



Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren

Diplomarbeit

Wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Pharmazeut

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von Martin Kraase

Greifswald, Oktober 2006

 Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Einleitung.....	6
1.2 Retroviren	6
1.3 Porzine endogene Retroviren, PERV.....	10
1.4 Humanes Immundefizienzvirus, HIV	13
1.5 Antikörper.....	19
1.6 Zielsetzung.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.2 Zellbiologische Methoden	26
2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.2.2 Hybridomtechnik	27
2.2.3 Immunisierung.....	27
2.2.4 Fusion.....	28
2.2.5 Anlegen einer Milzkultur.....	29
2.2.6 Reservefusion.....	30
2.2.7 Klonierungen	30
2.2.8 Umstellung auf serumfreies Medium	31
2.2.9 Anlegen eines Virusstocks.....	31
2.2.10 Adaption porziner Viren an human 293 Zellen	32
2.2.11 Neutralisationstest.....	32
2.3 Proteinchemische Methoden.....	33
2.3.1 Expression rekombinater Proteine in E. coli	33
2.3.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung des rp15E mit Calmodulin.....	34
2.3.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Kulturüberstände.....	34
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest	36
2.3.5 SDS-PAGE, SodiumDodecylSulfat PolyacrylAmidGelElektrophorese	36
2.4 Immunologische Methoden	37
2.4.1 Western Blot	37

2.4.2	ELISA	38
2.4.3	Subklassentest	39
2.4.4	Epitopkartierung	40
2.5	Molekularbiologische Methoden	42
2.5.1	Zellyse und Proteinverdau	42
2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.5.3	Agarosegelelektrophorese.....	43
2.5.4	Quantitative Real time PCR.....	43
2.5.5	Etablierung einer Zytotoxizitätskontrolle	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Aufbau eines Neutralisationstests	46
3.1.1	Real time PCR zum Nachweis der Virusinfektion und Toxizität.....	46
3.1.2	Charakterisierung des für die Neutralisationsversuche verwendeten PERV	49
3.2	Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV	50
3.2.1	Gewinnung und Charakterisierung des Impfantigens rp15E von PERV	50
3.2.2	Charakterisierung der Seren nach Immunisierung mit rp15E von PERV	51
3.2.3	Gewinnung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen rp15E von PERV	54
3.3	Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV	59
3.3.1	Das Immunisierungsprotein Hybrid II.....	59
3.3.2	Charakterisierung der Seren nach Immunisierung mit Hybrid II	60
3.3.3	Gewinnung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen gp41 von HIV-1	62
4	Diskussion	66
4.1	Untersuchung von Multimerisierungen im LTR-Bereich von PERV	66
4.2	Die Induktion neutralisierender Antikörper durch rp15E von PERV	67
4.3	Etablierung monoklonaler Antikörper gegen rp15E von PERV	68
4.4	HIV neutralisierende Seren.....	71
4.5	Monoklonale Antikörper gegen gp41 von HIV-1.....	72

5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	75

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)
CHR	C-terminale Helixregion
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)
Cys	Cystein
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	Aqua bidest
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>envelope protein</i> , Hüllprotein
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> , Katzen-Leukämie-Virus
FKS	fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
Gag	<i>group specific antigen</i> , Gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
HAART	<i>highly active anti retroviral therapy</i> , Hochaktive antiretrovirale Therapie
HAT	Hypoxanthin, Azaserin, Thymidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HT	Hypoxanthin, Thymidin
HTLV	<i>human T cell leukemia virus</i> , humane T-Zell-Leukämie-Virus
Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
isu	immunsuppressiv
kB	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PERV	Porzines endogenes Retrovirus
PoI	Polymerase
POD	Peroxydase
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SHIV	SIV-HIV-Hybrid-Viren
SIV	<i>simian immune deficiency virus</i> , Affen-Immundefizienz-Virus
RT	Reverse Transkriptase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TM	Transmembranes Hüllprotein
TMD	Transmembrandurchgang
UNAIDS	<i>United Nations Department of AIDS</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

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

Die Basen von Oligonucleotidsequenzen sind in folgendem Code aufgeführt:

A:	Adenin
C:	Cytosin
G:	Guanin
T:	Thymin

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Viren sind einfach aufgebaute Infektionserreger ohne eigenen Stoffwechsel, sie dringen in Zellen eines Organismus ein, um sich in diesen zu vermehren. Das Maul-und-Klauenseuche-Virus wurde 1898 als erstes tierpathogenes Virus durch Loeffler und Frosch beschrieben (Loeffler und Frosch, 1898). Seitdem wurden zahlreiche weitere Viren entdeckt, darunter die Retroviren, deren Erstbeschreibung zu Beginn des letzten Jahrhunderts durch Ellermann und Bang erfolgte. Sie übertrugen Mäuseleukämie durch Injektionen von Ultrafiltraten (Modrow, 2003). Retrovirusinfektionen als Ursache für die Entstehung von Tumoren wurden noch in vielen weiteren Fällen, wie dem feline Leukämievirus FeLV oder dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus HTLV, beobachtet (Poiesz et al. 1981). Eine andere Folge retroviraler Erkrankungen kann die Ausbildung einer Immunschwäche sein. Ein deutliches Beispiel hierfür ist das *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), welches im Verlauf einer HIV Infektion entsteht (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984).

Im Gegensatz hierzu kann die Infektion mit Retroviren aber auch völlig harmlos vonstatten gehen, so verlaufen Infektionen im natürlichen Wirt oft apathogen. Auf die Einteilung und den Aufbau der Retroviren wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

1.2 Retroviren

Die Besonderheit der Retroviren, gegenüber anderen Viren liegt in einem von ihnen kodiertem Enzym, der Reversen Transkriptase (RT), die die Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA ermöglicht. Daraufhin wird die transkribierte DNA in das Genom der infizierten Zelle eingefügt. Ist die Virus-DNA in alle Zellen des Organismus integriert, so dass die Proviren einen festen Bestandteil des Genoms bilden und auf vertikalem Weg, d.h. über die Keimbahnzellen, an die Nachkommen weitergegeben werden, spricht man von endogenen Viren. Durch fehlenden Evolutionsdruck sind endogene Retroviren im Genom zum Teil als nicht mehr replikationsfähige Fragmente vorhanden, eine Aktivierung von Außen, z.B. durch Mitogenstimulierung (Wilson, et al., 1998) oder die Rekombination mit Helferviren

können jedoch zur Produktion exogener Viruspartikel führen. So ist beispielsweise das feline Sarkomvirus nur bei gleichzeitiger Infektion der Zelle mit FeLV in der Lage virale Partikel zu bilden (Gardner et al., 1970).

Exogene Retroviren hingegen werden nicht über die Keimbahn, sondern horizontal von Organismus zu Organismus übertragen.

Die Einteilung der Retroviren erfolgt in die Genera α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren sowie Lenti- und Spumaviren.

Retroviren sind wie folgt aufgebaut (Abbildung 1.1): Die circa 100 nm großen Viruspartikel sind von einer Membran umgeben, welche von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abstammt. An der Innenseite sind Matrixproteine (MA) assoziiert, die untereinander netzartig miteinander verbunden sind. Das Nukleokapsid (NC) und die viralen Enzyme sind von einer Hülle aus Capsidproteinen, dem Capsomer (CA), umgeben. Dieses kann eine konische (HIV) oder eine sphärisch-ikosaedrische (γ -Retroviren) Form besitzen.

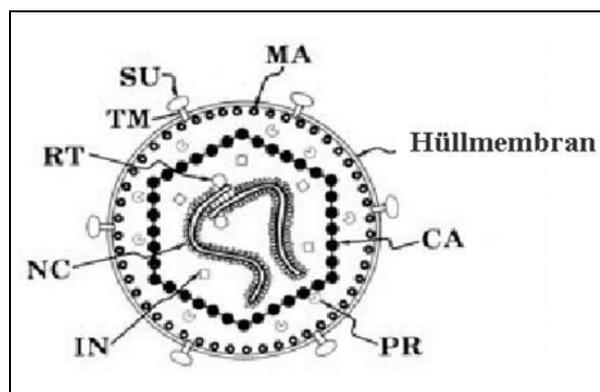


Abb.1.1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus, verändert nach Coffin et al., 1997

SU = Oberflächenprotein (Surface Unit), TM = Transmembranes Hüllprotein, MA = Matrix-Proteine, CA = Kapsidprotein, NC = Nukleokapsidprotein, RT = Reverse Transkriptase, PR = Protease, IN = Integrase

Das 7000-12000 Basen umfassende Virusgenom liegt komplexiert an Nukleokapsidproteinen vor. Des Weiteren enthält das Viruscapsid die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR).

An der Außenseite der Virusmembran befindet sich die Ektodomäne der transmembranen Hüllproteine (TM), die für die Fusion der Virus- und Wirtsmembran notwendig sind. Die TM sind über eine 20 AS lange, stark hydrophobe Region in der Membran verankert und weisen in verschiedener Viren strukturelle Homologien auf (z.B. p15E des murinen Leukämievirus MuLV, FeLV und PERV, gp36 von SIV) (Gallaher et al., 1989, Benit et al., 2001). Sie sind nur teilweise (gp41 von HIV-1) bzw. nicht (p15E, E für *envelope*) glykosiliert. In Abbildung 1.2 ist schematisch der lineare

Aufbau eines TM dargestellt. Die Untergliederung der TM erfolgt in einen extrviralen (Ektodomäne) und einen intraviralen (Endodomäne; zytoplasmatisch) Bereich. Der intravirale Abschnitt umfasst bei γ -Retroviren circa 30-40 AS, bei Lentiviren hingegen ist er auf circa 150 AS (2 α -Helices) erweitert (Schibli et al., 2001). Untersuchungen zeigten, dass das vollständige Protein für die Funktionalität notwendig ist, da Deletionen im cytoplasmatischen Bereich des TM von HIV zur Abnahme der Replikationsfähigkeit führten (Dubay et al., 1992, Freed und Martin, 1995). Die Ektodomäne des TM unterteilt sich in die C-terminalen Helixregion (CHR), die Cystein-Schleife (Cystein-Loop), die N-terminalen Helixregion (NHR) und das Fusionspeptid (FP).

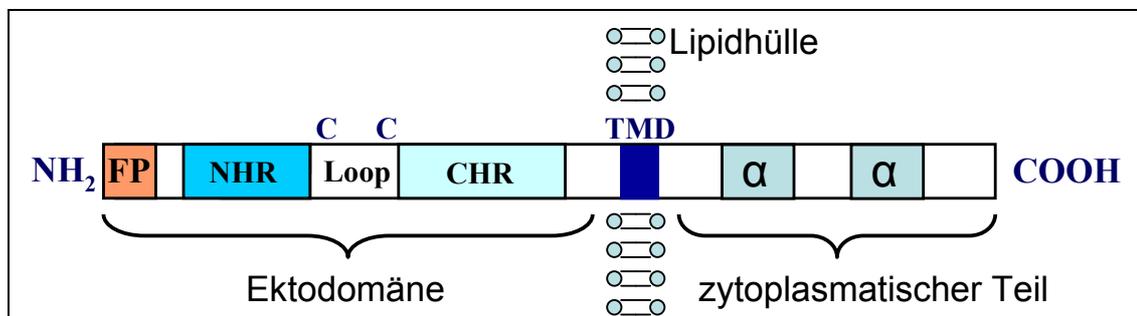


Abb.1.2 Schematischer Aufbau eines Transmembranen Hüllproteins am Beispiel von gp41 von HIV
 FP=Fusionspeptid, NHR=N-terminale Helixregion, C-C-Loop=Cysteinschleife, CHR=C-terminale Helixregion, TMD=Transmembrandurchgang, α = α -Helix (nur bei gp41 von HIV vorhanden)

Die Cystein-Loop-Struktur wird durch zwei Cysteine gebildet, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Am C-terminalen Ende der N-Helix liegt die immunsuppressive Domäne (ISU). Von der ISU-Domäne abgeleitete Peptide zeigten *in vitro* eine proliferationshemmende Wirkung auf humane Lymphozyten (Denner *et al.*, 1994, 1996) und eine Modulation in der Cytokinproduktion (Denner, 1998).

Den TM sind nicht-kovalent gebunden Oberflächenproteine (SU) aufgelagert, welche im Gegensatz zu den TM stark glykosiliert sind (Leonard et al., 1990). Die angelagerten Zuckermoleküle bestimmen teilweise die Antigenität der SU, das unmodifizierte Protein wird von einigen Antikörpern nicht erkannt. Der Komplex eines TM und SU liegt auf der Virusoberfläche als Trimer vor. Dieser Oberflächenproteinkomplex wird für die Bindung an die Wirtszelle und die Fusion der Virus- und Wirtsmembran benötigt. Durch die Bindung an zelluläre Rezeptoren löst sich das Oberflächenprotein vom TM und das freigelegte TM dringt mit dem am N-terminalen Ende befindlichen Fusionspeptid in die Zellmembran ein (Freed et al., 1990; Pereira et al., 1997). Hydrophobe Wechselwirkungen im TM-Trimers führen zur Annäherung zwischen

Virus und Zellmembran (Weissenhorn, et al. 1997) und durch die entstehende Fusionspore wird das Viruscapsid, welches die Virus-RNA enthält, in die Zelle freigesetzt. Das Genom eines infektiösen Retrovirus besteht aus zwei identischen RNA-Einzelsträngen in Positivorientierung, die ähnlich der eukaryotischen mRNA am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende eine Polyadenylierungssequenz besitzen (Übersicht siehe Modrow, 2003; Turner und Summers 1999). Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ermöglicht die Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA. Diese bleibt mit viralen Proteinkomponenten verbunden und kann aufgrund ihrer Größe von 20-30 nm die Kernporen nicht durchdringen. Die Integration der Virus-DNA erfolgt erst, wenn sich während der Mitose die Kernmembran auflöst. Eine Ausnahme bilden hier die Lentiviren, wie HIV, deren DNA-Transport in den Zellkern durch das akzessorische Protein Vpr unterstützt wird (Miller, et al. 1997) und so eine Infektion ruhender Zellen ermöglicht.

Durch die virale Integrase wird die virale DNA in das Genom der infizierten Zelle eingefügt. Die Genomstruktur der in das Wirtsgenom integrierten Provirus-DNA ist in Abb. 1.3 dargestellt.

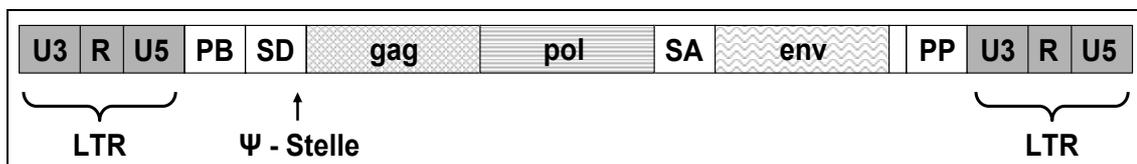


Abb. 1.3 Genomstruktur der integrierten Provirus-DNA

- LTR : long terminal repeats, enthält cis-aktive Sequenzen, Promotor- und Enhancer-Elemente
 U3/U5 : einzigartige (unique) Sequenzen; zur Integration des Provirus in das Wirtsgenom nötig
 R : wiederholte (redundant) Regionen; schließt sich an CAP-Struktur der RNA an
 PB : Primer-Bindungsstelle
 SD/SA : Spleißdonator und Spleißakzeptor
 ψ-Stelle : Sequenzfolge, über die die virale RNA mit Nucleocapsidproteinen wechselwirkt
 gag/pol/env : für virale Proteine kodierende Regionen
 PP : Polypurintrakt, wichtig für die Initiation der DNA-Doppelstrangsynthese bei der reversen Transkription

Die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene werden in 3 offenen Leserahmen kodiert. Im *gag*-Bereich ist die genetische Information für die gruppenspezifischen Antigene lokalisiert. Zu diesem Komplex zählen Matrix-, Kapsid- und Nucleokapsidproteine des Virus. Die *pol*-Region kodiert für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Die Pol-Proteine werden durch Leserahmenverschiebung als ein Fusionsprotein aus Gag- und Pol-Proteinen translatiert. Die Gag- und Pol-Proteine werden als Vorläuferprodukte gebildet und erst nach Freisetzung des Viruspartikels aus der Zelle durch die virale Protease in die einzelnen Komponenten gespalten.

Die genetische Information für die Hüllproteine (SU und TM) ist in der *env*-Region lokalisiert. Auch sie werden als ein gemeinsames Vorläuferprotein exprimiert, welches dann im Golgi-Apparat durch eine zelluläre Protease gespalten wird (Coffin et al., 1997).

Die codierenden Sequenzen für die *gag*-, *pol*- und *env*-Bereiche werden von *long terminal repeats* (LTR) flankiert. Diese Wiederholungseinheiten mit identischer Sequenzfolge und gleicher Orientierung enthalten alle Promotor- und Enhancer-Elemente, welche die retrovirale Genexpression steuern.

Im HIV-1-Genom finden sich außerdem die regulatorischen und akzessorischen Gene *nef*, *rev*, *tat*, *tef*, *vif*, *vpr* und *vpu*. γ -Retroviren (z.B. PERV) besitzen keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine (Czauderna et al., 2000).

Die von der Provirus-DNA transkriптиerte RNA dient zur Translation der Struktur- und Vorläuferproteine und als neue Virus-Genome, die sich mit den Proteinen an der Zellmembran zusammenlagern. Durch Ausstülpungen der Zellmembran werden während der Knospung unreife Viruspartikel gebildet. Die Reifung erfolgt durch Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease.

1.3 Porzine endogene Retroviren, PERV

Zur Beseitigung des weltweiten Mangels an Spenderorganen wird derzeit als möglicher Lösungsweg die Transplantation artfremder Organe diskutiert. Schweine werden auf dem Gebiet der Xenotransplantation aus verschiedenen Gründen favorisiert. Zum einen sind die Organe in Größe und Leistungskapazität denen des Menschen ähnlich (Hannon et al., 1990), zum anderen sind sie in großen Mengen kostengünstig verfügbar und eine Aufzucht der Tiere unter SPF-(*spezifiziert pathgen free*) Bedingungen ist möglich. Neben Abstoßungsreaktionen ist die mikrobielle Sicherheit ein zentrales Problem, welches genauerer Untersuchungen bedarf.

Porzine endogene Retroviren, PERVs, sind als endogene Retroviren in das Genom aller bekannten Schweinerassen integriert (Akiyoshi et al., 1998) und lassen sich durch keimfreie Aufzucht der Tiere nicht eliminieren (Denner, 1998). Einige, wie PERV-A, -B und -C werden dem Genus der γ -Retroviren zugeordnet. Sie wurden 1970 erstmalig aus porzinen Nieren-Zellen (PK-15) isoliert (Breese et al., 1970). Die Einteilung in die Subklassen A, B und C erfolgte aufgrund von Sequenzunterschieden in der *env*-Region des Genoms (Takeuchi et al., 1998). Die Identifizierung von PERV-A und -B erfolgte

nach Kultivierung humaner embryonaler Nierenzellen (293) mit Überständen der porzinen PK-15-Zellen. Diese polytropen Viren sind in der Lage, *in vitro* Zellen anderer Säugetierspezies (z.B. Katze, Pavian und Rhesusaffe) (Wilson et al., 2000, Specke et al., 2001b), einschließlich des Menschen, zu infizieren (Patience et al., 1997, Specke et al., 2001a). Das Wirtsspektrum des ecotropen PERV-C hingegen ist auf das Schwein beschränkt (Oldmixon et al., 2002). Die Ursache der divergierenden Wirtsspektren liegt in den subklassenspezifischen Unterschieden im *env*-Bereich, welche zur Expression unterschiedlicher Oberflächenproteine und somit zu abweichenden Bindungsstellen an zellulären Rezeptoren führen. Bislang ist es gelungen, zwei zelluläre Rezeptoren für PERV-A zu identifizieren ("human PERV-A receptor", huPAR-1/-2); die Funktion dieser Rezeptoren ist hingegen noch unbekannt (Ericsson et al., 2003).

Die verschiedenen Subklassen zeigen eine weitgehende Homologie der Sequenz im *gag*- und *pol*-Bereich. Dieser Umstand begünstigt eine Rekombination der Viren, so könnten aus ecotropen PERVs polytrope Viren entstehen. Tatsächlich wurden aus primären porzinen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) nach Mitogenstimulierung rekombinante PERV-Partikel freigesetzt, die in der Lage waren humane Zellen zu infizieren (Wilson et al., 1998, 2000). Sequenzanalysen dieser in den humanen Zellen gefundenen Viren ließen auf eine Rekombination aus der Rezeptorbindungsdomäne im *env*-Bereich von PERV-A und langen Abschnitten von PERV-C schließen. Diese PERV-A/C-Rekombinante zeigte die Fähigkeit zur Adaption an humane Zellen. So führte ein mehrfaches Passagieren auf humanen 293-Zellen zu sequentiellen Multimerisierungen im replikationsregulierenden Bereich der LTR. Aufgrund der gesteigerten Promotoraktivität erfolgte eine verstärkte Transkription der viralen RNA, was zu einer erhöhten Virusproduktion führte (Denner, et al., 2003; Wilson, et al., 2000).

Trotz der *in vitro* Übertragbarkeit von PERV auf Zellen anderer Säugetierspezies konnte eine *in vivo* Transmission von PERV bisher weder nach der Transplantation von porzinen Zellen, Geweben und Organen in nicht-humane Primaten, noch nach Infektionsversuchen im Kleintiermodell beobachtet werden. Auch nach Immunsupprimierung (Specke, et al., 2002b) der Tiere und der Verwendung Spezies-adaptierten PERV-Partikel war keine Infektion nachweisbar (Specke, et al., 2002a, 2002b; Switzer, et al., 2001). Zudem zeigte sich bei den ersten klinischen Anwendungen von Xenotransplantaten (Hautgewebe und β -Inselzellen) beim Menschen bislang keine Transmission von PERV (Heneine, et al., 1998; Irgang, et al., 2003; Levy,

et al., 2000; Patience, et al., 1998; Garkavenko et al., 2004). Die bisherigen Transplantationsversuche waren nur auf einen kurzen Zeitraum ausgelegt, mit der Entwicklung transgener Schweine und dem Einsatz von Immunsuppressiva würde sich die Verweildauer der Xenotransplantate im Körper verlängern. Damit könnte das Risiko einer Transmission von PERV bzw. einer nach Rekombination möglichen Infektion und Adaption an humane Zellen steigen.

PERV ist eng mit anderen γ -Retroviren, wie z.B. dem endogenen Mausleukämievirus (MuLV) verwandt (Tissier et al., 1997). Eines der MuLV gilt als der Ursprung des Gibbonleukämievirus (GaLV) und führt im neuen Wirt, dem Gibbonaffen, zu Leukämien und Lymphomen. Für das ebenfalls eng mit PERV verwandte Koala-Retrovirus KoRV (Hanger et al. 2000) wurde kürzlich die erste experimentelle *in vivo* Transspezies-Übertragung von γ -Retroviren beschrieben. Dabei konnten Ratten mit KoRV infiziert werden, *in vitro* war auch eine Infektion humaner Zellen möglich (Fiebig et al., 2006). Bei Koalas führen KoRV-Infektionen zu Leukämien und Immunschwäche (Hanger et al. 2000).

Aufgrund der engen Verwandtschaft zu MuLV und KoRV könnte bei einer durch das porcine endogene Retrovirus ausgelösten Zoonose beim Menschen somit die Gefahr einer Immunsuppression und die Entstehung von Tumorerkrankungen nicht ausgeschlossen werden (Tissier et al., 1997, Patience et al., 1997, Akiyoshi et al., 1998, Denner, 1998). Ein effektiver Impfstoff gegen PERV ist eine Möglichkeit, diese Gefahr zu verringern. Das bisher einzige γ -Retrovirus gegen welches erfolgreich immunisiert wird, ist das feline Leukämievirus. Die aus Viruslysaten bzw. dem SU von FeLV, gp70, bestehenden Impfstoffe bieten allerdings keinen 100 %igen Schutz (Sparkes, 1997).

Erste Immunisierungsversuche mit der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV lieferten Erfolg versprechende Ergebnisse. Das Serum einer mit rekombinanten p15E von PERV immunisierten Ziege neutralisierte *in vitro* PERV (Fiebig et al 2003). In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe zur Immunisierung von Ratten mit p15E wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (Fiebig et al., in Vorbereitung). Dabei wurden zwei Epitope, E1 und E2, für diese Antikörper auf p15E detektiert. Das Epitop E1 befindet sich in der N-terminalen Helix, das Epitop E2 in der C-terminalen Helix (Abbildung 1.4A). Es wird angenommen, dass diese Epitope sich im p15E während des Infektionsprozesses in räumlicher Nähe befinden und so ein Konformationsepitop für neutralisierende AK bilden (Fiebig et al 2003).

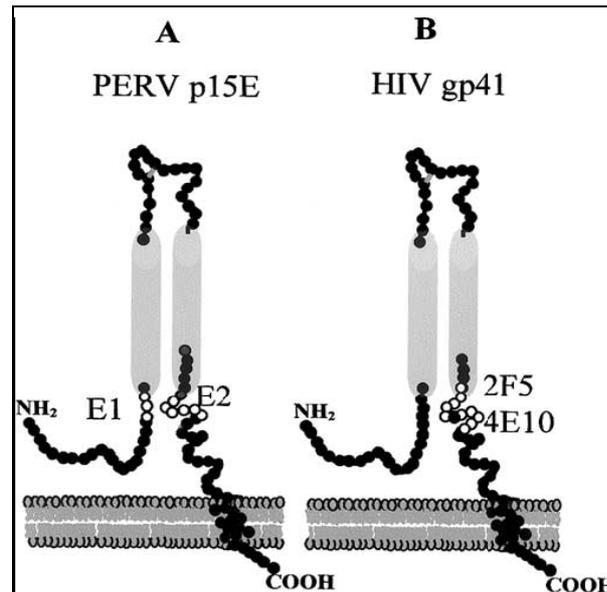


Abb. 1.4 Lokalisation der Epitope E1 und E2 (Fiebig et al., 2003)

A) p15E von PERV; Epitope erkannt von dem Serum einer mit p15E immunisierten Ziege (E2-Epitop: FEGWFN); B) gp41 von HIV; Epitope der neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 (4E10-Epitop: NWFNIT)

Das Epitop des monoklonalen HIV neutralisierenden Antikörpers 4E10 liegt im E2-Bereich des gp41 von HIV-1 (Abbildung 1.4B). Beide Sequenzen zeigen Homologien zueinander, so bindet das Ziegenserum die Sequenz FEGWFN während 4E10 die AS-Folge NWFNIT erkennt.

