Wechsel der Absorption des Reagens von einer Wellenlänge von 495 nm zu 595 nm. Der Anstieg der Absorption wird zur Bestimmung der Konzentration des gebundenen Proteins genutzt (Bradford, 1976).

Hier wurde der Bradford Assay genutzt, um die Konzentration verschiedener exprimierter Proteine nach der Elution zu bestimmen. Dazu wurden 4 µl der

Proteinlösung mit 196 µl Bradford-Lösung (Bio-Rad) vermischt und mit den Standardwerten für BSA (200-1200 µg/ml) ins Verhältnis gesetzt. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzreader bei 560 nm.

2.3.3. SDS-PAGE (Tricine System)

Die SDS-(Sodiumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Proteinen (Schagger et al., 1987). Durch Mercaptoethanol, SDS und Hitze werden Proteine denaturiert und ihre Schwefelbrücken gespalten. Zugewetztes SDS komplexiert mit Proteinen in einem konstanten Verhältnis, deshalb ist die Anzahl negativer Ladungen proportional zur Größe des Proteins. In einer porösen Polyacrylamidmatrix werden die SDS-Proteinkomplexe dann gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Hier wurde die SDS-Page zur Charakterisierung aufgereinigter IgM-Proben, für den Western Blot und zur Untersuchung von exprimiertem p15E Δ isu eingesetzt.

Die eingesetzten Gele waren 1,5mm stark und 10-14%ig, als Sammelgel wurde stets ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet. Zur Abschätzung des Molekulargewichts dienten 10µl SeeBlue[®] Plus2-Marker (Invitrogen) als Massenstandard. Zur Auftrennung wurden die Gele 30 min bei 60V und eine Stunde bei 110V in Hoefer SE250(minivertical) Gelapparaturen eingesetzt.

Die Gele der aufgereinigten Antikörper und delta isu-Proteine wurden nach der SDS-PAGE für eine Stunde in Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung gelegt und zum Entfärben mehrere Stunden in Entfärbelösung geschwenkt. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (Gel Doc 2000 von BioRad) und mit Dry Easy[™] Minicellophan (Invitrogen) konserviert.

Für den Western Blot wurden die Gele erst nach dem Blotten in Coomassie-Färbelösung gebracht, um zu überprüfen wie viel Protein im Gel verblieben war.

2.4. Hybridomtechnik

Die Hybridomtechnik diente hier zur Gewinnung muriner monoklonaler Antikörper. Durch dieses Verfahren können spezifische Antikörper angereichert werden und Effekte direkt auf ein bestimmtes Epitop, welches der Antikörper erkennt, bezogen werden. So könnte die Theorie zur Neutralisation durch Bindung von Antikörpern an die E2-Domäne durch Unterstützung der E1-Domäne bestätigt werden bzw. der Mechanismus der Neutralisation von verschiedenen Retroviren geklärt werden.

2.4.1. Immunisierung von Balb/c- Mäusen

Zur Herstellung von Hybridomen wurden 9 Balb/c-Mäuse intraperitoneal immunisiert. Allen Mäusen wurden zunächst 100µg Antigen in 100µl PBS mit Freundschem Adjuvans (FA) (v/v 1:1), injiziert. Nach 21 Tagen erfolgte der erste Boost mit 100µg Antigen und 1:1(v:v) FA. Der zweite Boost erfolgte 42 Tage später und der dritte Boost wurde 25 Tage vor der Fusion durchgeführt; beide Male mit 500µg Protein und 1:1 (v:v) IFA. 4 Tage vor der Fusion wurden ein letztes Mal 500µg Antigen ohne Adjuvans injiziert.

Zwischen dem ersten und zweiten Boost wurde Blut zur weiteren Untersuchung entnommen (Boostblut). Außerdem war allen Mäusen vor der Immunisierung Blut abgenommen worden. Das daraus gewonnene Präimmunserum wurde in verschiedenen Tests als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

Antigen	Sequenz	Ursprung	Tiere
FeLV p15E	LETAQFRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSE VVLQNRRLDILFLQEGGLCAALKEECCFYADHTG LVRDNMAKLRERLQKRRQLFDSQQGWFE GWFNK SPWF	<i>E.coli</i> (mit CBP- Tag) RKI	3 Balb/c- Mäuse
PERV p15E	LITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEES LTSLSEVVLQNRRLDILLFLKEGGLCVALKEECCF YVDESGAIRDSMSKLRERLERRRREREADQGWFE GWFN	<i>E.coli</i> (mit CBP- Tag) RKI	3 Balb/c- Mäuse
HIV gp41 E1 und E2	E1:LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSC E2:CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL	Peptidsynthese (Jerini, Berlin, Deutschland)	3 Balb/c- Mäuse

Tabelle 2: Ursprung und Sequenzen der eingesetzten Antigene und Anzahl der Versuchstiere

2.4.2. Gewinnung von Feederzellen (Ammenzellen)

Feederzellen unterstützen das Wachstum von Hybridomzellen durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und durch Phagozytose abgestorbener Zellen. Es handelt sich dabei um Phagozyten aus der Bauchhöhle von Säugetieren.

Feederzellen wurden in den besonders empfindlichen Stadien verwendet: direkt nach der Fusion, nach dem Auftauen von Hybridomen und bei der Reklonierung.

Zur Gewinnung von Feederzellen wurde eine Balb/c-Maus durch Zervikaldislokation oder mittels Trockeneis getötet und die Bauchdecke freigelegt. 5 ml gekühltes RPMI 1640 wurden in die Bauchhöhle gespritzt und mit einer sterilen Pinzette einmassiert. Die Zellsuspension wurde abgesaugt und in ein steriles gekühltes Röhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die gewonnenen Feederzellen dann mit Vollmedium auf das benötigte Volumen aufgefüllt. Um eine mögliche bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde dem Medium Gentamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Feederzellen wurden im gleichen Volumen wie die später zugefügte Zellsuspension vorgelegt (z.B. 100µl Feederzellen und 100µl Hybridome).

2.4.3. Präparation der Milzzellen

Eine immunisierte Maus wurde durch Trockeneis oder Zervikaldislokation getötet und die Milz wurde präpariert. Das Organ wurde entnommen und in eine sterile Petrischale mit 5ml RPMI 1640 überführt. Nach dem Aufschneiden der Bindegewebshülle war es möglich, die Milzzellen mit einem Spatel aus dem Milzschlauch zu streichen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein steriles Röhrchen überführt und mit der Suspension vereinigt, die durch das mehrmalige Ausspülen der Petrischale mit RPMI 1640 entstand. Ein Fünftel der Milzzellsuspension wurde zum Anlegen einer Milzkultur mit 15 ml Vollmedium in eine Zellkulturflasche überführt. Die verbleibenden vier Fünftel wurden nach einer Zentrifugation (10 Min. bei 1000U/min) dreimal mit 10 ml BSS-Fusionspuffer gewaschen (Zentrifugation bei 1000U/min für 10 Min.) und für die Zellfusion verwendet.

2.4.4. Gewinnung der Myelomzellen

Die verwendete Myelomzelllinie Sp2/0 stammt aus einem B-Zelltumor von Balb/c-Mäusen. Sp2/0-Zellen können selbst keine Antikörper produzieren und haben einen Defekt im HGPRT-Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen).

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bzw. bei -80°C gelagert und einige Tage vor der Fusion aufgetaut und in Zellkulturflaschen angezogen. Zur Zellfusion wurden die Zellen geerntet und ebenfalls durch Zentrifugation (10 Min. bei 1000U/min) dreimal mit 10 ml BSS- Fusionspuffer gewaschen.

2.4.5. Elektrofusion

Vor dem letzten Waschschrift wurde sowohl die Zellzahl der Milz- als auch der Myelomzellen in Neubauer-Zählkammern bestimmt. Um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt.

Für die Elektrofusion (Stoicheva et al., 1994) wurden Milz- und Myelomzellen im Verhältnis 3:1 bzw. 10:1 gemischt. Dann wurden 170 μl Zellsuspension (z.B. 12×10^7 Milzzellen und 4×10^7 Myelomzellen) 1:1 (v/v) mit autoklavierter PEG8000-Lösung (0,25mg/ml in BSS-Fusionspuffer) gemischt. Die Suspension wurde in eine Fusionsküvette überführt (Elektrodenabstand 0,2cm, BIO-RAD, Hercules, USA) und einem 20 μs langen Spannungsimpuls ausgesetzt. Die Fusion wurde in dem Elektrofusionsgerät EPI 2500 (Fa. Fischer, Heidelberg, Deutschland) mit den Parametern Spannung 640V, Impulslänge 20 μs , Kondensator 100 μF und Parallelwiderstand 5 Ω durchgeführt. Die fusionierten Zellen wurden dann in eine Zellkulturflasche mit 50 ml Fusionsmedium übertragen. Vom Zeitpunkt des Zusammenpipettierens der Zellen mit PEG8000 bis zur Überführung der Zellen in das Fusionsmedium sollten immer 3 Minuten verstreichen.

Nach zwei bis drei Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden weitere 30 ml Fusionsmedium und 3,2ml Azaserin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben. Dann wurde die Zellsuspension auf acht 96Well-Platten, mit je 100 μl Feederzellen pro Napf, ausplattiert. Waren mehrere Fusionen gleichzeitig zu betreuen, wurden nur zwei 96Well-Platten befüllt und die restliche Zellsuspension in Zellkulturflaschen überführt. Nach der HAT-Selektion konnten die Zellen aus den Flaschen zunächst eingefroren werden und bei Bedarf aufgetaut und weiter gescreent werden.

Für eine erfolgreiche HAT-Selektion wurden die Zellen drei Tage nach der Fusion nochmals mit HAT-Medium versetzt, danach wurden die Hybridomas in Vollmedium gehalten.

2.4.6. Reklonierung

Im ELISA positiv getestete Klone wurden rekloniert, um einzeln wachsende, stabile Hybridomklone zu erhalten. Auch bereits etablierte Klone wurden in einem Abstand von 30 Tagen rekloniert, um eine konstante Produktion von Antikörpern zu gewährleisten.

Zum Reklonieren wurden Zellen im Napf suspendiert und anhand eines Aliquots mit Trypanblaufärbung die Zellzahl bestimmt (siehe 2.6.1.). Es wurden 300 Zellen pro 96Well-Platte ausgesät. Da damit zu rechnen ist, dass 1-2 Zellen pro Well absterben, besteht so eine große Wahrscheinlichkeit, dass die wachsenden Klone monoklonal, also alle Zellen durch Teilung aus einer einzigen Zelle entstanden, sind.

Nach einer Woche konnten die Hybridomklone im Lichtmikroskop visuell beurteilt werden. Sichtbare Klone wurden im Enzymimmuntest untersucht und bei weiterhin positivem Ergebnis in 24Well-Platten erweitert.

2.4.7. Einfrieren und Auftauen muriner Hybridome

Wie bei allen Zellen, die in Kultur gehalten werden, werden auch bei Hybridomen Sicherheitseinfrierungen vorgenommen. Im Falle einer Kontamination o.ä. können nicht kontaminierte Proben aus der Langzeitlagerung aufgetaut werden. Zudem können momentan nicht benötigte Hybridome so über lange Zeit verwahrt werden.

Zum Einfrieren wurde das gesamte Medium eines Klons einer 24Well-Platten abgenommen und die Zellen mit 500µl frischem Vollmedium vom Plattenboden abgespült und suspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt und mit 500µl Einfriermedium versetzt. Die Röhrchen wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert, auf Eis gestellt und dann in einer dickwandigen Styroporkiste in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Durch die Isoliereigenschaft des Styropors wird die Temperatur langsam und stetig abgesenkt (ca. 1°C pro Stunde). Zusammen mit dem zugesetzten DMSO hat dies den Effekt, dass sich keine Eiskristalle in den Zellen bilden. Das Einfrieren aus Zellkulturflaschen erfolgte prinzipiell genauso. Die abgespülten Zellen aus einer 150cm²-Flasche wurden abzentrifugiert (1500 U/min,

5 Min.), in 1 bis 1,5 ml Vollmedium aufgenommen und in zwei bis drei Kryoröhrchen eingefroren.

Das Auftauen der Hybridomzellen sollte möglichst schnell erfolgen, da das Zellgift DMSO bei Raumtemperatur toxisch wirkt. Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml vorgewärmtes Vollmedium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 U/min für 6 Minuten wurde der Überstand (der das DMSO enthielt) verworfen und das Zellpellet in 1ml Vollmedium aufgenommen. Die Hybridomas wurden dann in den Napf einer 24Well-Platte bzw. eine 75cm²-Zellkulturflasche mit Feederzellen überführt oder zur Reklonierung in einer 96Well-Platte verteilt.

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. Enzymimmuntests (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)

2.5.1.1. HIV- Enzymimmuntest

An die feste Phase einer proBind-96Well-Platte wurden 100ng Peptid E1 bzw. E2 oder 50ng E1 und 50ng E2 in 100 µl destilliertem Wasser pro Napf über Nacht bei 37°C adsorbiert. Alle weiteren Inkubationen erfolgten für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Zunächst wurden mit 10% FKS/PBS (200µl/Napf) freie Bindungsstellen blockiert und dann 50µl pro Napf unverdünnter Kulturüberstand bzw. Serumverdünnungen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-markierten Anti-Maus-Antikörper, der nach Empfehlung des Herstellers in 10% FKS/PBS verdünnt wurde. Dann wurden 50µl OPD-Lösung (c=1mg/ml) aufgetragen, für 10 bis 20 Minuten im Dunklen inkubiert und anschließend die Reaktion mit 50µl 5N H₂SO₄ abgestoppt. Die Farbentwicklung wurde im Fluoreszenzmessgerät bei 492nm und 620nm als Referenz gemessen

Als Positivkontrolle wurde bei jedem Test der humane monoklonale Antikörper 2F5 (0,2µg/ml in PBS/10%FKS) mitgeführt. Bei diesem Antikörper ist bekannt, dass E1 nicht, E2 stark und die Kombination der Peptide (E1+E2) synergistisch erkannt wird. Als Negativkontrolle diente PBS anstatt des Primärantikörpers.

Außer auf die Peptide E1 und E2 wurde auf das Protein FeLV p15E getestet, da es einen ähnlichen Aufbau hat und so ein sensibles Screening ermöglicht. Zudem

wurde auf Bindung an Proteine wie BSA, FKS oder an Plastik getestet, um von vornherein unspezifische Antikörper auszusortieren.

2.5.1.2. FeLV- Enzymimmuntest

Etablierung eines Screening-Tests für Antikörper gegen FeLV p15E

Zum Nachweis von Antikörpern gegen p15E wurde ein Enzymimmuntest etabliert. Da p15E ein kleines Protein (15kDa) ist, wurde das Nachweissystem nach dem Sandwichprinzip aufgebaut. Zunächst wurden Verdünnungen eines mittels ProteinG-Affinitätschromatographie aufgereinigten Anti-FeLV p15E-Ziegenserums und des Peptids FeLV p15E hergestellt. Das polyklonale Serum wurde in einer 96Well-Platte ausgehend von 1µg/µl jeweils 1:1 mit 2,5% BSA/PBS bis auf 7,8ng/µl verdünnt. In einer weiteren Platte wurde p15E von einer Ausgangskonzentration von 5µg/µl in PBS bis auf 0,002ng/µl verdünnt. Nach zweistündiger Adsorption der Immunglobuline an die feste Phase einer proBind-96Well-Platte wurden freie Bindungsstellen mit 5% BSA/PBS für 1 Stunde blockiert. Danach wurde die p15E -Verdünnungsreihe übertragen. Als Probe diente ein bereits in anderen Tests positiv bewertetes Rattenserum, das mit Anti-Ratte-IgG-POD detektiert wurde (Vorgehensweise siehe unten).

Die Platten wurden bei 492nm/620nm gemessen.

Außerdem wurde ein Test auf Kreuzreaktivität zwischen den an der festen Phase adsorbierten Immunglobulinen und dem Sekundärantikörper Kaninchen-Anti-Ratte-POD bzw. Ziege-Anti-Maus-POD durchgeführt. Dazu wurden mittels ProteinG-Affinitätschromatographie aufgereinigte Ziege-Anti-FeLV p15E-Antikörper, nach dem Blocken mit BSA/PBS, direkt mit dem Sekundärantikörper inkubiert und die Fluoreszenz gemessen.

FeLV-p15E-Antikörper -ELISA

Zur Untersuchung der Antikörper aus Serum und Hybridomtechnik wurde letztlich dieser Enzymimmuntest verwendet:

- Adsorption an der festen Phase: 500ng Ziege-anti-p15E-Ak in 50µl PBS, 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C
- Blocken: 100µl 5%BSA in PBS, 1Stunde bei RT
- Antigen p15E: 150ng in 50µl PBS, 1 Stunde bei RT
- Probe: Kulturüberstand unverdünnt bzw. zu testendes Serum (1:1000 in 2,5%BSA), 50µl, 1Stunde RT
- Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus-POD 1:2000 in 2,5%BSA in PBS, 50µl, 1 Stunde bei RT

- Substrat: OPD-Lösung (1mg/ml), 50µl, Inkubationszeit variabel
- Stopplösung: 5N H₂SO₄, 50µl

Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Platte dreimal bzw. nach dem Sekundärantikörper sechsmal mit PBS-Tween (0,1%) gewaschen. Es wurde immer auch ein positiv bewertetes Serum und PBS anstelle des Primärantikörpers als Kontrolle mitgeführt. Es konnte so überprüft werden, ob der Test selbst funktioniert hatte und die unspezifischen Hintergrundwerte konnten bestimmt werden.

2.5.1.3. Subklassentest

Zur Bestimmung der Klasse und Subklasse von Antikörpern wurden Überstände von ausgesuchten Hybridomen in einem indirekten Enzymimmuntest mit den jeweiligen Subklassen spezifischen Antikörpern inkubiert.

Eine 96Well-Platte wurde mit den von HIV abgeleiteten Peptiden E1 und E2 beschichtet (jeweils 50ng/100µl destilliertem Wasser, bei 37°C über Nacht). Das Blocken der freien Bindungsstellen erfolgte mit 200µl PBS/10%FKS. Es wurden 50µl der zu untersuchenden Proben aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Subklassen-spezifische Antikörper ZAMAK-IgG1, -IgG2a,-IgG2b,-IgG3,-IgM,-IgA/Biotin (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) verdünnt in PBS/10%FKS nach Empfehlung des Herstellers (50 µl/Napf) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt wurden je 50µl eines Streptavidin-POD Konjugates (Verdünnung nach Herstellerangaben in PBS/10%FKS) aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 50µl Substratlösung (TMB-Lösung) aufgetragen. 20 Minuten später wurde die enzymatische Reaktion durch Auftragen von 50µl 1M H₂SO₄ gestoppt und die Proben bei 450 nm gemessen.

Für FeLV-Kulturüberstände wurde ein entsprechender Subklassentest durchgeführt. Es wurde FeLVp15E an die feste Phase einer 96Wellplatte immobilisiert, mit PBS/FKS(10%) geblockt, die Kulturüberstände wurden aufgetragen und mit biotinylierten subklassenspezifischen Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte wie für HIV-Kulturüberstände mit Streptavidin-POD und TMB-Substrat.

2.5.1.5. Kompetitions-ELISA

Um zu überprüfen, ob die Antigene die Bindung der Antikörper blockieren können, wurde ein Kompetitions-ELISA durchgeführt.

Dazu wurde eine Ausverdünnung von Kulturüberstand und aufgereinigten Antikörpern hergestellt und die resultierende Titer-Kurve logarithmisch aufgetragen. Für den weiteren Versuch wurde eine Verdünnungsstufe aus dem linearen Bereich ausgewählt. Im gesättigten Bereich liegt eine so große Menge an Antikörper vor, dass selbst nach der Inkubation mit kompetitivem Antigen noch ausreichend Immunglobuline ungebunden vorliegen, um mit dem an der festen Phase immobilisierten Antigen eine deutliche Reaktion zu zeigen.

Als nächster Schritt wurde eine Antigenausverdünnung hergestellt (1 µg bis 0,001 ng in PBS). 25 µl dieser Verdünnung wurden mit 25 µl der zuvor ausgewählten Antikörperverdünnung 15 Min. vorinkubiert und dann als Probe im zuvor beschriebenen HIV-ELISA (Absatz 2.5.1.1.) eingesetzt.

Als Kontrolle wurden 25 µl Probe mit 25 µl PBS/10%FKS inkubiert.

2.5.2. Western Blot

Der Western Blot kann zur sensitiven und spezifischen Detektion von Proteinen genutzt werden. Zudem gibt er Aufschluss darüber, was für eine Art von Epitop von Antikörpern erkannt wird. Nach der Denaturierung von Protein in der SDS-Page können in der Regel nur noch lineare, kontinuierliche Epitope (also zusammenhängende Aminosäuresequenzen) von Antikörpern erkannt werden. Diskontinuierliche Konformationsepitope können nur unter nicht denaturierenden Bedingungen detektiert werden.

Ein Western Blot besteht aus der SDS-Page, dem Übertragen der Proteine auf eine PVDF-Membran (Blotten), der Bindung der Primärantikörper und der Detektion von Primärantikörpern durch Peroxidase-markierte Sekundärantikörper.

Die SDS-Page zur Denaturierung und Auftrennung von Protein erfolgte wie in Absatz 2.3.3. beschrieben. Das Polyacrylamidgel wurde in Transferpuffer überführt und dort 10 Minuten äquilibriert.

Parallel dazu wurden eine 0,45 µm PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran (Millipore ImobilonTM-P^{sq}, Schwalbach, Deutschland) sowie 2 Stück Blotpapier (CriterionTM, BioRad) zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol und anschließend mit dem Blotpapier in Transferpuffer geschwenkt. Zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde auf der Anodenseite einer Blotkammer (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) ein „Sandwich“ aufgebaut: Zwischen den angefeuchteten Blotpapieren wurde die Membran und auf diese das

Polyacrylamidgel aufgelegt. Der Elektrobplot erfolgte für 15 Min bei 30V. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Proteine färben sich auf der Membran rot und so konnte das Blotergebnis überprüft werden. Mit destilliertem Wasser wurde die Färbung vollständig rückgängig gemacht.

Zusätzlich wurde das Gel in Coomassie Brilliant Blue gefärbt, um im Gel verbliebene Proteine sichtbar zu machen.

Im letzten Schritt des Western Blots wurden Kulturüberstände bzw. aufgereinigte Fraktionen der Kulturüberstände auf ihre Fähigkeit zur Erkennung von denaturiertem gp41 untersucht. Um verschiedene Antikörper untersuchen zu können, wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten in mehrere Streifen geschnitten oder alternativ eine Kapillarblotkammer verwendet.

In beiden Fällen wurde die Membran zunächst mit Blockierlösung für zwei Stunden bei RT inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Membran und Antikörpern zu verhindern. Nach dem Waschen mit PBS-Tween (0,1%) wurden unverdünnter Kulturüberstand oder verschiedene Serumverdünnungen für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen und speziesspezifischer Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser erkennt den konstanten Teil der Primärantikörper (Fc-Teil) und ist an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Dieses Enzym setzt das Substrat DAB (Diaminobenzidin) in ein farbiges Produkt um. Alternativ wurde auch ECL-Detergenz eingesetzt, um die gebundenen Antikörper auf einem Röntgenfilm sichtbar zu machen.

2.5.3. Epitopkartierung

Zur Epitopkartierung wurde eine PepSpot-Membran (Jerini, Berlin, Deutschland) benutzt, auf der sich eine Peptidbank befindet. Die je 15 Aminosäuren langen Peptide wurden dazu kovalent über den C-Terminus an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt. Die Sequenzen der nebeneinander liegenden 15mere verschieben sich jeweils um zwei Aminosäuren in Richtung des C-Terminus. Wird ein Epitop erkannt, binden die Antikörper deshalb an mehrere nebeneinander liegende Peptide, die sich im Epitop überschneiden. Die verwendete Membran umfasste die Aminosäuresequenz der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteines gp41 von HIV-1 IIIB bzw. p15E von FeLV-A.

Sowohl die Bindungsregion der Antikörper des Boostblutes, als auch die der Antikörper in Hybridomaüberständen wurden durch Epitopkartierung charakterisiert. Für die Kartierungen wurden die freien, unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit Trockenmilchlösung (3% Trockenmilchpulver, 1% Saccharose in 0,1%igem PBS-Tween20) über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. In Blockierlösung verdünnte Probe (Serum oder Kulturüberstand) wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Über-Kopf-Schüttler befestigt. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Membran zwei Stunden bei Raumtemperatur mit peroxidase markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Durch Zugabe von ECL-Detergenz (enhanced chemiluminescence) waren gebundene Peptidspots auf einem aufgelegten Röntgenfilm als dunkle Punkte zu erkennen.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran je 30 Minuten mit PBS-T(0,1%) gewaschen, um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen.

2.5.4. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzanalyse von Anti-gp41-Antikörpern wurden 293-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden dazu in 6Well-Platten gegeben und erst mit 1 ml Ethanol gespült, dann dreimal mit 2ml PBS gewaschen. Es wurden ca. 2×10^3 Zellen in 2ml Medium ausgesät. Wenn das Gläschen nahezu konfluent bewachsen waren, wurde das Medium abgenommen und die Zellen zur Fixierung 20 Minuten mit 3,7% Formaldehyd-in-PBS inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde daraufhin 15 Minuten in 1% Triton X-100-in-PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die restlichen Zellen verblieben währenddessen in PBS. Nach dem Blockieren (20 Minuten in 5% Trockenmilchpulver-in-PBS) wurden die zu untersuchenden Antikörper in 2,5% Trockenmilchpulver-in-PBS verdünnt und 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde ein FITC (fluorochrom)-konjugierter Sekundärantikörper (in 2,5% Trockenmilchpulver-in-PBS) ebenfalls eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zuletzt wurde ein Tropfen Eindeckmedium auf einen Objektträger aufgetragen und die gewaschenen Deckgläschen darauf gelegt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Deckgläschen 3x5 Minuten bzw. 5x5 Minuten nach dem Sekundärantikörper, mit PBS gespült.

Im Fluoreszenzmikroskop konnte das konjugierte FITC bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden und die Emission bei 530nm als grünes Leuchten beobachtet werden.

2.6. Zellkultur

2.6.1. Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblaufärbung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl-Aliquots der Zellsuspensionen entnommen und 1:1 mit Trypanblau (0,4%) vermischt. Das Gemisch wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert in der vier geeichte Felder ausgezählt wurden. Da nur bei abgestorbenen Zellen Trypanblau durch die Zellmembran diffundieren kann, war eine Unterscheidung zwischen Lebend- und Gesamtzellzahl möglich. Die Zahl der lebenden Zellen wurde durch 4 geteilt und ergab so die Zellzahl N mit der die absolute Zellzahl und auch die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden konnte. Dabei galt die Formel: $Z=N \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$

(Z: Dichte der Zellen pro Volumen, N: Zellzahl, 2: Verdünnungsfaktor Trypanblau, 10^4 : Faktor der Neubauerkammer)

Multiplizierte man diesen Wert mit dem Gesamtvolumen der vorhandenen Zellsuspension, erhielt man die absolute Zellzahl.

2.6.2. Suspensionszellen und adhärenente Zellen

Sowohl bei C8166-Zellen als auch bei der Zelllinie CEM174x SEAP handelt es sich um Suspensionszellen. Zum Mediumwechsel musste deshalb die Zellsuspension 6 Minuten bei 1400U/min zentrifugiert werden. Das verbrauchte Medium konnte dann abgenommen werden und die Zellen in frischem Medium resuspendiert werden.

Waren die Zellkulturflaschen sehr dicht bewachsen (beide Zelllinien bildeten dann vermehrt Aggregate) wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:10 „gesplittet“, das heißt die Hälfte bis zu 9/10 der Zellsuspension wurde abgenommen und die verbliebenen Zellen mit frischem Medium aufgefüllt.

Zur Kryokonservierung wurden 1×10^7 Zellen pelletiert, in 1ml gekühlter Einfrierlösung (5% DMSO in FKS) aufgenommen und in 2ml Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. 24 Stunden später konnten die eingefrorenen Zellen in einen Lagertank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und in 10ml angewärmtes Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das verbliebene DMSO zu entfernen.

FEA-Zellen und 293-Zellen (humane Nierenzellen) wachsen in Zellkultur adhärent. Beim Erreichen der Konfluenz, das heißt wenn die gesamte Oberfläche des Kulturgefäßes bewachsen ist, müssen adhärente Zellen passagiert werden. Aufgrund von Kontaktinhibition können die Zellen sonst nicht weiter im Monolayer wachsen. Zum Passagieren wurde das gesamte Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 10ml PBS gespült. Dann wurde mit 0,25%iger Trypsinlösung 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten anschließend durch Klopfen von der Oberfläche gelöst werden. Trypsin wurde durch Zugabe des doppelten Volumens serumhaltigen Mediums inaktiviert und die Suspension bei 1400 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Je nachdem wie schnell die Zellen wachsen, wurde 1:2 bis 1:10 gesplittet und die Zellen wieder in die Zellkulturflasche gegeben.

Zur Durchführung einer Immunfluoreszenz wurden die Zellen nicht mit Trypsin abgelöst, um den enzymatischen Verdau von Oberflächenproteinen, an die die Antikörper binden sollen, zu verhindern. Alternativ wurden die Zellen in diesem Fall mit einem Zellschaber abgelöst.

2.7. Virologische Methoden

2.7.1. FeLV-Neutralisationstest

Um FeLV-Seren auf Neutralisation zu testen, wurden FEA-Zellen (feline embryonale Fibroblasten) mit FeLV infiziert. Dazu wurden 6×10^3 Zellen in einer 96Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Aussäen wurde das Medium abgenommen, Zelltrümmer durch Waschen mit 10 ml PBS abgespült und 2ml Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden dann in 8ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1600 U/Min zentrifugiert. Zuvor wurde anhand eines Aliquots mit Trypanblau die Zellzahl bestimmt.

Um das Neutralisationspotenzial zu testen, wurden Virus- und Serumverdünnungen hergestellt und in einer gesonderten 96 Wellplatte bei 37°C inkubiert. Dadurch sollte den Antikörpern Zeit zur Bindung an die Viren geben werden, bevor diese die Zellen infizieren konnten. Nach 30 Minuten wurden die Verdünnungen zu den ausgesäten Zellen gegeben. 24 Stunden später wurden 100µl Medium pro Napf zugeben. Nach weiteren 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Platte mit den Zellpellets einem dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus (-80°C und 56°C, jeweils 30Min) ausgesetzt. Es folgte die Zelllyse mittels Proteinase K. Dazu wurde 100µl Lysepuffer auf die Zellpellets gegeben. Dadurch wurden die Histone enzymatisch von der genomischen DNS gelöst. Die Proteinase K wurde 3 Stunden bei 56°C aktiviert und bei 99°C für 30 Minuten inaktiviert. Aus dem erhaltenen Lysat konnte DNS für Untersuchungen mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) entnommen werden.

Ansatz:

2µl template
2,3µl 10xPCR-Puffer
3,5µl MgCl₂ (aus 25mM)
0,5µl dNTP (10mM)
5 pmol FeLV forward primer (sense)
5 pmol FeLV reverse primer (antisense)
5 pmol Sonde
0,25µl Gold Taq-Polymerase
14,95µl nukleasefreies Wasser

Im Real-Time-PCR-Cycler durchliefen die Proben 50mal folgendes Programm:
10min 95°C

30sec 95°C
 1min 59°C
 30sec 72°C

sense primer 5'-TCAAGTATGTTCCCATGAGATACAA-3'
 antisense primer 5'-GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT-3'
 Sonde: 5' 6Fam-TTAAGCACCTGGGCCCCCGGC-Dabcyl-3'

2.7.2. HIV-Neutralisationstests

2.7.2.1. Real-Time-PCR- Neutralisationstest (RTQ-PCR)

In der verwendeten *Realtime*-Lyse-PCR wurde, wie beim FeLV-Neutralisationstest, Proteinase K-behandeltes Zelllysat als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden *env*-spezifische Primer verwendet, die ein möglichst großes Spektrum von Subtypen detektieren (Ou, et al., 1988, Cassol, et al., 1991, Schweiger, et al., 1997). Die verwendete Sonde ist ein *env*-spezifisches 25mer. Für die Reaktion wurde Taqman-Universal Mastermix verwendet. Die Messung erfolgte mit dem MX4000-Cycler von Stratagene.

Um die neutralisierende Wirkung eines Immuserums oder eines Hybridomazellkulturüberstandes darzustellen, wurden die ct-Werte (Threshold Cycle) umgerechnet. Der ct-Wert entspricht der Zahl des PCR-Zyklus, bei der das Fluoreszenz-Signal einer Probe erstmals über einen definierten Schwellenwert steigt. Zur Berechnung galt folgende Formel:

$$\text{Hemmung der Virusreplikation [\%]} = 100 - 100/2^{\Delta ct} \times X$$

[Mit X = Test-abhängiger Korrekturfaktor, der mittels der Verdünnung eines Standard- *Templates* berechnet wurde. Dieser Faktor hat für die eingesetzten Primer und Sonde eine Größe von 1,08.]

Der delta ct (Δct) ergab sich aus der Differenz der ct-Mittelwerte und des ct-Mittelwertes für infizierte Zellen.

Für den RTQ-*in vitro*-Neutralisationstest wurden 5×10^6 C8166-Zellen (humane T-Zell-lymphomzellen) in 100µl pro Napf, in einer sterilen 96-Well-Rundboden-Platte ausgesät. 50µl HIV-1 IIIB-Virusstock (TCID₅₀: 5×10^2 - 2×10^3) und 50µl Kulturüberstand oder Serum in verschiedenen Verdünnungen wurden 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Die 96-Well-Platte wurde für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte inkubiert. Als Kontrollen wurden der HIV-1-neutralisierende, monoklonale Antikörper 2F5 in einer Konzentration von

0,1µg/ml-25µg/ml und infizierte Zellen mitgeführt. Nach 72 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden durch einen dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus (-80°C und 56°C) aufgeschlossen und wie in Punkt 2.5.3.1. lysiert. Je 2µl der Zelllysate wurden direkt als *Template* im Realtime-PCR- Nachweis eingesetzt.

Ansatz:

2µl Template
 12,5 µl Mastermix
 5pmol Primer 68i
 5pmol Primer 69i
 5pmol Sonde
 9µl H₂O bidest

SK68i: 5'GGARCAGCIGGAAGCACIATGG'3

SK69i: 5'CCCCAGACIGTGAGITICAACA'3

Sonde: 5'- 6Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-Dabcyl-'3 (TIB-Molbiol)

Die Ansätze durchliefen nach 10 Minuten bei 95°C 45-mal den Zyklus 30 Sekunden 95°C und 1 Minute 55°C. Der „range“ wurde auf 1,6 (statt normal 2,2) herabgesetzt.

2.7.2.2. CEM-SEAP-Test

Die für den SEAP (sekretierte alkalische Phosphatase)-Test eingesetzten CEMx174-SEAP-Zellen basieren auf der CD4-Zelllinie CEMx174. Diese ist ein Fusionsprodukt der humanen B-Zelllinie 721-174 und der humanen T-Zelllinie CEM. Es handelt sich um Suspensionszellen, die leicht mit HIV infizierbar sind und für Infektionsstudien geeignet sind. Die CEMx174-SEAP-Zellen enthalten zusätzlich ein Reportergen, für die humane plazentale alkalische Phosphatase, das unter der Kontrolle des SIV-1-LTR Promotors steht. In HIV infizierten Zellen wird das viruscodierte Protein Tat exprimiert, welches durch Bindung an das TAR-Element den Promotor transaktiviert (Means et al., 1997). Die Aktivität der in den Zellkulturüberstand sekretierten alkalische Phosphatase (SEAP) wird quantifiziert und lässt so Rückschlüsse auf die Vermehrungsfähigkeit der infizierenden Viren zu.

Die Quantifizierung der SEAP erfolgte durch Lumineszenzmessung.

Zur luminometrischen Bestimmung der SEAP-Aktivität wurden 20µl Zellkulturüberstand mit dem "Phosphalight[®]“-Kit verwendet. Es enthält das Chemilumineszenzsubstrat CSPD[®] (disodium 3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1]decan]-4-yl)phenyl-phosphat). CSPD wird durch enzymatische Dephosphorylierung zu instabilem Dioxetanion, das unter

Lichtabgabe zerfällt (Bronstein et al., 1994). Diese Lichtemission wurde im Plattenluminometer (TopCount) in cps (counts per second) gemessen. Die gemessenen cps sind direkt proportional zur Menge an sezernierter alkalischer Phosphatase und somit zur Replikation von HIV-1 IIB.

Für den Test wurden $2,5 \times 10^4$ CEMx174-SEAP-Zellen pro Napf ausgesät. 50 μ l Antikörper in verschiedenen Verdünnungen und 50 μ l Virusverdünnungen wurden auf einer gesonderten Platte 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann zu 100 μ l Zellen gegeben. Insgesamt wurde ein Volumen von 200 μ l im Test eingesetzt. Bei Virustitrationen wurde das fehlende Volumen mit Medium aufgefüllt. Nach 48 bzw. 72 Stunden wurden 20 μ l-Aliquots entnommen und mit 20 μ l Lysisreagenz in weiße Luminometerplatten (OptiplateTM-96, Packard) pipettiert. Nach dem Ausschleusen wurde die Platte zur Eliminierung der Infektiosität des Virus bei 65°C für 40 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte wurden 33 μ l Assaypuffer und nach 5 Minuten 33 ml Reaktionspuffer zugegeben. Es erfolgte eine Messung der Lumineszenz nach 12 bzw. 30 Minuten Inkubation.

Nach der Lumineszenzmessung war zusätzlich eine Messung in der Real-Time-PCR möglich (siehe 2.7.2.1.).

3. Ergebnisse

3.1. Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV

3.1.1. Charakterisierung der Antikörper im Serum und in Überständen von Milzkulturen

3.1.1.1. Nachweis von bindenden Antikörpern in Enzymimmuntests

Zur Bestimmung induzierter Antikörper nach Immunisierung mit den Peptiden E1 und E2, die von gp41 von HIV abgeleitet wurden, wurde bei allen immunisierten Mäusen Blut und Milzkulturüberstand im Enzymimmuntest untersucht.

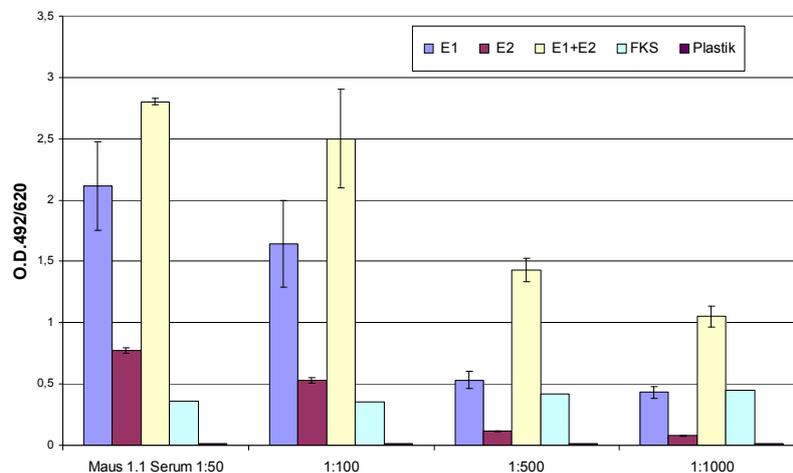


Abb.9: ELISA des Serums von Maus 1.1: An der festen Phase wurden die Peptide E1 und E2 oder das Protein FKS immobilisiert, die Testung auf Plastik erfolgte im unbeschichteten Well; Serum wurde in PBS/10%FKS ausverdünnt und der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG-POD wurde 1:2000 verdünnt

Das bei der Milzpräparation entnommene Serum der Maus 1.1 enthielt Antikörper, die verstärkt das Peptid E1 und die Kombination E1+E2 erkannten. Das Serum zeigte mit zunehmender Verdünnung abnehmende O.D.-Werte im ELISA, das Verhältnis der Erkennung blieb jedoch unverändert und auch bei tausendfacher Verdünnung konnten noch optische Dichten über 0,5 detektiert werden. Zudem erkannte das Serum von Tier 1.1 auch das Peptid E2, wenn auch nur mit einem Drittel der Intensität von E1 und E1+E2. Es wurde daraus geschlossen, dass die Immunisierung zu Antikörpern geführt hatte, die verstärkt E1 erkannten, jedoch auch in einem geringeren Maß Antikörper gegen das Peptid E2 vorlagen. Somit war auch nicht auszuschließen, dass ein Antikörper beide Peptide erkennt.

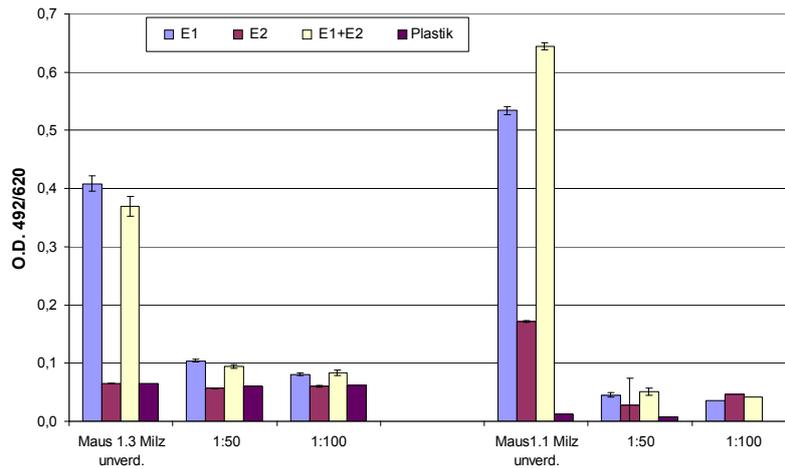


Abb10.: ELISA der Milzkulturüberstände von Maus 1.3 und Maus 1.1. An der festen Phase sind die HIV-Peptide E1 und E2 immobilisiert, als Kontrolle wurde die Testplatte nicht beschichtet.

Der Milzkulturüberstand von Maus 1.1 erreichte nur 40% der Werte für das Serum. Die Erkennung von Peptid E1 oder Peptid E2 blieb im Verhältnis gleich. Der Milzkulturüberstand von Maus 1.3 enthielt Antikörper die das Peptid E1 binden, E2 wurde nicht messbar erkannt. Die Werte waren im Vergleich zu Maus 1.1 um 1/3 niedriger.

Lag eine Erkennung eines Peptids vor, war davon auszugehen, dass auch die Mischung E1 + E2, erkannt werden musste, da beide Peptide vorhanden waren. Obwohl bei der Beschichtung der festen Phase mit E1+E2 nur jeweils die halbe Peptidmenge aufgetragen wurde (50ng E1+ 50ng E2 statt 100ng E1 oder 100ng E2), zeigte die Antikörperreaktion im Überstand der Milzkulturen von Maus 1.1 aber O.D.-Werte, die über der Einzelerkennung lagen.

3.1.1.2. Epitopkartierung

Für die Seren der Mäuse, die mit E1 und E2 von HIV immunisiert worden waren, wurde eine Epitopkartierung durchgeführt, um festzustellen, welche Epitope des gp41 erkannt werden. Die Kartierung führte zu folgenden Ergebnissen:

Antikörper im Serum der Maus 1.3 erkannten ein Epitop am N-terminalen Ende des Peptids E1 (blaue Buchstaben in Abb.11). Die Sequenz FLGAAGSTMG und ein Aspartat-haltiges Epitop (QQQNN) wurden außerhalb der für die Immunisierung verwendeten Peptide detektiert. Im C-terminalen Bereich fand eine Bindung an ein Epitop N-terminal vor der Sequenz des Peptids E2 (ebenfalls blaue Buchstaben in Abb.11) statt (QQEKN).

Das Serum der Maus 1.2 erkannte zwei Epitope, wobei das N-terminale Epitop mit dem übereinstimmte, das von Serum 1.3 erkannt wurde. Das C-terminale Epitop war 9 Aminosäuren länger als das entsprechende Epitop, das vom Serum der Maus 1.3 erkannt wurde (QQEKNEQELLELDKW).

Die Antikörper aus Serum 1.1 banden an das Epitop QNQQEKNEQELLELDKWAS. Es enthielt die gesamte ELDKWAS-Sequenz, die vom humanen neutralisierenden Antikörper 2F5 erkannt wird. Es wurde kein N-terminales Epitop erkannt.



Abb.11: Epitopkartierung der Seren der HIV-Mäuse 1.3 (türkis), 1.2 (orange) und 1.1 (gelb). Gezeigt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz des transmembranen gp41-Bereichs, der in Form von 13 Aminosäuren langen Peptide auf der Pepspotmembran immobilisiert war. Die blauen Aminosäuren entsprechen den zur Immunisierung genutzten Peptiden E1 und E2.

3.1.1.3. Nachweis neutralisierender Antikörper im Infektionsversuch

Um neutralisierende Antikörper zu analysieren, wurde Serum, das nach dem ersten Boost abgenommen worden war, in einem Real-Time-PCR-Neutralisationstest untersucht (Abb.12). Der als Kontrolle eingesetzte neutralisierende monoklonale Antikörper 2F5 verringerte die Restinfektion von HIV-1 IIIb auf c8166-Zellen auf unter 1%.

Alle drei Immunsereen zeigten eine verringerte Infektion im Vergleich zu infizierten Zellen, die nicht mit Antikörpern behandelt worden waren. Problematisch war jedoch, dass die Präimmunsereen überhaupt keine Infektion anzeigten. Die Präimmunsereen waren zentrifugiert und dekomplementiert worden, dennoch zeigten sie einen stark cytotoxischen Effekt. Es war deshalb nicht möglich, eine Aussage über neutralisierende Antikörper im Serum zu treffen.

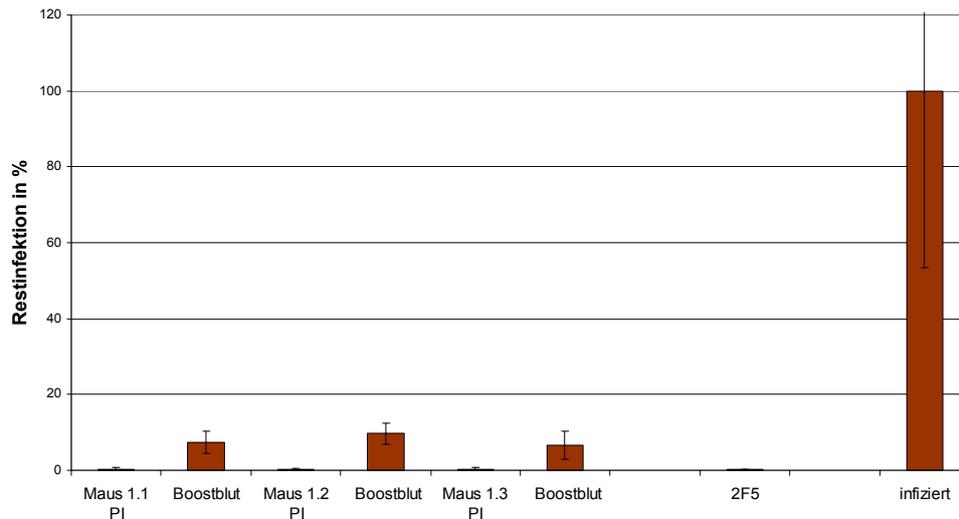


Abb.12: Real-Time-PCR-Neutralisationstest des Mausextrakts nach dem ersten Boost; als Kontrollwerte wurde der humane Antikörper 2F5 und infizierte Zellen eingesetzt

3.1.2. Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die Peptide E1 und E2 von HIV

3.1.2.1. Gewinnung monoklonaler Antikörper

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden für die erste Fusion $70,25 \times 10^6$ Milzzellen mit $17,6 \times 10^6$ Myelomzellen, also im Verhältnis 4:1, fusioniert. Da die Literaturangaben zu den besten Zellverhältnissen sehr stark variieren, wurde die zweite Fusion (Maus 1.1) im Verhältnis 10:1, also 70×10^6 Milzzellen mit 7×10^6 Myelomzellen, durchgeführt.