Ein *in vivo* Testsystem für PERV-Impfstoffe ist nicht verfügbar, da bisher keine Infektion anderer Spezies beschrieben werden konnte.

1.4 *Humanes Immundefizienzvirus, HIV*

Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus, HIV, haben sich seit dessen Erstbeschreibung 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983) zu einer weltweiten Pandemie entwickelt. Mittlerweile zählt die WHO bis zu 46 Mio HIV Erkrankte weltweit für das Jahr 2005. Jährlich kommt es zu 4,1 Mio. Neuinfektionen, tödlich enden jedes Jahr etwa 2,8 Mio. Erkrankungen (UNAIDS, 2006).

Das HI-Virus wird dem Genus der Lentiviren zugeordnet und in HIV-1 und HIV-2 eingeteilt, da diese aus verschiedenen Primatenviren hervor gegangen sind. So bildet das SIVcpz (*simian immunodeficiency virus*), dessen natürlicher Wirt der Schimpanse ist, den Ausgangspunkt für HIV-1 (Gao et al. 1999), während die HIV-2 Subtypen durch die Transpeziesübertragung des SIVsm von der Mangabe auf den Menschen

entstanden (Gao et al., 1992). Eine Infektion mit diesen Viren verläuft im natürlichen Wirt apathogen, kann in anderen Spezies jedoch AIDS auslösen.

Die vor allem in Afrika, Indien, Südostasien und Südamerika pandemisch vertretenen HIV-1 werden in die Subtypen M (major), O (outlier) und N (new) eingeteilt. Der Subtyp M wird zusätzlich in die Genotypen A bis I unterteilt, wobei in Nordwesteuropa und den Vereinigten Staaten hauptsächlich Genotyp B vorzufinden ist. HIV-2 wird in die Genotypen A bis F eingeteilt, es breitet sich vornehmlich in Westafrika und Indien aus.

Die Infektion mit HIV verläuft in drei Phasen. Stadium I, kurz nach der Infektion, zeichnet sich durch einen hohen Virustiter mit bis zu 10^8 Partikeln pro ml Blut aus. Vorübergehend kommt es zum Absinken der $CD4^+$ -T-Lymphozyten unter 500 Zellen pro ml Blut. Während dieser Phase beginnt die adaptive Immunantwort mit der Bildung erster spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten und der Produktion von Antikörpern. In dem sich anschließenden Stadium II bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Virusproduktion und Virusabwehr durch das Immunsystem aus. In diesem Latenzstadium, das mehrere Jahre dauern kann, sind 10^3 - 10^4 Genomäquivalente pro ml Blut nachweisbar, die Serumtiter der HIV-spezifischen IgG bleiben über einen langen Zeitraum stabil und sinken zum Ende des Stadium II stark ab. Auch die Zahl der $CD4^+$ -T-Lymphozyten fällt während der Latenzphase langsam ab und erreicht in Stadium III Werte von unter 200 Zellen pro ml Blut. Die Schäden am Immunsystem führen zu verstärkten Infektionen mit opportunistischen Erregern (Candida, Cytomegalivirus und Herpes Zoster) und dem Auftreten maligner Tumorerkrankungen (Kaposi-Sarkom), es kommt zum Ausbruch des Vollbildes der Immunschwächekrankheit AIDS. Die Infizierten versterben meist an einer der opportunistischen Erkrankungen.

Nur wenige Individuen besitzen eine natürliche Resistenz gegen die Infektion mit HIV. So ist eine kleine Gruppe regelmäßig HIV ausgesetzter Personen nicht nachweisbar infiziert. Im Blut dieser Menschen finden sich zytotoxische T-Lymphozyten, deren Hauptziel offensichtlich HIV-infizierte Zellen sind (Kaul et al., 2001). Zusätzlich wurden in den Schleimhäuten dieser Personen neutralisierende Antikörper beschrieben (Beyrer et al. 1999).

Die Infektion mit HIV erfolgt über Körperflüssigkeiten (Blut, Vaginalsekret, Samenflüssigkeit, Muttermilch). Die Zielzellen des HI-Virus sind $CD4^+$ -Rezeptor tragende Zellen (McDougal et al., 1986). Neben Anderen werden vor allem T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten infiziert. Weiterhin benötigt das Virus

Corezeptoren um in die Zellen zu gelangen. Dies sind auf den T-Lymphozyten die CXCR4-Rezeptoren (Feng et al., 1996) und auf den Makrophagen und Monozyten die CCR5-Rezeptoren (Alkhatib et al., 1996). HIV bindet mit dem Oberflächenprotein gp120 an CD4⁺-Rezeptoren und nach Anlagerung an den Corezeptor kommt es zu Konformationsänderungen im gp120. Die Bindung zwischen dem SU und dem TM gp41 wird dabei gelöst (Jones et al., 1998) (Abbildung 1.5).

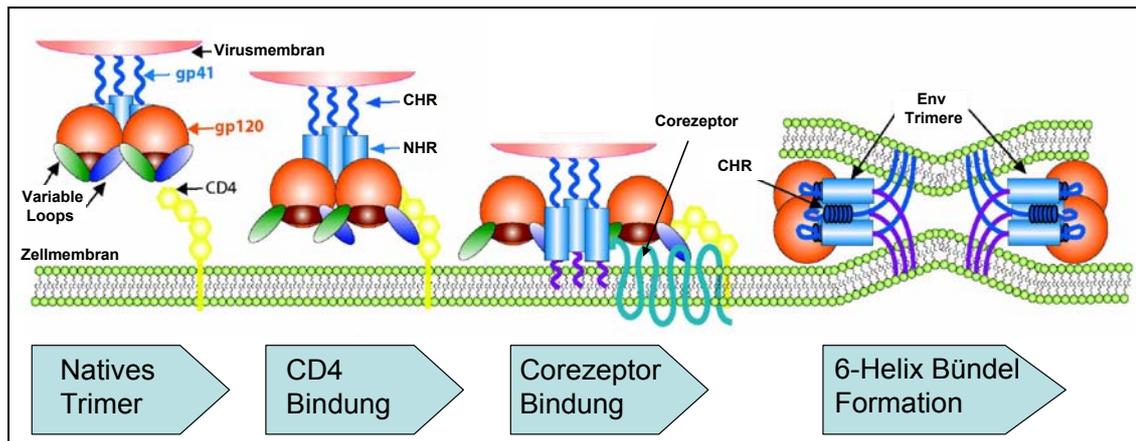


Abb. 1.5 Modell der Rezeptorerkennung und Membranfusion des HIV (Ray und Doms, 2006); Die Bindung des Oberflächenprotein gp120 an zelluläre CD4-Rezeptoren führt zu Konformationsänderungen der variablen Loops, welche die Corezeptorbindungsstelle demaskieren. Durch die Bindung des Corezeptors wird das transmembrane Hüllprotein gp41 freigelegt und dringt mit dem Fusionspeptid in die Wirtsmembran ein. Die Bildung eines 6-Helix Bündels bringt die Membranen in räumliche Nähe.

Nach dem Freilegen des gp41 und der Verankerung des Fusionspeptids in der Zellmembran (Freed et al., 1990; Pereira et al., 1997) kommt es zu Umlagerungen im gp41, die zur Annäherung und Fusion der Membranen führt (Gallo et al. 2003).

Werden anfangs noch verstärkt CCR5-Rezeptor tragende Zellen infiziert, so kommt es mit dem Voranschreiten der Erkrankung zur verstärkten Bildung von Viren die den CXCR4-Rezeptor nutzen und nun vermehrt T-Lymphozyten infizieren (Weber, 2001).

Einige Individuen exprimieren durch Mutationen im CCR5-Rezeptor-Gen einen leicht veränderten CCR5-Rezeptor auf ihren Makrophagen. Dies hat einen partiellen Schutz vor einer HIV-Infektion über die Schleimhäute und einen verlangsamten Krankheitsverlauf zur Folge (Samson et al., 1996).

Medikamentöse Therapie

Antivirale Medikamente richten sich vor allem gegen die Enzyme Reverse Transkriptase und die virale Protease. Auch ein Fusionsinhibitor (T-20) ist mittlerweile erhältlich. Die Hemmung der Reversen Transkription erfolgt durch verschiedene Mechanismen. So werden die Nukleosidische Inhibitoren als nicht-natürliche

Nukleotide von der RT in die umgeschriebene DNA eingebaut, wodurch es zum Kettenabbruch kommt. Die nicht-nukleosidischen Inhibitoren hingegen lagern sich nahe der Substratbindungsstelle an und blockieren so den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms. Die Proteasehemmer inhibieren die Spaltung der viralen Vorläuferproteine. Infolge dessen kommt es zur Bildung nicht infektiöser Partikel. Einen anderen Wirkmechanismus verfolgt der Fusionsinhibitor T-20, er verhindert durch Anlagerung an gp41 ein Eindringen der Viren in die Zellen.

Die antivirale Therapie erfolgt meist durch Applikation von Kombinationen aus RT- und Proteaseinhibitoren, so wird ein resistenzbedingtes Therapieversagen hinausgezögert (Hanna et al., 2002). T-20 wird bei Therapieversagen als Reservetherapeutikum eingesetzt.

Das humane Immunsystem ist nicht in der Lage, HIV auf Dauer effektiv zu bekämpfen und auch die medikamentöse Therapie kann den Ausbruch der Immunschwäche nur hinauszögern, eine Heilung ist jedoch nicht möglich. Die Gründe hierfür liegen zum einen in persistierenden Infektionen in CD4-T-Gedächtniszellen, Gewebemakrophagen und dendritischen Zellen. Aus diesen Reservoiren werden ständig geringer Mengen Virus freigesetzt. Zum anderen führen die hohe Mutationsrate und der Selektionsdruck durch Virusstatika (Kijak et al., 2002), zytotoxische T-Lymphozyten und spezifische Antikörper zur Bildung resistenter Quasispezies (Evans und Desrosiers, 2001; Wei et al., 2003).

Ein subklassenübergreifender Immunschutz durch präventive Immunisierung wäre ein kostengünstiger, auch in Länder der Dritten Welt gut durchführbarer Weg die weltweite HIV-Pandemie einzugrenzen.

Impfstoffe

Obwohl HIV seit über 20 Jahren bekannt ist, existiert bisher kein effektiver Impfstoff. Ein Grund hierfür ist das Fehlen eines kostengünstigen *in vivo* Testsystems für die Untersuchung der Wirksamkeit eines HIV Vakzins. Die als Modellorganismen dienenden Primaten stehen unter strengen Artenschutzbestimmungen und die Immunisierungsversuche wären mit einem hohen Kostenaufwand verbunden. Schimpansen sind die einzige Spezies, die mit HIV-1 infiziert werden können. Ein weiteres Tiermodell stellen Rhesusaffen und Makaken dar, welche mit SIV infizierbar

sind und in Folge der Erkrankung AIDS ähnliche Symptome entwickeln. Auch Infektionen mit HIV/SIV-Rekombinanten sind möglich.

Bisher wurde eine Vielzahl von Immunisierungsstrategien untersucht. Die Impfungen mit abgetöteten Viren zeigten bisher keinen Erfolg (Norley et al., 1996) und der Einsatz abgeschwächte Lebendimpfstoffe gilt als bedenklich, da diese Viren pathogen sind (Cohen, 1997). Eine mögliche Alternative wären DNA-Vakzine, diese würden die humorale und zelluläre Immunität induzieren. Erste Versuche mit DNA-Vakzinen, die für Proteinanteile des Oberflächenproteins einer HIV/SIV-Rekombinante kodierten, induzierten neutralisierende Antikörper (Rasmussen et al., 2002). Ähnlich erfolgreich zeigte sich der Einsatz rekombinanter Vaccinaviren, welche im Rhesusaffenmodell vor der Ausbruch von AIDS schützten (Rose et al., 2001).

Das Oberflächenprotein von HIV gp120 ist der humoralen Immunantwort durch seine Lage am besten zugänglich und ist daher ein favorisierter Impfstoffkandidat. Analog zum gp120 von HIV werden mit dem Oberflächenhüllprotein gp70 von FeLV Katzen immunisiert (Marciani et al., 1991). Das HIV-Oberflächenhüllprotein ist in den verschiedenen Subklassen hochvariabel und unterliegt während der Erkrankung zahlreichen Mutationen (Evans und Desrosiers, 2001). In Phase I und II Studien mit auf rekombinanten gp120 basierenden Impfstoffen wurden in fast 100 % der Rezipienten Antikörperantworten erzielt (Graham et al., 1996; Pitisuttithum et al. 2003). In der Phase III Studie dieser Impfstoffe zeigte sich allerdings keine Prävention einer HIV-Infektion (rgp120 HIV Vaccine Study Group, 2004).

Weiterhin führte die Immunisierung mit replikationskompetenten Adenovirus-HIV gp160 (env-Vorläuferprotein) in Schimpansen zu HIV-1 neutralisierenden Seren (Robert-Guroff et al., 1998).

Auch gp41 ist ein interessantes Ziel für die Impfstoffentwicklung. Teile des gp41 sind in allen HI-Viren der Subklasse M hoch konserviert (Zwick et al., 2001). Mutationen in bestimmten Bereichen des Proteins führen wahrscheinlich zum Verlust der Fähigkeit in die Zellmembran einzudringen. Doch sind bisherige Immunisierungsversuche mit rekombinanten gp41 fehlgeschlagen (Fiebig et al., in Vorbereitung).

Aus den Seren HIV-Infizierter ließen sich mit Hilfe von Epstein-Barr-Virus-Immortalisierung von B-Zellen bzw. Phagen Display bisher mehrere monoklonale Antikörper isolieren, die *in vitro* und *in vivo* (Stiegler et al., 2002, Armbruster et al., 2002) HIV neutralisierten. Die gp120 spezifischen Antikörper binden verschiedene Bereiche des Moleküls, so detektiert 2G12 die C4/V4 Region (Trkola et al., 1995;

Scanlan et al., 2002), 1b12 die CD4-Rezeptorbindungsstelle (Burton et al., 1994) und 17b die Corezeptorbindungsstelle (Thali et al., 1993; Moulard et al., 2002).

Die gp41 spezifischen Antikörper 2F5 (Muster et al., 1993, Conley et al., 1994, Muster et al., 1994, Purtscher et al., 1994) und 4E10 (Zwick et al., 2001a, Zwick et al., 2001b, Ruprecht et al., 2003) zeigten ein besonders breites Neutralisationsspektrum. Epitopkartierungen von 2F5 deuteten auf ein lineares Epitop, E2, im C-terminalen Bereich des gp41 mit der Sequenz ELDKWA (AS 662-667, HIV-Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner et al., 1985) hin, für die Bindung unerlässlich ist die Sequenz (L)DKW (Muster et al., 1993, McGaughey et al., 2003). Peptidvakzine, welche das 2F5 Epitop enthielten, führten bisher nur zur Bildung bindender Antikörper, eine neutralisierende Wirkung besaßen diese nicht (McGaughey et al., 2003; Huang et al., 2002). Das Epitop (NWFN/DIT) von 4E10 liegt in unmittelbarer Nähe zum 2F5 Epitop. Zusätzlich wurden für 2F5 und 4E10 im N-terminalen Helixbereich Sequenzen beschrieben (E1), die die Bindung an die E2-Epitope verstärkten (Schmolke, 2004; Fiebig et al., 2005a, b). Durch die Faltung des gp41 könnten E1 und E2 in räumlicher Nähe liegen (Lorizante et al. 2006). Die genaue Lage der E1-Epitope ist noch unklar, sie werden einerseits mit der Sequenz AV(L/M)**FLGFLGAA** (AS 517-526, HIV-1 Isolat MN; HIV-1 HXB2, Hager-Braun, et al. 2006) bzw. VGIGAM**FLGFLGAAG** (AS 513-527; BH10 Isolat, Gen Bank accession no. M15654; Lorizante, et al. 2006), andererseits mit der Sequenz AASVTLTVQARQLLS (AS 532-546; HIV-1 Isolat MN; HIV-1 HXB2; Fiebig et al; 2005b) angegeben.

In dieser Diplomarbeit wurde ein Hybrid, das die Sequenzen der E2 Bereiche von 2F5 und 4E10 sowie den von Fiebig et al. postulierten E1 Bereich enthielt (Fiebig et al., 2005a, b), eingesetzt. Dieses Konstrukt bestand aus dem Grundgerüst des p15E von PERV. Die E1 und E2-Bereiche von PERV wurden entfernt und durch die entsprechenden Sequenzen von HIV ersetzt.

1.5 Antikörper

Antikörper bilden einen wichtigen Teil der humoralen Immunabwehr. Sie werden in großen Mengen von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, sezerniert. Jeder B-Lymphozyt produziert ein Immunglobulin mit einer einzigen Spezifität, dieses trägt er zusätzlich als Antigenrezeptor auf der Zelloberfläche (Janeway, 2002).

Antikörper können durch Bindung an Viren deren Fähigkeit zur Infektion von Zellen stark einschränken, sie wirken neutralisierend. Zusätzlich führt die Opsonierung eines Pathogens zur erleichterten Phagozytose durch Makrophagen und zur Komplementaktivierung. Abbildung 1.6 zeigt die schematische Darstellung der Immunglobuline.

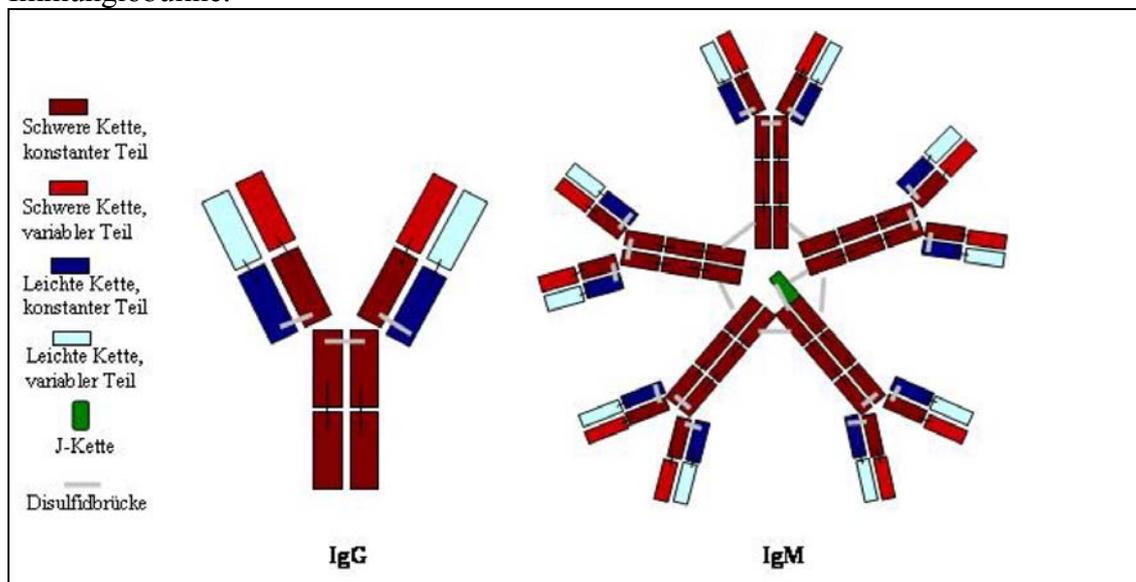


Abb. 1.6 Schematische Darstellung von IgG- und IgM-Molekülen

Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Ihr Molekulargewicht beträgt abhängig vom Isotyp 150 - 195 kDa.

Es existieren fünf verschiedene schwere Ketten, μ , γ , ϵ , δ und α , diesen entsprechend erfolgt die Einteilung in die Isotypen IgM, IgG, IgE, IgD und IgA. Die leichten Ketten untergliedern sich in die κ - und λ -Kette. Die leichten und schweren Ketten der Immunglobuline setzen sich aus einem konstanten (Fc) und einem variablen (Fv) Teil zusammen. Der Fc-Teil bestimmt die Funktion eines Antikörpers. Während die Bindung durch IgM vor allem zur Komplementaktivierung führt, wirkt IgG auch über eine Aktivierung von Makrophagen. Immunglobuline der Klasse A werden in Schleimhäuten und Tränenflüssigkeit gefunden, ihnen kommt damit eine wichtige Abwehrfunktion an den Eintrittsforten des Körpers zu.

Der variable Teil ist für die Bindung an das Antigen verantwortlich. Die Antigenbindungsstellen der Antikörper, die Paratope, werden durch die hypervariablen Regionen am N-Terminus des Fv-Teils festgelegt.

In B-Lymphozyten wird durch Rekombination von Genen während der Reifung eine große Vielfalt von produzierbaren Antikörpern geschaffen. Dabei sezerniert jede reife B-Zelle nur einen bestimmten Antikörper. Eine Stimulation durch das Antigen kann in der reifen B-Zelle jedoch zu somatischen Hypermutationen in den hypervariablen Regionen führen, wodurch sich die Spezifität für das Antigen noch erhöhen kann. Durch Mehrfachimmunisierungen steigt somit die Affinität der Antikörper gegen ein Antigen. Auch kann die Antigenstimulation von B-Zellen zum Isotypwechsel führen. Durch eine DNA-Rekombination wird dabei der konstante Teil des Antikörpers ausgetauscht, die variablen Regionen allerdings bleiben unverändert. Der erste von B-Zellen sezernierte Antikörper gehört immer dem Isotyp M an, dies ist sinnvoll, da die Antikörper zu Beginn der Immunreaktion noch relativ unspezifisch sind. Da IgM als Pentamer vorliegt, gleicht es durch seine durch zehn Antigenbindungsstellen erhaltene erhöhte effektive Bindungsstärke (Avidität), den Mangel an spezifischer Bindungskapazität wieder aus. Die nach Isotypwechsel produzierten IgG besitzen dagegen nur zwei Paratope, sind aber wesentlich stabiler und affiner.

Die von Antikörpern detektierten Antigen determinanten, die Epitope, sind fünf bis sieben AS umfassende Abschnitte. Sie werden in diskontinuierliche (Konformations-) und kontinuierliche (lineare) Epitope eingeteilt. Konformationsepitope findet man vor allem bei Proteinen. Die durch den Antikörper erkannten Abschnitte an der Oberfläche sind durch Faltungsvorgänge in räumliche Nähe gebrachte Sequenzen. In der entfalteten Primärstruktur würden diese Abschnitte allerdings nicht beisammen liegen. Ein lineares Epitop besteht aus einer einzelnen Peptidsequenz.

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen müssen Versuchstiere mit diesem Antigen immunisiert werden. Die dabei gewonnenen Immunsereen enthalten Immunglobuline, die meist an verschiedene Epitope des Antigens binden, die Seren sind dann polyklonal. Dies bringt einige Nachteile mit sich, da zum einen die Seren verschiedener Tiere mit gleicher Immunisierung divergieren, zum anderen auch die Seren desselben Tieres zu verschiedenen Blutabnahmetermen abweichende Eigenschaften zeigen können. Zudem werden selbst nach affinitätschromatographischer Aufreinigung oft Antikörpergemische erhalten. Daher ist die Gewinnung monoklonaler

Antikörper von Vorteil, da es sich hierbei um Antikörper derselben Spezifität und desselben Isotyps handelt.

Seit Entdeckung der Hybridomtechnik durch Milstein und Köhler (1970) ist die Gewinnung solch monoklonaler Antikörper (mAK) möglich. Neben der PEG-vermittelten Fusion wurden noch andere Methoden etabliert. Dies waren z. B. die Elektrofusion und die Immortalisierung von B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus.

1.6 Zielsetzung

Das humane Immundefizienz Virus (HIV) und das porcine endogene Retrovirus (PERV) gehören zur Familie der Retroviren. HIV führt bei Infizierten zur unheilbaren Immunschwäche AIDS. PERV ist ubiquitär im Genom von Schweinen verbreitet und stellt, da es in der Lage ist, *in vitro* humane Zellen zu infizieren, einen Risikofaktor bei Xenotransplantationen dar. Ein Vakzin zur präventiven Immunisierung wäre für beide Fälle notwendig.

Nach der Immunisierung von Ratten und Ziegen mit der rekombinant hergestellten Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV wurden Seren erhalten, die *in vitro* PERV neutralisieren und an zwei Epitope im p15E binden, eines im N-terminalen Bereich (E1) und ein anderes im C-terminalen Bereich (E2).

Zwei aus HIV-Infizierten isolierte Antikörper, 2F5 und 4E10, binden an gp41 und wirken *in vitro* breit neutralisierend gegen HIV. Durch passive Immunisierung mit diesen Immunglobulinen konnten die Virustiter in Infizierten teilweise unter die Nachweisgrenze gesenkt werden. Die Epitope von 2F5 und 4E10 im gp41 sind identisch lokalisiert wie E2 im p15E von PERV, trotz der evolutionären Unterschiede gibt es sogar Sequenzhomologien. Allerdings schlugen alle Versuche, neutralisierende Antikörper vom Typ 2F5/4E10 zu induzieren, bislang fehl. Die Arbeitsgruppe Denner konnte erstmals zeigen, dass im gp41 von HIV-1 auch eine E1-Domäne existiert, die ähnlich lokalisiert ist, wie die im p15E und die, wenn sie mit E2 von HIV interagiert, die Bindung von 2F5 und 4E10 an ihre Epitope verstärkt. Diese Daten wurden unlängst von zwei anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Es wurden deshalb Versuche begonnen, die E1 und E2 Domänen in p15E durch die von HIV zu ersetzen und durch Immunisierung mit diesen Hybridproteinen HIV-neutralisierende Antikörper zu gewinnen.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, nach Immunisierung von Ratten mit p15E von PERV und einem PERV-HIV-Hybridprotein mittels PEG-vermittelter Zellfusion monoklonale Antikörper (mAK) gegen die transmembranen Hüllproteine von PERV und HIV zu erhalten. Die Bindung dieser mAK an die Immunisierungsantigene sollte im ELISA und Western Blot bestätigt und ihre Epitope sollten mit Hilfe überlappenden Peptiden bestimmt werden. Zusätzlich sollten untersucht werden, ob die gewonnenen mAK PERV bzw. HIV neutralisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Verbrauchsmaterialien der Zellkultur wurden größtenteils von TPP (St. Louis, MO) bezogen, Abweichungen sind im Text angegeben.