Die Überstände der wachsenden Zellen wurden von Anfang an auf Antikörper gegen die Peptide E1, E2 und E1+E2 getestet, sowie auf Antikörper gegen FeLVp15E, BSA und Plastik. Für jede Fusion waren acht 96Well-Platten zu screenen und jeder einzelne Napf wurde im 2-Tagesrhythmus auf Zellwachstum, Klonegröße und Kontaminationen untersucht. Alle positiv getesteten Klone wurden in 24Well-Platten erweitert und jeder dieser Klone in 96Well-Platten rekloniert. Die Kulturüberstände der Reklonierungen und Erweiterungen wurden ebenfalls auf Antikörper gegen die Peptide E1, E2 und E1+E2 getestet und die negative Selektion durch Testung auf BSA und Plastik wurde auch hier weitergeführt. Klone, die auch nach fünf Reklonierungen weiterhin positive und spezifische Signale ergaben, wurden in Zellkulturflaschen etabliert.

Tier	Positive Testergebnisse	Etablierte Klone
Maus 1.3	510	Keine
Maus 1.1	3246	4 positive Klone

Tabelle 3: Übersicht über positive Testergebnisse der eingesetzten Kulturüberstände

Die Fusion der Maus 1.3 führte nicht zur Etablierung stabiler Hybridome, da die Zellen schlecht wuchsen und 3 Wochen nach der Fusion abstarben. Positive Signale waren auf noch produzierende Milzzellen zurückzuführen.

3.1.2.2. Charakterisierung der Bindungseigenschaften

Alle HIV-spezifischen Klone produzierten Antikörper, die auch p15E von FeLV erkannten und auch der als positive Kontrolle verwendete humane monoklonale Antikörper 2F5 erkannte dieses Protein. Selektiert wurden deshalb Klone, deren Antikörper FeLV p15E sehr schwach (max.1/4 des Wertes für die Peptidbindung) banden.

Diese HIV-spezifischen Hybridome wurden in 24Well-Platten erweitert und rekloniert, wobei ständig überprüft wurde, ob noch aktive Antikörper sezerniert wurden. War dies der Fall, wurden die Klone in Zellkulturflaschen erweitert und die Zellkulturüberstände in weiteren ELISA eingesetzt bzw. nach der Subklassenbestimmung aufgereinigt.

Aus der Fusion 1.1 konnten stabile Hybridome gewonnen werden, die genauer charakterisiert wurden. Im HIV-ELISA konnten die vier ausgewählten Klone folgende Peptide binden:

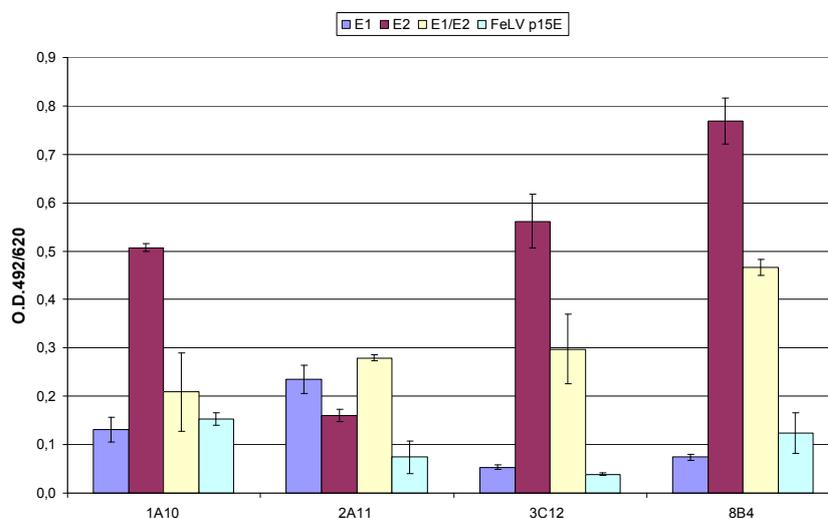


Abb.13: Enzymimmuntest der Kulturüberstände der Hybridome; getestet auf Antikörper gegen Peptid E1 und E2 und gegen die Kombination beider; außerdem auf Bindung an FeLV p15E.

Die Kulturüberstände der Klone 1A10, 3C12 und 8B4 enthielten Antikörper, die stark an das Peptid E2 banden und in geringerem Maße an das Peptid E1. Für die Kombination beider Peptide lies sich kein synergistischer Effekt nachweisen. Im Gegenteil, führte die Kombination beider Peptide zu einem schwächeren Signal. Dies korreliert mit dem Fakt, dass für E1+E2 jeweils nur 50% der Einzelpeptidmengen eingesetzt wurden.

Klon 2A11 sezernierte Antikörper, die das Peptid E1 stärker banden als das Peptid E2. Auch hier war kein synergistischer Effekt nachzuweisen.

3.1.2.3. Analyse der Subklassenzugehörigkeit der monoklonalen Antikörper

Als nächstes wurde ein Subklassentest durchgeführt. Dieser Test sollte eigentlich klären, welcher IgG-Subklasse die produzierten Antikörper angehören, da alle vorangegangenen Tests mit IgG-spezifischem Anti-Maus-POD durchgeführt worden waren.

Dazu wurden die Peptide E1+E2 immobilisiert und Kulturüberstände wurden dazugegeben. Im Test mit verschiedenen subklassenspezifischen Antikörpern zeigte sich folgendes Ergebnis:

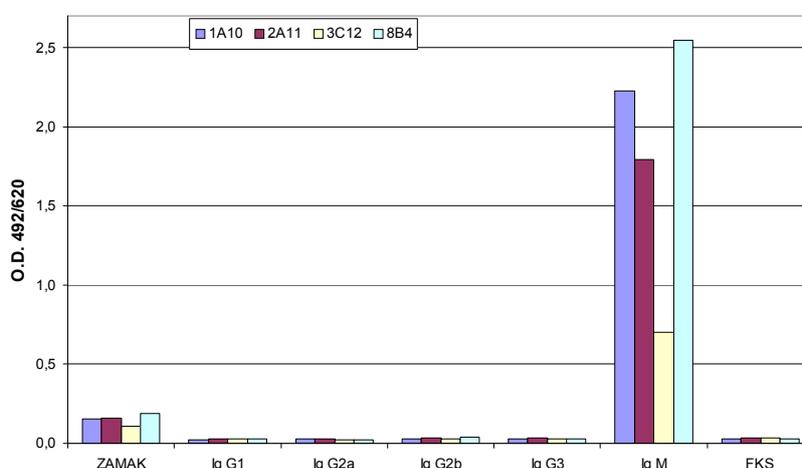


Abb.14: Subklassentest von Kulturüberständen der Hybridomklone, die monoklonale Antikörper produzieren. Als Kontrolle wurde statt Kulturüberstand FKS aufgetragen, um eine unspezifische Bindung der subklassenspezifischen Sekundärantikörper an zugesetztes FKS auszuschließen. ZAMAK steht für Ziege-Anti-Maus-Antikörper.

Bei allen 4 getesteten Überständen wurde eine optische Dichte von über 0,5 für biotinylierte anti-IgM-Antikörper gemessen. Für alle anderen Subklassen lagen die optischen Dichten unter 0,05. Als negative Kontrolle war PBS/10%FKS statt Kulturüberstand eingesetzt worden. Damit konnte belegt werden, dass es sich nicht um eine Detektion der bovinen Immunglobuline des Mediums handelte. Zudem

wurde mit nicht subklassenspezifischem Ziege-Anti-Maus-Antikörper inkubiert. Die gemessenen optischen Dichten lagen deutlich unter den Werten für IgM, jedoch auch signifikant über den Werten der anderen Subklassen. Die Auswertung des Tests identifizierte alle vier monoklonalen Antikörper als Immunglobuline der Klasse M.

3.1.2.4. Aufreinigung der IgM

Da Antikörper der Klasse M nicht mit ProteinG-Säulen aufgereinigt werden können, wurde eine Affinitätschromatographie mit BakerBond Ab^x-Säulen durchgeführt.

Für die Klone 1A10 und 3C12 wurden 100ml Kulturüberstand auf eine Säule geladen und nach dem Waschen wurden zwei 2ml-Fractionen eluiert. Um die proteinhaltigen Fractionen zu erkennen, wurde während der Elution die optische Dichte bei 280nm aufgezeichnet. Ab dem Zeitpunkt des ersten Ausschlags bis zum Wiedererreichen der Nulllinie wurde das Eluat gesammelt. Von den erhaltenen Proben wurden je 20µl durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.15). Es waren nur in der ersten Fraction (erste 2ml) Proteine nachzuweisen, die bei ca.75kDa (schwere IgM-Kette) und 25kDa (leichte Kette) prominente Banden aufwiesen. Da an die verwendeten Säulen auch andere Proteine gebunden werden, waren jedoch auch etliche andere Proteinbanden verschiedener Größen im Gel zu sehen.

Außerdem wurde im SDS-Gel der Durchlauf des auf die Säule geladenen Kulturüberstandes und ein Aliquot des Kulturüberstandes aufgetrennt. Beide zeigten eine deutliche Bande auf der Höhe des BSA (ca.55kDa), aber auch die selben Banden wie die aufgereinigten Immunglobuline.

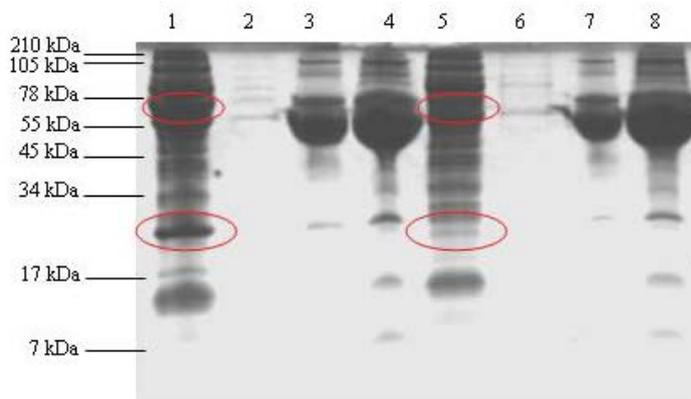


Abb.15: SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus Kulturüberständen der Klone 1A10 und 3C12

Spalte1: 1A10 Fraktion1, Spalte2: 1A10 Fraktion2, Spalte3: 1A10 Durchlauf, Spalte4: 1A10 Kulturüberstand, Spalte5: 3C12 Fraktion1, Spalte6: 3C12 Fraktion2, Spalte7: 3C12 Durchlauf, Spalte8: 3C12 Kulturüberstand; Marker See Blue Plus2 (Größen in kDa)

Die Banden der schweren und der leichten Ketten der IgM sind rot umrandet.

Zur Aufreinigung der Klone 2A11 und 8B4 wurden 150ml Kulturüberstand auf BakerBond-Säulen geladen und ebenfalls zwei 2ml-Fractionen eluiert. Im SDS-Gel (Abb.16a,16b) wurden 5µl der Eluate aufgetragen, außerdem wieder Kulturüberstand und Durchlauf. Nach der Coomassie-Färbung waren auch hier Banden auf der Höhe von 75 und 25kDa zu erkennen. Wie bei 3C12 und 1A10 enthielten diese Eluate noch große Mengen an anderen Proteinen und wieder waren nur in der ersten Fraktion Antikörper zu sehen. Für den Kulturüberstand und den Durchlauf waren, wie im vorherigen Gel, entsprechende FKS-Banden zu sehen, sowie Banden die denen der IgM entsprachen.

Da bereits in der ersten Aufreinigung (1A10 und 3C12) festgestellt worden war, dass die Reinheit der Fractionen noch verbessert werden muss, wurden je 1ml der ersten Fractionen mit 6% PEG gefällt. Direkt nach Zugabe des PEG konnte man eine Trübung der Lösung beobachten. Im SDS-Gel zeigte sich, dass die PEG-Fällung keine weitere Aufreinigung erbrachte. Zudem waren auch im PEG- Durchlauf (PEG-DL) noch immer deutliche Banden zu sehen.

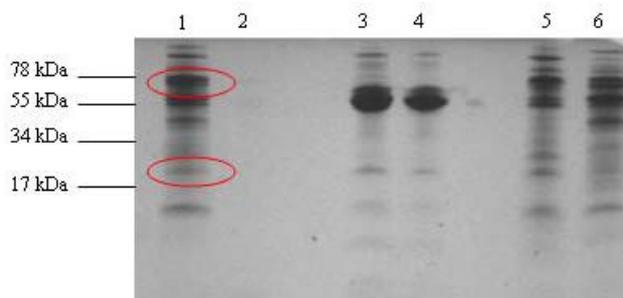


Abb.16a: SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus dem Kulturüberstand des Klons 8B4

Spalte1: Fraktion1, Spalte2: Fraktion2, Spalte3: Kulturüberstand, Spalte4: Durchlauf, Spalte5: PEG-Fällung, Spalte6: Überstand der PEG-Fällung; Marker SeeBlue Plus2
Die Banden der schweren und der leichten Ketten der IgM sind rot umrandet.

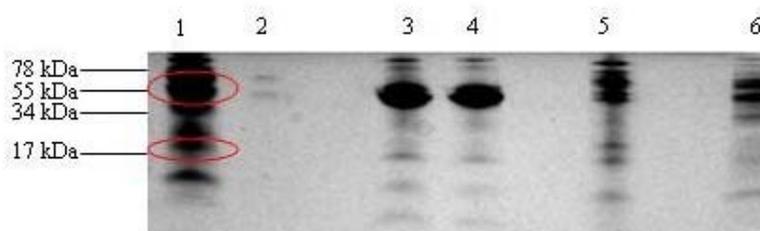


Abb.16b: SDS-Gelanalyse aufgereinigter IgM aus dem Kulturüberstand des Klons 2A11

Spalte1: Fraktion1, Spalte2: Fraktion2, Spalte3: Kulturüberstand, Spalte4: Durchlauf, Spalte5: PEG-Fällung, Spalte6: Überstand der PEG-Fällung; Marker SeeBlue Plus2
Die Banden der schweren und der leichten Ketten der IgM sind rot umrandet.

3.1.2.5. Aktivitätstest der aufgereinigten IgM

Nach der Aufreinigung der IgM wurde ein Aktivitätstest durchgeführt, um sicher zu gehen, dass gp41 spezifische Antikörper aufgereinigt worden waren und um zu prüfen, ob sie noch in der Lage sind, die Peptide E1 und E2 zu erkennen. Dazu wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem auf die immobilisierten Peptide E1+E2 Verdünnungen der Antikörper von 1:10 bis 1:640 aufgetragen wurden.

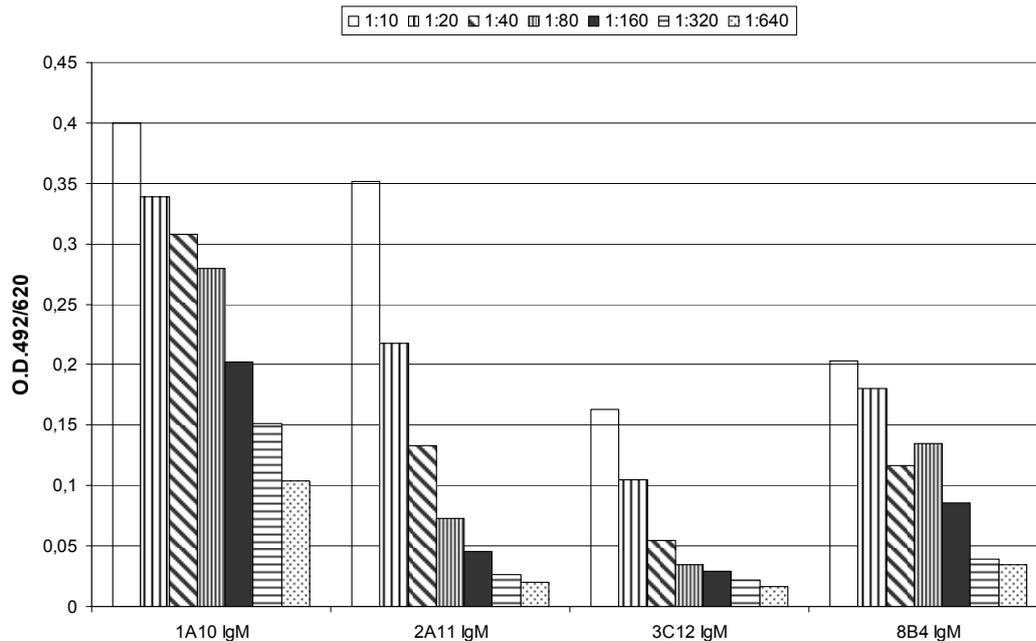


Abb.17: Aktivitätstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM aus Kulturüberständen der Klone 1A10, 2A11, 3C12 und 8B4; an der festen Phase sind E1+E2 immobilisiert, detektiert wurde mit Ziege-anti-Maus-IgM, 1:2000 verdünnt.

Wie in Abb.17 zu sehen, erkannten alle mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper weiterhin die Peptidkombination E1+E2. Die IgM aus dem Überstand des Klons 1A10 lieferten bis zu einer Verdünnung von 1:640 deutlich positive Signale, 2A11-IgM waren bis 1:40 verdünnbar, 3C12-IgM nur bis 1:20 und IgM des Klones 8B4 erzeugte bei einer Verdünnung von 1:80 noch Werte die positive Ergebnisse anzeigten.

3.1.2.6. Nachweis der Spezifität der monoklonalen Antikörper in Kompetitionsversuchen

Im Wettbewerbstest sollte überprüft werden, ob die ausgewählten Antikörper durch Zugabe der spezifischen Peptide an der Bindung an die immobilisierten Peptide gehindert werden können.

Dazu wurden Ausverdünnungen frischer Kulturüberstände hergestellt. So sollte

ermittelt werden, ab wann eine lineare Abnahme der Bindung zu erwarten ist, also die Antikörper nicht mehr im Überschuss vorliegen (Abb.18).

Die ausgewählten Kulturüberstände wurden alle unverdünnt eingesetzt.

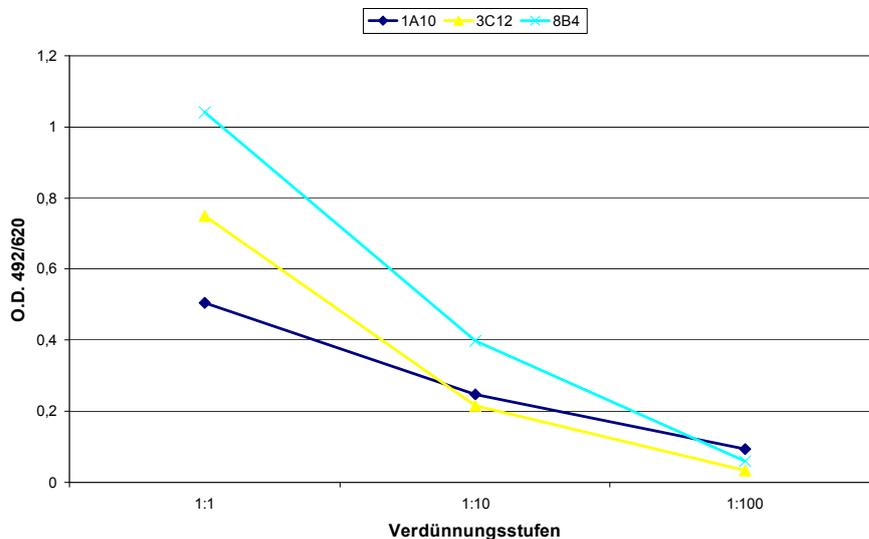


Abb.18: Titration der Kulturüberstände 1A10, 3C12 und 8B4. Die feste Phase war mit E1+E2 beschichtet, als Sekundärantikörper wurde Anti-Maus Ig-POD (1:2000) verwendet.

Der Kulturüberstand des Klons 1A10 lies sich mit den Peptiden E1+E2 wie erwartet hemmen. Als Kontrolle wurde der monoklonale HIV-Antikörper 2F5 eingesetzt und ebenfalls mit dem Peptidgemisch E1+E2 inkubiert. Auch hier wurde eine Kompetition nachgewiesen (Abb.19).

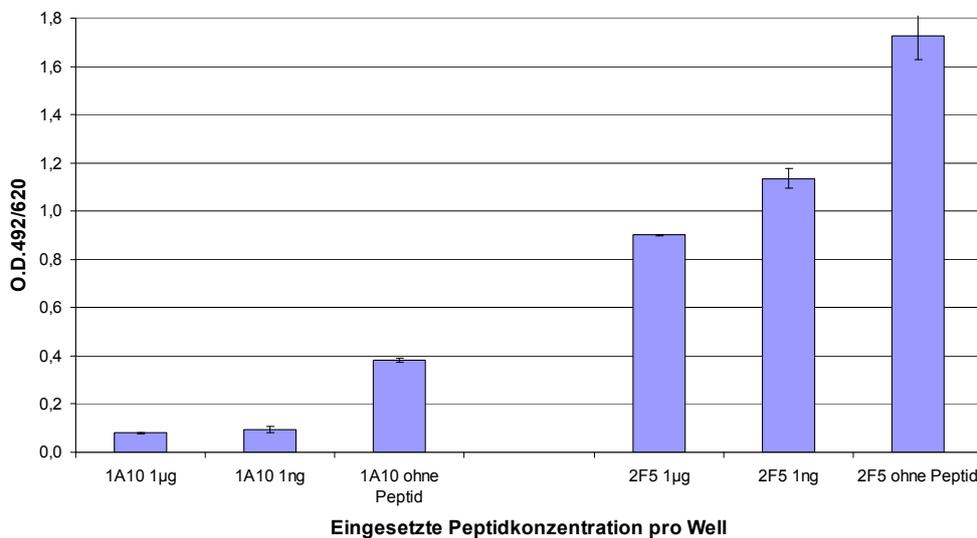


Abb.19: Kompetition des Kulturüberstandes 1A10 und einer 1:50000-Verdünnung des monoklonalen HIV-Antikörpers 2F5 im ELISA mit den Peptiden E1 und E2

Für die anderen Proben war mit der Peptidkombination E1 und E2 zunächst keine Konkurrenz nachweisbar, die Werte blieben konstant. In einem weiteren Versuch (Abb.20) wurden deshalb die frischen Kulturüberstände der Klone 8B4 und 3C12 mit 5µg/ml des Peptids E2 kompetitiert. Im Vergleich zur Inkubation mit PBS/10%FKS zeigten die mit E2 vorinkubierten Überstände ca. 50% verringerte Werte, wurden also von E2 kompetitiert.

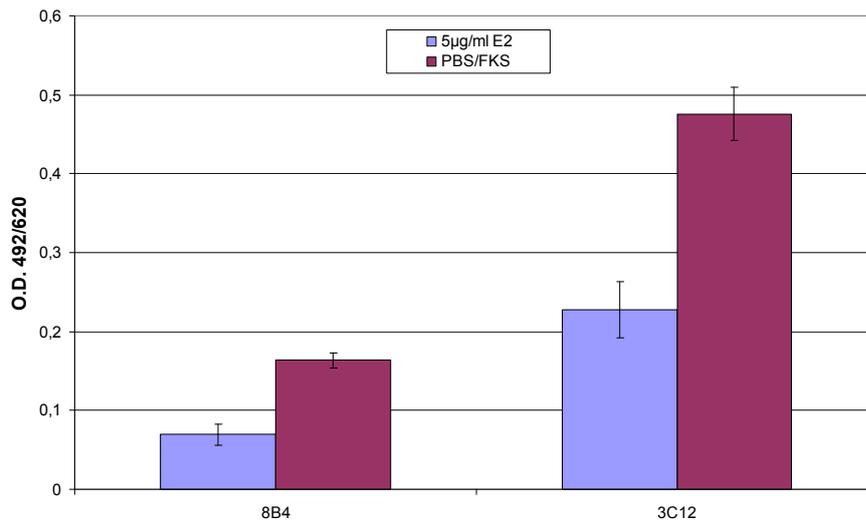


Abb.20: Kompetitions-ELISA der Kulturüberstände 8B4 und 3C12, an der festen Phase wurde das Peptid E2 immobilisiert, die Hemmung wurde mit 5µg/ml des Peptids E2 durchgeführt, als Kontrolle erfolgte die Inkubation mit PBS/10%FKS anstelle von Peptid E2

3.1.2.7. Epitopkartierung der monoklonalen Antikörper

Sowohl mit den Kulturüberständen als auch mit den aufgereinigten IgM wurden Epitop-Kartierungen auf einer Pepspot-Membran (Jerini, Berlin) mit Peptiden, die dem transmembranen Bereich des HIV-1 gp41 entsprechen, durchgeführt. Mit den eingesetzten Kulturüberständen konnten keine eindeutigen Epitope erkannt werden. Bei den aufgereinigten IgM waren mehrere Epitope zu erkennen, was für monoklonale Antikörper nicht erwartet wurde (Abb.21). Zudem erkannten alle vier Antikörper auch Epitope, die nicht im Antigen lagen. Dennoch lies sich für die Antikörper 8B4 und 1A10 eine Bindung an einen Teil der ELDKWAS-Sequenz bestätigen (KWASLWN für 8B4, DKWASLW für 1A10). 8B4 erkannte zudem das kurze Epitop IWN, das nicht im Antigenbereich lag, aber dem schon aufgeführten Epitop ähnelte (...LWN> Leucin statt Isoleucin). Der dritte erkannte Bereich (ILAVERYLK) lag nicht auf der Sequenz der Immunisierungspeptide. Er war in der sogenannten isu-Domäne lokalisiert.

1A10 IgM detektierten neben dem oben genannten KWASLW-Epitop ein zweites Epitop, das mit dem IWN von 8B4 überlappte (IWNNTWWM).

Die aufgereinigten IgM des Hybridoms 2A11 erkannten deutlich Sequenzen von Peptid E1 (GSTMGCTSMTLTV), was auch mit den Enzyimmunteresterggebnissen übereinstimmte. Zusätzlich wurde das glutaminreiche Epitop VQQQNN und ein ebenfalls glutaminreiches Epitop N-terminal von Peptid E2 erkannt (IEESQNQQEK). Für 3C12 wurden zwei Epitope detektiert: SDIVQQQN enthielt den C-terminalen Teil des Peptids E1 und NQQEKNE überlappte mit dem N-terminalen Ende des Peptids E2.

Alle vier Klone erkennen auch Epitope im Bereich von Peptid E2, der bereits nach der Epitopkartierung des Serums der fusionierten Maus (Serum1.1), erkannt wurde.

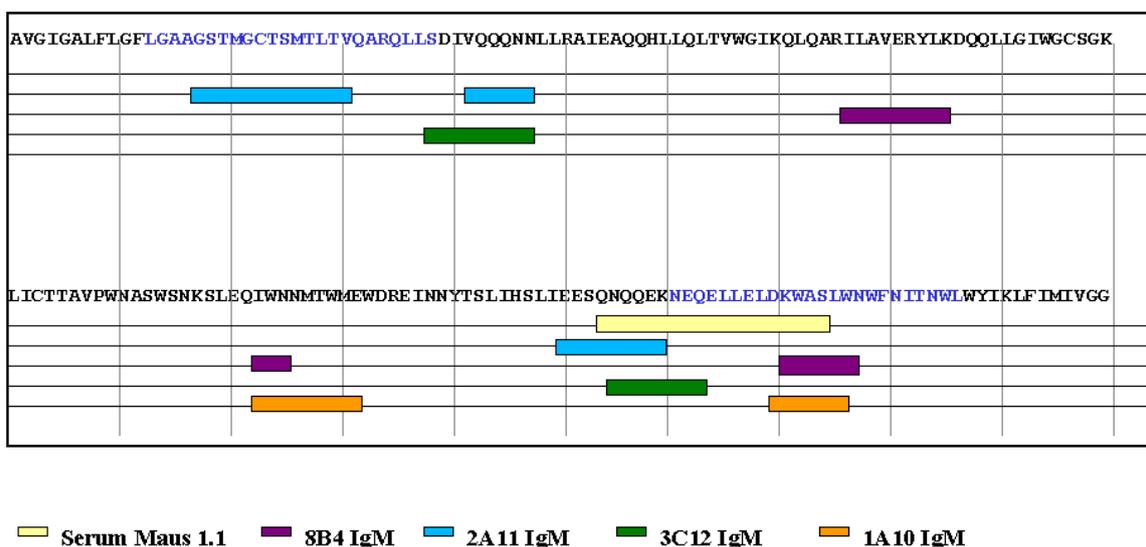


Abb.21: Epitopkartierung der aufgereinigten IgM aus Kulturüberständen der Klone 1A10, 2A11, 3C12 und 8B4 auf einer Teilsequenz des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1. Die synthetischen Peptide die zur Immunisierung verwendet wurden sind blau markiert.

3.1.2.8. Analyse der monoklonalen Antikörper im Western Blot

Um festzustellen, ob die untersuchten Antikörper lineare Epitope oder Konformations-epitope erkennen, wurde ein Western Blot durchgeführt.

Zunächst wurden dazu 145µg des Chaperon-assoziierten Proteins recss41m4 verwendet, es konnte jedoch keine Bindung der monoklonalen Antikörper detektiert werden. Da das Protein TM II in anderen Western Blots der Arbeitsgruppe sehr starke Reaktionen mit dem Antikörper 2F5 aufwies, wurden in einem weiteren Versuch 5µg davon im 10%igen SDS-Gel aufgetragen und auf eine 45µm PVDF-Membran geblottet. Es wurde frischer Kulturüberstand der Klone 2A11 und 8B4

unverdünnt aufgetragen. Um eine sensitive Detektion zu erreichen, wurden die POD-markierten Sekundärantikörper mittels ECL-Detergens sichtbar gemacht. Auf den Streifen 1 und 2 war bereits nach 30 Sekunden eine deutliche Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm sichtbar. Auf diesen Streifen waren im Western Blot die unverdünnten Kulturüberstände (1=8B4, 2=2A11) aufgetragen worden. Diese Überstände erkannten beide die aufgetragene Form von gp41, also TM II (rote Pfeile in Abb.22 in Höhe von 17 und 40kDa), wenn auch 8B4 stärker als 2A11. Das eingesetzte gp41 stammte aus *E.coli* und war deshalb nicht glykosyliert und enthielt ein CBP-Tag. Außerdem wurden der Transmembrandurchgang und das Fusionspeptid entfernt. In der SDS-Gelanalyse war das Protein TM II bei einer Höhe von 17kDa als Monomer und bei ca. 40kDa als Dimer zu erkennen.

Streifen 3 enthielt einen negativen Kontrollkulturüberstand, der wie erwartet gp41 nicht erkannte.

Die positive Kontrolle 2F5 (1:50000) wurde anschließend mit DAB-Färbung nachgewiesen, da 2F5 auf dem Röntgenfilm zu starke Signale zur Auswertung gab.

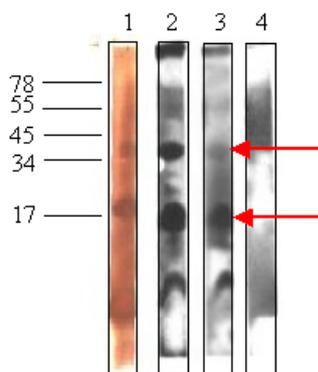


Abb.22: Western Blot Analyse der Kulturüberstände 2A11 und 8B4 mit dem Protein TM II (gp41)

Streifen1: humaner Antikörper 2F5 als Kontrolle, Streifen2: 8B4 Kulturüberstand, Streifen3: 2A11 Kulturüberstand, Streifen4: negativer Kulturüberstand (EB7). Marker:SeeBlue Plus2
Rote Pfeile bei 17 und 40 kDa.

Damit konnte gezeigt werden, dass die von den Klonen 2A11 und 8B4 produzierten monoklonalen Antikörper rekombinante Sequenzen von gp41 erkennen.

3.1.2.9. Neutralisationseigenschaften der Kulturüberstände HIV- Antikörperproduzierender Hybridome

Um eine Neutralisation nachzuweisen, wurden C8166-Zellen mit HIV infiziert, die zu analysierenden Kulturüberstände zugegeben und es wurden Real-Time-PCR-Analysen zum Nachweis des Provirus durchgeführt. Ist eine Zelle HIV-infiziert, enthält sie in ihrem Genom Virus-DNS (Provirus). Je mehr Zellen infiziert sind, desto

mehr DNS kann nachgewiesen werden und desto niedriger ist der ct-Wert (Threshold Cycle). Nichtinfizierte Zellen, die z.B. durch neutralisierende Antikörper geschützt wurden, sollten keine Provirus-DNS integriert haben und deshalb einen hohen ct-Wert in der Real-Time-PCR aufweisen. Durch die Auswertung der Daten wird daraus die Restinfektion berechnet, die bei Zugabe neutralisierender Substanzen nur wenige Prozent betragen sollte.

Beim SEAP-Assay äußert sich eine Infektion mit HIV in der vermehrten Produktion des viralen Proteins Tat. Tat bindet an die LTR der ins Genom der CEM-SEAP-Zellen eingefügten sekretorischen alkalischen Phosphatase, die mit der LTR von SIV gekoppelt ist, und transaktiviert sie so. Die gemessene Lumineszenz ist dementsprechend umso höher, je mehr Zellen infiziert sind.

In beiden Systemen gab es verschiedene Unsicherheitsfaktoren wie Wachstumsunterschiede der Zellen, eventuelle Zytotoxizität eingesetzter Komponenten und andere. Deshalb war es schwierig, eindeutig reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Vor beiden Testmethoden wurden die Zellkulturplatten im Mikroskop betrachtet. Es wurden die Pelletgrößen verglichen und nach Kontaminationen gesucht, die das Ergebnis verfälschen könnten. Nur wenn auch am Ende des Tests noch entsprechende Zellzahlen vorhanden sind, kann man auf eine Neutralisation schließen. Wäre ein Teil der Zellen abgestorben und würde deshalb ein geringerer CPS- Wert gemessen, läge keine Neutralisation vor.

Kulturüberstände wurden für die Neutralisationstests eingesetzt, bevor die Subklasse bestimmt war und aufgereinigte Proben vorlagen. Im Folgenden als Beispiel ein CEM-SEAP-Test mit Kulturüberstand der Klone die die monoklonalen Antikörper 2A11 und 8B4 produzieren (Abb.23).

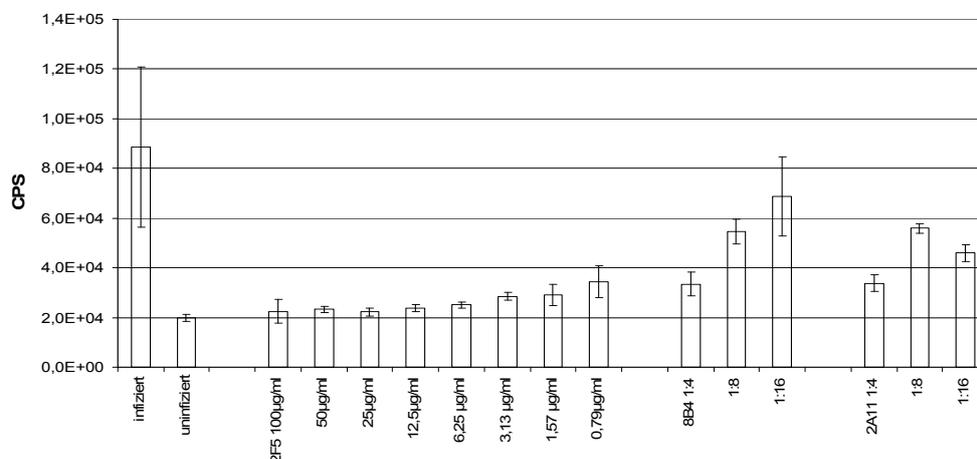


Abb.23: CEM-Neutralisationsassay mit den Kulturüberstände 8B4 und 2A11 nach 48h; angegeben sind die Endkonzentrationen im Well; als Kontrolle diente die Ausverdünnung des neutralisierenden Antikörpers 2F5 (100µg/ml bis 0,79µg/ml)

Bei der Ausverdünnung des humanen Antikörpers 2F5 wurde im Vergleich zu den bei infizierten Zellen gemessenen Werten, eine deutliche Hemmung des HIV-1 IIB gemessen, die sich mit zunehmender Verdünnungsstufe abschwächte. Auch die Kulturüberstände der Hybridome 8B4 und 2A11 verursachten in der geringsten Verdünnungsstufe reduzierte Werte, was für eine Neutralisation der HI-Viren spricht. Mit zunehmender Verdünnung ließ auch hier der Neutralisationseffekt nach. Nach 72 Stunden wurden wieder Proben entnommen und erneut die Lumineszenz bestimmt (Abb.24).

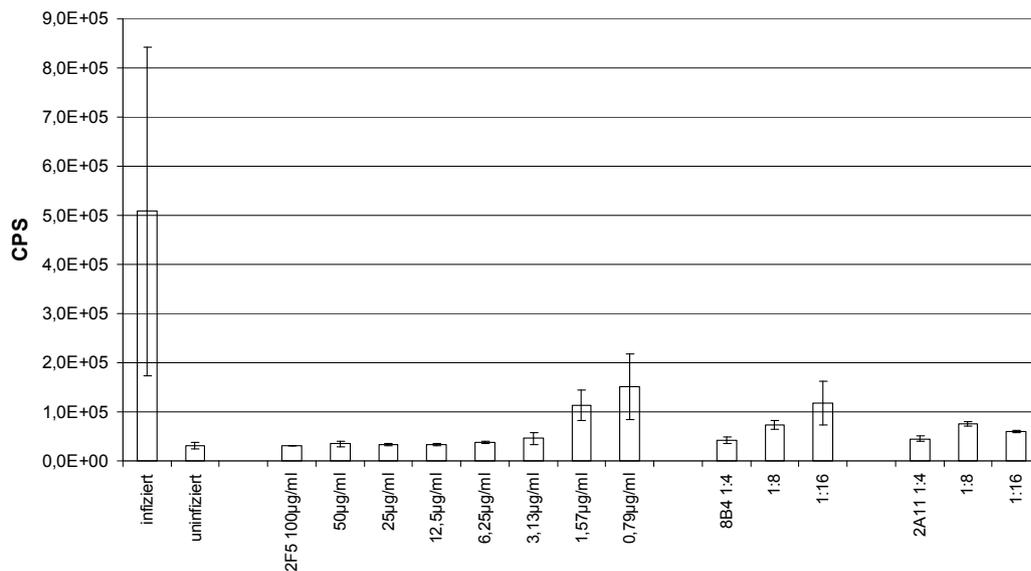


Abb.24: CEM-SEAP-Neutralisationstest der Kulturüberstände 8B4 und 2A11 nach 72h; angegeben sind die Endkonzentrationen im Well

Im Vergleich zur 48Stunden-Messung (siehe Abb.23) waren nach 72 Stunden generell höhere CPS zu messen. Dennoch blieben die Verhältnisse zu denen des 48-Stunden-Tests entsprechend bzw. waren die Tendenzen noch deutlicher geworden. Nach diesem Testergebnis wären die beiden hergestellten monoklonalen Antikörper 2A11 und 8B4 in der Lage, HIV-1 IIB zu neutralisieren.

3.1.2.10 Neutralisationsanalyse der IgM aufgereinigter Kulturüberstände

Da Kulturüberstände je nach Charge unterschiedliche Antikörperkonzentrationen aufweisen können und Antikörper der Klasse M instabil sind und schon nach einigen Tagen zerfallen können, wurden für die weitergehenden Neutralisationstests aufgereinigte IgM benutzt. Bereits bei der Elution der gereinigten Antikörper waren keinerlei toxischen Substanzen eingesetzt worden und die Eluate waren vor dem Einsatz in den Tests gegen PBS dialysiert worden.

Die gereinigten IgM wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt, um eine nachlassende Neutralisation bei geringerer Konzentration nachzuweisen. Als positive Kontrolle wurde der humane neutralisierende monoklonale Antikörper 2F5 in verschiedenen Mengen eingesetzt (25µg/ml, 2,5µg/ml, 0,25µg/ml). Er diente zur Überprüfung der Funktionalität der Tests.

Alle Proben wurden in Dreifachansätzen getestet. Die CEM-Assays wurden nach 12 und nach 30 Minuten Inkubationszeit gemessen. Nach 30 Minuten waren immer deutlich höhere Werte zu messen, die Verhältnisse der Werte für die einzelnen Proben blieben jedoch erhalten.

Im ersten Test, nach 12 Minuten (Abb.25), lagen sowohl der Wert für 2A11-IgM 1:16 als auch der für 8B4-IgM 1:16 auf dem Niveau der Neutralisation von 2F5 und der uninfizierten Zellen. In der höheren Verdünnungsstufe (1:400) wurde keine Neutralisation gemessen.

Die Kulturüberstände 3C12 und 1A10 zeigten etwas erniedrigte CPS-Werte im Vergleich zu infizierten Zellen, erreichten jedoch nicht das Neutralisationsniveau der Antikörper 8B4 und 2A11. Auffällig war auch, dass Polyethylenglykol-gefällte IgM von 8B4 und 2A11 nicht die Werte der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM erreichten.

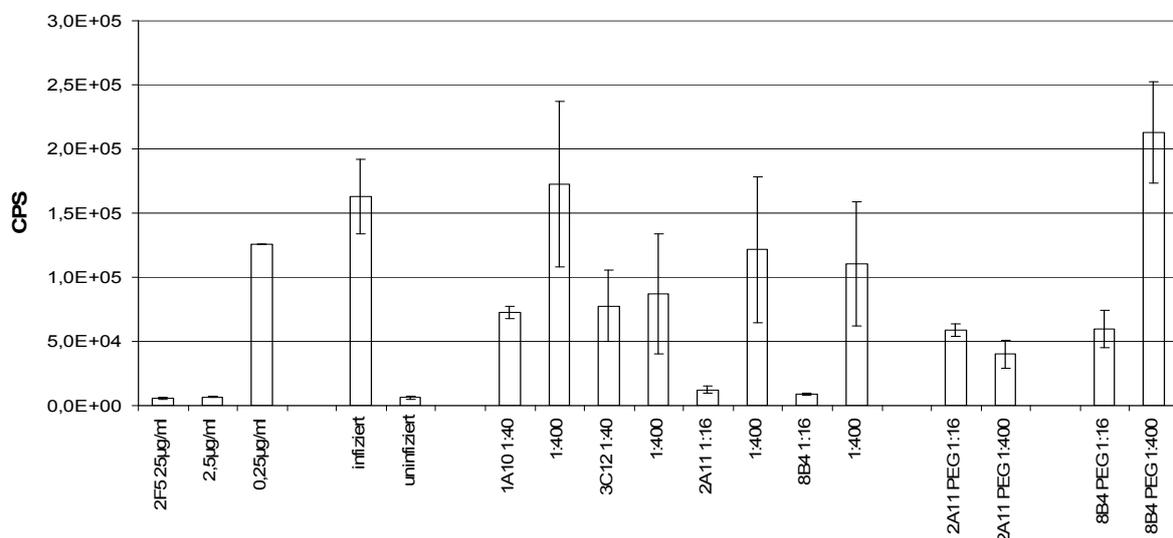


Abb.25: CEM-SEAP-Neutralisationstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten monoklonalen Antikörper 1A10, 2A11, 3C12 und 8B4 und PEG-gefällter Proben von 2A11 und 8B4. Gezeigt ist die gemessene Lumineszenz in cps nach 12 Minuten Inkubation. Als Kontrolle ist der humane neutralisierende Antikörper 2F5 aufgetragen. Zusätzlich liegen Werte für nicht infizierte Zellen und durchinfizierte Zellen vor.

Beim zweiten Test nach 30 Minuten (Abb.26) lagen die Werte wie erwartet höher, die Tendenzen bzw. Verhältnisse des 12-Minuten-Tests blieben jedoch erhalten. Nach diesem Test wiesen die mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM 2A11 und 8B4 weiterhin Neutralisationspotential auf.

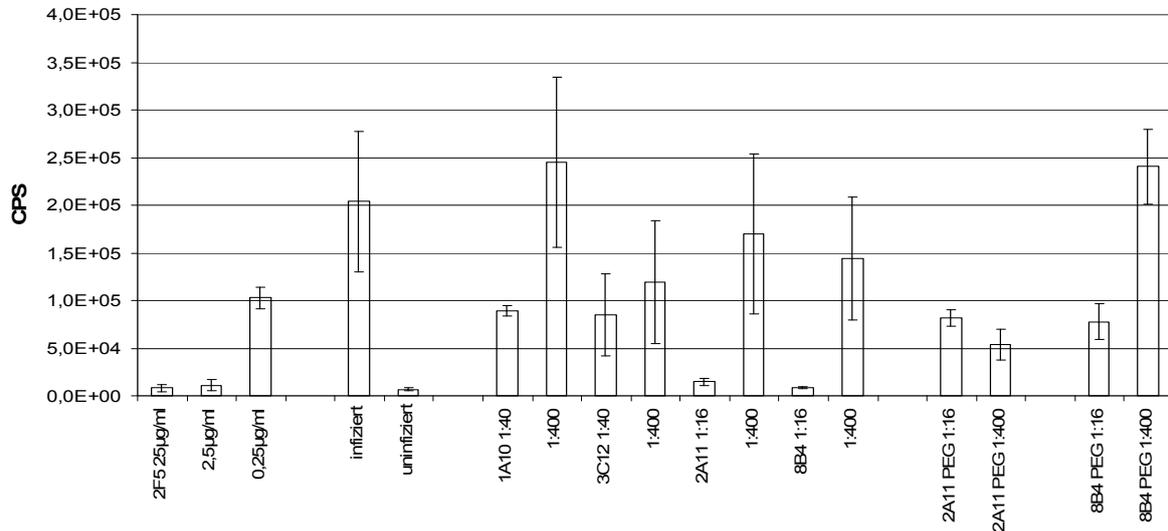


Abb.26: CEM-SEAP-Nutralisationstest der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten monoklonalen Antikörper 1A10, 2A11, 3C12 und 8B4 und PEG-gällter Proben von 2A11 und 8B4 nach 30min Inkubation; gezeigt ist die gemessene Lumineszenz in cps (counts per second).

Nach der Lumineszenzmessung wurde das gesamte Medium abgenommen und die Zellen wurden einer Lyse mit Proteinase K unterzogen. Die anschließende Real-Time-PCR (Abb.27) bestätigte die Ergebnisse des CEM-Assays für den monoklonalen Antikörper 8B4 (aufgereinigte IgM), wonach dieser neutralisierende Eigenschaften besitzt.

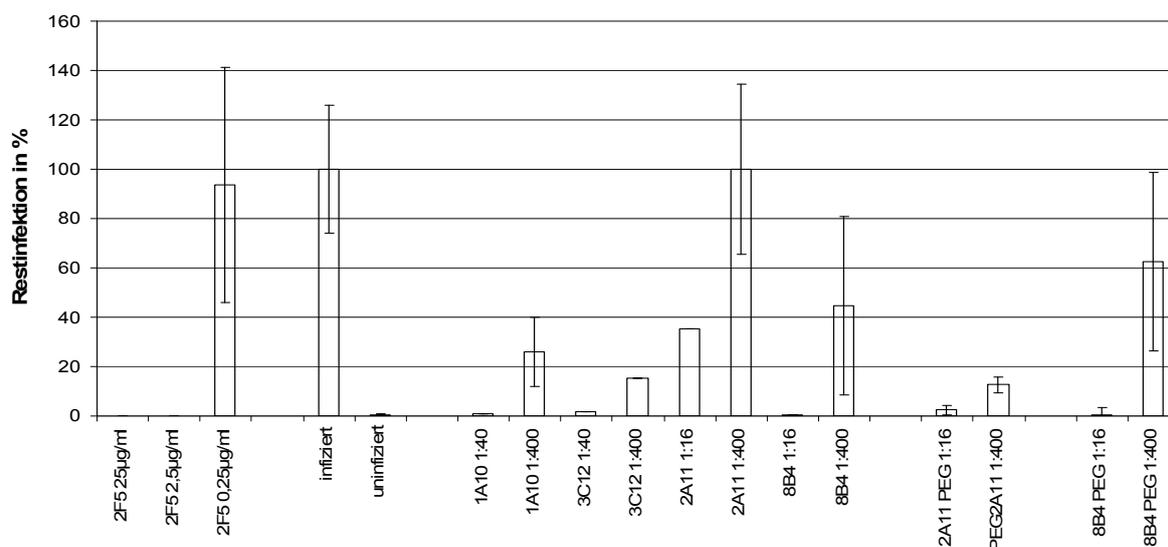


Abb.27: Real-Time-PCR-Analyse der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigten IgM der Klone 1A10, 2A11, 3C12 und 8B4 (selbe Aufteilung wie in den obigen CEM-Assays). Gezeigt ist die Restinfektion in Prozent.

Für IgM des Klons 2A11, die im vorausgegangenen Test neutralisierten, lag die gemessene Infektion zwar unter 40%, jedoch war der Neutralisationseffekt deutlich schwächer als im CEM-Test.