Primer und Sonden (Primer von Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland; Sonden von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland):

Spezifität		Sequenz (5' → 3')
PERV LTR (Czuderna et al., 2000)	Vorwärts	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC
	Rückwärts	ACGCACAAGACAAAGACACACGAA
PERV <i>gag</i>	Vorwärts	TCCAGGGCTCATAATTTGTC
	Rückwärts	TGATGGCCATCCAACATCGA
	Sonde	Fam-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT-BHQ1
HIV <i>env</i>	Vorwärts	GGARCAGCIGGAAGCACIATGG
	Rückwärts	CCCCAGACIGTGAGITICAACA
	Sonde	Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-Dabcyl
humane GAPDH	Vorwärts	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC
	Rückwärts	TGGTCCACACCCATGACGA
	Sonde	Hex-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG-Dabcyl

Fam = 6-Carboxy-Fluorescein, Dabcyl = Dabcylrest, Hex = Hexachloro-6-Carboxyfluorescein
Bei den HIV-Primern wurden degenerierte Basen verwendet, damit sie subtypübergreifend eingesetzt werden können: R = Adenin (A) oder Guanin (G), I = Desoxy-Inosin, N = Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T).

Antikörper

- Kaninchen anti-Ratten Ig, POD-gekoppelt, polyklonal (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)
- Kaninchen anti-Ratten Ig, POD-gekoppelt, polyklonal (Sigma)
- Maus anti-Ratten IgM, POD-gekoppelt, monoklonal (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Ziege anti-human IgG, POD-gekoppelt (Sigma)
- Rat Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Humaner, HIV gp41 spezifischer, mAK 2F5 IgG (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH: Dr. H.Katinger (Muster, et al., 1993))

Zelllinien

- | | |
|------------|--|
| 293 | humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC, Manassas, VA, USA) |
| Myelom 653 | Mausmyelom-Zelllinie P3X63 Ag8.653 aus Balb/c-Mäusen, Fusionspartner der Rattenmilzzellen bei der Gewinnung von Hybridomzellen, keine Ig-Eigenproduktion, Defekt im HPGRT-Gen (H Harris/ R Sutherland, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, UK) |
| Ghost R5 | humane Osteosarkomzellen, die den CD4+- und CCR5-Rezeptor exprimieren (Morner A, et al. J Virol 73:2343, 1999) |

Virenstämme

- | | |
|--------------|--|
| PERV 5° | Durch mehrfache Passagen der PERV-A/C Rekombinante, PERV-NIH/3° (Wilson et al., 1998, 2000) auf 293-Zellen, erhaltenes Virusisolat (Denner et al. 2003). |
| HIV-1 BA-L | Subtyp B, kein Syncytienbildner, Coreceptor CCR5, laoboradaptiertes Isolat, verwendet für <i>in vitro</i> HIV Neutralisationstests (GenBank M68893, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) |
| HIV-1 MN | Subtyp B, Coreceptor CXCR4, das zur Epitopkartierung verwendete HIV-env-Peptidset hatte die Sequenz dieses Isolats (GenBank M17449, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) |
| HIV-1 pNL4-3 | rekombinanter proviraler Molekularklon aus den HIV-1 Isolaten NY5, zur Herstellung des in dieser Arbeit vorgestellten Hybridkonstrukts verwendet, Subtyp B, Syncytienbildner, Coreceptor CXCR4 (GenBank M19921, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) |

Peptide

Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide:

Die angegebenen Aminosäurezahlen, beziehen sich auf den Referenzstamm HIV-1 HXB2. Wenn nicht anders angegeben wurden die Peptide vom NIH (*AIDS reagent and reference program*, #6451 MN Env 15mer peptide set) bezogen.

Tab. 2.1 Peptid Aminosäuresequenz (AS Referenzgenom)

P63 38	GALFLGFLGAAGSTM (516-530)
P63 39	LGFLGAAGSTMGAAS (520-534)
P63 40	GAAGSTMGAASVTLT (524-539)
P63 41	STMGAASVTLTVQAR (528-542)
P63 42	AASVTLTVQARQLLS (532-546)
P63 43	TLTVQARQLLSGIVQ (536-550)
P63 44	QARQLLSGIVQQNN (540-554)
P63 45	LLSGIVQQNNLLRA (544-558)
P63 46	IVQQNNLLRAIEAQ (548-562)
P63 47	QNNLLRAIEAQQHML (552-566)
P63 48	LRAIEAQQHMLQLTV (556-570)
P63 49	EAQQHMLQLTVWGIK (560-574)
P63 50	HMLQLTVWGIKQLQA (564-578)
P63 51	LTWGIKQLQARVLA (568-582)
P63 52	GIKQLQARVLAVERY (572-586)
P63 53	LQARVLAVERYLKDQ (576-590)
P63 54	VLAVERYLKDQQLLG (580-594)
P63 55	ERYLKDQQLLGFWGC (584-598)
P63 56	KDQQLLGFWGC SGKL (588-602)
P63 57	LLGFWGC SGKLICTT (562-606)
P63 58	WGCSGKLICTTTVPW (566-610)
P63 59	GKLICTTTVPWNASW (570-614)
P63 60	CTTTVPWNASWSNKS (574-618)
P63 61	VPWNASWSNKS LDDI (578-622)
P63 62	ASWSNKS LDDIWNM (582-626)
P63 63	NKS LDDIWNM TWMQ (586-630)
P63 64	DDIWNM TWMQ WERE (590-634)
P63 65	NNM TWMQ WERE IDNY (594-638)
P63 66	WMQ WERE IDNY TSLI (598-642)
P63 67	ERE IDNY TSLI YSL (602-646)
P63 68	DNY TSLI YSL LEKSQ (606-650)
P63 69	SLI YSL LEKSQ TQQE (610-654)
P63 70	SLLEKSQ TQQE KNEQ (614-658)
P63 71	KSQ TQQE KNEQ ELLE (618-662)
P63 72	QQE KNEQ ELLE LDKW (622-666)
P63 73	NEQ ELLE LDKW ASLW (626-670)
P63 74	LLE LDKW ASLW NWF (630-674)
P63 75	DKW ASLW NWF DITNW (634-678)
P63 76	SLW NWF DITNW LWYI (638-682)
P63 77	WFDITNW LWYI KIFI (642-686)
P63 78	TNWLWYI KIFI MIVG (646-690)
P63 79	WYI KIFI MIVG GLVG (650-694)
E1 long	LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSC, Jerini, Berlin, Deutschland
E2 long	CNEQELLELDKWASLWNWF DITNWL, Jerini, Berlin, Deutschland
PERV E1	AALITGPQOLEKGLSNLHRICKKK, Jerini, Berlin, Deutschland
PERV E2	KKKCCRERERDQWFEGWFNSPWM, Jerini, Berlin, Deutschland

2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Die 653- und Hybridom-Zellen wurden in Hybridoma-Medium [RPMI (Invitrogen, Leek, Niederlande), 20 % (v/v) FKS (Hyclone Perbio, Bonn, Deutschland), 10 mM HEPES-Puffer (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 100 µg/ml Gentamycin (Biochrom), 4mM L-Glutamin (Biochrom)] kultiviert. Die zur Selektionierung verwendeten HAT- und HT-Medien bestanden aus Hybridoma-Medium mit zugesetztem HAT (1x HAT-Supplement, Invitrogen) bzw. HT (1x HT-Supplement, Invitrogen). Die Kultivierung der adhärennten Ghost- und 293-Zellen erfolgte in DMEM (Invitrogen), 10 % (v/v) FKS (PAA, Pasching, Österreich), 15 mM HEPES-Puffer, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 4mM L-Glutamin.

Ghost- und 293-Zellen wurden 2x wöchentlich, Myelom- und Hybridomzellen alle 2 Tage 1:4 gesplittet. Adhärennte Zellen wurden mit PBS (137 mM NaCl, 8,8 mM Na₂PO₄, 2,7 mM KCl, 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,2) gewaschen, in neuem, auf 37°C angewärmten Medium aufgenommen, mittels Zellschaber vom Flaschenboden abgeschabt, resuspendiert, anteilig verworfen und die restlichen Zellen mit frischem Medium aufgefüllt. Suspensionszellen wurden zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und anteilig wieder in die Kulturflasche zurückgegeben. Alle Zentrifugationsschritte mit Zellen und Kulturüberständen wurden über 8 Minuten mit 250 xg (Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R Kendro, Langenselbold, Deutschland) durchgeführt.

2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden in Medium resuspendiert und 10min bei 500 xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Einfriermedium resuspendiert, auf 10⁵ Zellen pro ml verteilt und eingefroren. Das Einfrieren erfolgte mit einer Abkühlung von ca. -1 °C/min auf -80 °C. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in die Gasphase über flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Einfrier Röhrchens direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37 °C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 20ml PBS überführt. Dann wurde für 10 min bei 500xg und 25 °C zentrifugiert, das Zellpellet mit warmem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.2 *Hybridomtechnik*

Für die Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAK) wird eine über einen langen Zeitraum kultivierbare, Antikörper produzierende Zellpopulation benötigt. Aus Milzgewebe isolierte B-Lymphozyten, sind zwar in der Lage weiterhin Antikörper zu bilden, überleben *in vitro* aber nur wenige Tage.

Die Tumorlinie P3 x 63 Ag8.653 besteht aus Myelomzellen muriner B-Lymphozyten. Diese Zellen produzieren keine Antikörper, aber besitzen *in vitro* ein hohes Wachstumspotential. Die aus dem Milzgewebe der immunisierten Ratten isolierten B-Lymphozyten wurden mit den murinen 653 Myelomzellen nach dem von Köhler und Milstein etablierten Verfahren polyethylenglykolvermittelt fusioniert (Köhler und Milstein, 1975). Es handelte sich hierbei um eine Heterohybridisierung, da Zellen verschiedener Spezies fusioniert wurden. Neben den entstandenen Heterohybridomem erhält man ein Zellgemisch aus mehrfach fusionierten Zellen sowie unfusionierten Myelom- und Milzzellen.

Die 653 Myelomzellen tragen einen Enzymdefekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), dieses ist für die Aufnahme von Hypoxanthin in die Zelle notwendig und das Fehlen ermöglicht eine nachfolgende Selektion. Die B-Lymphozyten der immunisierten Ratten besitzen diesen Gendefekt nicht und übertragen die Fähigkeit zur Hypoxanthinaufnahme bei der Fusion auf die beteiligte Myelomzelle. Dem Selektionsmedium (**HAT**-Medium) sind **H**ypoxanthin, **A**minopterin sowie **T**hymidin zugesetzt. Aminopterin blockiert den Hauptstoffwechselweg der Purin- und Pyrimidinsynthese, was zum Absterben der unfusionierten Myelomzellen führt. Hypoxanthin und Thymidin stellen Substrate für einen Reservestoffwechselweg zur Nukleinsäureproduktion dar. Sie können von Fusionszellen aus Milz- und Myelomzelle genutzt werden, so dass diese Zellen überlebensfähig sind. Unfusionierte Milzzellen und mehrfach fusionierte Zellen sterben innerhalb weniger Tage ab. Die nach Selektion (HAT) und Vereinzelung (Klonierung) gewonnenen Zellen produzieren Antikörper einer einzigen Spezifität und eines Isotyps.

2.2.3 *Immunisierung*

Je eine Gruppe Wistar-Ratten (4 weibliche Tiere) wurde mit rekombinanten p15E PERV (siehe Konstrukte) bzw. Hybrid II (siehe Konstrukte) immunisiert. Das Antigen wurde am Tag der Immunisierung in PBS gelöst und 1:1 mit inkompletten Freundschem

Adjuvanz versetzt und durch mehrfaches Resuspendieren homogen gemischt. Die Immunisierung erfolgte zu gleichen Teilen intramuskulär (i.m.) in die Hinterläufe und subcutan (s.c.) ins Nackenfell. Vier Tage vor der Fusion erhielten die Ratten die letzte Injektion. Das komplette Immunisierungsschema ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2: Immunisierungsschema

Zeit (Tage)	Immunisierung	Antigen	Adjuvanz
1	Grundimmunisierung	100 µg rp15E PERV	Freundsches inkomplett
21	1. Boost	100 µg rp15E PERV	Freundsches inkomplett
42	2. Boost	500 µg rp15E PERV	Freundsches inkomplett
64	3. Boost	500 µg rp15E PERV	Freundsches inkomplett
74	Blutentnahme		
181	4. Boost	500 µg rp15E PERV	ohne Adjuvanz
185	Fusion		
Zeit (Tage)	Immunisierung	Antigen	Adjuvanz
1	Grundimmunisierung	250µg Hybrid II	Freundsches inkomplett
21	1. Boost	250µg Hybrid II	Freundsches inkomplett
	Blutentnahme		
40	2. Boost	250µg Hybrid II	ohne Adjuvanz
44	Fusion		

2.2.4 Fusion

In Vorbereitung der Heterohybridisierung mussten ausreichenden Mengen an Milz- und Myelomzellen gewonnen werden. Dazu wurden 10 Tage vor der Fusion 653-Myelomzellen in Myelomamedium kultiviert. Durch die Immunisierung vier Tage vor der Fusion wurden die B-Lymphozyten der Ratten stimuliert und zur Proliferation angeregt.

Die Tötung der immunisierten Ratten erfolgte mit einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran, die Milz wurde steril entnommen und von Bindegewebe befreit. Anschließend wurde das Milzgewebe durch ein Sieb (Cell Dissociation Set, Sigma, Maschenweite 380 µm) gepresst und in 4 °C kaltem RPMI mit 10 % FKS resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer 10 minütigen Sedimentationsphase wurde der Überstand, welcher die B-Lymphozyten enthielt, von den sich abgesetzten Geweberesten getrennt. Milzzellen und Myelomzellen wurden jeweils in RPMI mit 10 % FKS (4 °C) resuspendiert und bei 400 xg für 10 min abzentrifugiert und erneut in RPMI mit 10 % FKS (4 °C) aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

Fünf g PEG 4000 (zuvor autoklaviert, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden bei 60 °C geschmolzen und mit 5 ml RPMI (37 °C) gemischt. Die Lösung wurde tropfenweise mit 0,5 N NaOH versetzt bis ein Farbumschlag des Mediums von gelb nach rot erfolgte. Um ein gleichwertiges Mischverhältnis von Milz- und Myelomzellen zu erhalten, wurde die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt, beide Zellsorten wurden mit jeweils 50 Mio. Zellen eingesetzt. Diese wurden anschließend gemischt und bei 130 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde aufgelockert und durch ein mit 37°C warmen Wasser gefülltes Becherglas temperiert. Das Pellet wurde mit 800 µl der PEG-RPMI-Mischung (37 °C) in 1 min betropft und 1 min gerührt. Danach wurde die Suspension mit 2 ml RPMI (37 °C) in 2 min betropft und anschließend 8 ml RPMI (37 °C) in 4 min zugegeben. Das Volumen wurde mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt und die Zellsuspension bei 130 xg und 24 °C für 5 min zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 120 ml HAT-Medium resuspendiert und mit 200 µl/Well auf 6 Flachbodenplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 96 Wells verteilt. Nach jeweils 7 Tagen wurden je 100µl verbrauchtes durch frisches HAT-Medium ersetzt. Ab der 3. Woche erhielten die Zellen HT-Medium, mit der 5. Woche wurden die Zellen auf Hybridomamedium umgestellt. Die Untersuchung der Überstände im ELISA auf Bindung der Immunisierungsproteine (2.4.2 ELISA) erfolgte ab der 3. Woche. Dazu wurden die Überstände aus bewachsenen Wells in welchen sich das Medium gelb färbte, verwendet. Positive Klone wurden weiter auf 24-Well-Platten kultiviert.

2.2.5 Anlegen einer Milzkultur

Milzzellen überleben *in vitro* nur ca. 14 Tage. Während dieser Zeit produzieren sie weiter Antikörper. Das Gemisch dieser polyklonalen Antikörper entspricht im wesentlichen der Zusammensetzung im Serum der immunisierten Ratte, lediglich die Konzentration der Antikörper ist geringer. Die Überstände einer Milzkultur können daher als Kontrollen im ELISA und Western Blot genutzt werden.

1/10 der bei der Fusion genutzten Milzzellsuspension wurde in 50 ml Hybridomamedium kultiviert. Nach einer Woche wurde das verbrauchte Medium abgenommen, Zellreste durch Zentrifugation entfernt und die Überstände bei -20 °C eingefroren.

2.2.6 Reservefusion

Ein Einfrieren fusionierter Zellen ist erst sinnvoll, wenn positive Daten aus den ELISA-Bindungsstudien vorliegen und die Zellpopulation eine ausreichende Größe erreicht hat. Somit wurden Sicherheitseinfrierungen erst 6 Wochen nach der Fusion vorgenommen. Sollte während dieses Zeitraums durch äußere Einflüsse ein Absterben der Zellen erfolgen, hätte eine weitere Ratte immunisiert werden müssen. Aus diesem Grund wurden die Milzzellen, welche nicht bei der Fusion verbraucht worden waren, zu gleichen Teilen mit Myelomzellen gemischt und die Fusion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Da die Zellen einer Reservefusionen einen Einfrier/Auftauzyklus durchlaufen, musste mit schlechteren Zellausbeuten als bei frischen Fusionen gerechnet werden. Um eine weitere Schädigung der Zellen durch das Aminopterin zu umgehen, wurden diese statt in HAT-Medium, einen Tag vor und nach dem Einfrieren, in HT-Medium kultiviert. Am 2. Tag nach dem Auftauen wurden die Zellen in HAT-Medium aufgenommen und auf 96-Well-Platten ausplattiert.

2.2.7 Klonierungen

Die im ELISA positiv getesteten Zellen sollten kloniert werden. Dazu wurden die Zellen resuspendiert und mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in je 100 µl Hybridomamedium so auf einer 96-Wellplatte ausplattiert, das sich in den ersten drei Reihen rechnerisch je 5 Zellen pro Well befanden. In den nächsten drei Reihen sollten sich je eine Zelle pro Well und in den letzten Reihen je eine Zelle in zwei Wells befinden. Nach einer Woche wurden 50 µl Hybridomamedium zugegeben und nach zwei Wochen die Überstände im ELISA getestet

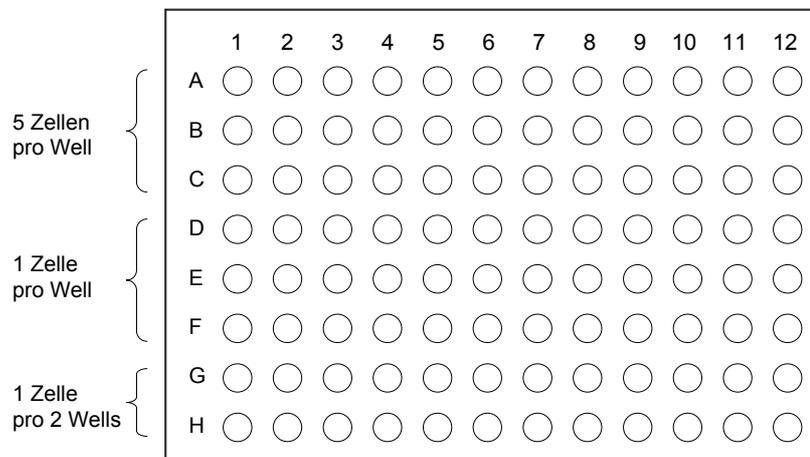


Abb.2.1 Reklonierungsschema

Die Klone, die bei kleinster Zahl ausgesäter Zellen die höchste OD im ELISA zeigte, wurden expandiert.

Hybridoma, die nach zwei aufeinander folgenden Reklonierungen jeweils aus einer Zelle gewachsen waren, wurden als monoklonal angesehen.

2.2.8 Umstellung auf serumfreies Medium

Die Aufreinigung von Antikörpern mit Protein G- bzw. IgM-Säulen erfolgt nicht artspezifisch, d.h. im FKS enthaltene bovine Antikörper werden an den Säulen gebunden. Um die reinen Rattenantikörper aus den Hybridomaüberständen zu erhalten, mussten die Zellen auf serumfreies Medium umgestellt werden. Diese Umstellung erfolgte unmittelbar, da die Hybridoma bei einer schrittweisen Anpassung an das Medium abstarben, bevor die benötigte Größe der Kultur erreicht war. Drei Tage nach Wechsel des Mediums wurden die Überstände abgenommen und die Kultur verworfen.

2.2.9 Anlegen eines Virusstocks

Um bei Neutralisationsversuchen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, war es notwendig einen einheitlichen PERV-Virusstock anzulegen. Dazu wurden bereits mit PERV infizierte humane embryonale Nierenzellen (293) kultiviert. Die gesammelten virushaltigen Überstände wurden vereinigt, sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Deutschland) und in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Infektionstiter, d.h. die reziproke Verdünnung der Virus-haltigen Überstände, bei der eine Infektion noch nachweisbar ist, wurde mittels Endpunktbestimmung analysiert. Dazu wurden native 293 Zellen mit 1×10^4 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Flachbodenplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Am nächsten Tag wurde virushaltiger Überstand aufgetaut und in mehreren Stufen, beginnend mit einer 1:64 Verdünnung (erste Verdünnung $D_0 = 64$), jeweils um den Faktor 2 auf den Zellen verdünnt (Verdünnungsstufe $D_s = 2$). Nach 3 tägiger Kultivierung wurde das Medium entfernt und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Zelllysate wurden mit 100 µl Proteinase K-Lösung behandelt (2.5.1. Zelllyse und Proteinverdau) und dienten als Template für die Real time PCR. So konnte die Virusverdünnung ermittelt werden, bei der keine Infektion der Zellen mehr auftrat.

Der $TCID_{50}$ -Wert (*tissue culture infectious dose*; reziproke Virusverdünnung, bei der 50 % der Zellen infiziert werden) errechnete sich mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode wie folgt:

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = \frac{D_S \left(\frac{N_+}{N_{\text{Repl.}}} \right)^{+0,5}}{\left(\frac{1}{D_0} \right) \times D_S \times \left(\frac{V}{1000} \right)}$$

Abb. 2.2 TCID₅₀/ml-Berechnung nach Spearman und Kärber

N₊: Anzahl der infizierten Wells; **N_{Repl.}**: Anzahl der Replikate;

D_S: Verdünnungsstufe; **D₀**: erste Verdünnung; **V**: Volumen pro Well [μl]

Der für die HIV-Neutralisationstests benötigte Virusstock war bereits etabliert.

2.2.10 *Adaption porziner Viren an human 293 Zellen*

Um die Produktion der Viren zu steigern, können Viren an Zellen adaptiert werden. Dazu wurden viruspartikelhaltige Kulturüberstände auf uninfizierte 293-Zellen übertragen und die Überstände dieser Zellen wiederum auf uninfizierte 293-Zellen überführt. Alle 3-4 Tage wurde so eine Passage der Viren durchgeführt und die Überstände jeder Passage eingefroren.

Die Virustiter der Zellüberstände wurden mittels Real time PCR bestimmt. Weiterhin wurden die Zelllysate mit Hilfe von LTR-spezifischen Primern in einer PCR auf eine Verlängerung der LTR untersucht. Die Amplifikate wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.11 *Neutralisationstest*

Zur Untersuchung der PERV-neutralisierenden Wirkung von Seren (zuvor 45 min bei 56 °C dekomplementiert) und Kulturüberständen wurden auf einer 96-Well-Flachbodenplatte uninfizierte 293 Zellen mit 1x10⁴ Zellen pro 100 μl 293-Medium pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden diese Zellen mit PERV (Endverdünnungen zwischen 1:16 – 1:128; TCID₅₀/ml zwischen 1,4x10² – 1,1x10³) infiziert. Dazu wurden auf einer separaten 96-Well-Platte 55μl der Virusverdünnung und 55 μl der antikörperhaltigen Lösung gemischt und bei 37°C inkubiert. So wurde den Antikörpern eine Bindung an die Viren ermöglicht, bevor diese die Zellen infizieren konnten. Nach 45 min wurden 100 μl dieser Verdünnungen auf die am Vortag ausgesäten 293-Zellen übertragen. Nach drei Tagen wurde das Medium von den Zellen entfernt. Nach der Einfrier/Auftau-Lyse und der Proteinase K-Behandlung (2.5.1. Zelllyse und Proteinverdau) dienten die Zelllysate als Template für die Real time PCR.

Die HIV-Neutralisationstests wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt. Hierfür wurden 10⁴ Ghost R5-Zellen pro Well ausgesät und über Nacht bebrütet. HIV

BA-L ($4,4 \times 10^2$ TCID₅₀/ml) wurde mit den Seren bzw. den mAK für 45 min vorinkubiert und auf die Zellen gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

Mittels quantitativer Real time PCR (siehe 2.5.4) war es möglich, die virale DNA in den Zellen zu untersuchen und quantitativen Vergleiche der Amplifikate verschiedener Proben durchzuführen. Anhand der Ct-Werte (Ct-Wert = PCR-Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal einer Probe über einen definierten Schwellenwert steigt) konnte bestimmt werden wie sehr sich das Virus in den Zellen vermehrt hatte. Um die neutralisierende Wirkung eines Immunsersums im Vergleich zu der des entsprechenden Präimmunsersums darzustellen, wurde die Differenz zwischen den Ct-Werten des Immunsersums und des Präimmunsersums ermittelt. Die Virusneutralisation der Seren bzw. Kulturüberstände, im Vergleich zum Präimmunsersum bzw. Hybridomamedium errechnete sich wie folgt:

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

2.3 *Proteinchemische Methoden*

2.3.1 *Expression rekombinanter Proteine in E. coli*

Zum Immunisieren der Ratten und für die affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörper wurde rekombinantes p15E PERV eingesetzt. Dieses wurde in dem *E. coli* Expressionsstamm TOP-10 (Invitrogen) produziert. Die Bakterien waren mit dem p-Caln rp15E PERV-Vektor transfiziert worden, der zusätzlich das Calmodulinbindenprotein (CBP) kodierte. So entstand ein Fusionsprotein aus p15E PERV und CBP. Die Transkription des für p15E PERV codierenden Gens wurde durch einen Lactose-abhängigen Promotor gesteuert und war durch Lactose oder das Substratanalogon IPTG (Isopropylthiogalaktopyranosid) induzierbar.

5 µl einer Glycerinkultur dieser Bakterien wurden mit 5 ml LB-Amp-Medium ü. N. bei 37°C inkubiert. 1 l LB-Amp-Medium wurde mit 0,2 % dieser Vorkultur versetzt und solange bei 37°C geschüttelt, bis die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 600 nm einen Wert von 0,5 bis 0,6 erreichte. Durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde die Expression der rekombinanten Gene induziert. Nach 3 h wurden die Bakterien bei 4000 xg 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren oder gleich weiterverarbeitet. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte

mittels Ultraschall (Branson Sonifer 250), das Lysat wurde anschließend in CaCl₂-Bindepuffer resuspendiert und mit 4000 xg abzentrifugiert. Das im Überstand gelöste rp15E PERV wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Das für die Gewinnung der mAK gegen gp41 von HIV-1 benötigte PERV/HIV-Konstrukt, Hybrid II, lag aufgereinigt vor (Schmolke, 2004).

2.3.2 *Affinitätschromatographische Aufreinigung des rp15E mit Calmodulin*

In Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen binden Fusionsproteine mit CBP-Anhang an Calmodulin (Stratagene) und verbleiben so an der Säule (Stofko-Hahn, et al., 1992). Das im CaCl₂-Bindepuffer gelöste rp15E PERV wurde über Nacht bei 4 °C im geschlossenen Kreislauf auf die Säule geladen. Diese wurde anschließend mit 10 Säulenvolumen CaCl₂-Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 1ml Fraktionen mit EGTA haltigem Elutionspuffer, da durch die Chelatisierung der Ca²⁺-Ionen die Bindung zwischen CBP und Calmodulin gelöst wurde. Von den Fraktionen wurde mittels Bradfordtest eine Proteinbestimmung durchgeführt. Positive Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert.

CaCl₂-Bindepuffer		Elutionspuffer	
50mM	Tris-HCl (pH8,0)	50mM	Tris-HCl (pH8,0)
150mM	NaCl	2mM	EGTA
1mM	MgAcetat	150mM	NaCl
1mM	Imidazol	10mM	β-Mercaptoethanol
2mM	CaCl ₂		
10mM	β-Mercaptoethanol		

2.3.3 *Affinitätschromatographische Aufreinigung der Kulturüberstände*

rp15E-Säule

Um die Antikörper in den Kulturüberständen der Hybridoma aus der Fusion der Milzzellen der mit rp15E von PERV immunisierten Ratten affinitätschromatographisch aufzureinigen zu können, wurde rp15E PERV an Sepharose CNBr (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Dazu wurde die Sepharose CNBr nach den Herstellerangaben aktiviert und das zuvor Calmodulin-aufgereinigte rp15E von PERV wurde kovalent an die Sepharose gebunden. Vor und nach dem Beladen der Säule mit den Antikörpern aus den Kulturüberständen wurde diese mit 150 ml Chromatographiepuffer (20mM Na₂HPO₄, 500mM NaCl, Aqua dest., pH 7,0) gespült. Die Überstände zirkulierten im geschlossenen Kreislauf über Nacht bei 4 °C auf der Säule. Die Elution erfolgte zu Fraktionen von 1 ml mit 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,5).

Durch den niedrigen pH-Wert dieses Elutionspuffers wurden die Antikörper denaturiert, was zum Verlust der spezifischen Bindung an p15E führte. In jeder Fraktion wurden 100 µl Auffangpuffer (1M Tris, pH 9) vorgelegt, wodurch der Elutionspuffer neutralisiert wurde, sodass die Antikörper wieder renaturieren konnten.

Mittels Bradfordtest bzw. ELISA wurden die Menge an Protein bzw. spezifischen Antikörpern in den Fraktionen ermittelt. Antikörperhaltige Fraktionen wurden vereinigt und gegen Aqua dest. dialysiert. Das Volumen wurde mit einer Vakuumzentrifuge Centricon®Plus-80 (Amicon Bioseparations, Millipore) eingeengt.

Protein G

Protein G, ein Zellwandprotein aus *Staphylococcus*, bindet spezifisch den Fc-Teil von Immunglobulinen der Klasse G, wobei die Spezifität für Rinder Antikörper höher als für Immunglobuline der Ratte ist. Um die durch die Hybridoma produzierten Antikörper aufzureinigen zu können, mussten die Zellen daher erst auf serumfreies Medium umgestellt werden.

Das für die Säule benötigte Protein G lag fertig an Sepharose gekoppelt vor (FastFlow Sepharose Protein G Amersham) und wurde nach den Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Säule erfolgte in gleicher Weise wie bei der rp15E-Säule.

Adsorption an das Proteinantigen Hybrid II

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung der Kulturüberstände der HIV/PERV-Hybrid Fusion konnte keine Säule hergestellt werden, da Hybrid II unlöslich ist. Stattdessen wurden die Kulturüberstände direkt mit dem Hybrid II enthaltenden Bakterienlysate inkubiert. Die Suspension wurde bei 6000 xg, 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Chromatographiepuffer (20mM Na₂HPO₄, 500mM NaCl, Aqua dest., pH 7,0) aufgenommen und ein weiteres Mal zentrifugiert (6000 xg, 10 min). Die in dem Pellet spezifisch an Hybrid II gebundenen Antikörper wurden durch einen 0,1 M Glycinpuffer, pH 2,5, denaturiert, was zum Verlust der spezifischen Bindung an Hybrid II führte. Nach Zentrifugation bei 6000 xg, für 5 min wurde der Antikörper enthaltende Überstand mit 1M Tris-Puffer auf den pH-Wert 7 eingestellt. Die Antikörper-Lsg. wurde gegen Aqua dest. dialysiert und das Volumen wurde mit der Vakuumzentrifuge eingeengt.

IgM-Säule

Immunglobuline der Klasse M binden weder an Protein G noch an Protein A. Daher wurden HiTrap IgM Säulen der Firma Amersham verwendet. Die Säulen wurden nach den Herstellerangaben verwendet. Die mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration 1 M) versetzten Überstände zirkulierten ü. N. auf der Säule. Die Elution erfolgte mit einem Ammoniumsulfat-freien Elutionspuffer.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradfordtest

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgte mittels Bradfordtest. Das im Bradford-Reagenz enthaltene Coomassie-Brilliantblau G 250 bindet an Seitenketten von Proteinen, dabei verschiebt sich (im sauren Milieu) das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 495 nm zu 595 nm. Der Anstieg der Absorption bei 595 nm dient zur Bestimmung der Konzentration des gebundenen Proteins. Der Test wurde zur Konzentrationbestimmung des Calmodulin-aufgereinigten rp15E PERV bzw. der Antikörper nach Elution von den Affinitätschromatographiesäulen (Protein G, rp15E-Sepharose) genutzt.

Aus einer 2mg/ml BSA-Stammlösung wurde ein Proteinstandard mit 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml BSA hergestellt. Je 4µl proteinhaltige Probe wurden mit 196µl Bradford-Reagenz gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde im UV-Spektrometer (Tecan Spectra, Crailsheim) bei 595 nm gemessen. Aus der erhaltenen Absorption konnte über die BSA-Verdünnungsreihe die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.3.5 SDS-PAGE, SodiumDodecylSulfat PolyacrylamidGelElektrophorese

Im Verlauf der SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer Molekulargröße aufgetrennt (Laemmli, et al., 1970). Dazu werden die zu untersuchenden Proteine mit Mercaptoethanol und SDS erhitzt. Die reduzierende Wirkung des Mercaptoethanols zerstört Disulfidbrücken und durch das SDS werden auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Bindungen zerstört, so dass das Protein denaturiert. So entstehen negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung und Masse. Während der Elektrophorese durchwandert der SDS-Protein-Komplex eine poröse Acrylamidmatrix, dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit

von der Molekulargröße des Proteins, der angelegten Spannung und dem Gehalt an Polyacrylamid ab.

Es wurde das Tricin-Puffersystem nach Schagger und von Jagow (1987) angewandt, mit dem kleine Proteine gut aufgetrennt werden können. Die Gele wurden mit den entsprechenden Mengen Rotiphorese-Mischung, Gelpuffer, Aqua dest. sowie 100 µl APS (10%-ig) und 10 µl TEMED gegossen. Zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteine wurden 10 %ige Trenngele verwendet und diese mit 4 %igen Sammelgelen überschichtet. Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und nachdem unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (15000 xg, 10 min) entfernt wurden, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zum Sammeln der Probenfront zunächst bei 60 V, danach bei 110 V durchgeführt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde ein gefärbter Proteinmarker PageRuler (Fermentas) mitgeführt. Das Gel wurde nach beendeter Elektrophorese für 30 min in Coomassieblue-Lösung angefärbt. Im Anschluss wurde nicht gebundener Farbstoff durch zweistündige Entfärbung mit Entfärbepuffer ausgewaschen und die Lage der Banden überprüft.

Gelpuffer:	3 M	Tris	Probenpuffer:	50mM	Tris
	0,3% (w/v)	SDS		12% (v/v)	Glycerin
	pH 8,4			4% (w/v)	SDS
Anodenpuffer:	0,2 M	Tris		5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	pH 8,9			0,01% (w/v)	Coomassie Blue G250 (Biorad, Hercules, USA)
Kathodenpuffer:	0,1M	Tris	Entfärbelösung:	10%(v/v)	Essigsäure
	0,1M	Tricin		25%(v/v)	Methanol
	0,1% (w/v)	SDS		in H ₂ O dest	
	pH 8,25				

Biorad Mini-Protean II-Gelsystem

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Western Blot

Der Western Blot bzw. Immuno Blot ist eine immunologische Methode zur Detektion von Proteinen auf einer Trägermembran mit spezifischen Antikörpern (Towbin, et al., 1989). Die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Semidry-Blotting-Verfahren durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feldes (20 V für 20-30 min) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2 µm Poren von

Millipore, Billerica, MA USA) übertragen. Zum Blockieren freier Bindungsstellen auf der geblotteten PVDF-Membran wurde diese für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert. Die blockierte Membran wurde mit Primärantikörpern (Hybridomakulturüberstände unverdünnt, Seren 1:250 in Blockpuffer verdünnt) für 2h bei RT oder ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (α -Ratten IgG 1:3500; Dako) für 2 h bei RT. Ungebundene AK wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Detektion erfolgte mittels DAB-Färbung (Diaminobenzidin, Merck), die Reaktion wurde durch Schwenken der Membran in Wasser abgestoppt.

Alternativ erfolge die Detektion unter Verwendung eines ECL-Systems (enhanced chemoluminescence), des ‚ECL Western Blotting Detection Reagents Kit‘ (Amersham Biosciences). Das in der Substratlg. enthaltene Luminol wurde in Anwesenheit der Sekundärantikörper-Peroxidase oxidiert. Die bei dieser Reaktion entstandene Lichtemission wurde zur Belichtung eines Röntgenfilms (2 s bis 5 Minuten je nach Stärke des Signals) genutzt.

Transferpuffer:	48mM Tris 39mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,0375% (w/v) SDS pH 9.2	Blockierungspuffer:	PBS 0,05% (v/v) Tween-20 5% (w/v) Magermilchpulver pH 7,4
Waschpuffer:	PBS 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,4	Substratlösung:	25mM Tris(pH 8,0) 0,05%(w/v) Diaminobenzidin 0,2% (v/v) H2O2

Biorad Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell

2.4.2 ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) ist eine immunologische Methode, bei der ein Antigen an den Boden einer speziell beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) immobilisiert wird. Die Bindung eines Primärantikörpers an dieses Antigen kann wie im Western Blot durch die Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert werden und wird durch eine farbgebende Substratreaktion quantifizierbar.

Proteine und Peptide wurden mit je 100 ng/100 μ l pro Well auf 96-Well-Mikrotiterplatten immobilisiert. Dazu wurden Proteine wie das rp15E von PERV und Hybrid II in Carbonatpuffer gelöst und bei 4 °C über Nacht an die Platte adsorbiert.

Peptide wurden in destilliertem Wasser gelöst und bei 37°C auf der Platte eingetrocknet. Die Platte wurde einmal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl Blockierungspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Primärantikörper-Lösung pro Well auf die Platte pipettiert. Dabei erfolgte die Verdünnung von Seren und Überständen im Blockierungspuffer. Nach 1,5 h bei 37 °C wurden ungebundene Primärantikörper durch fünf Waschzyklen mit je 300 µl Waschpuffer wieder entfernt. Als Sekundärantikörper wurden je 100 µl Peroxidasegekoppelte Kaninchen α-Ratten IgG Antikörper (Sigma 1:2000, Dako 1:3500) bzw. zum Nachweis des humanen mAK 2F5 ein POD-Ratten α-Mensch Antikörper (Sigma 1:2000) verwendet. Die Antikörper wurden in Blockpuffer verdünnt. Auf eine 1,5 stündige Inkubation bei 37 °C folgten 5 Waschschrte mit 300 µl Waschpuffer. 50 µl / Well der Substratlösung wurden hinzupipettiert und die Farbreaktion wurde nach 1 bis 15 min durch Zugabe von 50 µl 5N Schwefelsäure gestoppt. Mit dem ELISA-Plattenphotometer (Spectra Classic; Tecan, Crailsheim, Deutschland) wurde die optische Dichte der Farblösung in den Wells bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm bestimmt. Eine OD > 0,1 wurde als positiv gewertet. Als Negativkontrolle bei der ELISA-Selektion der Klone wurde Hybridomamedium als Primärantikörper eingesetzt. Außerdem wurden die Antikörper auf eine mögliche unspezifische Bindung an Plaste und FKS hin untersucht.

Blockierungspuffer:	PBS 10% (v/v) FKS 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,4	Carbonatpuffer:	Aqua dest. 50 mM NaHCO ₃ 1 mM NaCl pH 9,6
Substratlösung:	PBS 0,03 mM H ₂ O ₂ 0,1% (w/v) OPD (o-Phenylendiamindihydrochlorid) pH 6,0	Waschpuffer:	PBS 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,4

2.4.3 Subklassentest

Zur Subtypenbestimmung wurde ein Subklassenkit der Firma BD PharMingen genutzt. Es war damit möglich, Rattenantikörper der Subklassen IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, IgM, IgA sowie den konstanten Bereich der leichten Kette κ bzw. λ nachzuweisen. Das System funktionierte als Sandwich-ELISA, bei dem auf einer ELISA-Platte 100µl einer Verdünnung subklassenspezifischer Fangantikörper gecoatet wurde. Die Antikörper wurden nach folgendem Schema aufgetragen:

	Kulturüberstände										Kontrollen	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	-
Maus α -Ratten-IgG1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-IgG2a	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-IgG2b	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-IgG2c	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-IgM	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-IgA	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-Ig κ	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Maus α -Ratten-Ig λ	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 2.3 **Auftragschema der Fangantikörper und Erstantikörper:** 100 μ l Kulturüberstand wurden jeweils in die Spalte 1-10 pipettiert. Als Positivkontrolle in Spalte 11 diente ein Antikörpergemisch des Herstellers. Als Negativkontrolle in Spalte 12 wurde der Überstand einer 653-Myelomakultur verwendet.

Als Erstantikörper wurden die Hybridomaüberstände mit je 100 μ l pro Well eingesetzt. Die Positiv-Kontrolle bestand aus einer Mischung aller detektierbaren Rattenantikörper, als Negativ-Kontrolle wurde verbrauchtes Medium einer 653-Myelomakultur verwendet. Der POD-gekoppelte Zweitantikörper wurde 1:100 in Blockpuffer verdünnt und mit je 100 μ l pro Well verwendet. Die Blockierung, die Waschschrte und die Detektion erfolgten wie unter Abschnitt 2.4.2 ELISA beschrieben.

2.4.4 Epitopkartierung

Antikörper sind spezifisch gegen einen bestimmten Teil des Antigens gerichtet. Ein solches Epitop definiert sich als ein Peptidabschnitt von 5-7 Aminosäuren Länge. Ist die Aminosäuresequenz des Antigens bekannt, kann mit synthetischen Peptiden die Lage des Epitops eingegrenzt werden.

Für diese Diplomarbeit lagen für rp15E von PERV die Peptide E1 und E2 vor (siehe Material), diese 24 AS langen Peptide enthielten die Sequenzen der von Fiebig et al. (2003) auf p15E beschrieben E1 und E2 Bereiche.

Für das Antigen Hybrid II existierten Peptide die Sequenzen von gp41 von HIV darstellten. Diese 25 AS langen Peptide enthielten zum einen die für die humanen mAK 2F5 und 4E10 beschriebenen Epitope im E2-Bereich (Peptid E2 long) zum anderen eine als E1 Bereich des mAK 2F5 beschriebene Sequenz (Schmolke, 2004; Fiebig et al. 2005a, b) (Peptid E1 long). Die AS-Folgen beider Peptide kamen zum größten Teil in der Sequenz des Immunisierungspotein Hybrid II vor.

Durch den Einsatz kürzerer synthetischer Peptide, deren Sequenzen sich überlappten, konnten die Epitope weiter eingegrenzt werden. Für diese Diplomarbeit wurden Pepspot-Membranen (Jerini, Berlin, Deutschland) und Peptid-ELISAs zur Kartierung der Epitope genutzt. Eine Pepspot-Membran besteht aus einer Peptidbank von 15 AS langen Peptiden, die über eine kovalente Bindung am C-Terminus an eine Cellulose-Membran gekoppelt sind. Es standen zwei Membranen zur Verfügung, eine enthielt einen Teil der Aminosäuresequenz der Ektodomäne von p15E PERV und die andere einen Teil der Ektodomäne von gp41 von HIV IIIB. Die auf die Membran aufgetragenen Peptide überlappten sich um je 13 AS (p15E-Pepspot-Membran) bzw. 12 AS (gp41-Pepspot-Membran), d.h. die Sequenzen der nebeneinander liegenden Peptidspots verschoben sich um jeweils zwei bzw. drei AS Richtung C-Terminus. Wurden also mehrere aufeinander folgende Peptide erkannt, so konnte aus der Aminosäuresequenz, die in jedem der Peptiden enthalten war, das Epitop des Antikörpers abgeleitet werden. Die auf der Membran verteilten Spots enthielten 5 ng Peptid pro Spot.

Die Anwendung der Membranen erfolgte nach den Herstellerangaben. Als Erstantikörper wurden die Hybridomaüberstände unverdünnt, bzw. die Seren und die Aufreinigungen der mAK in Blockierungspuffer (siehe 2.3.1 Western Blot) verdünnt, eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch einen 1:10000 in Blockierungspuffer verdünnten POD-gekoppelten Zweitantikörper (α -Ratten Ig, Dako) welcher eine ECL-Reaktion (siehe 2.3.1 Western Blot) katalysierte. Positive Spots zeigten Lumineszenz, welche durch Schwärzung eines Röntgenfilms festgehalten wurde. Da die Membranen mehrfach verwendet wurden, erfolgte nach jeder Anwendung eine Regeneration nach den Angaben des Herstellers. Vor jeder Benutzung wurde die Bindung des Sekundärantikörpers an die Membran getestet.

Für die Kartierung der Epitope der gegen gp41 gerichteten mAK stand ein Peptidset des NIH (*AIDS reagent and reference program*, #6451 MN Env 15mer peptide set) zur Verfügung (siehe Material). Diese Peptide wurden jeweils in drei Replikaten auf 96-Well-Mikrotiterplatten mit 100 ng in 100 μ l Aqua dest. pro Well über Nacht auf der Platte eingetrocknet. Das weitere Vorgehen ist unter 2.4.2 ELISA beschrieben. Die Positiv-Kontrolle erfolgte durch den humanen mAK 2F5 in Konzentration von 0,33 μ g/ml.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Zellyse und Proteinverdau

Um zelluläre DNA für PCR- bzw. Real time PCR-Untersuchungen zugänglich zu machen, erfolgte ein dreimaliges Einfrieren (-80 °C) und Erhitzen (56 °C) der Zellen. Durch Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 µg/ml für 3 h bei 56 °C, wurden die Histone enzymatisch von der genomischen DNA gelöst. Abschließend wurde die Proteinase K durch Inkubation bei 95 °C für 20 min inaktiviert.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Abschnitte spezifisch und exponentiell vermehrt werden (Mullis, et al., 1986). Die Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) katalysiert. Weiterhin werden Oligonukleotid-Primer benötigt, welche komplementär an die DNA-Matrize binden und so das 3' und 5' Ende der amplifizierten Nukleinsäuresequenz bestimmen. An die Primer werden durch die Polymerase kovalent, unter Pyrophosphatabspaltung, Nukleosidtriphosphate (dNTP) angefügt, so dass doppelsträngige DNA-Abschnitte entstehen.

Die zyklische Reaktion umfasst folgende Reaktionsschritte:

- Denaturierung der DNA-Matrize in ihre Einzelstränge, bei 95°C
- Anlagerung (Annealing) der Primer an die DNA-Einzelstränge, primerabhängig bei 45-60°C
- Synthese des neuen, komplementären DNA-Stranges (Elongation) bei 72°C durch die Polymerase
- Ablösung der Polymerase und Hybridisierung der DNA-Stränge

Da die Komplementierung an beiden DNA-Strängen abläuft, erreicht man theoretisch von Zyklus zu Zyklus eine Verdopplung des DNA-Templates. Diese Methode eignet sich somit zum Nachweis kleinster DNA-Mengen.

Für die Untersuchung der viralen LTR waren in 25 µl PCR-Ansatz 2,5 µl 10xPCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 0,625 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 0,2 µl Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (5 U/ml, Applied Biosystems), 1 µl von jedem Primer (10 pmol/µl, Sigma-Genosys) und 2 µl Zellysat, als Template enthalten. Folgendes Temperaturprogramm wurde im PCR-Cycler (MJ Research, PTC-200 Thermocycler;

Perkin Elmer, GeneAmp 2400 PCR-System) durchlaufen: 10 Minuten bei 95°C (denaturiert die DNA und aktiviert "hot start" Taq-Polymerase) und 35 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 60 s bei 50 °C, 30 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Zur größenspezifischen Trennung der PCR-Amplifikate wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Dabei durchläuft die negativ geladene DNA im elektrischen Feld ein Gel aus Kohlenhydratpolymeren und wird entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung der 1,5 %ige Gele wurde die Agarose mit TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8) aufgekocht und nach dem Auspolymerisieren des Gels in eine Elektrophoresekammer gegeben. Die mit Probenpuffer (10x; „Blue Juice“, Invitrogen) versetzten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Der mitgeführte Größenmarker O'GeneRuler (Fermentas) diente zur Abschätzung der Fragmentgröße. Die Laufspannung betrug 90 V. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 20 min in einer Lösung des Inkalationsfarbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) inkubiert. Die Färbung der Banden wurde bei einer Wellenlänge von 360nm sichtbar gemacht und mit der Geldokumentationsapparatur GelDoc 2000 (BIO RAD) fotografiert.

2.5.4 Quantitative Real time PCR

Die quantitative Real time PCR ist eine Erweiterung der herkömmlichen PCR zur spezifischen Amplifikation und Detektion von DNA (Higuchi, et al., 1992). Es werden zusätzlich Amplifikat-spezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die sich an der DNA-Matrize zwischen den Primerbindungssequenzen anlagern. Während des Anneling-Schrittes binden die Sonden aufgrund einer höheren Schmelztemperatur vor den Primern an die DNA-Matrize. Diese Sonden besitzen am 5' und 3'-Ende Fluorochrome, die sich durch ihr Anregungsspektrum unterscheiden. Das Emissionsspektrum E1 von Fluorochrom 1 (F1, Reporter) entspricht dem Anregungsspektrum von Fluorochrom 2 (F2, Quencher). Befinden sich beide Fluorochrome in ausreichender räumlicher Nähe (intakte Sonde), wird die Emission von Licht der Wellenlänge E1 unterdrückt (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase freigesetzt, so steigt die Lichtproduktion der Wellenlänge E1 (Lee, et al., 1993). Der für die Real time

PCR-Messungen verwendete Cycler MX4000 (Stratagene) detektiert die Emission von Licht der Wellenlänge E1.

Die Untersuchung der viralen DNA in den Zellen erfolgte mit PERV-*gag*-spezifischem Primer und Sonde. Für die Messung der GAPDH (Glycerinphosphodehydrogenase) kodierenden DNA (siehe 2.5.5 Etablierung einer Zytotoxizitätskontrolle) wurden Primern und Sonde verwendet, die spezifisch für die humane GAPDH-DNA waren (da es sich bei den verwendeten 293-Zellen um ein humane Zelllinie handelte). In einem 25 µl PCR-Ansatz waren 2,5 µl 10xPCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl₂, Applied Biosystems), 1,75 µl MgCl₂ (25mM, Fermentas), 0,625 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM, Fermentas), 0,25 µl Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (5 U/ml, Applied Biosystems), 0,5 µl von jedem Primer (10 pmol/µl, Sigma-Genosys) und jeder Sonde (10 pmol/µl, Sigma-Genosys) und 3 µl Zellysat, als Template enthalten. Folgendes Temperaturprogramm wurde durchlaufen: 10 Minuten bei 95°C und 50 Zyklen mit 60 s bei 95 °C, 60 s bei 52 °C, 20 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C.

Für den Nachweis HIV-DNA wurden HIV-*env*-spezifische Primer und Sonde eingesetzt. Das verwendete Reaktionsgemisch und die PCR-Cyclereinstellungen waren dieselben wie bei der PERV-PCR, es wurden lediglich die Primer und Sonde durch HIV-Primer und Sonde ersetzt, die Konzentrationen wurden beibehalten.

2.5.5 Etablierung einer Zytotoxizitätskontrolle

Seren und Antikörperaufreinigungen können zytotoxische Eigenschaften besitzen. Da Virusneutralisation und Zytotoxizität jeweils zu erhöhten Ct-Werten für die Provirusintegration führen, wird hierdurch eine Aussage über virusneutralisierende Eigenschaften falsch.

Der für das Enzym GAPDH (Glycerinphosphodehydrogenase) kodierende DNA-Abschnitt ist als Haushaltsgen in allen Zellen und Geweben vorhanden. Alle Real time PCR-Messungen wurden daher als Duplex-PCR durchgeführt und auf die GAPDH-DNA normiert. Proben deren Ct-Werte der GAPDH mehr als 1 Ct über den GAPDH-Werten der Negativkontrolle lagen, wurden als zytotoxisch angesehen.