Die Polyethylenglykol-gefällten Antikörper zeigten in der 1:16 Endverdünnung einen neutralisierenden Effekt, der im CEM-Assay nur schwach angezeigt wurde bzw. nicht zu sehen war.

Die IgM der Klone 1A10 und 3C12 hatten nach der Real-Time-PCR-Analyse auch einen neutralisierenden Effekt, der mit abnehmender Konzentration verringert wurde. Insgesamt liegt die Restinfektion von 8B4 jedoch bei nur 2% und somit unter den Neutralisationswerten der anderen getesteten IgM. Er zeigt das deutlichste Neutralisationspotential.

3.1.2.11. Analyse des monoklonalen Antikörpers 1A10 in der Immunfluoreszenz

Um die Erkennung des Transmembranproteins gp41 sichtbar zu machen, wurden transfizierte 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) verwendet. Die 293 gp41-Zellen sind so verändert, dass sie auf ihrer Oberfläche gp41 exprimieren. Zuerst wurde der mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigte murine monoklonale Antikörper 1A10 in einer 1:20- Verdünnung analysiert (Abb.28). Im Fluoreszenzmikroskop wurden Aufnahmen bei einer Anregung von 488nm und einer Messung der Emission bei 530nm gemacht. Bei diesen Einstellungen ist die Fluoreszenz von FITC als grüne Farbe zu sehen. Die Eigenfluoreszenz von Zellen konnte mit einem anderen Filter als rotes Leuchten sichtbar gemacht werden. Auch bei der Anregung bei 488nm sieht man die Eigenfluoreszenz grün. Deshalb wurden zur Verdeutlichung des Unterschiedes Eigenfluoreszenzmessung und FITC-Detektion übereinander gelegt. Die dann noch grünen Bereiche sind auf FITC-markierte Antikörper zurückzuführen.

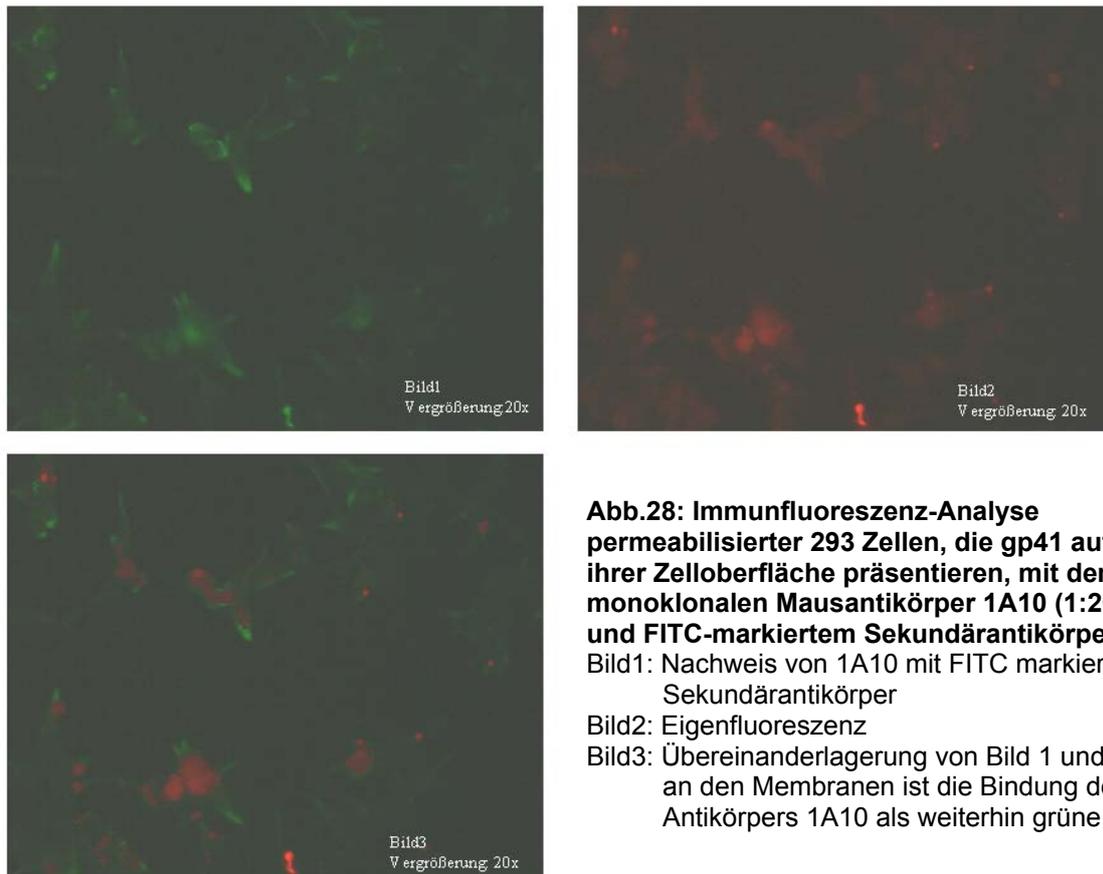


Abb.28: Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit dem monoklonalen Mausantikörper 1A10 (1:20) und FITC-markiertem Sekundärantikörper

Bild1: Nachweis von 1A10 mit FITC markiertem Sekundärantikörper
 Bild2: Eigenfluoreszenz
 Bild3: Übereinanderlagerung von Bild 1 und 2, an den Membranen ist die Bindung des Antikörpers 1A10 als weiterhin grüne

Als Kontrolle wurde der humane monoklonale Antikörper 2F5 ebenfalls mit transfizierten 293-Zellen inkubiert (Abb.29). Mit 2F5 ist die Bindung deutlicher zu sehen als mit 1A10, er liegt jedoch auch in reinerer Form und höheren Konzentrationen vor. Zudem ist er affiner als 1A10, was an der deutlich stärkeren Grünfärbung zu erkennen ist.

Als letzte Kontrolle wurde nur der Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz eingesetzt (Abb.30). Besonders in der Überlagerung der Bilder sieht man deutlich, dass der Sekundärantikörper alleine nicht an gp41 auf der Zellmembran binden kann.

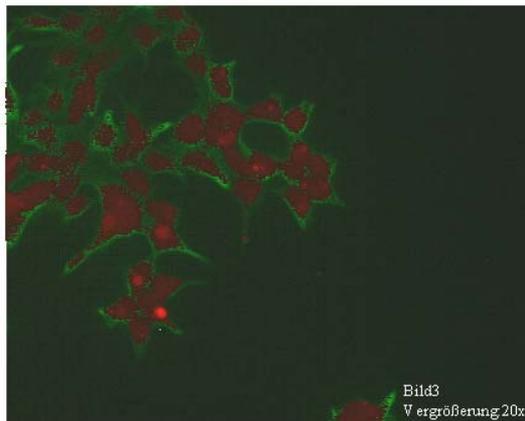
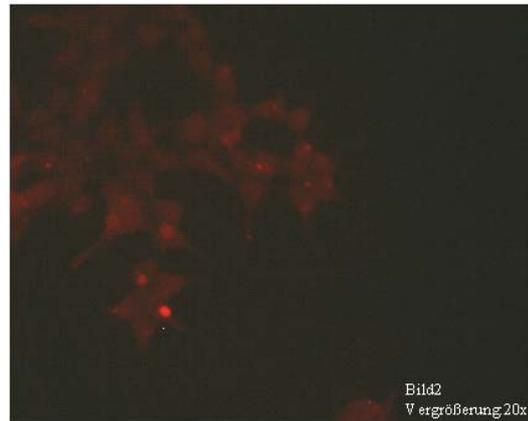
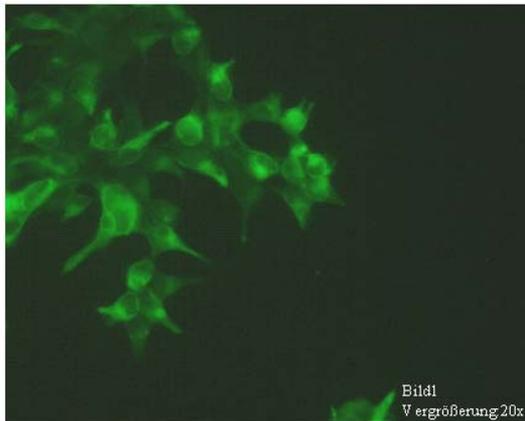


Abb.29: Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit dem humanen monoklonalen Antikörper 2F5 (1:30000) und FITC-markiertem Sekundärantikörper

Bild1: FITC markierte Antikörper auf 2F5

Bild2: Eigenfluoreszenz

Bild3: Übereinanderlagerung von Bild 1 und 2, an den Membranen ist die Bindung des Antikörpers 2F5 als weiterhin grüne Färbung zu beobachten

3.2. Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane

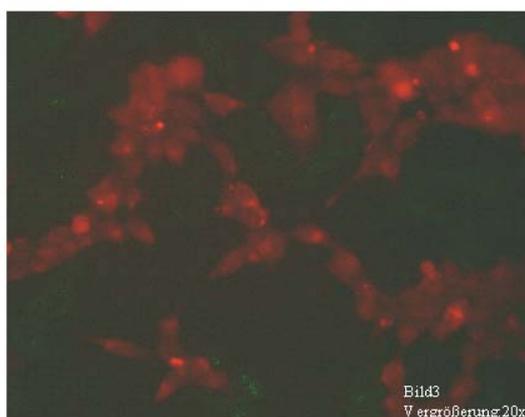
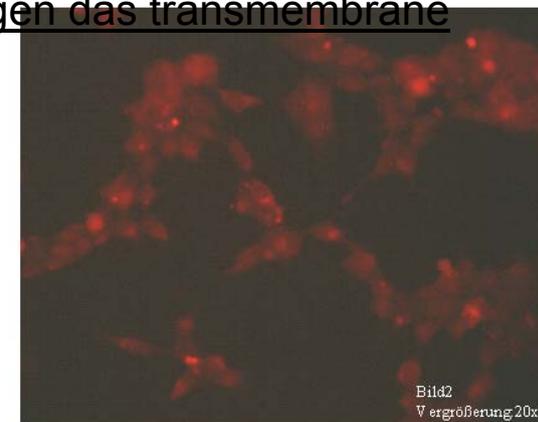
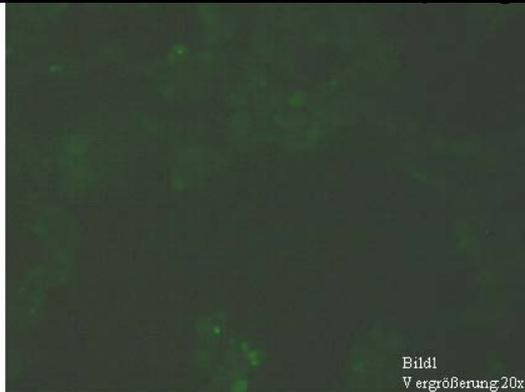


Abb.30: Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter 293 Zellen, die gp41 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, mit FITC-markiertem Sekundärantikörper

Bild1: FITC markierter Anti-Maus-Sekundärantikörper

Bild2: Eigenfluoreszenz

Bild3: Übereinanderlagerung von Bild 1 und 2, an den Membranen ist keine grüne Fluoreszenz mehr zu sehen, da die Sekundärantikörper alleine nicht an 293gp41-Zellen binden

Hüllprotein von FeLV

3.2.1. Charakterisierung der Antikörper im Serum und in Milzkulturüberstand

3.2.1.1. Nachweis bindender Antikörper im Enzymimmuntest

Von den mit FeLVp15E immunisierten Mäusen wurde vor dem ersten Boost und bei der Milzentnahme Serum gewonnen. Dieses wurde mittels Enzymimmuntest auf Antikörper gegen p15E untersucht. Zudem wurde bei der Fusion aus den Resten der Milzpräparation eine Kultur angelegt, deren Überstand ebenfalls getestet wurde.

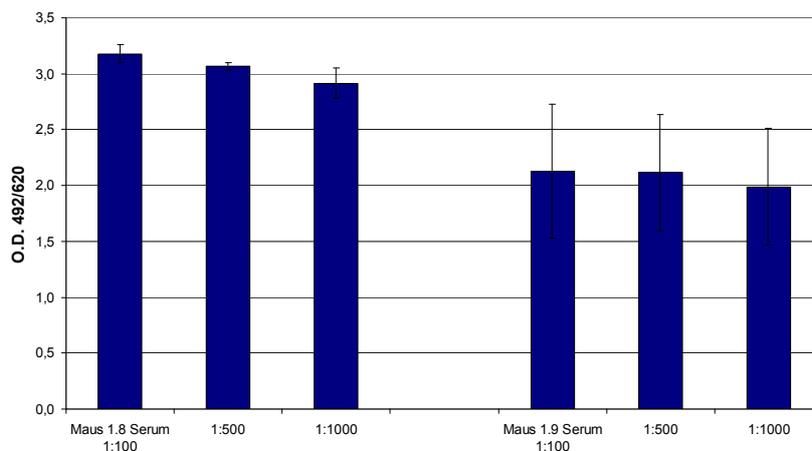


Abb.31: Enzymimmuntests der Seren der Tiere 1.8 und 1.9, an der festen Phase ist das Protein FeLV p15E immobilisiert

Das am Tag der Fusion abgenommene Serum beider Mäuse zeigte hohe O.D.-Werte für FeLV p15E bindende Antikörper. Die Werte verringerten sich bis zu einer Verdünnung von 1:1000 um lediglich 10%. Das Serum 1.8 verursachte 30% höhere Signale als Serum 1.9, was für einen größeren Anteil an Antikörpern gegen p15E spricht.

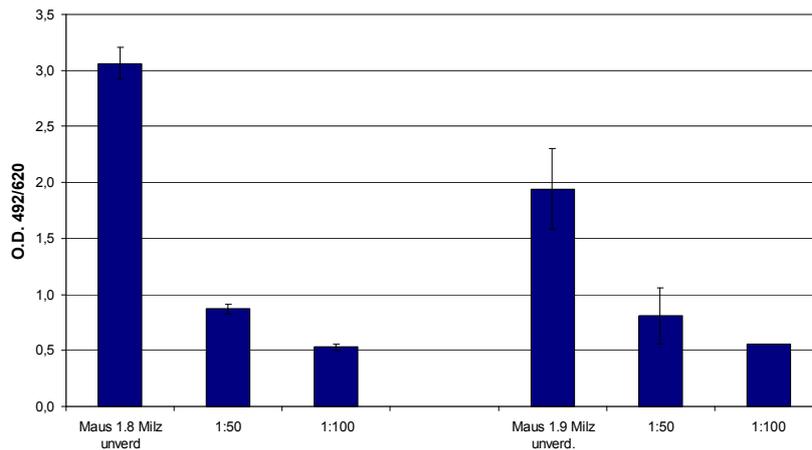


Abb.32: Enzymimmuntest der Milzkulturüberstände der Mäuse 1.8 und 1.9, an der festen Phase ist das Protein FeLV p15E immobilisiert

Unverdünnter Milzkulturüberstand beider Mäuse enthielt Antikörper gegen FeLV p15E. Auch hier zeigten sich stärker Signale für die Proben von Maus 1.8, was mit den ermittelten Serumwerten übereinstimmte. Beide Milzkulturen lieferten bis zu einer Verdünnung von 1:100 optische Dichten über 0,5 (Abb.32).

Aus diesen beiden Enzymimmuntests konnte geschlossen werden, dass die Immunisierung in beiden Tieren zur Bildung von Antikörpern gegen das Antigen p15E geführt hatte. Maus 1.8 hatte einen 30% höheren Antikörpertiter aufgebaut als Maus 1.9.

Die Milzkultur diente zusätzlich als Kontrolle eventueller Kontaminationen bei der Präparierung der Milz. Diese wurden jedoch in keinem Fall beobachtet.

3.2.2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

3.2.2.1. Charakterisierung der Bindungseigenschaften

Tier	Positive Testergebnisse	Etablierte Klone
Maus 1.8	54	keine
Maus 1.9	503	3

Tabelle 4: Übersicht über positive Testergebnisse der eingesetzten Kulturüberstände
Bei der Fusion der Milz des Tieres 1.8 mit Myelomzellen, wuchsen auf acht 96Wellplatten lediglich 11 sichtbare Klone. Die ersten positiven Ergebnisse beruhten in diesem Fall auf noch vorhandenen Milzzellen, da reklonierte Klone keine positiven ELISA-Ergebnisse erzeugten. Für Maus 1.9 waren nach der Fusion auf allen acht Platten etwa 50% der Näpfe von Hybridomen bewachsen.

Die gewonnenen Klone wurden nach der HAT-Selektion im Enzymimmuntest untersucht. Dazu wurde an der festen Phase p15E-Protein immobilisiert. Als Kontrolle für die Spezifität wurde auf unspezifische Proteine getestet. Es wurden Klone ausgewählt die Antikörper produzierten, die an p15E banden, jedoch nicht an Plastik, BSA oder FKS.

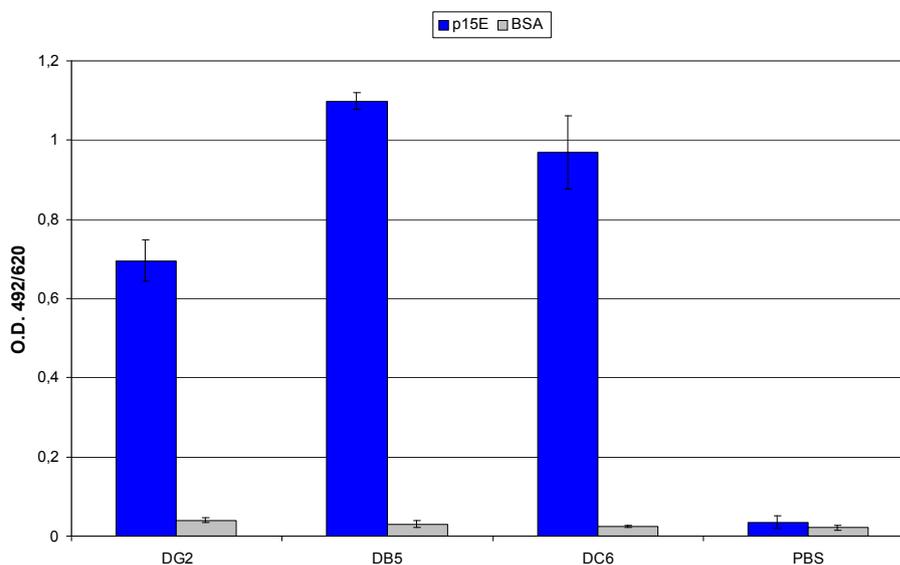


Abb.34: Enzymimmuntest der Kulturüberstände von Klonen der Maus 1.9, an der festen Phase war das Protein p15E bzw. BSA immobilisiert, analysiert wurden die Kulturüberstände der Klone DG2, DB5, DC6 und als negative Kontrolle PBS.

Die ausgewählten Klone DG2, DB5 und DC6 zeigten eine spezifische Bindung an FeLVp15E und wurden daraufhin in Neutralisationstests eingesetzt. Dort lies sich keine neutralisierende Aktivität nachweisen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2. Subklassentest

Um die zugehörige Subklasse der monoklonalen Antikörper gegen p15E FeLV zu bestimmen, wurde ein Enzymimmuntest mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt. Im Test (Abb.35) zeigte sich, dass die Antikörper DG2, DB5 und DC6 der Subklasse IgG1 angehören.

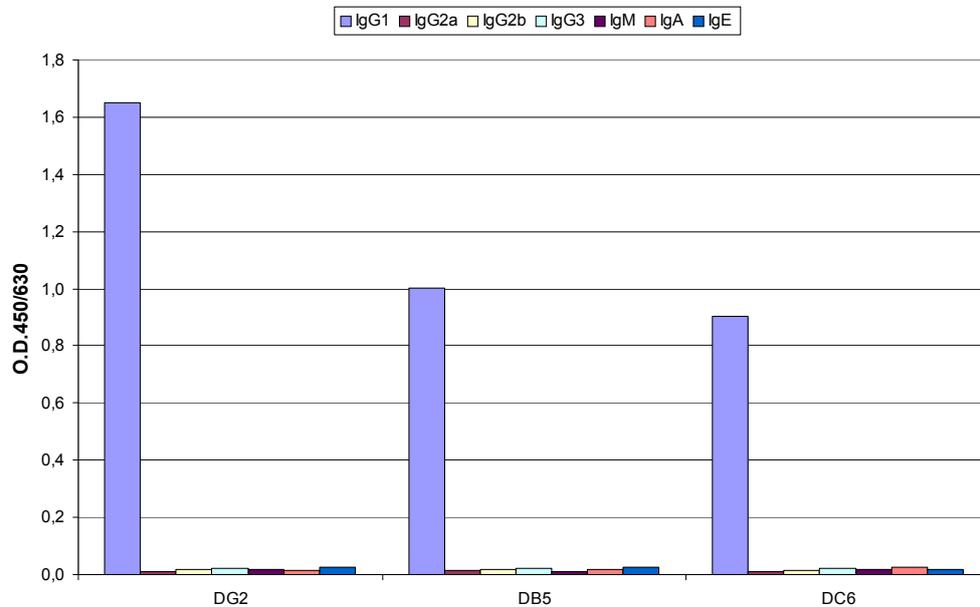


Abb.35: Subklassentest von Hybridom- Kulturüberständen der Maus 1.9

An der festen Phase war FeLVp15E immobilisiert, biotinylierte subklassenspezifische Sekundärantikörper wurden 1:2000 in PBS/10%FKS verdünnt und mittels Streptavidin-POD detektiert

3.3. Klonierung und Expression des transmembranen Hüllproteins p15E von FeLV mit deletierter isu-Domäne (p15E Δ isu)

Im transmembranen Bereich von FeLV p15E liegt die isu-(immunsuppressive) Domäne. Um nachzuweisen, ob bei ihrer Deletion bessere Immunantworten entstehen, sollte sie ausgeschnitten werden und mit dem verkürzten p15E sollten Mäuse immunisiert werden.

Um die eventuell benötigte Konformation des Peptids zu erhalten, wurde nicht nur die Sequenz der isu-Domäne entfernt, sondern auch eine entsprechend lange Aminosäuresequenz an der im gefalteten Zustand gegenüberliegenden Domäne ausgeschnitten. Die isu-Domäne und die C-terminale Domäne sind durch einen Cysteinloop, der die Konformation bestimmt, getrennt.

Zunächst sollten die beiden Fragmente mittels PCR „ausgeschnitten“ und amplifiziert werden, dann sollten die entstandenen Fragmente ligiert und das Ganze in einen pCAL-n-Vektor kloniert werden. Mittels dieses Vektors sollte das neue Protein in *E.coli*-Zellen exprimiert werden und aufgereinigt werden. Nach diesem Schema wurde auch das rekombinante FeLV-A p15E gewonnen.