Um auszuschließen, dass sich PERV und GAPDH Primer bzw. Sonde bei der PCR beeinflussen, musste zuvor die Effizienz der PCR bestimmt werden. Dazu wurde für die Effizienzbestimmung der PERV-PCR eine Ausverdünnung von Zellysat mit PERV infizierten 293-Zellen auf Zellysat uninfizierter 293-Zellen als Template eingesetzt. In einer Real time PCR wurden je drei PCR-Ansätze untersucht. Es wurden in Ansatz eins

nur die PERV Primer und Sonde verwendet und in Ansatz zwei nur GAPDH Primer und Sonde. Im dritten Ansatz wurden PERV und GAPDH Primer und Sonden zusammen eingesetzt. Die Effizienzbestimmung der GAPDH-PCR erfolgte in gleicher Weise, lediglich das Template wurde geändert, die PERV infizierten 293-Zellen wurden in Aqua bidest. ausverdünnt.

Die Berechnung der Effizienz erfolgte auf Grundlage folgender Formeln:

$$C = (E + 1)^{-\Delta Ct}$$

$$\log C = -\Delta Ct \times \log(E + 1)$$

$$\Delta Ct = \frac{1}{\log(E + 1)} \times (-1 \times \log C)$$

$$y = m \times x$$

E = Effizienz; C = Anteil infizierter Zellen; für unverdünnte infizierte Zellen ist C = 1;

$\Delta Ct = Ct$ (der zum Anteil C infizierten Zellen) – Ct_o (der unverdünnten infizierten Zellen)

Wird der negative dekadische Logarithmus des Anteils an Template in der Probe gegen die Differenz der Ct-Werte der Probe mit dem verdünnten Template und der Probe mit dem unverdünnten Template aufgetragen, so kann aus dem Anstieg ($m=1/\log(E+1)$) die Effizienz der PCR berechnet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau eines Neutralisationstests

3.1.1 Real time PCR zum Nachweis der Virusinfektion und Toxizität

Ein zentraler Punkt der Charakterisierung der gewonnenen Antikörper war die Untersuchung der Virusneutralisation. Für diese war eine Erweiterung der schon bestehenden Real time PCR Methode zur Messung der Provirusintegration nötig. In dem bereits etablierten PERV-Neutralisationstest konnten Seren und Aufreinigungen von Antikörpern zu falsch positiven Ergebnissen führen. Seren können im *in vitro* Test als Folge von Stressreaktionen oder Infektionen des Versuchstiers zytotoxische Effekte zeigen und auch in Antikörperaufreinigungen treten diese, beispielsweise bei unzureichender Dialyse gegen PBS auf. Solche zytotoxischen Eigenschaften führen zum Absterben oder zum verminderten Wachstum der Zellen und somit, wie auch die Virusneutralisation zu einer verminderten Virusproduktion.

Die Quantifizierung der für das Enzym GAPDH (Glycerinphosphodehydrogenase) kodierenden DNA in Zelllysaten lässt einen Rückschluss auf die Anzahl bzw. das Wachstum der Zellen zu. Für die Neutralisationstests sollte daher, in Anlehnung an einen bereits etablierten Neutralisationstest für HIV, eine Duplex-PCR zur Messung der Provirusintegration und der Präsenz des zellulären Gens für GAPDH etabliert werden. Um auszuschließen, dass sich die Primer und Sonden des jeweils zu untersuchenden DNA-Abschnitts gegenseitig beeinflussen, wurden die jeweiligen Effizienzen der PCR bestimmt. Dazu wurden PERV-infizierte 293-Zellen auf uninfizierten 293-Zellen ausverdünnt und die Ct-Werte für PERV und GAPDH jeweils als Monoplex- und als Duplex-Real time PCR bestimmt. Aus der graphischen Auftragung der Δ Ct-Werte gegen den negativen dekadischen Logarithmus des Anteils infizierter Zellen im untersuchten Well (-logC) ließ sich anhand des Anstiegs die Effizienz der jeweiligen Real time PCR ermitteln. Eine Effizienz von 1 bzw. 100 % entspricht einer Verdopplung der DNA und einer Zunahme des Ct-Wertes um 1 pro Zyklus. Die Δ Ct-Werte der PERV-Monoplex- und Duplex-PCR der Verdünnungen der infizierten Zellen sind in Tabellen 3.1 aufgeführt. Die aus diesen Werten erhaltene graphische Auftragung der Δ Ct-Werte gegen die -logC-Werte ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Aus den Anstiegen der Geraden ließen sich für die PERV-Monoplex-PCR eine Effizienz von 0,96 und für die PERV-Duplex-PCR eine Effizienz von 1,1 ermitteln.

Tabelle 3.1 Ct-Werte einer Real time Monoplex- und Duplex-PCR einer Ausverdünnung von PERV-infizierten Zellen auf uninfizierten Zellen

Anteil infizierter Zellen C	-logC	PERV-Primer			PERV+GAPDH-Primer		
		Ct-Mittelwerte	Stabw.	ΔCt	Ct-Mittelwerte	Stabw.	ΔCt
1	0	29,44	0,32	0	29,35	0,08	0
0,5	0,30	30,33	0,15	0,89	30,44	0,34	1,09
0,25	0,60	31,58	0,15	2,14	31,19	0,37	1,84
0,125	0,90	32,57	0,23	3,13	32,28	0,13	2,93
0,0625	1,20	33,47	0,65	4,03	33,11	0,03	3,76

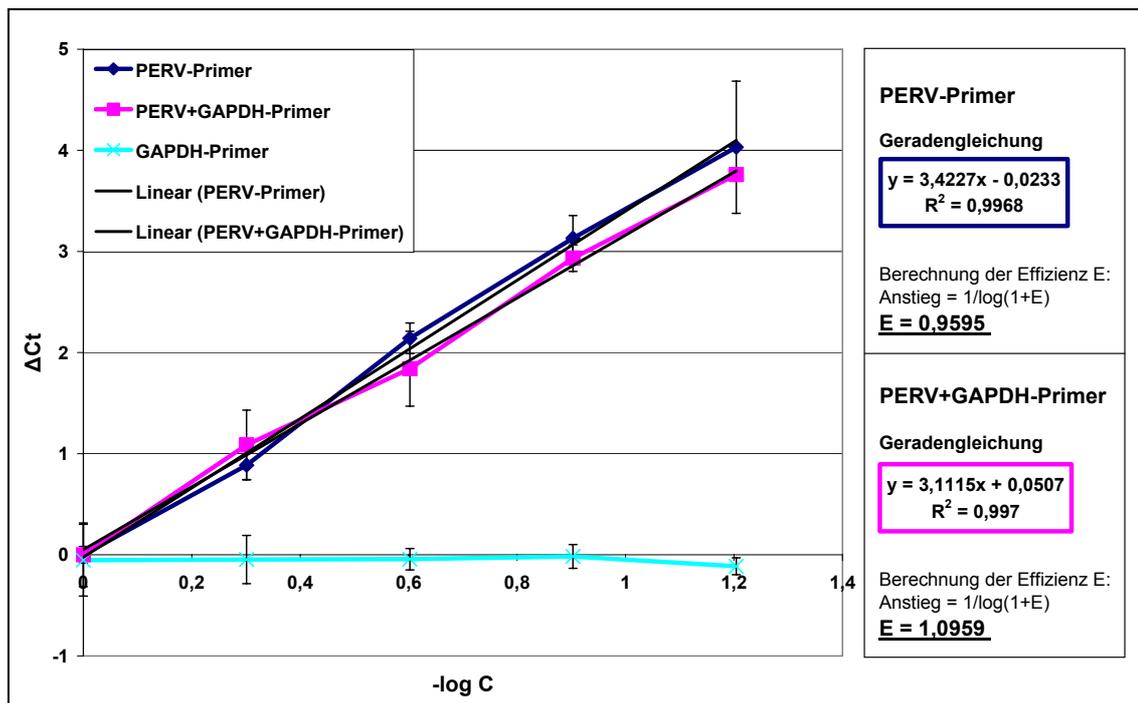


Abb.3.1 Graphische Ermittlung der Effizienz der PERV-PCR; Es wurden mit PERV infizierte Zellen auf uninfizierten Zellen ausverdünnung und mittels Real time PCR die Ct-Werte für die Amplifikation der PERV- und GAPDH-Abschnitte bestimmt. Die Durchführung dieser Reaktion als Duplex-PCR (PERV- und GAPDH-Primer) änderte die Effizienz der PERV-PCR um 0,136. Die Ct-Werte der GAPDH blieben unbeeinflusst. $\Delta Ct = Ct$ (verdünnte infizierte Zellen) – Ct (unverdünnte infizierte Zellen); C=Anteil der infizierten Zellen; C=1 entspricht unverdünnten infizierten Zellen

Durch das Verdünnen der infizierten Zellen mit uninfizierten Zellen bleibt die Gesamtmenge an GAPDH kodierender DNA gleich und somit liegen die in Abbildung 3.1 dargestellten ΔCt -Werte der GAPDH-PCR bei Null. Um die Effizienz der GAPDH-PCR bestimmen zu können, wurden uninfizierte 293-Zellen in Aqua bidest. ausverdünnung, so konnte der lineare Anstieg der ΔCt -Werte untersucht werden. In Tabelle 3.2 sind die ΔCt -Werte der GAPDH-Monoplex und Duplex-PCR aufgelistet. Diese ΔCt -Werte wurde in Abbildung 3.2 gegen die -logC-Werte aufgetragen. Aus den Anstiegen der Geraden ließen sich für die GAPDH-Monoplex-PCR eine Effizienz von 0,883 und für die GAPDH-Duplex-PCR eine Effizienz von 0,833 ermitteln.

Tabelle 3.2 Ct-Werte einer Real time Monoplex und Duplex-PCR einer Ausverdünnung von unifizierten 293-Zellen in Aqua bidest.

Anteil infizierter Zellen C	-logC	GAPDH-Primer			GAPDH+PERV-Primer		
		Ct-Mittelwerte	Stabw.	ΔCt	Ct-Mittelwerte	Stabw.	ΔCt
1	0	23,94	0,21	0	24,04	0,19	0
0,5	0,30	24,91	0,50	0,97	25,33	0,11	1,29
0,25	0,60	26,02	0,29	2,08	26,17	0,17	2,13
0,125	0,90	27,02	0,36	3,08	27,50	0,21	3,46
0,0625	1,20	28,37	0,22	4,42	28,68	0,14	4,64

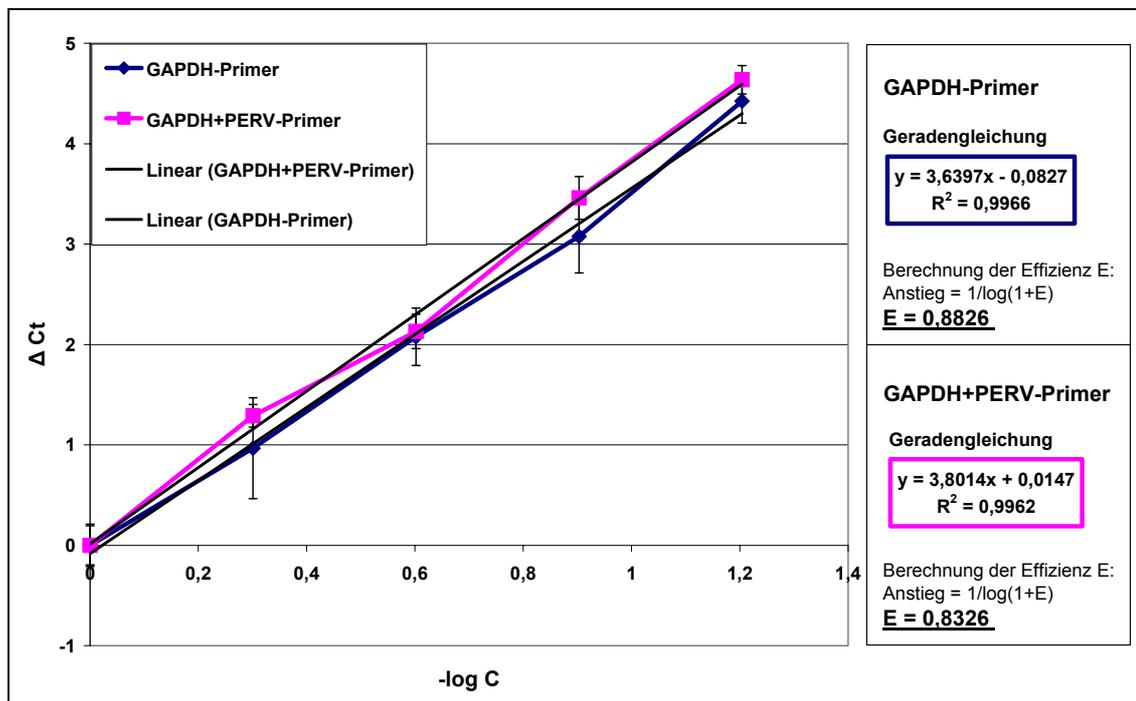


Abb.3.2 Graphische Ermittlung der Effizienz der GAPDH-PCR; Es wurden mit PERV infizierte Zellen in Aqua bidest. ausverdünnung und mittels Real time PCR die Ct-Werte für die Amplifikation der GAPDH-Abschnitte bestimmt. Die Durchführung dieser Reaktion als Duplex-PCR (PERV- und GAPDH-Primer) änderte die Effizienz der GAPDH-PCR um 0,05. $\Delta Ct = Ct$ (verdünnte unifizerte Zellen) – Ct (unverdünnte unifizerte Zellen); C=Anteil der unifizierten Zellen; C=1 entspricht unverdünnten unifizierten Zellen

Die geringen Abweichungen der Effizienzen zeigen, dass sich GAPDH und PERV Primer und Sonden gegenseitig nicht beeinflussten. Die Effizienz von annähernd eins für die Messung der viralen DNA erlaubte die Berechnung der Neutralisation ohne die Einbeziehung von Korrekturfaktoren.

Die im HIV-Neutralisationsassay genutzten Primer und Sonden für die Virus-DNA und die GAPDH-DNA waren vor Beginn der Diplomarbeit bereits untersucht worden und zeigten ebenfalls keine gegenseitige Beeinflussung.

Es konnte für den PERV-Neutralisationstest eine Real time-Duplex-PCR etabliert werden, die eine Erfassung der Provirusintegration und zytotoxischer Effekte erlaubte.

3.1.2 Charakterisierung des für die Neutralisationsversuche verwendeten PERV

Um bei den Neutralisationsversuchen mit gleichen Virusmengen zu arbeiten, wurde ein Virusstock angelegt. Die Berechnung der TCID₅₀/ml ergab einen Wert von $1,8 \times 10^4$. Das in dieser Diplomarbeit verwendete Virus ist eine Rekombinante aus PERV-A und PERV-C. Es wurde ursprünglich durch zwei Passagen auf humanen 293-Zellen an diese Zellen adaptiert und zeigte Multimerisierungen im LTR-Bereich (PERV-NIH/3°) (Wilson et al., 1998, 2000). Weitere in der Arbeitsgruppe durchgeführte Passagen führten zu zusätzlichen Multimerisierungen im LTR-Bereich (PERV 4°, 5°) die mit einer Zunahme der Virustiter einher gingen (Denner et. al, 2001, 2003). Das in dieser Diplomarbeit verwendete Ausgangsvirus sollte nach erneuten Passagen auf Veränderungen in der LTR und des Virustiters untersucht werden. Hierzu wurde das Ausgangsvirus zehnmal auf uninfizierten 293-Zellen passagiert. Die infizierten Zellen wurden in mehrtägigen Abständen gesammelt und mittels PCR auf Multimerisierungen des viralen LTR-Bereichs untersucht. Für diese Untersuchung wurden Plasmide, welche die LTR-Bereiche von PERV 3°, 4° und 5° enthielten, mitgeführt. In Abbildung 3.3 sind die mittels LTR-PCR amplifizierten LTR-Abschnitte der infizierten Zellen auf einem Agarosegel dargestellt.

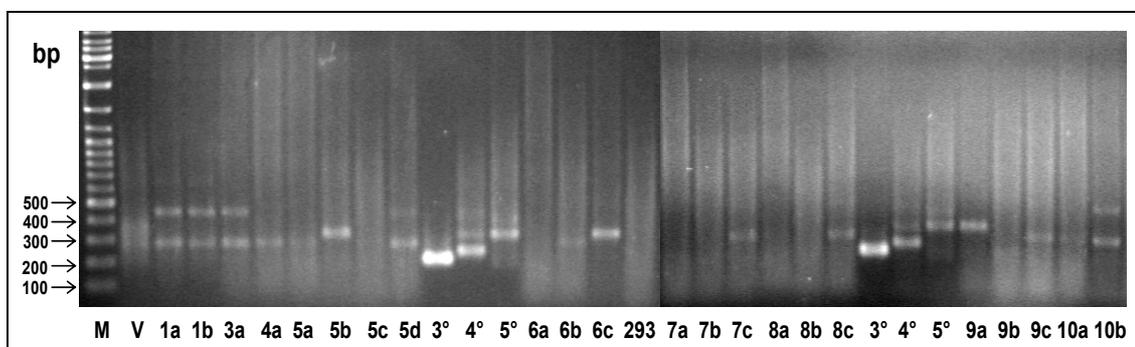


Abb.3.3: LTR-PCR der infizierten Zellen; Dargestellt sind die Amplifikate der LTR-PCR der infizierten 293-Zellen nach verschiedenen Passagen des Virus auf 293-Zellen. Die Zellen wurden jeweils 3 Tage nach Infektion und nach weiterer Kultivierung auf eine LTR-Verlängerung untersucht. Plasmid 3°, 4°, 5° sind Amplifikate von Plasmiden welche die LTR von PERV 3°, PERV 4° und PERV 5° enthalten. Das Ausgangsvirus (V) zeigt eine Bande im Bereich der Plasmide 4° und 5°. Nur die Amplifikate der 5. Passage 9 Tage nach der Infektion und der 6. Passage 17 Tage nach der Infektion sowie der 9. Passage 3 Tage nach der Infektion erreichen die Laufhöhe des 5°-Plasmids. M = Marker (O'GeneRuler); V = Ausgangsvirus; 1a = 1. Pass. 3d nach Infekt.; 1b = 1. Pass. 5d nach Infekt.; 3a = 3. Pass. 3d nach Infekt.; 4a = 4. Pass. 3d nach Infekt.; 5a = 5. Pass. 3d nach Infekt.; 5b = 5. Pass. 9d nach Infekt.; 5c = 5. Pass. 14d nach Infekt.; 5d = 5. Pass. 17d nach Infekt.; 3° = Plasmid LTR 3°; 4° = Plasmid LTR 4°; 5° = Plasmid LTR 5°; 6a = 6. Pass. 3d nach Infekt.; 6b = 6. Pass. 14d nach Infekt.; 6c = 6. Pass. 17d nach Infekt.; 293 = uninfizierte 293-Zellen; 7a = 7. Pass. 3d nach Infekt.; 7b = 7. Pass. 14d nach Infekt.; 7c = 7. Pass. 17d nach Infekt.; 8a = 8. Pass. 3d nach Infekt.; 8b = 8. Pass. 11d nach Infekt.; 8c = 8. Pass. 14d nach Infekt.; 3° = Plasmid LTR 3°; 4° = Plasmid LTR 4°; 5° = Plasmid LTR 5°; 9a = 9. Pass. 3d nach Infekt.; 9b = 9. Pass. 6d nach Infekt.; 9c = 9. Pass. 9d nach Infekt.; 10a = 10. Pass. 3d nach Infekt.; 10b = 10. Pass. 6d nach Infekt.

Bei jeder Passage konnte die LTR amplifiziert werden, teilweise waren die Banden aber erst nach weiterer Kultivierung der Zellen nachweisbar. Das Amplifikat des Ausgangsvirus zeigt eine Bande im Bereich des 4°- und 5°-Plasmids. Bei einigen Proben (1.Passage 3. Tag und 5. Tag, 3.Passage 3. Tag, 5.Passage 17. Tag, 10. Passage 6.Tag) trat eine zusätzliche Bande zwischen 400 und 500 kDa auf. Nur drei Proben (5.Passage 9.Tag, 6.Passage 17.Tag, 9.Passage 3.Tag) zeigten eine Bande in gleicher Laufhöhe wie die des 5°-Plasmids. In uninfizierten 293-Zellen ließ sich keine LTR nachweisen. Im Anschluß an den LTR-Nachweis sollten die Überstände der infizierten Zellen auf ihre Infektionseigenschaften untersucht werden. Dabei zeigte außer dem Ausgangsüberstand keiner der nach Passagierung erhaltenen Überstände eine mittels Real time PCR nachweisbare Infektion von nativen 293-Zellen.

Es konnte für den PERV-Neutralisationstest ein Virusstock angelegt werden ($1,8 \times 10^4$ TCID₅₀/ml). Parallel konnten frühere Befunde zur Verlängerung der LTR bei der Passagierung von PERV auf 293-Zellen bestätigt werden.

3.2 *Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV*

3.2.1 *Gewinnung und Charakterisierung des Impfantigens rp15E von PERV*

Die Immunisierung der Ratten erfolgte mit rekombinant hergestelltem p15E. Dieses wurde ebenfalls für die ELISA-Bindungsstudien und die affinitätschromatographische Aufreinigung der mAK genutzt. Das rp15E wurde als Fusionsprotein aus der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV und dem Calmodulinbindeprotein exprimiert. Der Transmembrandurchgang, der zytoplasmatische Teil und das Fusionspeptid von p15E waren deletiert, so dass die Masse des Proteins ca. 15 kDa betrug. In Abbildung 3.4 ist der schematische Aufbau des viralen TMs und des rp15E von PERV dargestellt.

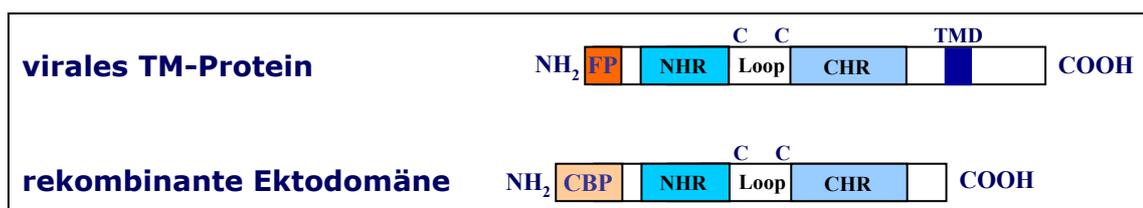


Abb. 3.4 Schematische Darstellung des viralen und des rekombinanten p15E von PERV: Das rekombinante p15E von PERV besteht aus einem Fusionsprotein aus der Ektodomäne und dem Calmodulinbindeprotein (CBP). Der Transmembrandurchgang (TMD), das Fusionspeptid (FP) und der zytoplasmatische Teil sind deletiert [N-terminale Helixregion=NHR; C-terminale Helixregion=CHR; Cysteinloop=C-C-Loop].

Das in *E.coli* produzierte rp15E wurde über eine Calmodulinsäule aufgereinigt und die Reinheit des Proteins mittels SDS-Gel überprüft (Abbildung 3.5A). Im Western Blot zeigte das Serum einer mit p15E PERV immunisierter Ziege aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe (Fiebig et al., 2003) in einer 1:750 Verdünnung (2. Antikörper: anti-Ziege 1:5000) Bindung an das rp15E (Abbildung 3.5 B).

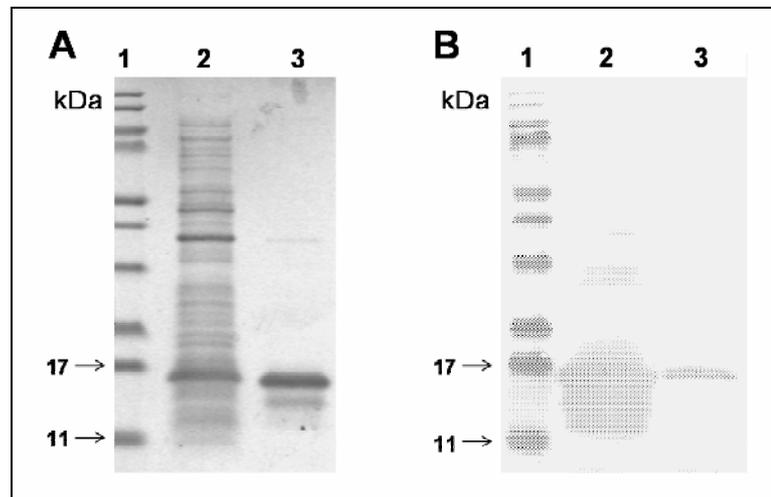


Abb. 3.5 SDS-Gel und Western Blot mit rp15E von PERV: A) SDS-Gel; B) Westernblot mit dem Serum der Ziege 20 als 1. Antikörper; 1 = Marker PageRuler; 2 = rp15E-haltiges Bakterienlysats; 3 = rp15E nach affinitätschromatographischer Aufreinigung mittels Calmodulin.

Die Konzentration des gereinigten rp15E wurde im Bradfordtest ermittelt, es konnten aus einer 5 l Bakterienkultur 10 mg rp15E erhalten werden. Zur späteren Aufreinigung der mAK wurde eine rp15E-Säule hergestellt, dazu wurden 8 mg des rp15E PERV an Sepharose gekoppelt.

Das rp15E von PERV wurde in hoher Reinheit erhalten und konnte im Western Blot als rp15E identifiziert werden.

3.2.2 Charakterisierung der Seren nach Immunisierung mit rp15E von PERV

Mit dem gereinigten rp15E wurden 4 Wistar-Ratten (Gruppe 103) über einen Zeitraum von 6 Monaten immunisiert. Nach der 3. Boost-Impfung erfolgte eine Blutabnahme. Die Seren aller Tiere zeigten im ELISA eine deutliche Bindung an das Immunisierungsprotein. Besonders ausgeprägt war diese bei den Seren der Ratten 103/2 und 103/4 (Abbildung 3.6 A). Sie erreichten bei Verdünnungen von 1:500000 (103/2) bzw. 1:250000 (103/4) noch eine $OD > 0,1$. Auch im Western Blot wurde rp15E durch diese Seren detektiert (Abbildung 3.6 B).

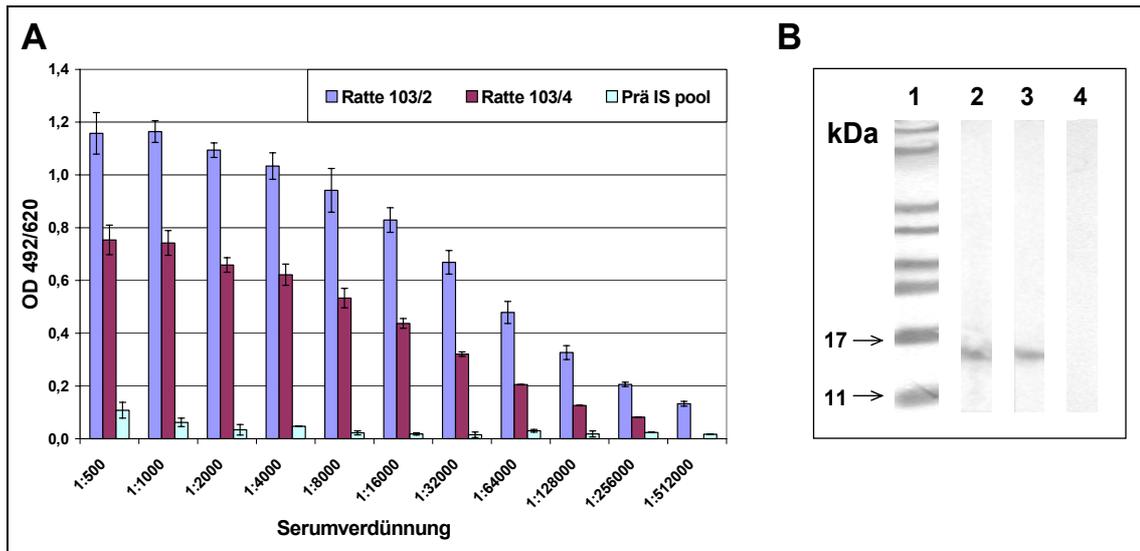


Abb. 3.6 Bindung der Seren 103/2 und 103/4 an rp15E von PERV im ELISA und Western Blot: A) ELISA: An der festen Phase wurden je 100 ng rp15E/well immobilisiert. Die Immunsereen erreichten bei einer Verdünnung von 1:500000 (103/2) bzw. von 1:125000 (103/4) eine OD>0,1. Ein Pool aus Präimmunsereen (Prä IS pool) zeigte keine Bindung rp15E. B) Western Blot mit 0,5 µg rp15E/Slot; Die Detektion erfolgte mittels DAB-Färbung. 1=Marker PageRuler; 2=Immunsereum 103/2; 3=Immunsereum 103/4; 4=Pool aus Präimmunsereen

Im Neutralisationstest waren die Seren aller Ratten, in einer 1:16 Endverdünnung, in der Lage, PERV zu neutralisieren. In Abbildung 3.7 ist der Neutralisationstest der für die Fusion ausgewählten Tiere 103/2 und 103/4 dargestellt.

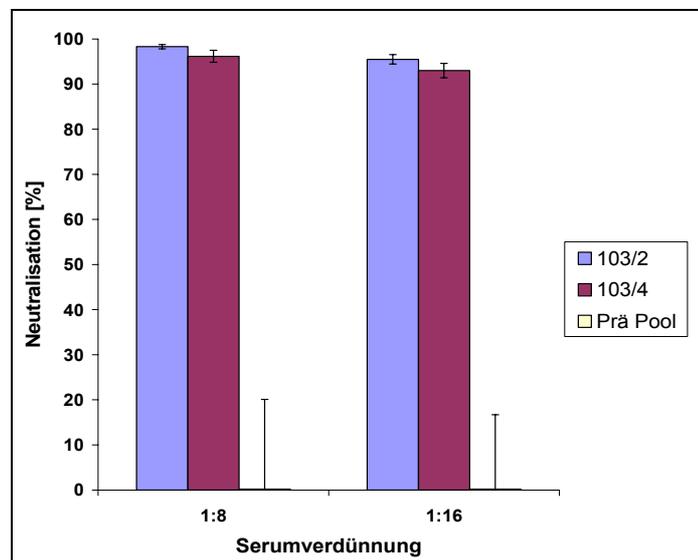


Abb. 3.7 Real time PCR-Neutralisationstest der Immunsereen der Rattengruppe 103: Die Neutralisation wurde auf einen Pool aus Präimmunsereen (Prä Pool) bezogen. PERV wurde in einer 1:16 Endverdünnung ($1,1 \times 10^3$ TCID₅₀/ml) eingesetzt. 103/2 = Immunsereum der Ratte 103/2; 103/4 = Immunsereum der Ratte 103/4

Die Präimmunsereen, nicht aber die Immunsereen zeigten anhand der GAPDH-Kontrolle zytotoxische Eigenschaften. Es wurde daher ein Pool aus nicht zytotoxischen Präimmunsereen eingesetzt, auf welchen die Neutralisation bezogen wurde, die neutralisierenden Eigenschaften dieses Präimmunpools wurden somit Null gesetzt. Das

Durch Immunisierung von Ratten mit rp15E wurden Seren erhalten, die rp15E im ELISA und Western Blot detektieren und in der Lage waren PERV zu neutralisieren. Die Epitope der Seren konnten detektiert werden.

3.2.3 Gewinnung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen rp15E von PERV

Die Milzzellen der Ratten 103/2 und 103/4 wurden mit den 653-Myelomzellen fusioniert. Aus der Fusion der Ratte 103/4 konnten etwa 300 Klone erhalten werden. Die Ausbeute der Fusion mit dem Tier 103/2 fiel mit 100 Klonen geringer aus. Nach dreimaliger ELISA-Selektion auf rp15E wurden positive Klone auf 24-Well-Platten erweitert und 2-mal rekloniert. Es konnten aus beiden Fusionen insgesamt fünf stabile Klone etabliert werden (Tabelle 3.3), welche im Folgenden genauer charakterisiert werden.

Tabelle 3.3 Fusionsausbeute der mit rp15E immunisierten Ratten 103/2 und 103/4

Ratte	Klone	Bindende Antikörper	Etablierte mAK	Bindung an E1 oder E2
103/2	100	2	1	0
103/4	300	10	4	0

Die Überstände der Hybridomakulturen reagierten im ELISA mit rp15E noch bei einer Verdünnung von 1:2500 bzw. 1:10000 (Abbildung 3.10).

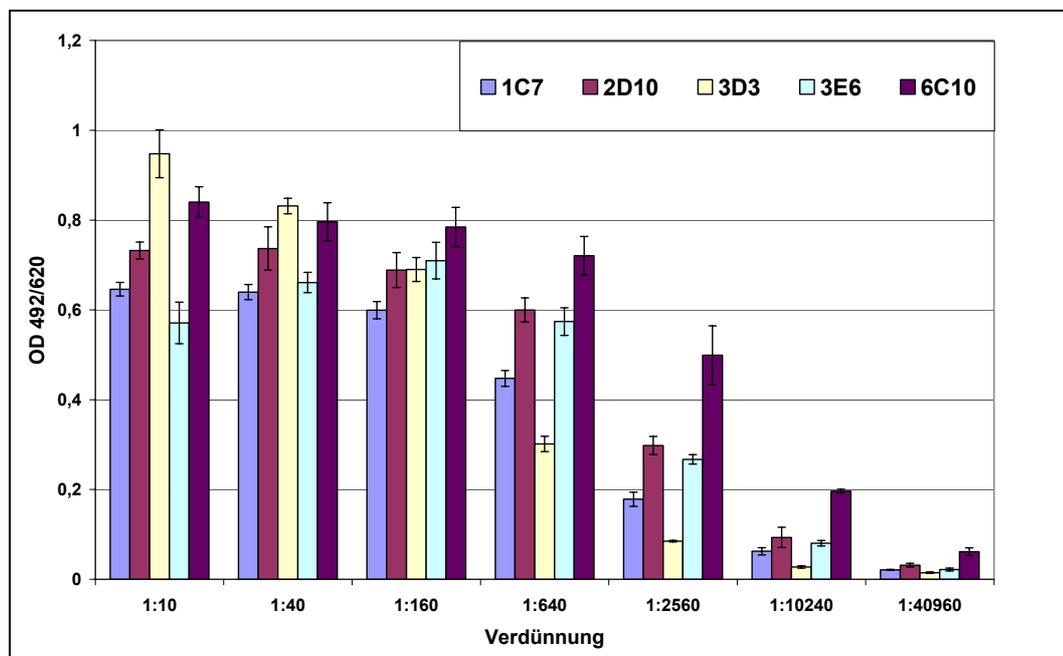


Abb.3.10 ELISA-Titration der Hybridomaüberstände auf rp15E von PERV: An der festen Phase wurden 100ng rp15E immobilisiert. Die mAK 6C10 und 2D10 erreichen bei einer Verdünnung von 1:10000 eine OD>0,1.

Keiner der Überstände war in der Lage, die synthetischen Peptide E1 und E2 von PERV, welche die Sequenzen der auf rp15E beschriebenen E1 und E2 Bereiche (Fiebig et al., 2003) enthielten, zu detektieren. Die mAK wurden im ELISA auf eine Reaktion mit FKS oder Plaste überprüft, diese Kontrolle fiel für alle mAK negativ aus.

Um festzustellen, ob durch die mAK das Immunisierungsprotein oder bakterielle Verunreinigungen detektiert wurden, wurde ein Western Blot mit rp15E durchgeführt (Abbildung 3.11). Hierbei zeigte nur der mAK 6C10 eine Bindung an rp15E.

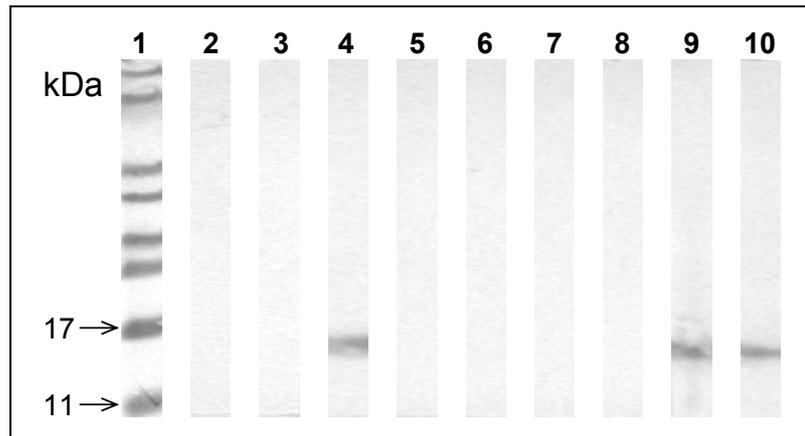


Abb.3.11 Western Blot der Hybridomakulturüberstände der rp15E Fusion und die Immunsereen 103/2 und 103/4: Die Detektion erfolgte mittels DAB-Färbung. 1 = Marker PageRuler; 2 = Neg.Ko.: humaner mAK 2F5 (0,5 µg/ml); 3 = Neg.Ko.: Medium; 4 = mAK 6C10; 5 = mAK 3E6; 6 = mAK 2D10; 7 = mAK 3D3; 8 = mAK 1C7; 9 = Immunsereum 103/2; 10 = Immunsereum 103/4

Da die zur Detektion verwendete DAB-Färbung wenig sensitiv ist, wurde ein weiterer Western Blot durchgeführt, welcher mittels ECL detektiert wurde. Dabei zeigten die mAK 6C10 und 1C7 eine deutliche Bindung, der mAK 3D3 eine schwache Bindung an rp15E (Abbildung 3.12).

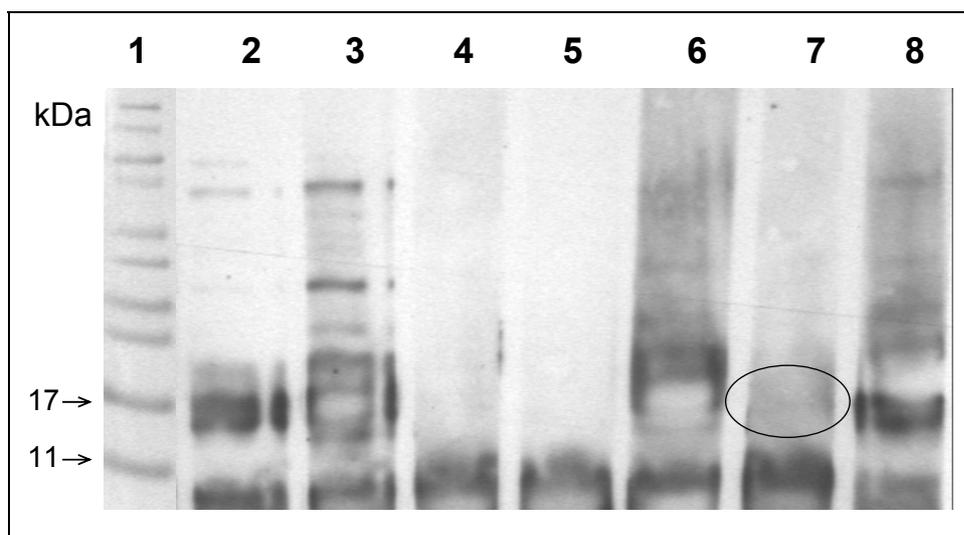


Abb. 3.12 Western Blot der Hybridomakultur- und Milzkulturüberstände auf rp15E PERV: Die Überstände wurden unverdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels ECL. Die mAK 1C7 (6), 3D3 (7, die Bande ist eingekreist) und 6C10 (8) binden an rp15E. 1=Marker PageRuler; 2=Milzkultur 103/4; 3=Milzkultur 103/2; 4=mAK 3E6; 5=mAK 2D10; 6=mAK 1C7; 7=mAK 3D3; 8=mAK 6C10

Zur genaueren Charakterisierung der mAK wurde ein Subklassentest durchgeführt. Dieser zeigte, dass alle gewonnenen mAK dem Isotyp IgG2a bzw. IgG2b zuzuordnen sind (Abbildung 3.13).

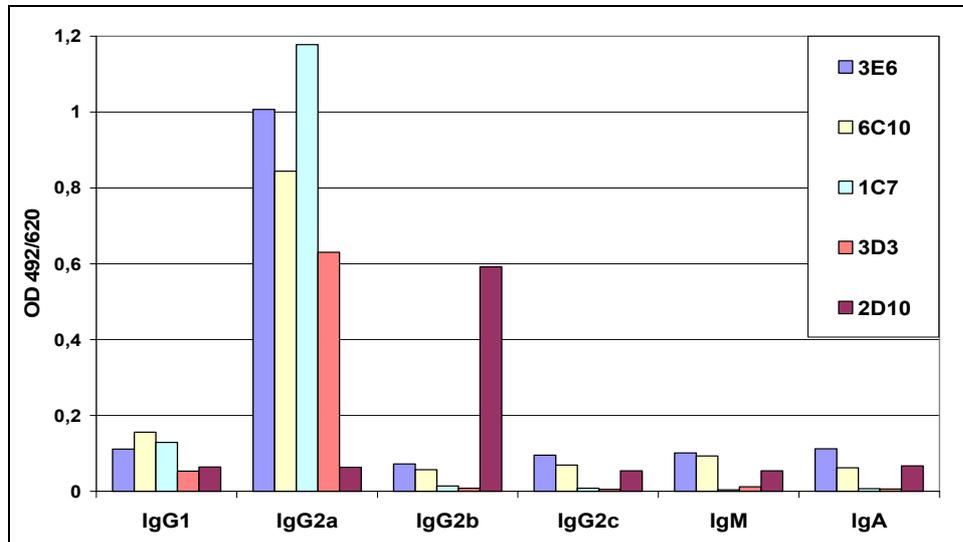


Abb. 3.13 Subklassentest der mAK 3E6, 2D10, 6C10, 1C7 und 3D3: Alle mAK wurden der Subklasse IgG2a zugeordnet, lediglich der mAK 2D10 wurde als IgG2b identifiziert.

Die Titration der mAK im ELISA auf rp15E (Abbildung 3.10) lieferte keine Aussage über die Antikörperkonzentration in den Überständen, daher sollten die mAK mit rp15E, das an eine Sepharosesäule gekoppelt war, aufgereinigt werden und anschließend sollte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Keine der von der rp15E-Säule eluierten Fraktionen enthielt eine mit dem Bradfordtest messbare Konzentration an Antikörpern (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher jeweils 50 ml FKS-freier Hybridomakulturüberstand über eine Protein G-Säule aufgereinigt. Mittels Bradfordtest war die Konzentration der hierdurch erhaltenen Antikörperkonzentrate (0,5 – 1 ml) bestimmbar (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Antikörperkonzentration und ELISA-Titererhöhung nach ProteinG-Aufreinigung der mAK

mAK	6C10	2D10	3D3	1C7	3E6
Konzentration [µg/ml]	190	440	175	70	632
Titererhöhung zum Ausgangsüberstand	4-fach	16-fach	16-fach	4-fach	4-fach

Ebenso erhöhte sich auch der Titer im ELISA auf rp15E bei allen Aufreinigungen auf das 4 bis 16-fache (beispielhaft für mAK 3D3 in Abbildung 3.14 dargestellt).

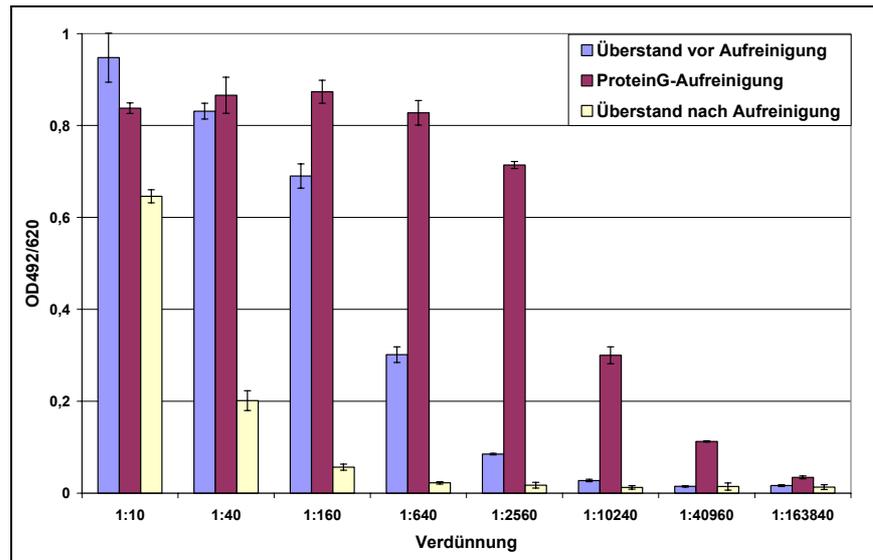


Abb.3.14 ELISA-Titer der affinitätschromatographischen Aufreinigung des mAK 3D3 mittels ProteinG: Der ELISA-Titer erhöht sich durch die Aufreinigung um das 16-fache. Der Gehalt an rp15E spezifischen Antikörpern im Hybridomaüberstand sinkt durch die ProteinG-Aufreinigung deutlich ab.

Um die durch die mAK erkannten Epitope genauer eingrenzen zu können, wurde ein Western Blot mit dem Protein Hybrid II als Antigen durchgeführt (Abbildung 3.15). Dieses ist fast identisch mit dem rp15E, lediglich die E1 und E2 Bereiche von PERV sind durch die entsprechenden Sequenzen von HIV ersetzt. Eine Bindung der mAK an Hybrid II ließe somit auf Epitope außerhalb des E1 oder E2 Bereichs schließen. Der mAK 6C10 und die Seren 103/2 und 103/4 zeigten eine schwache Bindung an Hybrid II, die anderen mAK reagierten nicht.

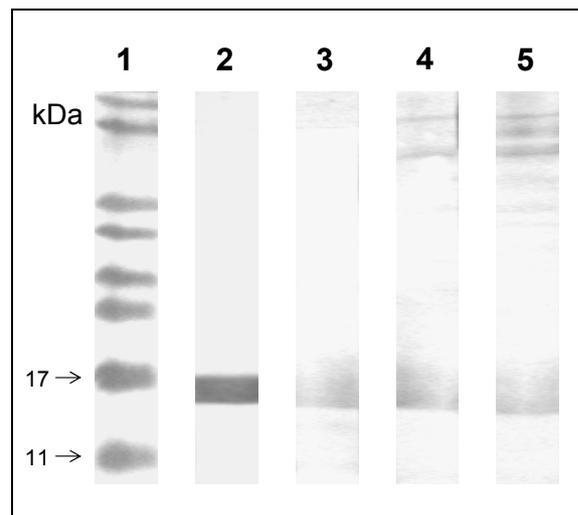


Abb.3.15 Western Blot der rp15E Seren und mAK auf Hybrid II: Die Detektion erfolgte mittels DAB-Färbung. 1 = Marker PageRuler; 2 = humaner mAK 2F5 (0,5 µg/ml); 3 = mAK 6C10, unverdünnter Hybridomakulturüberstand; 4 = Serum 103/2, 1:500 verdünnt; 5 = Serum 103/4, 1:500 verdünnt

Der mAK 6C10 lieferte als einzige Antikörper, mit einer definierten Konzentration von 10µg/ml innerhalb weniger Sekunden ein deutliches Bild auf der Pepsot-Membran (Abbildung 3.16). Die unverdünnten Überstände der mAK 6C10 und 3D3 ergaben auf

der Pepsot-Membran nach mehreren Minuten ein identisches Bild. Die anderen mAK waren nicht detektierbar. Die von den mAK 6C10 und 3D3 erkannte Sequenz RERLERR liegt in der Immunisierungssequenz. Sie weicht von der durch die Immunseren erkannten Sequenz ab.

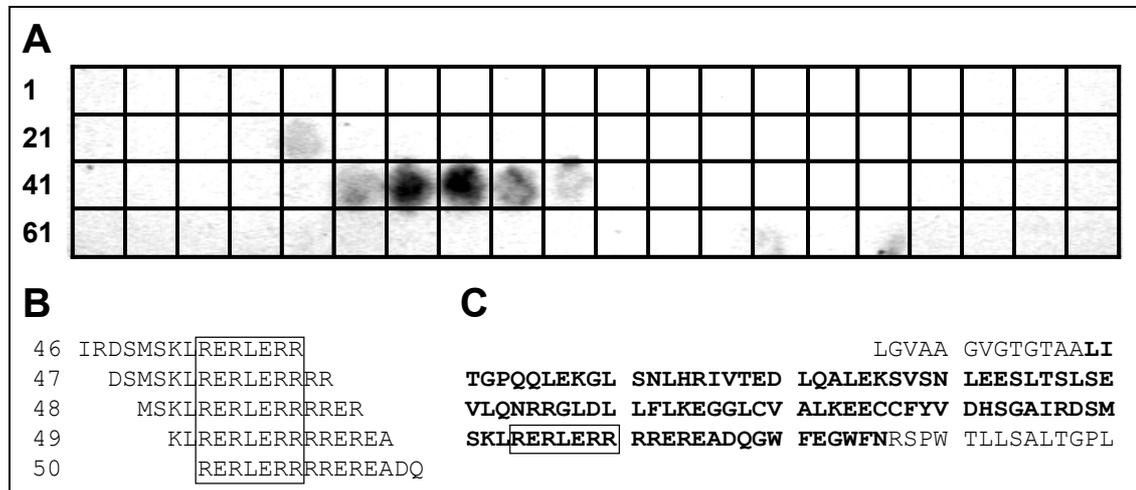


Abb.3.16: Kartierung des Epitops des mAK 6C10 auf der p15E Membran: A) Bindung des mAK 6C10 an die Peptide 46-50 auf der Pepsot-Membran. Der mAK 6C10 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. B) Auflistung der Sequenzen der vom mAK 6C10 gebundenen Peptide und des ermittelten Epitops RERLERR (umrahmt). C) Darstellung der auf der Pepsot-Membran aufgetragenen Sequenz des p15E von PERV A. Die Sequenz des für die Immunisierung genutzten rp15E ist fett gedruckt. Der mAK 6C10 detektiert das Epitop RERLERR (umrahmt).

Die mAK-haltigen Überstände der Hybridomakulturen wurden im PERV-Neutralisationstest untersucht. Es konnte keine Neutralisation gemessen werden.

Die Antikörperkonzentration im Überstand einer gut produzierenden Hybridomakultur liegt bei ca. 20 µg/ml. Im Neutralisationstest lag der Kulturüberstand in einer Endverdünnung von 1:4 vor. Die somit eingesetzte Endkonzentration der Antikörper betrug höchstens 5 µg/ml. Arbeitsgruppeninterne Erfahrungen zeigten jedoch, dass eine PERV-Neutralisation nur bis zu einer Antikörperkonzentration von etwa 10 µg/ml nachweisbar ist.

Es wurden daher die zuvor mehrfach gegen PBS dialysierten Antikörperaufreinigungen im Neutralisationstest eingesetzt (Abbildung 3.17). Keine Aufreinigung wirkte infektionsunterstützend oder wurde durch die GAPDH-Kontrolle als zytotoxisch identifiziert. Die Neutralisation wurde auf den am schwächsten neutralisierenden mAK bezogen. Die Ct-Werte dieses mAK entsprachen etwa denen der Durchinfektion. Lediglich die mAK 6C10 und 3D3 zeigten eine neutralisierende Wirkung. Der mAK 6C10 senkte in einer Verdünnung von 1:4 bzw. 1:8 die Provirusintegration um 97 % bzw. 80 %. Eine signifikante Virusneutralisation war mit dem mAK 3D3 nur in einer Verdünnung von 1:4 zu erreichen.

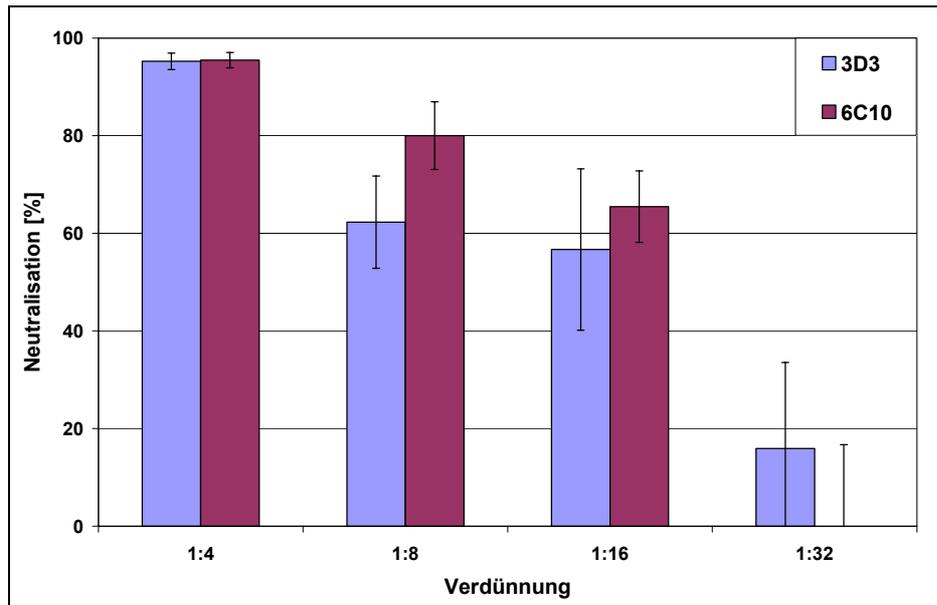


Abb. 3.17 Real time PCR-Neutralisationstest der Antikörperaufreinigungen der mAK 3D3 und 6C10: Die Neutralisation von PERV ($1,4 \times 10^2$ TCID₅₀/ml) wurde auf die am schwächsten neutralisierende Antikörperaufreinigung bezogen.