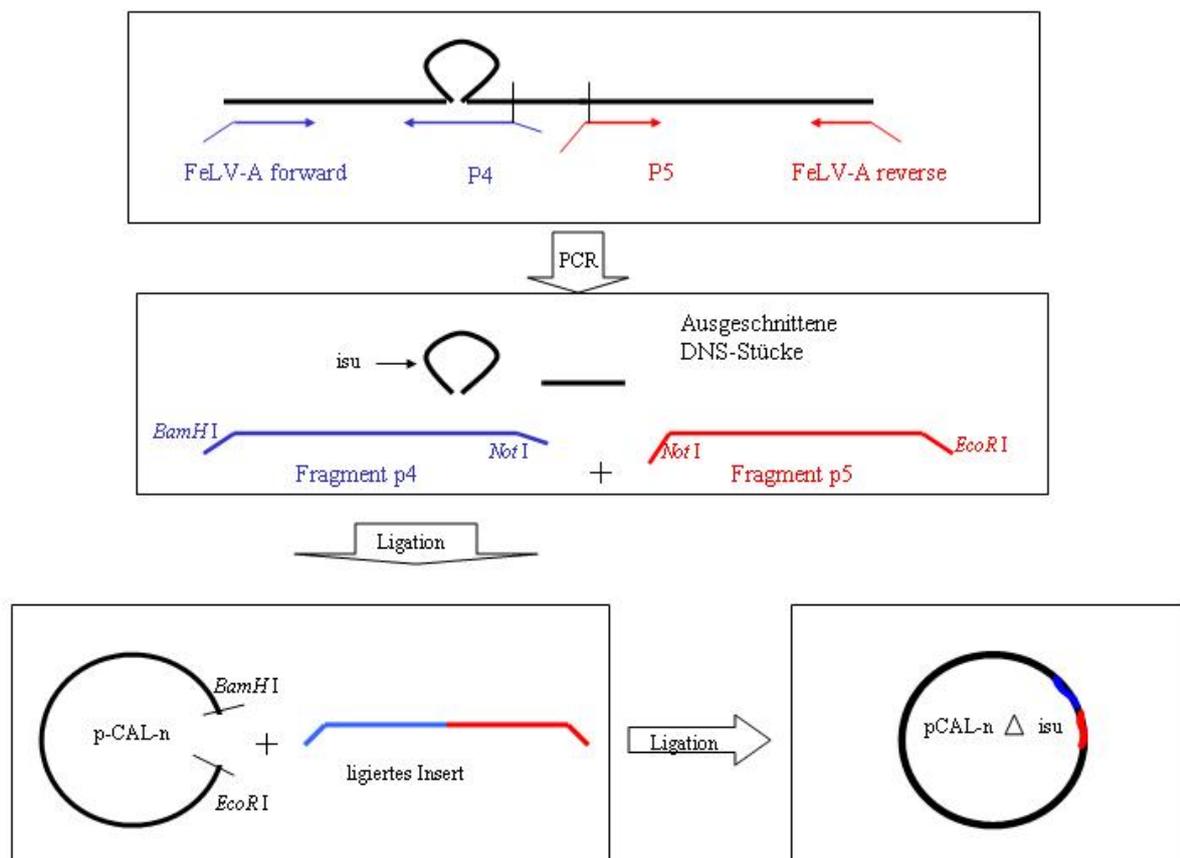


Abb.36: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie

3.3.1. Gradienten-PCR zur Gewinnung des Inserts

Mit Hilfe einer Gradienten-PCR wurde ermittelt, welche Annealing-Temperatur für die weiteren Amplifizierungen eingesetzt werden sollte. Außerdem wurden durch den Einsatz ausgewählter Primer die beiden Fragmente p4 und p5 amplifiziert. Das Produkt wurde später als Insert verwendet.

Nach der Gelelektrophorese waren keine deutlichen Unterschiede bei der Amplifikation mit unterschiedlichen Temperaturen zu sehen. Es wurde eine mittlere Annealingtemperatur von 55°C für spätere Versuche ausgewählt, da so ein Kompromiss zwischen Spezifität und Sensitivität (niedrigere Annealingtemperatur für längere Zeit lässt mehr Möglichkeiten zum Hybridisieren, es können jedoch mehr unspezifische Amplifikate entstehen) ermöglicht wurde.

Auf den Gelbildern konnte durch den Vergleich der Fragmentgröße mit dem Größenstandard (1kb⁺-Marker) überprüft werden, dass die gewünschten Sequenzen amplifiziert worden waren. Das Fragment p4 hatte eine Größe von 138 bp. Fragment p5 war im Gel bei 75bp zu sehen (Abb.37).

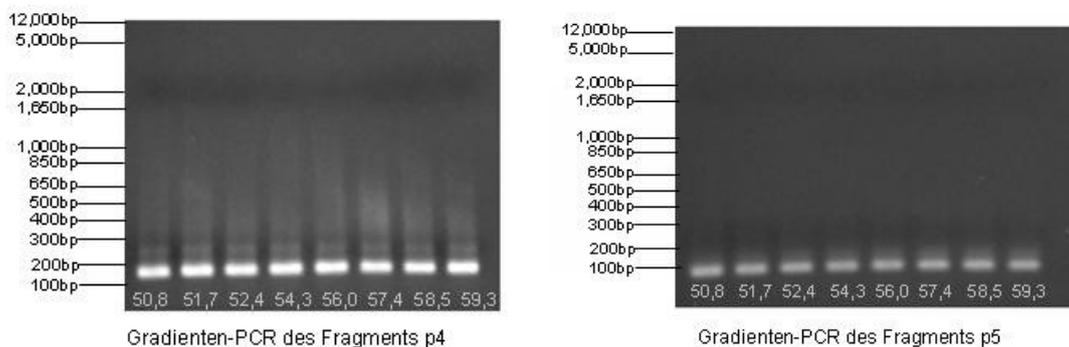


Abb.37: Gradienten PCR zur Gewinnung der Fragmente p4 und p5, Marker 1kb⁺

3.3.2. Restriktionsverdau des Vektors pCAL-n und des Inserts

Nach der Extraktion der identifizierten Fragmente und dem Restriktionsverdau mit *BamH* I und *Not* I bei p4 bzw. *EcoR* I und *Not* I bei p5 wurden die Fragmente aufgereinigt und danach mit T4- oder Quickligase ligiert. Um eine größere Menge der Fragmente zur Verfügung zu haben, wurde eine PCR mit den Primern FeLV forward und FeLV reverse durchgeführt. Im Gelbild (Abb.38) konnte man erkennen, dass die Ligation und die Amplifikation erfolgreich waren und das neu entstandene Fragment aus p4 und p5 auf der erwarteten Höhe von 213 bp lag.

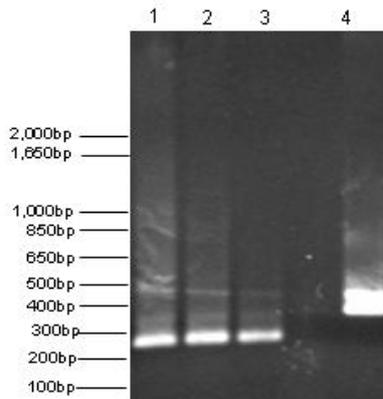


Abb.38: Ligation der Fragmente p4 und p5 nach PCR (Spur 1, 2 und 3); Spur4: FeLV p15E, Marker 1kb⁺

Der Erfolg der Restriktion des pCAL-n-Vektors wurde ebenfalls durch eine Gelelektrophorese überprüft. Der geschnittene Vektor lag bei einer Höhe von 5,6 kb und das ausgeschnittene Fragment (in der MCS zwischen den Restriktionsstellen *BamH* I und *EcoR* I) bildete eine Bande von 330 bp (Abb.39). Durch das Ausschneiden und Extrahieren des Vektors aus dem Gel konnte sichergestellt werden, dass sich das ausgeschnittene Fragment nicht mehr im Probenansatz befand. Bei einer weiteren Ligation hätte sonst statt des gewünschten Inserts auch das alte Fragment mit dem Vektor religieren können. Zusätzlich wurde ein SAP-Verdau durchgeführt, der durch das Abverdauen der Phosphatgruppen am 3'-Ende eine Vektorreligation verhindern sollte.

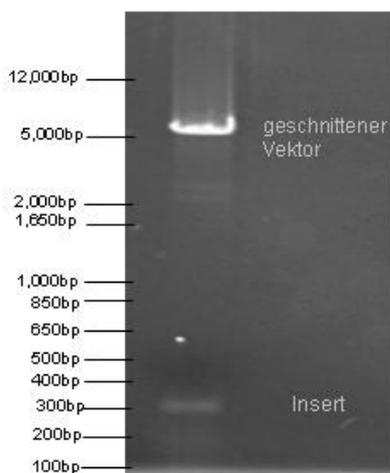


Abb.39: Agarosegelelektrophorese des pCALn- Vektors geschnitten mit *Bam* HI und *Eco*RI (5,6kb) und ausgeschnittenes Insert (330bp)

3.3.3. Transformation und Kolonie-PCR

Nach der Extraktion des Vektors wurde die Ligation mit dem Insert p4+p5 durchgeführt. Dies war zuvor nochmals aufgereinigt worden, um unspezifische Nebenprodukte aus der PCR zu entfernen.

Der neu entstandene Vektor wurde in kompetente *E.coli* TopTen-Zellen transformiert und diese wurden auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen. Nach 16 Stunden konnten mehrere Klone auf den Agarplatten identifiziert werden. Um festzustellen, dass diese den gewünschten Vektor (mit den gewünschten Fragmenten) enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die DNA der gepickten Klone diente dabei als Template und wurde durch die Primer FeLV forward und reverse amplifiziert. In Abb.40 ist die Analyse von 4 gepickten Klonen gezeigt. In Spur 2, 3 und 4 liegt ein positives Ergebnis vor, da die FeLVp15E Δ isu-Konstrukte im Gel eine Bande von ca. 530bp ergeben, die unter der Kontrollbande von FeLVp15E liegt. Der Klon in Spur 1 weist mehrere Banden auf, unter anderem auch auf der Höhe des FeLVp15E (ca. 600bp). Dieser Klon enthält also das nicht deletierte p15E.

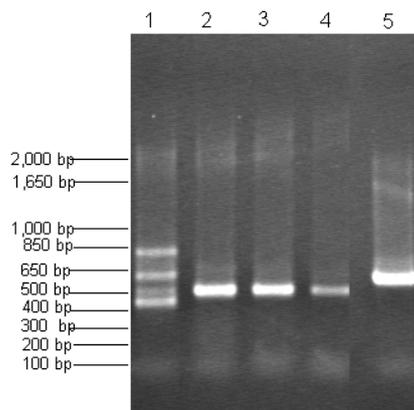
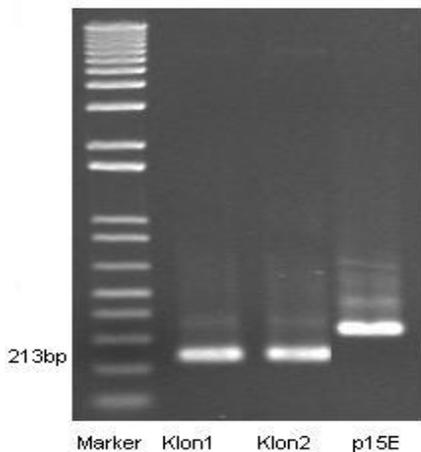


Abb.40: Kolonie-PCR gepickter p15E Δ isu-Klone

Spur1: negativer Klon, Spur 2-4: positive Klone, Spur5: p15E-Kontrolle; Marker 1kb⁺



Als letzte Überprüfung vor der Sequenzierung wurde noch eine PCR der Minipräparation zweier in der Kolonie-PCR positiven Klone durchgeführt. Dafür wurden der FeLV forward und der FeLV reverse Primer eingesetzt und es wurden wieder die spezifischen Banden bei 213bp detektiert (Abb.41). Es konnte so sichergestellt werden, dass durch die Minipräparation keine Verunreinigungen o.ä. auftraten.

Abb.41: PCR mit den FeLV forward und reverse Primern zur Überprüfung der Minipräparation zwei gepickter und für positiv befundener Klone

Klon 1 und 2 (Abb.41) wurden daraufhin sequenziert. So konnte belegt werden, dass beide genau die Ziel-Sequenz aufwiesen (Daten siehe Anhang).

3.3.4. Expression und Charakterisierung des p15E Δ isu

Klone 1 und 2 wurden daraufhin in den *E.coli*-Expressionsstamm BL1-Blue transformiert und es wurden davon 500ml-Kulturen angelegt. Das produzierte Protein wurde durch Lyse aus den Zellen gewonnen, getrocknet, in PBS suspendiert und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Hiermit konnte (wieder anhand der Größe) nochmals belegt werden, dass das gewünschte Δ isu-Peptid transformiert und exprimiert worden war: Im Unterschied zum ebenfalls aufgetragenen p15E (ca.16kDa) liegt das exprimierte Peptid zwischen 17 und 7kDa (ca. 12 kDa). Beide Proteine sind um ca. 4kDa schwerer als errechnet, da das Gewicht des Calmodulinbindeproteins (4kDa) noch hinzukommt.

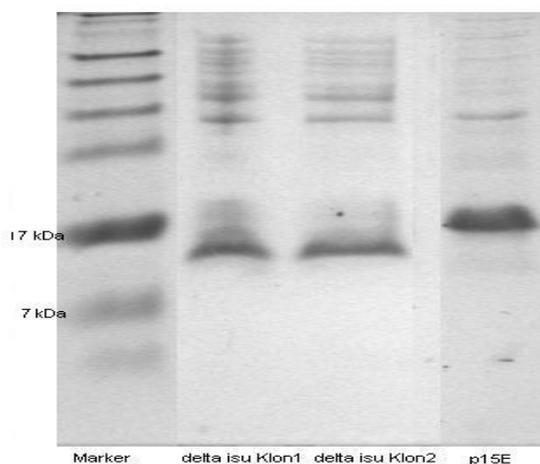


Abb.42: SDS-Gelanalyse der Δ isu Expression; Spur1: Marker SeeBluePlus2, Spur2 und 3: exprimiertes Protein aus den Klonen 1 und 2, Spur4: FeLVp15E-Kontrolle

Zur Verdeutlichung des Effekts der Deletion und zur Überprüfung der Größen im SDS-Gel wurde die Aminosäuresequenz von p15E FeLV-A und Δ isu miteinander verglichen. Dazu wurde mit Hilfe des Programms EditSeq (DNA-Star) die sequenzierte Nukleotidsequenz in Aminosäuren umgeschrieben. Die deletierten Aminosäuren wurden rot gekennzeichnet.

p15E FeLV-A: 12,5 kDa

LETAQFRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSEVVLQNRRLDILFLQEGGLCAALKEEC
CFYADHTGLVRDNMAKLRERLKQRQQLFDSQQGWFEFGWFKSPWF

Δ ISU FeLV: 8,29 kDa:

LETAQFRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSELCAALKEECCAAARKQRQQLFDSQQ
GWFEFGWFKSPWF

In der Δ ISU FeLV-Sequenz waren aufgrund der eingefügten Restriktionsstellen drei Alanine hinzugekommen (blaue Buchstaben). Die restliche Sequenz stimmte jedoch genau mit der erwarteten Aminosäureabfolge überein.

4. Diskussion

Etablierung von Antikörpern gegen HIV-1 gp41

Gründe zur Herstellung neutralisierender Antikörper gegen gp41

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten vier monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 des HIV-1 etabliert und charakterisiert werden. Diese wurden durch Immunisierung mit gp41-abgeleiteten Peptiden (E1 und E2) und die Herstellung von Zellklonen, die die monoklonalen Antikörper produzieren, durch Fusion von Milzzellen der immunisierten Tiere mit Mausmyelomzellen erhalten und erkannten die zur Immunisierung eingesetzten Peptide unterschiedlich stark. Drei der vier untersuchten monoklonalen Antikörper (1A10, 3C12 und 8B4) erkannten das C-terminale Peptid E2 besser als das N-terminale Peptid E1. Im Gegensatz dazu erkannten die Antikörper des Klons 2A11 Peptid E1 stärker als E2 (siehe Abb.13).

Das für die Immunisierung verwendete Peptid E2 (CNEQELLELDKWLWNWFDITNWL) beinhaltet eine 6 bzw. 7 Aminosäuren lange Sequenz (ELDKWA(S)), die als Epitop des neutralisierenden monoklonalen Antikörpers 2F5 identifiziert wurde (Muster et al., 1993). Zudem liegt das Epitop NWFDIT, das von dem humanen neutralisierenden Antikörper 4E10 erkannt wird, drei Aminosäuren entfernt vom 2F5-Epitop, ebenfalls im Peptid E2 (Stiegler et al., 2001). Dieses Epitop ist vor allem wegen der Sequenzhomologie mit Epitopen, die von neutralisierenden Antikörpern gegen PERV erkannt werden (50% Sequenzübereinstimmung), von Interesse. Zudem zeigte sich in Studien mit Primärisolaten HIV-infizierter Patienten, dass 4E10 91 von 91 Primärisolaten des Stammes B neutralisieren konnte (Mehandru, et al., 2004).

In zahlreichen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass bindende Antikörper gegen das neutralisierende Epitop von 2F5 induziert werden können, diese jedoch nicht HIV-neutralisierend sind (siehe Tab.1 in der Einleitung).

Eine der wenigen Ausnahmen wurde in der Arbeit von Marusic et al. (2001) beschrieben. Rekombinantes PVX (potato virus X) wurde mit der HIV-Sequenz ELDKWA am N-Terminus des Hüllproteins modifiziert. Im Tiermodell mit hu-PBL-SCID-Mäusen (human/peripheral blood lymphocyte (PBL)-severe combined immunodeficiency (SCID)) konnten bindende Antikörper nachgewiesen werden und die Seren inhibierten die Syncytienbildung von C8166-Zellen nach Infektion mit HIV-1

IIIB. Es konnte dennoch keine subtypübergreifende Neutralisation festgestellt werden.

Allgemein gesehen, müssen induzierte Antikörper für einen effektiven Impfschutz das Virus am Eindringen in die Zelle hindern, das heißt, sie müssen das Oberflächenprotein gp120 oder die Ektodomäne des Transmembranproteins gp41 binden. Gp120 ist genetisch sehr variabel (innerhalb eines Subtyps bis zu 20% Varianz, subtypenübergreifend bis zu 35% (Gaschen et al., 2002)) und besitzt eine stark glykosylierte Oberfläche. Deshalb bietet es nur wenige Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper und es konnten *in vivo* stabile Fluchtmutanten gegenüber cytotoxischen T-Zellen und neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden (Langedijk et al., 1995, Goulder et al., 2001).

Das transmembrane Hüllprotein gp41 ist deutlich konservierter als gp120 (maximal 15% Sequenzvarianz zwischen verschiedenen Subtypen der Gruppe M (Gaschen et al., 2002)), was in der geringeren Variabilität der für die Fusion notwendigen Strukturen begründet liegt. Deshalb wird angenommen, dass es ein besseres Ziel für neutralisierende Antikörper darstellt als gp120.

Möglicher Mechanismus der Wirkung der neutralisierenden Antikörper

Die hier beschriebenen Versuche lassen sich auf Untersuchungen zur Virussicherheit porziner Xenotransplantate zurückführen, in denen die Ektodomäne des Transmembranproteins des porzinen endogenen Retrovirus PERV, p15E, in Immunisierungsversuchen eingesetzt wurde (Fiebig et al., 2003). In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Immunisierung mit der rekombinant generierten p15E-Ektodomäne neutralisierende Antikörper gegen PERV induziert werden können. Auf dieser Basis könnte ein präventiver Impfstoff zum Schutz potentieller Xenotransplantatrezipienten entwickelt werden. Die Charakterisierung der induzierten Antikörper zeigte eine Immundominanz zweier Domänen, eine im N-terminalen und eine im C-terminalen Bereich der Ektodomäne lokalisiert. Aufgrund der Ergebnisse der ELISA-Bindungsstudien und der Wettbewerbsversuchen im *in vitro* Neutralisationstest, wurde die Bildung eines Konformationsepitopes durch diese beiden Domänen vermutet und die Arbeitshypothese aufgestellt, dass zur stabilen Bindung und auch zur Neutralisation zusätzlich ein zweites Epitop (E1) notwendig ist. Deshalb wurden in dieser Diplomarbeit zwei Peptide, die von den entsprechenden Domänen des

transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 abgeleitet wurden, zur Generierung der monoklonalen Antikörper eingesetzt. Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Peptid E2, wurde das Peptid E1 (LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSC) verwendet. Dieses Peptid wurde in ELISA-Bindungsstudien mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 entdeckt. Der neutralisierende Antikörper erkannte die Kombination der Peptide E1 und E2 synergistisch, das heißt die gemessene optische Dichte entsprach einem höheren Wert als die Addition der gemessenen optischen Dichte für äquivalente Mengen an Einzelpeptiden (Schmolke, 2004).

Mögliche Gründe für die ausschließliche Gewinnung von Antikörpern der Klasse M

Die verwendeten Peptide E1 und E2 hatten an ihren N- bzw. C-terminalen Enden Cysteine. Durch die Dimerisierung beider Peptide über Cysteinbrücken könnten Peptide mit einer Gesamtlänge von 50 Aminosäuren entstehen. Die Induktion einer Immunantwort im Versuchstier ist entscheidend abhängig von der Größe des Antigens (Janeway, 2002). Die Prozessierung und Präsentation von Peptiden auf B-Zellen, die zur Erkennung durch T-Zellen und die Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen nötig ist, kann nur durch ausreichend große Peptide erfolgen. Bei einer schwachen Immunantwort, das heißt, wenn nur wenige T-Zellen aktiviert werden, ist die Konzentration an sezernierten Cytokinen entsprechend geringer. Dies führt dazu, dass der cytokinabhängige Antikörperklassenwechsel nicht stattfinden kann und somit eine Dominanz der Immunglobuline der frühen Phase (IgM) vorliegt.

In diesem Versuch konnten auch nach dreimaliger Immunisierung der Versuchstiere ausschließlich Hybridome generiert werden, die Antikörper der Klasse M produzieren. Dies könnte daran liegen, dass das Antigen trotz Dimerisierung zu klein für eine effektive Immunantwort war oder nur partielle Dimerisierungen stattfanden. Die Peptidfragmente könnten dann zwar von B-Zellen gebunden und internalisiert werden, wären aber möglicherweise zu klein um prozessiert und T-Zellen präsentiert zu werden. Die betreffende B-Zelle könnte in diesem Fall also nicht durch eine T-Zelle stimuliert werden. Dieses Problem ist für Haptene seit längerem bekannt, deshalb werden diese kleinen Moleküle zur Immunisierung an große Trägermoleküle (Carrier) gekoppelt. Zukünftig wäre zu überlegen, ob zur Immunisierung weiterer Tiere mit den Peptiden E1 und E2 an Trägermoleküle gekoppelte Peptide verwendet werden sollten.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die verwendete Immunisierungsstrategie nicht zur Bildung anderer Antikörperklassen führte. Wenn zur Immunisierung zu geringe oder auch zu hohe Mengen an Antigen eingesetzt werden, kommt keine Immunantwort zu stande (Janeway, 2002). Da im Immunisierungsschema für die erste Immunisierung 100µg und für die zweite und dritte Immunisierung 500µg Peptid injiziert wurde, könnte eine zu hohe Menge an Antigen eingesetzt worden sein. Deshalb sollten andere Strategien auf ihren Einfluss auf die Immunantwort und die induzierten Antikörperklassen hin untersucht werden. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, beim letzten Immunisierungsschritt Interleukin-4 zu injizieren. In einer Arbeit von Schenk et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass dadurch der Anteil an IgG produzierenden Hybridomen anstieg.

Spezifität der monoklonalen Antikörper

Nach der Zellfusion wurden Hybridome selektiert, die Antikörper sezernierten, die im ELISA spezifisch die Peptide E1 und E2 erkannten und nicht mit Plastik oder BSA reagierten. Um eine möglichst hohe Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen HIV-1 gp41 nachzuweisen, wurde zusätzlich auf Bindung an das feline Leukämievirusprotein p15E getestet. Eine schwache Bindung an dieses transmembrane Hüllprotein konnte bei allen untersuchten Antikörpern nachgewiesen werden (Abb.13). FeLV p15E hat eine ähnliche tertiäre Proteinstruktur wie HIV-1 gp41, da es sich bei beiden um retrovirale Transmembranproteine handelt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien an FeLV p15E lassen sich zum einen damit begründen, dass die ausgewählten IgM trotz sorgfältiger Selektion nicht spezifisch genug sind, um den Unterschied zwischen beiden Transmembranproteinen im ELISA zu erkennen (Kreuzreaktivität). Es konnte jedoch im ELISA auch ein schwache Bindung von 2F5 an FeLV p15E detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise können p15E und die Peptide E1 und E2 eine ähnliche Konformation einnehmen und werden deshalb beide erkannt.

Eine mögliche Ursache der Selektion kreuzreaktiver Antikörper könnte im verwendeten Enzymimmunttest bzw. im „Festkleben“ der Peptide an die feste Phase liegen. Es wird zwar davon ausgegangen, dass die denaturierenden Effekte beim Eintrocknen für kurze Peptide unerheblich sind, eine Denaturierung der Struktur der verschiedenen Peptide würde jedoch die Kreuzreaktivität selektierter Klone erklären. Durch Adsorption der Peptide bei 4°C und ohne Eintrocknen würde die Konformation der Peptide wahrscheinlich besser erhalten bleiben. In vorhergehenden Tests zeigte

sich aber, dass sich die HIV-Peptide E1 und E2 bei diesen Bedingungen schlecht immobilisieren lassen. Eine andere Option wäre deshalb, die gewonnenen Antikörper an der ELISA-Platte zu immobilisieren und mit markierten Peptiden zu detektieren (Prof. Micheel, persönliche Mitteilung). Die Konformation der Peptide würde dadurch erhalten bleiben und die Selektion sollte spezifischer sein. Für diese Diplomarbeit lagen jedoch keine markierten Peptide vor. Für zukünftige Untersuchungen kann es sinnvoll sein, zum Beispiel radioaktiv- oder biotinmarkierte Peptide herzustellen.