Es konnten fünf mAK, 3D3, 6C10, 1C7, 2D10 und 3E6, etabliert werden, die im ELISA mit rp15E reagierten. Im Western Blot erfolgte eine Detektion des rp15E durch die mAK, 3D3, 6C10 und 1C7. PERV neutralisierend wirkten die Aufreinigungen der mAK 6C10 und 3D3. Die Epitope dieser mAK lagen im Immunisierungsprotein, außerhalb der Epitope, die durch das PERV-neutralisierende Serum einer mit p15E immunisierten Ziege erkannt wurden (Fiebig et al. 2003).

3.3 Monoklonale Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV

3.3.1 Das Immunisierungsprotein Hybrid II

Wie das rp15E ist auch Hybrid II ein rekombinant in *E.coli* hergestelltes Protein. Im Gegensatz zu rp15E ist es schwer löslich. Das Grundgerüst des Hybrid II ist mit dem des rp15E identisch, lediglich Sequenzen im E1 und E2 Bereich sind durch die entsprechenden Sequenzen von HIV ersetzt, die Masse dieses Proteins betrugt daher auch ca. 15 kDa (Abbildung 3.18). Teile der eingefügten HIV-Sequenzen im E2 Bereich werden durch die humanen mAK 2F5 (ELDKWAS) und 4E10 (WFNIT) detektiert. Die in den E1 Bereich von Hybrid II integrierte Sequenz TSMTLTVQARQLLS wurde für 2F5 und 4E10 als bindungsverstärkend beschrieben (Fiebig et al. 2005 a, b).

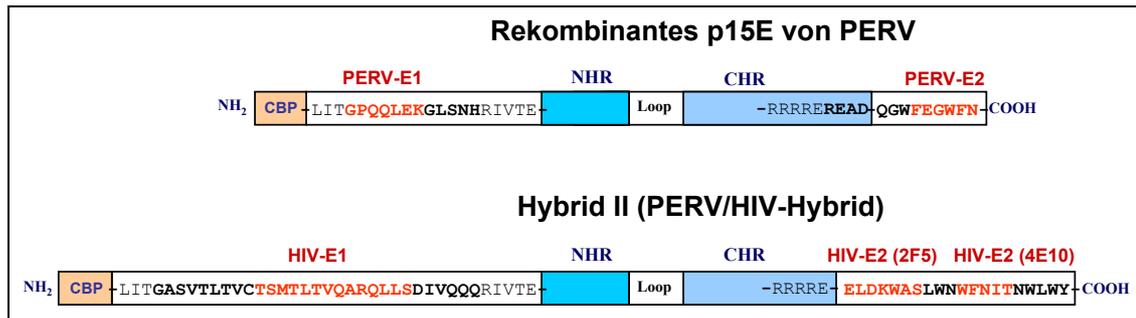


Abb. 3.18 Schematische Darstellung des rp15 von PERV und des Hybrid II: Hybrid II ist ein Konstrukt aus rp15E in dem die E1 und E2 Sequenzen (Fiebig et al., 2003) von PERV durch die entsprechenden Bereiche von gp41 von HIV-1 ersetzt wurden. Die Sequenz ELDKWAS von gp41 von HIV-1 wird von dem humanen mAK 2F5, die Sequenz WFNIT von dem humanen mAK 4E10 gebunden. Die mit HIV-E1 bezeichnete Sequenz wirkte für die mAK 2F5 und 4E10 im ELISA bindungsverstärkend (Schmolke, 2004). CBP = Calmodulinbindeprotein; NHR = N-terminale Helixregion; CHR = C-terminale Helixregion; Loop = Cysteinschleife

Das Protein Hybrid II lag zu Beginn der Diplomarbeit fertig aufgereinigt und charakterisiert vor.

3.3.2 Charakterisierung der Seren nach Immunisierung mit Hybrid II

Eine Rattengruppe (128) mit 4 Tieren wurde über einen Zeitraum von 2 Monaten mit Hybrid II immunisiert (siehe 2.1.2 Immunisierung). Nach der 1. Boosterung erfolgte eine Blutabnahme. Die Seren aller Tiere zeigten im ELISA eine Bindung an das Immunisierungsprotein. Besonders ausgeprägt war diese bei dem Serum der Ratte 128/2 (Abbildung 3.19 A). Sie erreichte bei Verdünnungen von 1:32000 noch eine OD>0,1. Auch im Western Blot wurde Hybrid II durch dieses Serum detektiert (Abbildung 3.19 B).

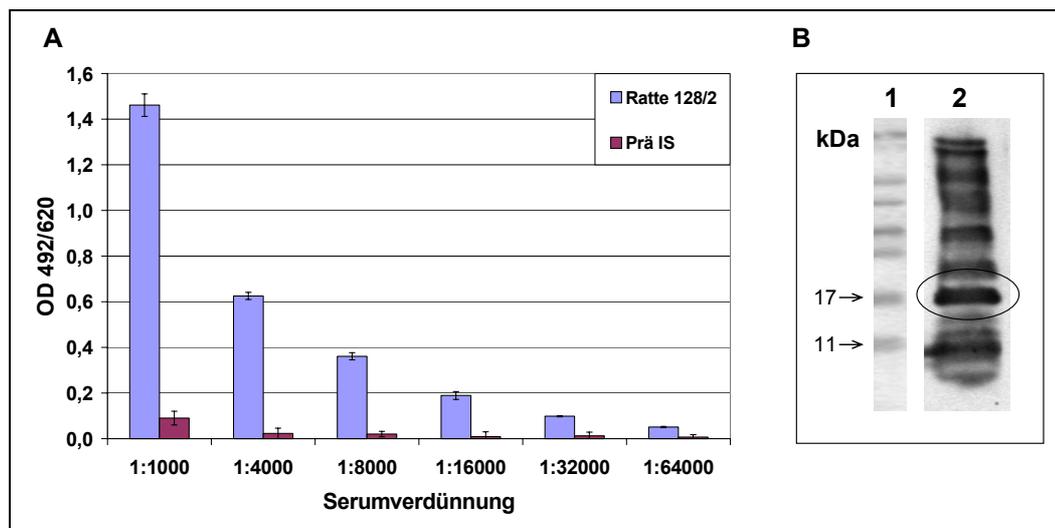


Abb. 3.19 Bindung des Serum 128/2 an Hybrid II im ELISA und Western Blot: A) ELISA: An der festen Phase wurden 100ng Hybrid II immobilisiert. Das Immunsereum der Ratte 128/2 erreichte bei einer Verdünnung von 1:32000 eine OD>0,1. Das Präimmunsereum (Prä IS) zeigte keine Bindung an Hybrid II. B) Western Blot mit 0,5 µg Hybrid II/Slot; Die Detektion erfolgte mittels ECL. Das Immunsereum 128/2 (2) bindet an Hybrid II (die Bande wurde eingekreist). 1=Marker PageRuler

Die Seren von zwei der vier immunisierten Tiere neutralisierten *in vitro* HIV. Das Serum 128/2 zeigte die stärkste Neutralisation, es senkte die Provirusintegration in einer Serumverdünnung von 1:80 noch um 78 % (Abbildung 3.20).

Die Ratte 128/2 wurde daher für die Fusion ausgewählt. Das Serum der Endblutung wurde mit der gp41-Pepspot-Membran auf Epitope untersucht. Es waren bei einer 1:300 Verdünnung des Serums keine Epitope detektierbar. Auch im Peptid-ELISA mit dem NIH-HIV-Peptidset konnten keine Epitope ausgemacht werden. Dieses Peptidset enthält auf 15 AS langen Peptiden, die sich um jeweils 11 AS überlappen die AS-Sequenz des gp41 des laboradaptierten HIV-1 Isolats MN. Lediglich an das 25 AS lange Peptid E2 long war im ELISA eine Bindung nachweisbar. Dieses von gp41 von HIV-1 abgeleitete synthetische Peptid enthält die Epitope der humanen mAK 2F5 und 4E10.

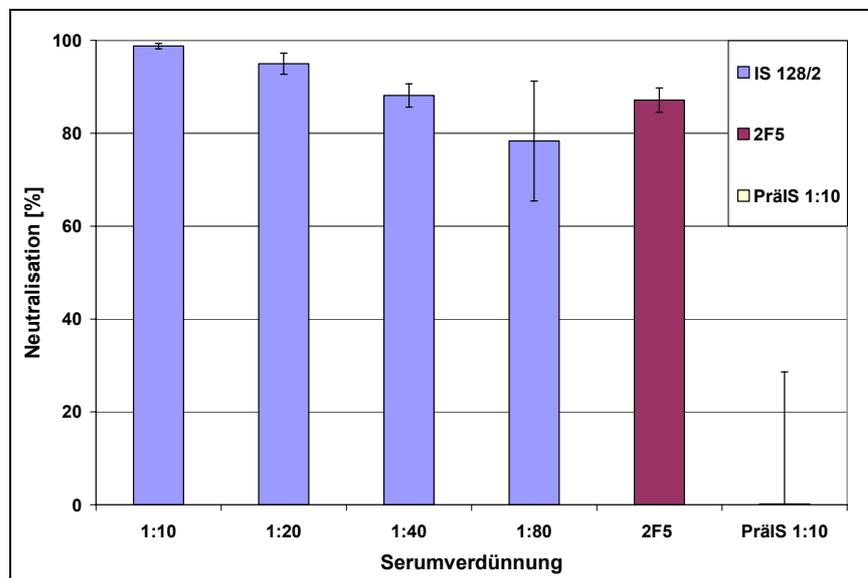


Abb.3.20 HIV-Neutralisationstest mit dem Serum der Ratte 128/2: Die Neutralisation von HIV-1 BAL (4,4x10² TCID₅₀/ml) des Immunsersums (IS 128/2) wurde auf das Präimmunsersum (PräIS) der Ratte bezogen. Die angegebenen Verdünnungen sind die Endverdünnungen im Test. Der humane mAK 2F5 wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/ml eingesetzt.

Durch Immunisierung von vier Ratten mit Hybrid II konnten Seren erhalten werden, die dieses Protein im ELISA und Western Blot binden, zwei dieser Seren reagierten im verwendeten HIV-Neutralisationstest positiv. Im ELISA war ebenfalls eine Bindung des Serums 128/2 an das Peptid E2 long detektierbar. Im ELISA mit überlappenden Peptiden von gp41 von HIV und auf der entsprechenden Pepspot-Membran waren keine Epitope nachweisbar.

3.3.3 Gewinnung und Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen gp41 von HIV-1

Die Fusion der Milzzellen der Ratte 128/2 mit Myelomzellen erbrachte nur eine sehr kleine Anzahl fusionierter Zellen (Tabelle 3.5). Nach ELISA-Selektionierung und Reklonierung konnten zwei mAK etabliert werden, die im ELISA eine Bindung an Hybrid II zeigten (Abbildung 3.21A). Beide mAK reagierten im ELISA nicht mit FKS oder Plastik.

Tabelle 3.5 Fusionsausbeute der mit Hybrid II immunisierten Ratte 128/2

Ratte	Klone	Bindende Antikörper	Etablierte mAK	Bindung an E1 oder E2
128/2	25	2	2	1

Der mAK 3B10 detektierte im ELISA das Peptid E2 long (Abbildung 3.21 B). Die Untersuchung der gewonnenen mAK im Western Blot zeigte für den mAK 3B10 eine Bindung an Hybrid II, der mAK 6F8 hingegen detektierte höchstwahrscheinlich bakterielle Banden (Abbildung 3.18 C).

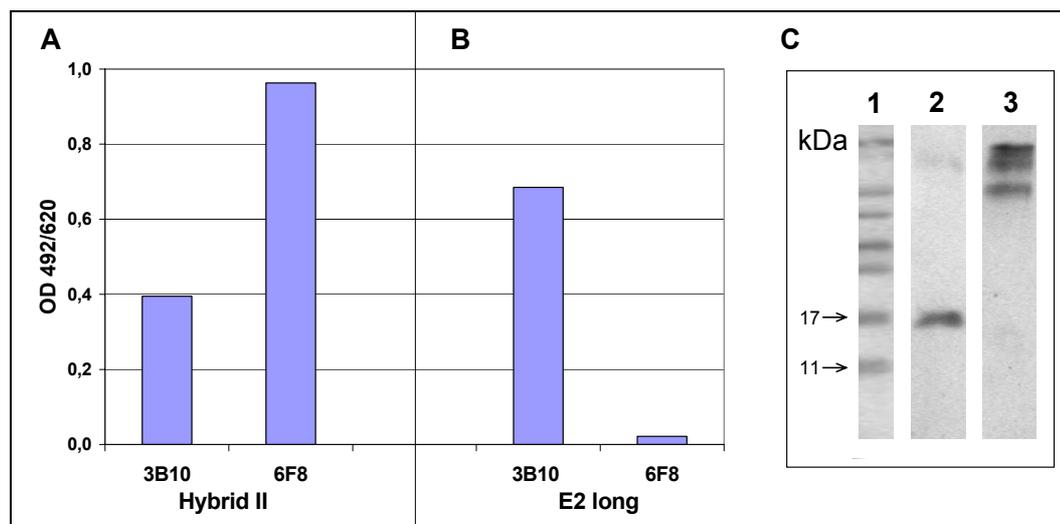


Abb.3.21 Bindung der mAK 3B10 und 6F8 im ELISA und Western Blot; A und B) ELISA: An der festen Phase wurden jeweils 100 ng Hybrid II (A) bzw. E2 long pro Well immobilisiert. E2 long ist ein synthetisches Peptid mit folgender Sequenz: CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL (Die Epitope der mAK 2F5 und 4E10 sind fett markiert). C) Western Blot mit 0,5 µg Hybrid II/Slot. Die Detektion erfolgte mittels ECL. 1 = Marker PageRuler; 2 = 3B10; 3 = 6F8

Die Isotypisierung der mAK ergab für den mAK 3B10 die Klasse IgM und für den mAK 6F8 die Klasse IgG2a (Abbildung 3.22). Da Antikörper der Klasse M nicht über Protein G aufreinebar sind, wurde eine Aufreinigung über eine Adsorption an das Proteinantigen versucht. Diese in der Arbeitsgruppe etablierte Methode funktionierte gut für die Aufreinigung von Seren und zeigte sich auch bei der Aufreinigung des humanen mAK 2F5 wirksam. Der mAK 3B10 konnte jedoch nicht aufgereinigt werden.

Die Epitope des mAK 3B10 wurden zusätzlich im Peptid-ELISA mit dem die gp41 Sequenz darstellenden Peptidset untersucht (Abbildung 3.24). Der unverdünnte Hybridomaüberstand zeigte hohe Hintergrundwerte, daher wurde der aufgereinigte mAK 3B10 mit ELISA-Blockpuffer zu einer Antikörperkonzentration von 4,5 µg/ml verdünnt eingesetzt. Dies senkte die unspezifischen Bindungen herab, so dass nur noch zwei Peptide deutlich gebunden wurden. Das Peptid 59 mit der Sequenz GKLICTTTVPWNASW befand sich nicht in der Immunisierungssequenz. Das Peptid 75 mit der Sequenz **DKWASLWNWFDITNW** befand sich in der Immunisierungssequenz und ist identisch mit der auf der Pepsot-Membran detektierten AS-Folge **DKWASL**.

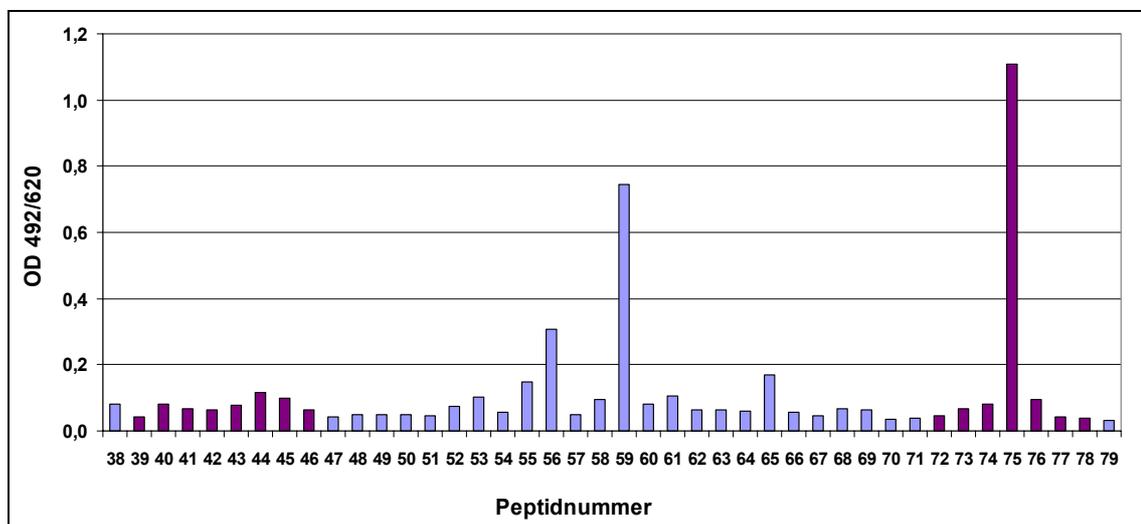


Abb.3.24 Peptid-ELISA des mAK 3B10: An der festen Phase wurden jeweils 100 ng Peptid/Well immobilisiert. Der mAK 3B10 wurde in einer Konzentration von 4,5 µg/ml eingesetzt. Die Peptide, die Sequenzen der Immunisierungssequenz enthalten, sind violett gefärbt. 3B10 bindet an das Peptid 59, mit der AS-Folge GKLICTTTVPWNASW und an das Peptid 75 mit der AS-Folge DKWASLWNWFDITNW.

Da das Immunisierungspolypeptid Hybrid II große Teile des rp15E enthält, wurde der mAK 3B10 auch auf Epitope auf der PERV-p15E-Pepsot-Membran untersucht (Abbildung 3.25). Dabei wurde ein Epitop, DSMSKL, im Bereich der C-terminalen Helixregion detektiert. Zusätzlich zeigte der mAK 3B10 Bindung an mehrere Peptide im Übergangsbereich des CHR zum E2-Bereich, die zum Teil nicht in der Immunisierungssequenz lagen. Unter diesen Epitopen befand sich auch die Epitop-Region FEGWFN, die von einem PERV neutralisierendem Ziegen Serum erkannt wurde (Fiebig et al. 2003).

4 Diskussion

Immunologische Abstoßung und physiologische Inkompatibilität stellen große Probleme im Bereich der Xenotransplantation dar, jedoch darf auch die Gefahr der Transmission pathogener Mikroorganismen nicht unterschätzt werden. Besonders die porzinen endogenen Retroviren PERV stellen eine wichtige Gefahrenquelle dar, da sie im Genom aller Schweinerassen integriert sind (Tissier et al., 1997; Patience et al., 2001).

Eine *in vivo* Übertragbarkeit war bisher nicht nachweisbar (Tacke, et al., 2001, Garkavenko et al., 2004, Irgang et al., 2003), doch zeigten *in vitro* Experimente die Möglichkeit einer Transmission auf menschliche Zellen (Patience et al., 1997, Wilson et al., 2000, Specke et al., 2001b, Specke et al., 2002b). Die Entwicklung von Impfstoffen könnte ein Weg sein, eine solche Transspeziesübertragung zu verhindern. Versuche mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein rp15E von PERV führten zu Seren, die *in vitro* PERV neutralisierten (Fiebig et al., 2003). Um den Wirkmechanismus der neutralisierenden Antikörper zu untersuchen, sollten monoklonale Antikörper gegen p15E gewonnen werden und ihre Interaktion mit dem Immunisierungsprotein sowie ihre Neutralisationseigenschaften charakterisiert werden.

4.1 Untersuchung von Multimerisierungen im LTR-Bereich von PERV

Zu Beginn der Diplomarbeit wurde für den Aufbau des PERV-Neutralisationstests ein Virustock angelegt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass sich die Virustiter von PERV durch Adaption an humane 293-Zellen erhöhen lassen (Denner et al., 2003). Das Ausgangsvirus dieser Versuche, die PERVA/C Rekombinante, PERV-NIH/3°, wurde durch das zweimalige Passagieren von aus porzinen Lymphozyten freigesetzten Viruspartikel auf 293-Zellen erhalten (Wilson et al. 1998, 2000). Die nach weiteren Passagen gewonnenen Viren wurden als PERV 4° und 5° bezeichnet und wiesen Multimerisierungen einer 37 bp langen DNA-Sequenz im LTR-Bereich auf, die Bindungsstellen des humanen Transkriptionsfaktors NF-Y enthielt (Denner et al., 2003). In PERV-NIH/3° trat diese Sequenz einmal, in PERV 4° zweimal und in PERV 5° drei- bis fünfmal auf. Das durch eine zusätzliche Passage erhaltene PERV 6° zeigte dagegen keine weitere Verlängerung der LTR (Denner et al. 2003). Eine Verlängerung

der LTR über die Ausmaße der PERV 5°-LTR hinaus, ist möglicherweise durch die Größe des viralen Capsids, welches die RNA umschließt, eingeschränkt.

Die in dieser Diplomarbeit für die Neutralisationsversuche verwendeten Viruspartikel wiesen eine deletierte Mutante von PERV 5°, PERV $\Delta 5^\circ$, auf (Abbildung 3.3) (Denner et al., in Vorbereitung). Durch zusätzliche Passagen konnte diese in drei Fällen wieder auf die Länge der PERV 5°-LTR erhöht werden, doch infektiöse Viruspartikel waren mit der Real time PCR in den Überständen der infizierten Zellen nicht nachweisbar. Zum Teil waren die LTR-Banden in den PCR-Amplifikaten der einzelnen Viruspassagen erst einige Tage nach der Passage sichtbar. Dies zeigte, dass eine Infektion mit PERV stattgefunden hatte, die aber mit der nicht ausreichend sensitiven Real time PCR nicht nachgewiesen werden konnte.

4.2 Die Induktion neutralisierender Antikörper durch rp15E von PERV

Zur Gewinnung der mAK wurden Ratten mit rp15E von PERV immunisiert. Die Seren dieser Tiere zeigten starke Neutralisationseigenschaften, aber eine Bindung an Epitope auf der Pepsin-Membran erfolgte, anders als nach den Daten von Fiebig et al. (2003) zu erwarten war, nur im E2-Bereich. Eine hierfür mögliche Erklärung ist, dass an den E1 Bereich bindende Antikörper in den Seren 103/2 und 103/4 möglicherweise vorhanden, aber eher unterrepräsentiert waren, so dass diese erst nach längerer Belichtung der Membran detektierbar gewesen wären. Dies war aber nicht möglich, da die Lumineszenz-Reaktion im Bereich der E2-Epitope anderenfalls den gesamten Röntgenfilm überbelichtet hätte. Ein denkbarer Lösungsansatz für dieses Problem wäre ein Neutralisationstest, in welchem die Seren mit den einzelnen Peptiden E1 und E2 vorinkubiert werden. Eine Abnahme der Neutralisationsfähigkeit würde für eine spezifische Bindung an das jeweilige Peptid sprechen.

Die Immunisierung mit rp15E von PERV induzierte in allen Ratten die Bildung neutralisierender Antikörper, es scheint sich somit hierbei um ein potentes Antigen zu handeln.

4.3 Etablierung monoklonaler Antikörper gegen rp15E von PERV

Die Bindung der mAK an minore Epitope

Eine Immunisierung führt in Tieren zur Bildung von polyklonalen Seren, die Antikörper, die gegen verschiedene Epitope auf dem Antigen gerichtet sind, enthalten. Durch Mehrfachimmunisierung wird die Spezifität einiger, durch die B-Lymphozyten produzierten, Antikörper gegen ihr Epitop erhöht, es kommen aber keine weiteren Epitope hinzu (Janeway, 2002). Der E2 Bereich ist wahrscheinlich ein solches dominantes Epitop, was durch die Untersuchung der Seren 103/2 und 103/4 mittels Pepspot-Membran bestätigt wurde (Abbildung 3.9, 3.10). Dennoch ist nicht geklärt, ob die gegen E2 gerichteten Antikörper auch die Ursache der hohen Serum-Titer im ELISA sind (Abbildung 3.7), da die Konformation, in welcher das rp15E adsorbiert an der festen Phase vorliegt, unklar ist. Auch bleibt zu beachten, dass das E2 Epitop auf der Pepspot-Membran als lineares Epitop präsentiert wird, wohingegen das rp15E im ELISA auch konformelle Epitope darstellen kann. Möglicherweise ist der E2 Bereich des adsorbierten rp15E für Antikörper nur schlecht zugänglich und andere, ein minore Epitop detekierende, Antikörper verursachen die hohen Serum-Titer im ELISA. Bestätigt wird das Vorhandensein solchen Antikörper durch die in Abbildung 3.15 dargestellte Bindung der Seren 103/2 und 103/4 im Western Blot an Hybrid II, welches den E1 und E2 Bereich von PERV nicht enthält. Hybridomkulturen, die Antikörper gegen minore Epitope produzieren, könnten verstärkt durch den rp15E ELISA selektioniert worden sein, sodass die abschließend gewonnenen mAK minore Epitope binden, die von den dominanten Epitopen der Seren abweichen. Die etablierten mAK 6C10 und 3D3 hatten aus diesem Grund wahrscheinlich auch dieselben Epitope. Die Möglichkeit das es sich bei den selektionierten Zellen um Subklone einer B-Zelle handelt entfällt, da der mAK 6C10 aus der Fusion der Ratte 103/2 und der mAK 3D3 aus der Fusion der Ratte 103/4 entstand.

Für weitere Versuche zur Gewinnung von mAK sollte die Auswahl positiver Klone zusätzlich zum rp15E ELISA auch mittels Peptid-ELISA mit den synthetischen E1 und E2 Peptiden erfolgen.