Warum werden bei der Epitopkartierung mehrere Epitope detektiert?

Die etablierten murinen monoklonalen Antikörper gegen die gp41-Peptide E1/E2 erkannten bei der Epitopkartierung auf der gp41-Peptidmembran mehrere Epitope. Da monoklonale Antikörper einer Hybridomzelle alle die selbe Spezifität besitzen sollten und das Paratop eines spezifischen Antikörpers auf die Detektion seines spezifischen Epitops festgelegt ist, war bei der Epitopkartierung die Bindung nur eines bzw. im Falle eines Konformationsepitops die Bindung an E1 und E2 erwartet gewesen. Fraglich ist, ob das postulierte Konformationsepitop mit einer Pepspotmembran detektiert werden kann. Im Fall des humanen neutralisierenden Antikörpers 2F5 lässt sich lediglich ein Epitop kartieren (ELDKWA), obwohl in ELISA-Bindungsstudien mit 2F5 die Peptidkombination E1 und E2, im Vergleich zu äquivalenten Mengen des einzelnen Peptids E2, wesentlich höhere optische Dichten erzeugt (Schmolke, 2004).

Dass die Erkennung mehrerer Epitope auf dem Vorliegen eines Antikörpergemischs im Hybridomzellkulturüberstand beruht, ist aufgrund mehrfacher Reklonierungen unwahrscheinlich. Um zu überprüfen, ob die mehrfachen Bindungen aus der geringeren Affinität von IgM-Pentameren resultieren, könnte in Zukunft eine Aviditätsbestimmung durchgeführt werden. Für die Spezifität der monoklonalen Antikörper spricht, dass sie nicht auf der ganzen Pepspotmembran unspezifische Signale auslösten und in wiederholten Versuchen die kartierten Epitope gleich blieben.

Fast alle erkannten Epitope lagen im Bereich der zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen. Der Antikörper 8B4 erkannte einen Teil der ELDKWAS-Sequenz (KWASL). Die Erkennung dieser Sequenz ist für den Neutralisationseffekt von 2F5 unerlässlich (Purtscher et al., 1996). Ein Epitop im Peptid E1 konnte jedoch, ähnlich wie bei 2F5, bei der Epitopkartierung nicht detektiert werden. Auch der monoklonale Antikörper 1A10 erkannte ein Epitop im E2-Bereich (DKWASLW). Der Antikörper

8B4 band zudem an ein Epitop (ILAVERYLK) in der außerhalb der für die Immunisierung verwendeten Peptide liegenden ISU-Domäne, welches der Antikörper 1A10 nicht erkannte. Ob die Bindung des monoklonalen Antikörpers 8B4 an die ISU-Domäne eine unspezifische Reaktion darstellt oder ob die Konformation dieser Domäne spezifisch von 8B4 erkannt wird ist unklar.

Allerdings ist bekannt, dass auch monoklonale Antikörper verschiedene Epitope erkennen können, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, aber offensichtlich durch eine identische Konformation charakterisiert sind. In einer Veröffentlichung von Reinecke et al. (2002) werden solche Peptide mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz aber scheinbar identischer Tertiärstruktur Mimotope genannt, da sie das Epitop bzw. das Antigen „mimen“. Für den monoklonalen Antikörper CB4-1 (anti-p24 HIV-1-Antikörper) konnten in dieser Arbeit Mimotope die nicht mit der Sequenz des Wildtypepitops übereinstimmen, nachgewiesen werden.

Auch der neutralisierende monoklonale Antikörper 4E10 erkennt, besonders in höheren Dosen, mehrere Epitope. So wurde sein Epitop zunächst mit AEGTDRV beschrieben (Zwick et al., 2001), bis erkannt wurde, dass das für die Neutralisation verantwortliche Epitop NWFDIT ist (Binley et al., 2004). Um herauszufinden, ob dies auch für den Antikörper 8B4 zutrifft, sind in der Zukunft Aviditätsuntersuchungen nötig.

In den zur weiteren Charakterisierung durchgeführten Western Blot Analysen konnte für die monoklonalen Antikörper 8B4 und 2A11 eine Bindung an denaturiertes gp41 nachgewiesen werden. Auch der neutralisierende Antikörper 2F5 erkannte im Western Blot das denaturierte Protein. Dieses Ergebnis würde jedoch darauf hindeuten, dass lineare Epitope erkannt werden, da man im allgemeinen davon ausgeht, dass im SDS-Gel wegen des Mercaptoethanols und der Hitze Konformationsepitope nicht erhalten bleiben (Streier, 1996). Bei Western Blot-Analysen mit dem neutralisierenden Antikörper 2F5 zeigte sich dass, das Protein TM II (enthält die Peptidregion E1 von HIV-1) besser erkannt wurde als das Peptid DP178 (enthält nur die ELDKWA-Sequenz, nicht die gesamte Peptidregion E1) (Schmolke, 2004). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass sich die TM II-Moleküle im Transferpuffer oder beim Blotten aufgrund ihrer hydrophoben Bereiche parallel zueinander anordnen (jeweils N-terminales E1 an C-terminales E2).

Auf diese Weise könnten auch im Western Blot Konformationsepitope gebildet werden, die von Antikörpern detektiert werden können.

Probleme mit Kulturüberständen bei den angewendeten Neutralisationstests und Möglichkeiten zur Aufreinigung von IgM

Die zunächst für die Neutralisationstests eingesetzten Kulturüberstände zeigten stark schwankende Ergebnisse. Verschiedene Assays ließen sich mit denselben Proben nicht kontinuierlich reproduzieren. Beim Einsatz verschiedener Kulturüberstandchargen war zudem nicht so, dass immer dieselbe Menge an Antikörper im Überstand vorlag. In Enzymimmuntests wurden für verschiedene Chargen, bei je 50µl-Aliquots, unterschiedlich hohe Werte für die optische Dichte gemessen. Die Antikörpermengen können durch Titrierung der Überstände im ELISA festgestellt werden, dieses Verfahren ist jedoch bei vielen verschiedenen Proben sehr zeitaufwendig. Weiterhin sind IgM-Pentamere weniger stabil als andere Antikörperklassen und könnten nach einiger Zeit zerfallen. Möglicherweise ist zur Neutralisation die Bindung vollständiger IgM nötig, da nur durch die Bindung aller zehn „Arme“ eine ausreichend starke Bindung möglich ist bzw. die steigende Avidität schwache Affinität ausgleicht.

Um eine konstante Menge an Immunglobulinen einsetzen zu können, wurden aus Kulturüberständen der Hybridome die Antikörper aufgereinigt. Die dazu eingesetzte BakerBond-Affinitätschromatographie-Säule bindet mit erhöhter Affinität IgM, jedoch auch andere Proteine. Dies zeigte sich in der SDS-Gelanalyse der aufgereinigten Fraktionen. Neben den Antikörperbanden bei 80kDa für die schweren Ketten und 25kDa für die leichten Ketten waren mehrere unspezifische Banden zu erkennen. Einige davon können auf partiell denaturierte IgM-Pentamere zurückgeführt werden oder aus Serumbestandteilen resultieren.

Dennoch konnte in Enzymimmuntests für die Eluate eine Anreicherung an IgM nachgewiesen werden. Die Eluate reagierten noch in 100facher Verdünnung, während entnommene Aliquots der Kulturüberstände sich nicht so weit ausverdünnen ließen. Für die Elution der Immunglobuline der Klasse M von den BakerBond-Säulen wurde eine erhöhte Salzkonzentration genutzt, um die Antikörper möglichst wenig zu denaturieren. Dennoch ist davon auszugehen, dass auch durch dieses Verfahren IgM denaturiert wurden und sich in der anschließenden Dialyse gegen PBS nicht renaturieren konnten.

Bei der zusätzlich vorgenommenen Polyethylenglykolfällung der mit Baker-Bond-Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper 8B4 und 2A11 ist anzunehmen, dass auch hier die IgM nicht vollständig renaturiert werden konnten. Durch die PEG-Fällung waren reinere und konzentriertere Proben erwartet worden, da PEG unter anderem Immunglobuline ausfällt. Im Vergleich zur Baker-Bond-Aufreinigung konnten jedoch weder Unterschiede im Reinheitsgrad (SDS-Gelelektrophorese) noch im Bindungsverhalten (ELISA) gezeigt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufkonzentration wäre eine Ammoniumsulfatfällung der Kulturüberstände oder eine Aufreinigung über ProteinL-Säulen. ProteinL bindet jedoch nur an leichte Ketten der Klasse κ . Weiterhin gibt es die Möglichkeit IgM über sogenannte HiTrap™-Säulen aufzureinigen, in welchen thiophiles Adsorptionsmedium mit 2-Mercaptopyridin an Sepharose gekoppelt ist. Dieses Verfahren wird gerade in der Arbeitsgruppe getestet.

Analyse der angewendeten Neutralisationstests

Der aufgereinigte monoklonale Antikörper 8B4 führte zu positiven Ergebnissen in verschiedenen Neutralisationstests: Sowohl in Real-Time-PCR-Analysen (Abb.27) als auch in CEM-SEAP-Tests (Abb.25, 26) konnte Neutralisation gezeigt werden, die mit zunehmender Verdünnung aufgehoben wurde. In der AG Norley konnten parallel die Neutralisationsergebnisse für den Antikörper 8B4 (in der Verdünnungsstufe 1:4) bestätigt werden (Abb.43). In einem Neutralisationstest wurde HIV-1IIIB mit verschiedenen Antikörperverdünnungen (1:4-1:512) vorinkubiert und zu C8166-Zellen gegeben. Die Neutralisationseffizienz der eingesetzten Proben wurde durch die Messung der Konzentration von HIV p24-Protein im Zelllysat bestimmt. Die Analyse wurde im p24-Capture-ELISA durchgeführt. Alle eingesetzten Proben zeigten im Zytotoxizitätstest keine zytotoxische Wirkung.

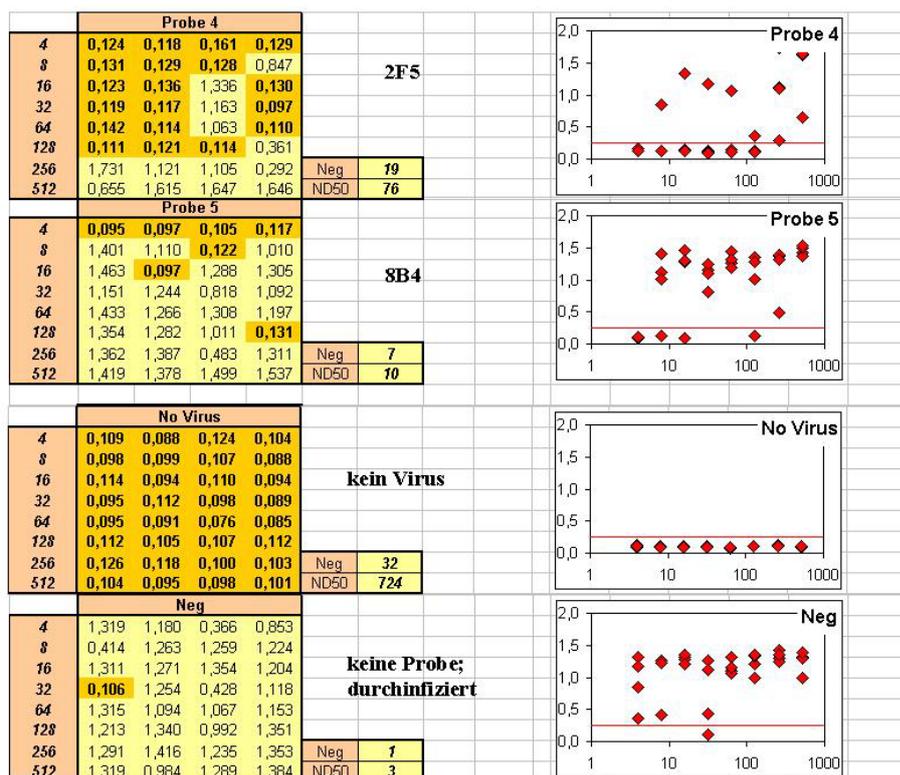


Abb.43: p24 Capture-ELISA (AG Norley): Gezeigt sind die Messwerte der optischen Dichte für die eingesetzten Antikörperverdünnungen (links), sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse unter Einbeziehung des Schwellenwertes (rechts).

Probe4: humaner Antikörper 2F5; Probe 5: mittels BakerBond-Affinitätschromatographie aufgereinigter Antikörper 8B4; Kontrollen: Test ohne Virus und durchinfizierte Proben

Die wiederholt positiven Neutralisationsergebnisse für den murinen monoklonalen Antikörper 8B4 warfen die Frage auf, ob Material aus der zur Aufreinigung verwendeten BakerBond-Affinitätschromatographie-Säule zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Da aber alle vier im Test eingesetzten monoklonalen Mausantikörper mit demselben Verfahren aufgereinigt worden waren, jedoch nur 8B4 neutralisierte, war diese Vermutung unwahrscheinlich.

Allgemein tritt die Frage auf, ob mit Immunglobulinen der Klasse M eine Neutralisation von HIV möglich ist. In einem Versuch von Kunert et al. (2004) wurde der neutralisierende monoklonale Antikörper 4E10 (IgG3) in die Subklasse IgM umkloniert. In Neutralisationsstudien mit diesem IgM-Konstrukt zeigte sich eine deutliche Abnahme der Neutralisationseffizienz bei gleich bleibenden Bindungseigenschaften im Peptid-ELISA. Möglicherweise ergeben sich durch die Größe der IgM-Pentamere sterische Behinderungen, die eine Bindung an schwer zugängliche Epitope verhindern. In Abb.44 ist schematisch die Lage der Epitope die durch die Antikörper 2F5, 4E10 und 8B4 in gp41 erkannt werden, gezeigt. Da das 8B4-Epitop weiter von der Lipidmembran entfernt liegt als 4E10, könnte es auch für Antikörper der Klasse M zugänglich sein.

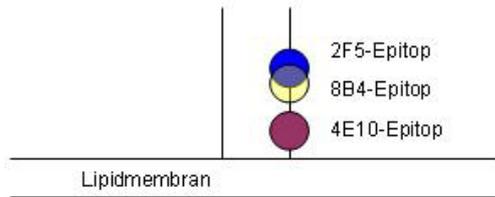


Abb.44: Schematische Darstellung der Lage der Epitope von 2F5,4E10 und 8B4

Als nächstes sollte die Avidität des Antikörpers 8B4 untersucht werden, um die Spezifität des Antikörpers genauer zu definieren. Weiterhin ist es nötig, den Neutralisationseffekt von 8B4 in Hinsicht auf verschiedene HIV-Stämme zu untersuchen.

Schließlich ist zu überlegen, ob der variable Teil von 8B4 auf einen konstanten IgG-Teil kloniert werden sollte, um durch verbesserte Stabilitätseigenschaften und geringere Größe eine stärkere Neutralisation zu erreichen.

Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von FeLV

Für die Immunsereen der mit FeLVp15E immunisierten Mäuse 1.7-1.9 wurden Epitopkartierungen durchgeführt und mit den Ergebnissen einer Epitopkartierung für neutralisierende Ziegen- und Rattenseren verglichen (siehe Abb.44). Bei der Kartierung der Rattenseren wurde festgestellt, dass neutralisierende Seren N-terminal entweder das Epitop E1b oder die Kombination der Epitope E1a+E1b erkannten, wobei im C-terminalen Bereich von allen Rattenseren E2a und E2b detektiert wurde. Bei dem untersuchten Ziegenserum wurde, im Gegensatz zu den Rattenseren, ausschließlich N-terminal E1a und C-terminal E2a erkannt.

Im Serum von Maus 1.7. befanden sich, wie bei verschiedenen Rattenseren, Antikörper gegen die Epitope E1a und E1b. Antikörper im Serum der Maus 1.8 und Maus 1.9 detektierten ausschließlich das Epitop E2b.

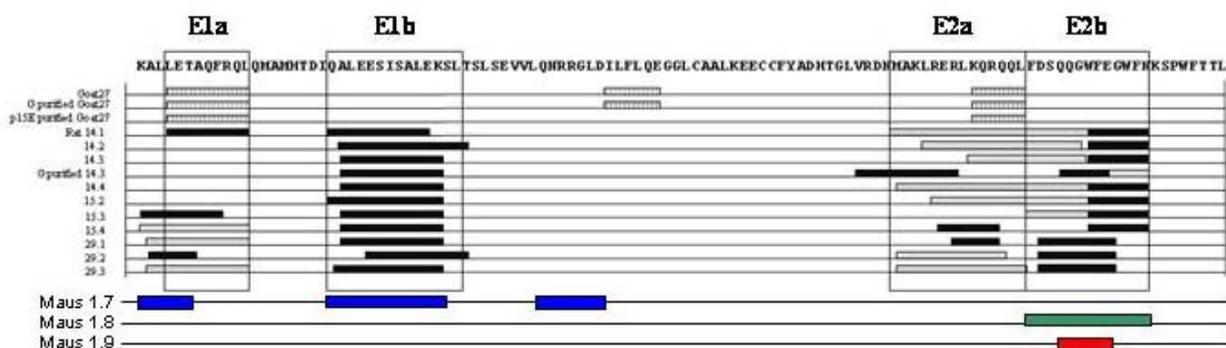


Abb.45: Vergleich der Epitopkartierung von Ziegen-, Ratten- und Mauseren gegen FeLVp15E
In schwarz und grau sind Ziegenserum (gestrichelt) und Rattenseren (uni) gezeigt. Stark detektierte Epitope sind dunkler gefärbt, schwächer erkannte Epitope dementsprechend heller. E1a und E1b sowie E2a und E2b markieren die immundominanten Bereiche, die in Kombination aus jeweils E1a oder E1b und E2a oder E2b zur Neutralisation erkannt werden müssen.

In Farbe sind die Epitope der kartierten Mauseren (Maus 1.7 blau, Maus 1.8 grün, Maus 1.9 rot) zum Vergleich aufgetragen.

Nach der Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen einer mit FeLVp15E immunisierten Balb/c-Maus konnten die Hybridome DG2, DB5 und DC6 selektiert werden, die bindende Antikörper gegen das Antigen bilden. Die produzierten Antikörper der Hybridomkulturen erkannten FeLV p15E spezifisch und konnten der Subklasse IgG1 zugeordnet werden.

In ersten Neutralisationstests der Kulturüberstände von etablierten Hybridomen war jedoch keine Neutralisation nachzuweisen. Zum einen könnte dies damit begründet werden, dass die Konzentration der Antikörper in den Kulturüberständen zu gering war. Zum anderen wurden, wie bereits angesprochen, bei einer Epitopkartierung des

Serums der entsprechenden Maus (Maus 1.9) nicht die Kombination der Epitopregionen E1 und E2 erkennt.

Es wäre deshalb möglich, dass eingesetzte Überstände bisher keine Neutralisation zeigten, weil nur einer der Epitopbereiche erkannt wurde, und nicht wie bei neutralisierenden Ziegen- und Rattenserum eine Kombination aus E1 und E2.

Das Ziegenserum und auch die Rattenserum der mit p15E immunisierten Tieren weisen jedoch darauf hin, dass durch p15E-Immunsierung neutralisierende Antikörper gebildet werden können (Langhammer et al., in Vorbereitung).

Für die Zukunft wäre es sinnvoll, weitere Mäuse mit FeLVp15E zu immunisieren, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass sich Ratte und Maus trotz speziesspezifischer Unterschiede so sehr in ihrer Antikörperproduktion unterscheiden, dass im Mausmodell keine neutralisierenden Antikörper durch p15E induziert werden können. Außerdem sollten Kulturüberstände der monoklonalen Antikörper in der Epitopkartierung eingesetzt werden, um herauszufinden, ob auch diese nur einen Epitopbereich erkennen.

Ein Grund warum auch weiterhin an einer FeLVp15E-Vakzine geforscht werden sollte, ist, dass bisherige Vakzinen noch immer keine 100%ige Schutzwirkung erreichen. In diesen Vakzinen wurde beispielsweise versucht über die Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen durch DNA-Vakzinen eine Virämie zu verhindern (Hanlon et al., 2001). Der Effekt wurde durch die zusätzliche Expression verschiedener Interleukine unterstützt. Auch Vakzinierung durch einen feline Herpesvirus Typ1-Vektor brachte positive Ergebnisse (Willemse et al., 1996). Beide Strategien konnten jedoch keine vollkommen zufrieden stellenden Ergebnisse liefern, weshalb die Induktion neutralisierender Antikörper ein notwendiger und vielversprechender Ansatz ist..

Klonierung von Δ isu

Im zweiten Teil der Diplomarbeit wurde die FeLVp15E-Ektodomäne mit einer Deletion im ISU-Bereich (N-terminal des Cysteinloops) kloniert und exprimiert. Das erhaltene Protein FeLV Δ isu hat eine Größe von ca. 12kDa.

In vorhergehenden Immunisierungsversuchen mit FeLVp15E konnten bei der Epitopkartierung FeLV-neutralisierender Seren zwei immundominante Domänen identifiziert werden die C- bzw. N-terminal des Cysteinloops liegen (siehe Abb.2 und 45). Damit diese Domänen auch im FeLV Δ ISU-Protein an topographisch äquivalenter Stelle liegen, wurde zusätzlich zur N-terminal gelegenen ISU-Domäne C-terminal des Cysteinloops eine Aminosäuresequenz deletiert. Diese entsprach in ihrer Größe der isu-Domäne. Dieses Konstrukt soll zukünftig als negative Kontrolle für die Untersuchung des Einflusses der isu-Domäne auf die Immunantwort gegen das FeLVp15E eingesetzt werden.

In einer weiteren Diplomarbeit wurde dieses Konstrukt bereits in Drosophilazellen umklontiert, um in Zukunft eine Aufreinigung des rekombinanten Δ ISU Proteins ohne Verunreinigungen mit Endotoxinen (*E.coli*-Expressionssystem) zu gewährleisten.

Dies ist besonders deshalb wichtig, weil das in *E.coli* exprimierte Δ ISU Protein nicht löslich war und so nicht über eine Calmodulinsäule aufgereinigt werden konnte. Zwar wurde das Produkt gewaschen und dialysiert, dennoch war die Reinheit erheblich niedriger als bei Calmodulin-aufgereinigten Proteinen (Abb.42). Mit endotoxinfreiem Protein erhofft man sich eine spezifische Immunantwort, die nur auf das eingesetzte Δ ISU Protein zurückzuführen ist.

Zusammenfassung:

Trotz intensiver Forschung konnte bis heute noch kein wirksamer HIV-Impfstoff gewonnen werden. Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV bietet sich als besonders geeignetes Antigen an, da es bei vielen HIV-Stämmen hochkonserviert ist und Mutationen zum Verlust seiner Funktion bei der Infektion der Wirtszelle führen. Hinzu kommt, dass von HIV-infizierten Patienten neutralisierende Antikörper gewonnenen wurden, die gut definierte Epitope im gp41 binden.

In dieser Arbeit wurden nach Immunisierung mit den synthetischen Peptiden E1 und E2, die von gp41 des HIV-1 abgeleitet wurden, vier gp41-spezifische monoklonale Antikörper gewonnen. Dazu wurden Mäuse mehrfach immunisiert und es wurde die Hybridomtechnik angewandt. Der Subtyp der monoklonalen Antikörper (IgM) und die Bindungsepitope wurden bestimmt. Drei der monoklonalen Antikörper erkennen ein Epitop, das die Sequenz ELDKWAS enthält, die dem Epitop des humanen neutralisierenden Antikörpers 2F5 entspricht. Einer der drei monoklonalen Antikörper zeigte in verschiedenen Neutralisationstests eine neutralisierende Wirkung, das heißt er hemmte die Infektion verschiedener humaner T-Zellen mit HIV-1 IIIB. Die Infektion wurde mittels Real-Time-PCR (Nachweis der Provirusintegration) und durch Lumineszenzmessung (Nachweis der Tat-Expression) bestimmt.

Parallel dazu wurden mittels Hybridomtechnik monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein p15E des feline Leukämievirus (FeLV) erzeugt. FeLV löst bei infizierten Katzen Leukämien und Immunschwächen aus. Während die Immunisierung von Ziegen und Ratten in vorausgegangenen Versuchen zu neutralisierenden Antikörpern führte, die zwei definierte Epitope im p15E erkannten, konnten in diesem Versuch keine neutralisierenden Antikörper in den Mäuseren detektiert werden, was damit korrelierte, dass höchstens eins der Epitope erkannt wurde.

Im zweiten Teil der Diplomarbeit wurde mittels PCR ein Klon des transmembranen FeLV p15E hergestellt, in dem die Sequenz für die sogenannte immunsuppressive (isu-) Domäne deletiert wurde (p15E Δ isu). Das entsprechende Protein wurde im *E.coli*-System exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Mit Hilfe dieses Proteins soll in vergleichenden Versuchen mit p15E der Einfluss der isu-Domäne *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Puffer

Puffer für die Calmodulinsäule:

CaCl₂-Bindepuffer

50mM Tris-HCl (pH8,0)
150mM NaCl
1mM MgAcetat
1mM Imidazol
2mM CaCl₂
10mM β-Mercaptoethanol
1 Spatelspitze Lysozym

Elutionspuffer

50mM Tris-HCl (pH8,0)
2mM EGTA
150mM NaCl
10mM β-Mercaptoethanol

Regenerationspuffer I

100mM NaHCO₃ (pH 8,6)
2mM EGTA

Regenerationspuffer II

1M NaCl
2mM CaCl₂

Regenerationspuffer III

100mM NaAcetat
2mM CaCl₂

pH 4,4

Agarosegelelektrophorese

50xTAE-Puffer

2M Tris
1M Acetat
50mM EDTA

10xGel Ladepuffer

50% (w/v) Glycerol
10mM Tris-HCL pH8,0
1mM EDTA
0,3% (w/v) Bromphenolblau
0,3% (w/v) Xylencyanol FF

SDS-PAGE

Gelpuffer

3M Tris-HCL pH 8,4
0,3% SDS

Anodenpuffer

0,2M Tris pH8,9

Kathodenpuffer

100mM Tris-Base (pH 8,25)

100mM Tricin

0,1% (w/v) SDS

Probenpuffer

50mM Tris-HCL pH6,8

12% (v/v) Glycerin

4% (w/v) SDS

10% (v/v) β -Mercaptoethanol

0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

Färbelösung

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

PBS pH 7,2

137mM NaCl

8,8mM Na₂PO₄

2,7mM KC,

0,7mM KH₂PO₄

Western Blot

Transferpuffer

48mM Tris

39mM Glycin

20% Methanol

3,75g/l SDS

Waschpuffer

PBS mit 0,1% Tween 20

Blockierungspuffer

5% Milchpulver

0,1% Tween 20 in PBS

Substratlösung (DAB)

25mM PBS

0,5mg/ml Diaminobenzidin

ProteinG Säule

BindepufferA

1,5M Glycin/NaOH Puffer

3M NaCl, pH9,0

Elutionspuffer B2

0,2M Glycin/HCl Puffer pH2,5

Neutralisationspuffer C

1M Tris/HCl Puffer pH9,0

BakerBond Ab^x-Säule

Laufpuffer

25mM MES (Morpholino-Ethanosulfonsäure) pH5,5 (filtriert)

Elutionspuffer

1M NaAcetat pH7 (filtriert)

Regenerationspuffer

2M NaAcetat pH6 (filtriert)

anderes

BSS-Fusionspuffer

125 mM NaCl

5 mM KCl

5 mM Tris-HCl

4 mM CaCl₂

pH 7,4; vor Verwendung sterilfiltrieren.

Lysepuffer (für 1 Platte)

100µl Proteinase K

1ml PCR Puffer (mit MgCl₂)

8,9ml destilliertes Wasser

TMB-Substratlösung

0,17 mg/ml tetra-Methylbenzidin (TMB)

50 mM Na₂HPO₄0,04% CH₄N₂O·H₂O₂

LB-Amp-Platten

10g/l Trypton

5g/l Hefeextrakt

10g/l NaCl

18g/l Agar

100µg/ml Ampicillin

Medium

- Hybridomamedium: RPMI 1640 mit 10-20% FKS, 1% Glutamin, 50µM Mercaptoethanol
- Fusionsmedium: Hybridomamedium mit 200 µM Hypoxanthin und 32µM 2´Deoxythymidin
- Einfriermedium: RPMI 1640 mit 20%(v/v) FKS und 15%(v/v) DMSO
- C8166-Medium: RPMI 1640 mit 10% FKS, 2% Glutamin, 1% HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin
- CEMx174-SEAP-Medium: RPMI 1640 mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES, 2mM Glutamin; alle 6 Wochen 125µl/100ml Neomycin um die Expression des SEAP-Gens zu unterstützen
- FEA-Medium: D-MEM mit 10% FKS, 2% Glutamin, 1% HEPES und 1% Streptomycin
- 293-Medium: D-MEM mit 4,5g Glukose, 10%FKS, 1,5% HEPES, 1% Streptomycin/Penicillin
- LB-Medium (Bakterienmedium):10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl

Primerliste:

1. FeLV forward: 5'-GCGGATCCCTTGAAACAGCCCAGTTCAGACAA-3'
2. FeLV reverse: 5'-CGGAATTCCCAGGGGGACTTGTTGAACCATCC-3'
3. FeLV p4: 5'-ATGCGGCCGCGCAACATTCTTCTTTCAATGCGGCA
CAGAGTTCAGAAAGGGAGGT- 3'
4. FeLV p5:5'-GCGCGGCCGCGAGACTAAAACAGCGGCAACA-3'
5. HIV-RTQ-Primer
68i: SK68i M:5'-GGARCAGCIGGAAGCACIATGG-3'
69i: SK69i M:5'-CCCCAGACIGTGAGITICAACA-3'
5'- 6Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-Dabcyl-3'
6. T7-Promotor:5'TAATACGACTCACTATAGGG'3
T7-Terminator: 5'TTATAGCAAAATCCTTTC'3
7. FeLV-RTQ-Primer
sense primer 5'-TCAAGTATGTTCCCATGAGATACAA-3'
antisense primer 5'-GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT-3'
Sonde: 5'- 6Fam-TTAAGCACCTGGGCCCCGGC-Dabcyl-3'

Hersteller: Sigma Genosys (Steinheim, Deutschland)

DNS-Sequenz von FeLV Δ isu

GTGTTCTTCTATTAAGAGGAAATTTNNGANGGAGATCNACATATGAAGAGACGATGG
 AAAAAGAAGTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATCTCATCCTCCG
 GGGCACTTCTGGTTCCGCGTGGATCCCTTGAAACAGCCCAGTTCAGACAACACTACAAATG
 GCCATGCACACAGACATCCAGGCCCTAGAAGAATCAATTAGTGCCTTAGAAAAGTCCCT
 GACCTCCCTTTCTGAACTCTGTGCCGCATTGAAAGAAGAATGTTGCGCGGCCGCAAGAC
 TAAAACAGCGGCAACAACACTATTTGACTCCCAGCAGGGATGGTTTGAAGGATGGTTCAAC
 AAGTCCCCCTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTGCGACTCGAGCTCAAGCTTANATCCGGC
 TGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGANCAATAACTA
 GCCATAACCCCTTGGGGGCCCTCTTAAACGGGGTCTTGGAGGGGTTNTTTTGCTGAAAA
 GGAGGAACTTTTTTCCCGGATATCCCGCCAAGAAGGNCCCAGGCANTAACNGGCNATA
 ACCAAAGCCTTNTGCCTNACNCCATCCCANNGTGTANTGGTNCCGTAAGNANGACAA
 TGNACANCCATNNGTTTAGATNNTCNTACCCGGTGGCCNGNACTTGCCTTAAANAATT
 TTACCTGTGNANAACTNCCNGCTTNTTAAAGGCTAANTNCGAAAGATAATNNTGTNN
 CNTANNGTNANAANTTCTGTNAAANACACAANAGGGGCCCCCTGGNANNCCCCNNNT
 TTTTCTNNNGGGGANGNGCTCTGNAGAAANAAAAGGGGNT

Übersetzte Aminosäuresequenz von FeLV Δ ISU

VFLLKRFXXEIXI.RDDGKRSFIAVSAANRFKKISSSGALLVPRGSLETAQFRQLQMAMHTD
 IQALEESISALEKSLTSLSELCAALKEECCAAARLKQRQQLFDSQQGWFEFQWFKSPWEF.T
 PWVDSSSSLXPAANKARKEAELAAATAXQ.LAITPWGPS.TGSRGXFAEKEELFSRISRQE
 GPGX.XAITKAXCLTXIPXVXGXVXTMXXHFRXSYPVAXTCV.XILPVXK
 PXXLXKG.XRKIXXXXVXXSVKXTXGAPWXXPXXFXXGXALXKXKG

Blaue Aminosäuren entsprechen dem eigentlichen Protein; daran angehängt die Sequenz des Calmodulin-Bindeproteins.

Literaturverzeichnis

Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jager W, Michael NL, Vetter N, Katinger HW.
A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1.
AIDS. 2002.16(2):p.227-33

Baltimore, D.
RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.
Nature, 1970. 226(252): p.1209-11

Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R.,
Zolla-Pazner S., Katinger H., Petropoulos C.J., Burton D.R.
Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human
immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies
J of Virology, 2004. 78(23):p. 13232-13252

Bradford, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing
the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem, 1976. 72:p.248-54

Bronstein I., Fortin JJ., Voyta JC., Juo RR., Edwards B., Oleson CE., Lijam N., Krickat J.
Chemiluminescent reporter gene assay: sensitive detection of the GUS and SEAP gene
products.
Biotechniques, 1994.17(1): p. 72-4, p.176-7

Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G,
Tauer C, Steindl F, Jungbauer A, et al.
Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and
Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1994 ;10(4):p.359-69

Caffrey, M.,
Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular
interactions of the gp41 loop.
Biochim Biophys Acta, 2001. 1536(2-3): p.116-22

Campbell N.A.,
Biologie, Spektrum Akademischer Verlag 1997: p.1326

Carr, D.W., et al.,
Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP- dependent protein kinase with RII-
anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif.
J Biol Chem, 1991. 266(22): p.14188-92

Cassol S, Salas T, Lapointe N, Arella M, Rudnik J, O'Shaughnessy M.
Improved detection of HIV-1 envelope sequences using optimized PCR and inosine-
substituted primers.
Mol Cell Probes. 1991 Apr;5(2):p.157-60

Cianciolo, G.J., R.J. Kipnis, and R. Snyderman,
Similarity between p15E of murine and feline leukaemia virus and p21 of HTLV.
Nature, 1984. 311(5986): p.515

- Cianciolo, G.J., et al.,
Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses.
Trans Assoc Am Physicians, 1985. 98: p.30-41
- Cianciolo, G.J., et al.,
Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins.
Science, 1985. 230(4724): p.453-5
- Coffin, J.M., S.H. Hughes, H. E.Varmus
Retroviruses.
1. Edition ed. 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Collette, Y., et al.,
Similarity between Nef of primate lentiviruses and p15E of murine and feline leukaemia viruses.
Aids, 1996. 10(4): p.441-2
- Colman, P.M. and M.C.Lawrence,
The structural biology of type I viral membrane fusion.
Nat Rev Mol Cell Biol, 2003.4(4): p.309-19
- Cotter, S.M., W.D. Hardy, Jr., and M. Essex,
Association of feline leukaemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat.
J Am Vet Med Assoc, 1975. 166(5): p.449-54
- Denner, J., Persin C., Vogel T., Haustein D., Norley S., Kurth R.
The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation.
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. 12(5):p.442-50
- Denner, J., V. Wunderlich, and D. Bierwolf,
Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV.
Int J Cancer, 1986. 37(2): p.311-6
- Denner, J., S.Norley, and R. Kurth,
The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.
Aids, 1994. 8(8): p. 1063-72
- Denner J.
Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation.
Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30;862:p.75-86. Review.
- Dent, P.B., R.D. Peterson, and R.A. Good,
A Defect in Cellular Immunity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice.
Proc Soc Exp Biol Med, 1965. 119: p 869-71
- Dianzani F, Antonelli G, Riva E, Turriziani O, Antonelli L, Tyring S, Carrasco DA, Lee H, Nguyen D, Pan J, Poast J, Cloyd M, Baron S.
Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes?
J Infect Dis. 2002;185(8):p.1051-4.

- Decroix N, Pamonsinlapatham P, Quan CP, Bouvet JP.
Impairment by mucosal adjuvants and cross-reactivity with variant peptides of the mucosal immunity induced by injection of the fusion peptide PADRE-ELDKWA.
Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(6):p.1103-8
- Eckhart L, Raffelsberger W, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Katinger H, Ruker F.
Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus.
J Gen Virol. 1996;77 (Pt 9):p.2001-8
- Engelman, R.W., et al.,
Suppression of gamma interferon production by inactivated feline leukaemia virus.
Science, 1985. 227(4692): p.1368-70
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J.
Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?
Virology. 2003;307(2):p.406-13
- Gallo, S.A., A.Puri, and R. Blumenthal,
HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process.
Biochemistry, 2001. 40(41): p.12231-6
- Gallo, S.A., et al.,
The HIV Env-mediated fusion reaction.
Biochim Biophys Acta, 2003. 1614(1): p.36-50
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B.
Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection.
Science. 2002. 296(5577):p.2354-60
- Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, Rosenberg ES, Nguyen T, Allen R, Trocha A, Altfeld M, He S, Bunce M, Funkhouser R, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Korber BT, Walker BD.
Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection.
Nature. 2001.412(6844):p.334-8
- Hanlon L., Argyle D., Bain D., Nicolson L., Dunham S., Golder MC., McDonald M., McGillivray C., Jarrett O., Neil JC., Onions DE.
Feline leukemia virus DNA vaccine efficiency is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors
J Virol.2001; 75(18):p.8424-33
- Haraguchi, S., et al.,
Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections.
J Leukoc Biol, 1997. 61(6): p.654-66
- Hardy, W.J., Jr., G.Geering, L.J. Old, P.W. Hess, M. Essex, and S.Cotter.
Horizontal transmission of feline leukaemia virus.
Nature 1973 244:p.266

Hebebrand, L.C., L.E. Mathes, and R.G. Olsen,
Inhibition of concanavalin A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukaemia virus.

Cancer Res, 1977. 37(12): p. 4532-3

Hebebrand, L.C., et al.,
Inhibition of human lymphocyte mitogen and antigen response by a 15,000-dalton protein from feline leukaemia virus.

Cancer Res, 1979. 39(2Pt1): p. 443-7

Ho J, MacDonald KS, Barber BH.

Construction of recombinant targeting immunogens incorporating an HIV-1 neutralizing epitope into sites of differing conformational constraint.

Vaccine. 2002 ;20(7-8):p.1169-80

Ikeda, H., et al.,

Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. V. Identification of a new murine viral protein, p15(E).

J Virol, 1975. 16(1): p. 53-61

Janeway, C.,

Immunologie

2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg;Berlin p.659

Jolles P.

Lysozymes: a chapter of molecular biology.

Angew Chem Int Ed Engl. 1969;8(4):p.227-39

Joyce JG, Hurni WM, Bogusky MJ, Garsky VM, Liang X, Citron MP, Danzeisen RC, Miller MD, Shiver JW, Keller PM.

Enhancement of alpha -helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design.

J Biol Chem. 2002. 277(48):p. 5811-20.

Kunert R., Wolbank S., Stiegler G., Weik R, Katinger H.

Characterization of Molecular Features, Antigen-Binding, and *in Vitro* Properties of IgG and IgM Variants of 4E10, an Anti-HIV Type 1 Neutralizing Monoclonal Antibody

AIDS Research and Human Retrovirus, 2004;20(7), p. 755-762(8)

Langedijk JP, Zwart G, Goudsmit J, Melen RH.

Fine specificity of antibody recognition may predict amino acid substitution in the third variable region of gp120 during HIV type 1 infection.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1995.11(10):p.1153-62

Lee LG, Connell CR, Bloch W.

Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.

Nucleic Acids Res. 1993;21(16):p.3761-6

Liu, W.T., et al.,

Remission of leukaemia and loss of feline leukaemia in cats injected with Staphylococcus protein A: association with increased circulating interferon and complement-dependent cytotoxic antibody.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(20):p. 6471-5

Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1.

J Virol. 2001;75(18):p.8434-9

Mathes, L.E., et al.,

Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a feline leukaemia virus protein.

Nature, 1978. 274(5672): p.687-9

Mathes, L.E., et al.,

Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukaemia virus.

Cancer Res, 1979. 39(3): p.950-5

McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, Joyce JG, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky MJ.

HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb.

Biochemistry. 2003;42(11):p.3214-23

Means RE, Greenough T, Desrosiers RC.

Neutralisation Sensitivity of Cell Culture-Passaged Simian Immunodeficiency Virus.

Journal of Virology 1997;71(10):p.7895-7902

Mehandru S., Wrin T., Galovich J., Stiegler G., Vcelar B., Hurley A., Hogan C., Vasan S., Katinger H., Petropoulos C., Markowitz M.

Neutralization profiles of newly transmitted human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies 2G12, 2F5 and 4E10

J of Virol., 2004. 78(24):p.14039-14042

Micheel B ,

Monoklonale Antikörper. In Grundlagen der Molekularen Medizin.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (2003), Hrsg. D. Ganten und K. Ruckpaul, 2. Auflage, p. 498

Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen,

Molekulare Virologie.

Vol.2.Auflage.2003, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. p.390-448

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.1986

Biotechnology. 1992;24:p.17-27

Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Rucker F, Katinger H.

A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.

J Virol. 1993;67(11):p.6642-7

Nara PL, Smit L, Dunlop N, Hatch W, Merges M, Waters D, Kelliher J, Gallo RC, Fischinger PJ, Goudsmit J.

Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIB infection of chimpanzees.

J Virol. 1990;64(8):p.3779-91

- Oostendorp, R.A., C.J. Meijer, and R.J. Scheper,
Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins and their role in non-retroviral human disease.
Crit Rev Oncol Hematol, 1993. 14(3): p.189-206
- Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G.
DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells.
Science. 1988;239(4837):p.295-7
- Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ.
The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.
AIDS. 1999;13 Suppl A:p.137-62
- Patarca, R. and W.A. Haseltine,
Similarities among retrovirus proteins.
Nature, 1984. 312(5994): p. 496
- Pedersen, N.C., G.H. Theilen, M.A. Keane, L.Fairbanks, T.Mason, B.Orser, C.-H. Chen, and C.Allison.
Studies of naturally transmitted feline leukaemia virus infection.
Am.J. Vet.1977 Res. 38:p.1523
- Peterson, R.D., R. Hendrickson, and R.A. Good,
Reduced Antibody Forming Capacity During the Incubation Period of Passage a Leukemia in C3h Mice.
Proc Soc Exp Biol Med, 1963. 114: p.517-20
- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A, Schulz PM, Klima A, Dopfer S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H.
Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5.
AIDS. 1996 ;10(6):p.587-93.
- Ratner,L., Haseltine,W., Patarca,R., Livak,K.J., Starcich,B. Josephs,S.F., Doran,E.R., Rafalski,J.A., Whitehorn,E.A, Baumeister,K., Ivanoff,L., Petteway,S.R. Jr., Pearson,M.L., Lautenberger,J.A., Papas,T.S., Ghayeb,J., Chang,N.T., Gallo,R.C. and Wong-Staal,F.
Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III
Nature 1985;313 (6000), p.277-284
- Reinecke U., Ivascu C., Schlieff M., Landgraf C., Gericke S., Zahn G., Herzel H., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J.
Identification of distinct antibody epitopes and minotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences
J of Immunol Methods, 2002. 267: p. 37-51
- Reitz MS Jr, Wilson C, Naugle C, Gallo RC, Robert-Guroff M.
Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene.
Cell. 1988;54(1):p.57-63
- Ruegg, C.L., C.R. Monell, and M. Strand,
Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol, 1989. 63(8): p.3257-60

Ruegg, C.L. and M.Strand,

A synthetic peptide with sequence identity to the transmembrane protein gp41 of HIV-1 inhibits distinct lymphocyte activation pathways dependent on protein kinase C and intracellular calcium influx.

Cell Immunol, 1991. 137(1): .1-13

Ruppach H, Nara P, Raudonat I, Elanjikal Z, Rubsamen-Waigmann H, Dietrich U.

Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes.

J Virol. 2000;74(12):p.5403-11

Sanger, F., S.Nicklen, and A.R. Coulson,

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7

Schagger, H. und G. von Jagow,

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Analyt.Biochem, 1987. 166(2):p.368-79

Schenk J.A., Matyssek F., Micheel B.

Interleukin 4 increases the antibody response against Rubisco in mice.

In Vivo. 2004 ;18(5):p.649-52.

Schmolke, M.

Wirkmechanismus und Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1

Dissertationsarbeit Westfälische Wilhelms-Universität, 2004

Schweiger B, Pauli G, Zeichhardt H, Kucherer C.

A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR.

J Virol Methods. 1997;67(1):p.45-55

Shnaper, S., et al.,

The C-and the N-terminal regions of gp41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively.

J Biol Chem, 2004;279(18):p.18526-34

Snyder, S.P., and G.H. Theilen.

Transmissible feline fibrosarkomas.

Nature1969. 221 :p.1074

Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H.

A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.

AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 ;17(18):p.1757-65.

Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jager W, Jacobson J, Vetter N, Katinger H.

Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation.

AIDS. 2002 ;16(15):p.2019-25

Streyer L.

Biochemie p.49

4.Auflage, 1996, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

- Stofko-Hahn, R.E., D.W. Carr, and J.D. Scott,
A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase.
FEBS Lett, 1992. 302(3):p. 274-8
- Stoicheva NG, Hui SW
Electrically induced fusion of mammalian cells in the presence of polyethylene glycol.
J Membr Biol ,1994;141, p.177-182
- Van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J.
Virus nomenclature: consensus versus chaos.
Arch Virol. 2000;145(10):p.2227-32
- Wain-Hobson, S., et al.,
Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.
Cell, 1985. 40(1): p.9-17
- Wang, H., P. Nishanian, and J.L. Fahey,
Characterization of immune suppression by a synthetic HIV gp41 peptide.
Cell Immunol, 1995. 161(2): p.236-43
- Watkins BA, Buge S, Aldrich K, Davis AE, Robinson J, Reitz MS Jr, Robert-Guroff M.
Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by natural antisera occurs through single amino acid substitutions that cause changes in antibody binding at multiple sites.
J Virol. 1996 ;70(12):p.8431-7
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.
Antibody neutralization and escape by HIV-1.
Nature. 2003. 20;422(6929):p.307-12
- Weissenhorn, W., et al.
Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Natur, 1997. 387(6331):p. 426-30
- Willemse MJ., van Schooneveld SH., Chalmers WS., Sondermeijer PJ.
Vaccination against feline leukemia using a new feline herpesvirus type 1 vector
Vaccine, 1996; 14(16):p. 1511-6
- Wyborski, D.L., et al.,
An Escherichia coli expression vector that allows recovery of proteins with native N-termini from purified calmodulin-binding peptide fusions.
Protein Expr Purif, 1999. 16(1): p.1-10
- Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW.
Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41.
J Virol. 2001;75(22):p.10892-905

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Dr. Joachim Denner für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, die theoretische Betreuung und die Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie für die Übernahme der Erstkorrektur.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Burkhard Micheel für die Betreuung der Diplomarbeit von Seiten der Universität Potsdam, die sehr gute Kooperation zur Herstellung monoklonaler Antikörper und die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Herrn Stefan Langhammer möchte ich für die super Betreuung der Arbeit, die Einführung in die Arbeitsmethoden und nicht zuletzt die große Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit danken.

Frau Katrin Messerschmidt und Herrn Dr. Olaf Behrsing danke ich für die Hilfe bei den Zellfusionen und der Aufreinigung der Antikörper und die ständige Ansprechbarkeit bei Fusionsfragen.

Außerdem danke ich der gesamten AG P13 des RKI für die tolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die vielen praktischen Hilfestellungen und Anregungen, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders herzlich danke ich außerdem meiner Familie, die mich immer unterstützte und hinter mir stand und Herrn Anselm Scholz ohne dessen moralische Unterstützung diese Arbeit wahrscheinlich nie zustande gekommen wäre.