Die mAK konnten mittels rp15E Säule nicht affinitätschromatographisch aufgereinigt werden

Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass an Sepharose gekoppeltes rp15E von PERV geeignet ist Antikörper aus Seren aufzureinigen. Diese Immunglobuline waren gegen die E1 und E2 Epitope auf p15E gerichtet. Eine Aufreinigung der mAK aus den Hybridomakulturüberständen war hingegen nicht möglich. Als Ursache hierfür könnte die Konformation des p15E der Säule angesehen werden, in welcher die Bereiche außerhalb der E1 und E2 Epitope nur schlecht präsentiert wurden. Unterstützt wird diese Vermutung durch Arbeiten mit rekombinanten p15E von FeLV, in welchen ebenfalls Antikörper die an p15E außerhalb des E1 und E2 Bereich binden nicht aufgereinigt werden konnten (Langhammer et al., 2005).

Neutralisation und Kreuzreaktion der mAK

Das Epitop der mAK 3D3 und 6C10, RERLERR, liegt außerhalb des Epitops, FEGWFN, das von einem neutralisierenden Ziegenserum erkannt wird (Fiebig et al. 2003). Eine PERV-Neutralisation durch die mAK schien daher unwahrscheinlich, doch auch andere Arbeiten mit Immunisierungen von Ratten mit rp15E von PERV führten zu neutralisierenden Seren, die die Sequenz RERLERR detektierten (Fiebig et al., in Vorbereitung). Interessanterweise wurden bei Immunisierungsversuchen mit rekombinantem p15E von FeLV in Ratten ähnliche Epitope wie bei den p15E PERV-Versuchen erhalten. Der von den Seren der mit p15E von FeLV immunisierten Tieren detektierte E2 Bereich wurde in E2a (MAKL**RERL**KQRRQQL) und E2b (FDSQQGW**FEGWFN**) unterteilt (Langhammer et al., 2005). Die für E2b beschriebene Sequenz ist identisch mit dem für PERV beschriebenem E2 Bereich (**FEGWFN**) (Fiebig et al., 2003). Die AS Folge des E2a Bereichs weist Homologien zu der Sequenz **RERLERR** auf, die durch die mAK 6C10 und 3D3 detektiert wurde. Die Epitopkartierungen der neutralisierenden Seren der mit p15E von FeLV (Langhammer et al., 2005) bzw. von PERV (Fiebig et al., 2003) immunisierten Tiere zeigten Epitope im E1 und E2 Bereich. Auf der Pepsot-Membran konnte für die neutralisierenden mAK 6C10 und 3D3 kein Epitop im E1 Bereich detektiert werden. Dass ein E1 Epitop für diese mAK dennoch existieren könnte, zeigten Untersuchungen an dem HIV neutralisierenden mAK 2F5, für diesen konnte auf der gp41-Pepsot-Membran nur die

E2 Sequenz ELDKWAS gefunden werden. Und auch im Peptid-ELISA war nur der E2 Bereich detektierbar. Dennoch konnte eine bindungsverstärkende Wirkung von E1 Peptiden für den mAK 2F5 nachgewiesen werden (Schmolke, 2004; Lorizante et al. 2006).

Möglicherweise wurde durch die mAK 6C10 und 3D3 ein weiterer immundominanter Bereich im rp15E von PERV, der zur Bildung neutralisierender Antikörper beiträgt, detektiert. Um dies abzuklären, müssten die Neutralisationseigenschaften der mAK 6C10 und 3D3 genauer charakterisiert werden. Dazu könnte der Neutralisationstest als Hemmversuch mit Peptiden des E1 und E2 Bereichs von PERV wiederholt werden. Eine Untergliederung der E1 und E2 Domänen in E1a und b sowie E2 a und b (Abbildung 4.1), wie sie durch Langhammer et al. (2005) vorgenommen wurde, könnte sich hierbei als sinnvoll erweisen, da das in der Arbeitsgruppe vorhandene E2 Peptid nur den E2b nicht aber den durch die mAK detektierten E2a Bereich abdeckt. Auch für den E1 Bereich wäre die Herstellung eines Peptids, E1b, das weiter C-terminal von der bisher beschriebenen E1 Sequenz GPQQLEK liegt sinnvoll. Weiterhin sollten die mAK 6C10 und 3D3 aufgrund der Homologie ihres Epitops **RERLERR** auf rp15E von PERV mit der Sequenz **RERLKQR** von FeLV auf eine Kreuzreaktion mit rp15E von FeLV im ELISA und Western Blot und eine Neutralisation von FeLV hin untersucht werden.

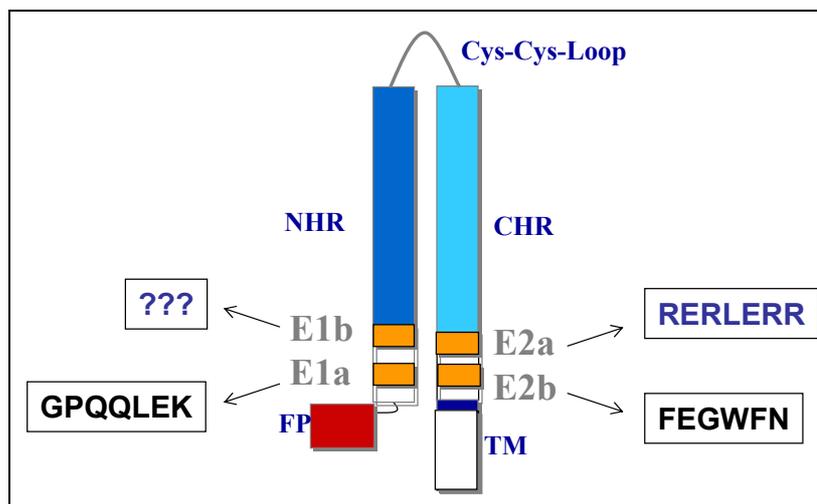


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Epitope auf p15E von PERV: Untergliederung der E1 und E2 Domäne. Die Sequenzen GPQQLEK und FEGWFN wurden von dem Serum einer mit rp15E von PERV immunisierten Ziege detektiert (Fiebig et al., 2003). Die AS Folge RERLERR wurde durch die in dieser Diplomarbeit gewonnenen mAK 6C10 und 3D3 gebunden. Ein in der N-terminalen Helixregion (NHR) liegendes E1 Epitop, konnte mit den mAK 6C10 und 3D3 nicht detektiert werden [CHR=C-terminale Helixregion; FP=Fusionspeptid; TM=Transmembrandurchgang]

4.4 *HIV neutralisierende Seren*

Nach der Immunisierung mit Hybrid II neutralisierten die Seren von zwei der vier Ratten den HIV-Laborstamm Ba-L in einer 1:80 Serumverdünnung noch deutlich (Abbildung 3.20). Die Induktion von Antikörpern die den breit neutralisierenden mAK 2F5 (Muster et al., 1993) und 4E10 (Zwick et al., 2001a) ähnlich sind, gestaltete sich bisher schwierig. Diese Untersuchungen hatten meist nur bindende Antikörper zur Folge (McGaughey et al., 2003; Huang et al., 2002). Hybrid II ist eines der wenigen Konstrukte, das in der Lage ist, neutralisierende Antikörper zu induzieren, die an den E2 Bereich von gp41 binden.

Mit dem Serum der Ratte 128/2 konnte lediglich eine Bindung an das synthetische Peptid E2 long nachgewiesen werden, die Detektion von Epitopen mittels gp41-Pepspot-Membran und Peptid-ELISA mit dem NIH-HIV-Peptidset war dagegen nicht möglich.

Der aus der Fusion der mit Hybrid II immunisierten Ratte hervorgegangene an E2 bindendene mAK 3B10 gehört der Klasse IgM an. Der Wechsel des Isotyps der durch eine B-Zelle sezernierten Antikörper erfolgt erst nach Aktivierung der B-Zellen durch T-Zellen. Für stark mit bakteriellem Material verunreinigte Antigene wurde eine T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung beschrieben (Janeway, 2002). Diese führt in den B-Zellen, ohne eine vorherige Stimulation durch T-Zellen, zur Ausschüttung von Antikörpern, jedoch nicht zum Wechsel des Isotyps. Das Antigen Hybrid II lässt sich aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nur wenig aufreinigen, so zeigt auch der Western Blot des Serums 128/2 eine Vielzahl bakterieller Banden (Abbildung 3.19). Auch in anderen Arbeiten mit Hybridkonstrukten zur Gewinnung von mAK wurden lediglich IgM selektioniert (Schnöller, 2004; Siewert, 2006). Man könnte daher im Rückschluss annehmen, dass die im Serum enthaltenen gp41 spezifischen Antikörper ebenfalls dem Isotyp M angehörten. Da Immunglobuline der Klasse M nur eine kurze Halbwertszeit besitzen (Janeway, 2002), könnte in dem für die Epitopkartierung eingesetzten Serum 128/2 die Menge der gp41 spezifischen Antikörper für die Detektion eines Epitops nicht mehr ausreichend hoch genug gewesen sein.

4.5 Monoklonale Antikörper gegen gp41 von HIV-1

Der mAK 3B10 bindet auf der gp41-Pepspot-Membran und im Peptid-ELISA an die Epitopsequenzen der neutralisierenden mAK 2F5 und 4E10 (Abbildungen 3.23, 3.24). Eine HIV-Neutralisation durch diesen Antikörper war jedoch weder mit den Hybridomkulturüberständen noch mit dem aufgereinigten mAK nachweisbar. Weitere Epitopuntersuchungen, wie beispielsweise die Reaktion des mAK 3B10 mit Kombinationen von E1 mit E2 Peptiden im ELISA wurden daher nicht durchgeführt. Allerdings hätten die Ergebnisse solcher Experimente erklären könne, warum keine Neutralisation stattfand. Da Wechselwirkungen mit Peptiden des E1 Bereichs für die breit neutralisierenden mAK 2F5 und 4E10 beschrieben wurden (Schmolke, 2004; Fiebig et al., 2005a, 2005b; Lorizante et al., 2006; Hager-Braun et al., 2006), würde die Abwesenheit solcher Wechselwirkungen eine mögliche Erklärung für die fehlende Neutralisation bieten. Weiterhin muss beachtet werden, dass der Isotyp des mAK für die Neutralisationskapazität von Wichtigkeit sein kann. In Versuchen von Kunert et al. (2004) und Wolbank et al. (2003) wurden die mAK 2F5 und 4E10 (beide IgG) in die Subklasse IgM umkloniert, dies führte zur deutlichen Abnahme der Neutralisationseffizienz bei ähnlich hohen Bindungswerten im ELISA.

Der mAK 3B10 bindet auf der gp41-Pepspot-Membran an mehrere Epitope und auch Bereiche, die nicht in der Immunisierungssequenz liegen, werden erkannt, daher scheint es sich hierbei um einen relativ unspezifischen Antikörper zu handeln.

Für weitere Versuche zur Gewinnung von mAK gegen gp41 durch die Immunisierung mit Hybridkonstrukten sollte überlegt werden, die Seren der Ratten auf die Isotypen der gp41-spezifischen Antikörper hin zu untersuchen. Dazu könnten in einem ELISA die synthetischen Peptide E1 und E2 immobilisiert werden. Der hauptsächlich vorhandene Isotyp könnte dann in den als Primärantikörper eingesetzten Seren durch subklassenspezifische Sekundärantikörper detektiert werden.

Für die Gewinnung von mAK aus Milzzellen von mit Hybridproteinen immunisierten Tieren würde es sich anbieten, für die Selektion der Klone die Antikörper im ELISA neben der Reaktion mit dem Immunisierungsprotein zusätzlich auf die Reaktion mit synthetischen Peptiden hin zu untersuchen. Besonders effektiv im Bezug auf die Etablierung HIV neutralisierenden mAK wäre die Selektion nach Neutralisationseigenschaften. Die in dieser Arbeit verwendete Messung der viralen

DNA mittels Real time PCR ist hierfür ungeeignet, da selbst der hochspezifische neutralisierende mAK 2F5 erst ab einer Konzentrationen von 5 µg/ml als neutralisierend erkannt wird. Es müssten also erst andere Methoden zur Messung der Neutralisation gesucht werden.

5 Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschungen ist das mikrobielle Risiko bei der Xenotransplantation von Schweineorganen bislang noch nicht ausgeräumt. Vor allem die Gefahr einer Transspeziesübertragung von porcinen endogenen Retroviren (PERV) auf den Menschen kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Eine Strategie, solche Übertragungen zu verhindern, besteht in der Entwicklung von Impfstoffen gegen PERV. Das rekombinant hergestellte transmembrane Hüllprotein p15E von PERV induzierte in bisherigen Untersuchungen neutralisierende Antikörper und auch in dieser Arbeit produzierten alle immunisierten Ratten neutralisierende Seren. Mittels Hybridomtechnik wurden von diesen Tieren monoklonale Antikörper gegen rp15E gewonnen. Im Western Blot reagierten drei der etablierten mAK mit rp15E und wiederum zwei dieser mAK neutralisierten nach Aufreinigung PERV. Die Epitope beider neutralisierender Antikörper waren identisch (RERLERR) und lagen N-terminal zum bisher für PERV beschriebenen Epitop nach Immunisierung mit rp15E. In Arbeiten mit rekombinanten p15E von FeLV, welches eng mit PERV verwandt ist, wurden im E2-Bereich zwei Epitope, E2a und E2b, analog zu den Epitopen der mAK 2F5 und 4E10 im gp41 von HIV, identifiziert. Die Sequenz des E2a-Epitops, **MAKLRERLKQRQQL** im p15E von FeLV weist Homologien zum Epitop **RERLERR** auf. Weitere Epitopuntersuchungen und Neutralisationsversuche sind nötig, um die möglicherweise vorhandenen Epitope im E1-Bereich zu detektieren und die neutralisierenden Eigenschaften der mAK genauer zu verifizieren.

Um einen Impfstoff gegen HIV auf der Basis neutralisierender Antikörper zu gewinnen, wurde ein Hybridkonstrukt aus p15E von PERV und den Sequenzen von gp41 von HIV, die den Epitopen der neutralisierenden gp41-spezifischen Antikörper 2F5 und 4E10 entsprachen, entwickelt. In 50 % der immunisierten Ratten wurden Seren erhalten, die HIV neutralisierten. Mit Hilfe der Hybridomtechnik wurden aus einer Ratte, die mit dem Hybridantigen immunisiert worden war, mAK gewonnen. Der mAK 3B10 reagierte im ELISA und Western Blot mit dem Hybridantigen. Dieser als IgM identifizierte mAK detektierte im Peptid-ELISA und auf der gp41-Pepspot-Membran die Epitope der mAK 2F5 und 4E10 im E2-Bereich, eine Bindung an die für diese mAK postulierten Epitope im E1-Bereich war jedoch nicht nachweisbar, was erklären könnte, dass auch eine HIV-neutralisierende Wirkung nicht nachgewiesen werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyoshi D, Denaro M, Zhu H, Greenstein J, Banerjee P, and Fishman J,
Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine
J Virol 1998, 72(5):4503-4507
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA
CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic
HIV-1
Science 1996, 272(5270):1955-8
- 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):227-33
- Barré-Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, Nugeyre M T, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C,
Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L,
Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome
(AIDS)
Science 1983, 220, 868-871
- Benit L, Dessen P, Heidmann T,
Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes
J Virol 2001, 75(23):11709-19
- Beyrer C, Artenstein AW, Rugsao S, Stephens H, VanCott TC, Robb ML, Rinkaew M, Birx DL,
Khamboonruang C, Zimmerman PA, Nelson KE, Natpratan C,
Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly
exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand.
Chiang Mai HEPS Working Group
J Infect Dis 1999, 179(1):59-67
- Breese S,
Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines
Archiv für die gesamte Virusforschung 1970, 401-404
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N,
Nara PL,
Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody
Science 1994, 266(5187):1024-7
- Coffin, J M, Hughes S H, Varmus H E,
Retroviruses 1. Edition
ed. 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cohen J,
Weakened SIV vaccine still kills
Science 1997, 278(5335):24-5
- Conley A J, Kessler J A 2nd, Boots L J, Tung J S, Arnold B A, Keller P M, Shaw A R, Emini E A,
Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-
41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody
Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91(8):3348-52
- Czauderna F, Fischer N, Boller K, Kurth R, and Tonjes R R,
Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating
on human cells
J Virol 2000, 74(9):4028-38

- Denner J, Norley S, Kurth R,
The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients
AIDS 1994, 8(8):1063-72
- Denner J, Persin C, Vogel T, Hausteil 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):442-50
- Denner J,
Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation
Ann N Y Acad Sci 1998, 862:75-86
- Denner J, Specke V, Schwendemann J, and Tacke S,
Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates
Ann Transplant 2001, 6(3):25-33
- Denner J, Specke V, Thiesen U, Karlas A, Kurth R,
Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells.
Virology 2003, 314(1):125-33
- Dubay JW, Roberts SJ, Hahn BH, Hunter E,
Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity
J Virol 1992, 66(11):6616-25
- Ericsson T A, Takeuchi Y, Templin C, Quinn G, Farhadian S F, Wood J C, Oldmixon B A, Suling K M, Ishii J K, Kitagawa Y, Miyazawa T, Salomon D R, Weiss R A, and Patience C,
Identification of receptors for pig endogenous retrovirus
Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100(11):6759-64
- Evans D T, Desrosiers R C,
Immune evasion strategies of the primate lentiviruses
Immunol Rev 2001, 183:141-58
- Feng Y, Broder C C, Kennedy P E, Berger E A,
HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor
Science 1996, 272(5263):872-7
- 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, 307:406-13
- Fiebig U, Langhammer S, Karlas A, Kurth R, Denner J,
Induction of HIV-neutralising Antibodies of the 2F5/4E10 Type
Retrovirology 2005a, 2(Suppl 1):S71
- Fiebig U, Schmolke M, Karlas A, Kurth R, Denner J,
Induction of anti-viral neutralising antibodies,
World Intellectual Property Organization; WO 2005b /021574
- Fiebig U, Hartmann M G, Bannert N, Kurth R, Denner J,
Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus
J Virol 2006, 80(11):5651-54
- Freed E O, Myers D J, Risser R,
Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41
Proc Natl Acad Sci U S A 1990, 87(12):4650-4

- Freed E O, Martin M A,
The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection
J Biol Chem 1995, 270(41):23883-6
- Gallaher W R, Ball J M, Garry R F, Griffin M C, Montelaro R C,
A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses
AIDS Res Hum Retroviruses 1989, 5(4):431-40
- Gallo R C, Salahuddin S Z, Popovic M, Shearer G M, Kaplan M, Haynes B F, Palker T J, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham P D,
Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS
Science 1984, 224:500-503
- Gallo S A, Finnegan C M, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat S S, Puri A, Durell S, Blumenthal R,
The HIV Env-mediated fusion reaction
Biochim Biophys Acta. 2003, 1614(1):36-50
- Gao F, Yue L, White A T, Pappas P G, Barchue J, Hanson A P, Greene B M, Sharp P M, Shaw G M, Hahn B H,
Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa
Nature 1992, 358(6386):495-9
- Gao F, Bailes E, Robertson D L, Chen Y, Rodenburg C M, Michael S F, Cummins LB, Arthur L O, Peeters M, Shaw G M, Sharp P M, Hahn B H,
Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*
Nature 1999, 397(6718):436-41
- Gardner M B, Rongey R W, Arnstein P, Estes J D, Sarma P, Huebner R J, Rickard C G,
Experimental transmission of feline fibrosarcoma to cats and dogs
Nature 1970, 226(5248):807-9
- Garkavenko O, Croxson M C, Irgang M, Karlas A, Denner J, Elliott R B,
Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation
JCM 2004, 42(11):5353–5356
- Graham B S, Keefer M C, McElrath M J,
Safety and immunogenicity of a candidate HIV-1 vaccine in healthy adults: recombinant glycoprotein (rgp) 120: a randomized, double-blind trial
National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group
Ann Intern Med 1996, 125:270–9
- Hager-Braun C, Katinger H, Tomer K B,
The HIV-neutralizing monoclonal antibody 4E10 recognizes N-terminal sequences on the native antigen
J Immunol 2006, 176: 7471–7481
- Hanger J J, Bromham L D, McKee J J, O'Brien T M, Robinson W F,
The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus
J Virol 2000, 74(9):4264-72
- Hanna G J,
HIV-1 genotypic and phenotypic resistance
Clin Lab Med 2002, 22(3):637-49
- Hannon J, Bossone C, Wade C,
Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research
Lab Anim Sci 1990, 40(3):293-8

Heneine W, Tibell A, Switzer W M, Sandstrom P, Rosales G V, Mathews A, Korsgren O, Chapman L E, Folks T M, Groth C G,
No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts
Lancet 1998, 352(9129):695-9

Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, Griffith R,
Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences
Biotechnology (N Y) 1992, 10(4):413-7

Huang J, Dong X, Liu Z, Qin L, Chen Y H,
A predefined epitope-specific monoclonal antibody recognizes ELDEWA-epitope just presenting on gp41 of HIV-1 O clade
Immunol Lett 2002, 84(3):205-9

Irgang M, Sauer I M, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach J C, Kurth R, Neuhaus P, Denner J,
Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells
J Clin Virol 2003, 28(2):141-54

Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M,
Immunologie
5. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, 2002

Jones P L, Korte T, Blumenthal R,
Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors
J Biol Chem 1998, 273(1):404-9

Kaul R, Rowland-Jones S L, Kimani J, Fowke K, Dong T, Kiama P, Rutherford J, Njagi E, Mwangi F, Rostron T, Onyango J, Oyugi J, MacDonald K S, Bwayo J J, Plummer FA,
New insights into HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, persistently seronegative Kenyan sex workers
Immunol Lett 2001, 79(1-2):3-13

Kijak G H, Simon V, Balfe P, Vanderhoeven J, Pampuro S E, Zala C, Ochoa C, Cahn P, Markowitz M, Salomon H,
Origin of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies emerging after antiretroviral treatment interruption in patients with therapeutic failure
J Virol 2002, 76(14):7000-9

Köhler G, Milstein C,
Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity
Nature 1975, 256:495-497

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): 755-762(8)

Laemmli U K, Beguin F, Gujer-Kellenberger G,
A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation
J Mol Biol 1970, 47(1):69-85

Langhammer S, Fiebig U, Kurth R, Denner J
Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV)
Vaccine 2005, 23:3341–3348

- Leonard C K, Spellman M W, Riddle L, Harris R J, Thomas J N, Gregory T J,
Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells
J Biol Chem 1990, 265(18):10373-82
- Levy M, Chrippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, Goldstein R, Newman J, Gonwa T, Banchereau J, Diamond L, Byrne G, Logan J, Klintmalm G,
Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers
Transplantation 2000, 69:272-280
- Loeffler, Frosch,
Berichte (I–III) der Kommission zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin
Centrbl Bakt Parasitenk 1898, 23:371–391
- Lorizate M, Gómaral M J, de la Torre B G, Andreu D, Nieva1 J L,
Membrane-transferring sequences of the HIV-1 gp41 ectodomain assemble into an immunogenic complex
J Mol Biol 2006, 360:45–55
- Marciani D J, Kensil C R, Beltz G A, Hung C H, Cronier J, Aubert A,
Genetically engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats
Vaccine 1991, 9:89–96
- McDougal J S, Maddon P J, Dalgleish A G, Clapham P R, Littman D R, Godfrey M, Maddon D E, Chess L, Weiss R A, Axel R,
The T4 glycoprotein is a cell-surface receptor for the AIDS virus
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986, 51(2):703-11
- McGaughey G B, Citron M, Danzeisen R C, Freidinger R M, Garsky V M, Hurni W M, Joyce J G, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky M J,
HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb
Biochemistry 2003, 42(11):3214-23
- Miller M D, Farnet C M, Bushman F D,
Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition
J. Virol. 1997, 71:5382-5390
- Moulard M, Phogat S K, Shu Y, Labrijn A F, Xiao X, Binley J M, Zhang M Y, Sidorov I A, Broder C C, Robinson J, Parren P W, Burton D R, Dimitrov D S,
Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes
Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99(10):6913-8
- 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, 24:17-27
- 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):6642-7
- Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H,
Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS
J Virol 1994, 68(6):4031-4

- Norley S, Beer B, Binninger-Schinzel D, Vogel T, Siegel F, Cosma C, Konig H, Megede J Z, Kurth R, Simian immunodeficiency virus live and inactivated experimental vaccines
AIDS Res Hum Retroviruses 1996, 12(5):447-9
- Oldmixon B A, Wood J C, Ericsson T A, Wilson C A, White-Scharf M E, Andersson G, Greenstein J L, Schuurman H J, Patience C,
Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine
J Virol 2002, 76(6):3045-8
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss R,
Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs
Nat Med 1997, 3(3):282-286
- Patience C.; Patton, G. S.; Takeuchi, Y.; Weiss, R. A.; McClure, M. O.; Rydberg, L. and Breimer, M.E.,
No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys
Lancet (vol. 352) 1998, No. 9129, pp. 699-701
- Patience C, Switzer W, Takeuchi Y, Griffiths D, Goward M, Heneine W, Stoye J, Weiss R,
Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species
J Virol 2001, 75(6):2771-2775.
- Pereira F B, Goni F M, Muga A, Nieva J L,
Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects
Biophys J 1997, 73(4):1977-86
- Pitisuttithum P, Nitayaporn S, Thongcharoen P,
Safety and immunogenicity of combinations of recombinant subtype E and B human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein 120 vaccines in healthy Thai adults
J Infect Dis 2003, 188:219-27
- Poiesz B J, Ruscetti F W, Reitz M S, Kalyanaraman V S, Gallo R C,
Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia
Nature 1981, 294:268-271
- Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A,
A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1
AIDS Res Hum Retroviruses 1994, 10(12):1651-8
- Rasmussen R A, Hofmann-Lehman R, Montefiori D C, Li P L, Liska V, Vlasak J, Baba T W, Schmitz J E, Kuroda M J, Robinson H L, McClure H M, Lu S, Hu S L, Rizvi T A, Ruprecht R M,
DNA prime/protein boost vaccine strategy in neonatal macaques against simian human immunodeficiency virus
J Med Primatol 2002, 31(1):40-60
- 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, Wong-Staal F,
Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III
Nature 1985, 313(6000):277-284
- Ray N, Doms RW,
HIV-1 coreceptors and their inhibitors
CTMI 2006, 303:97-120

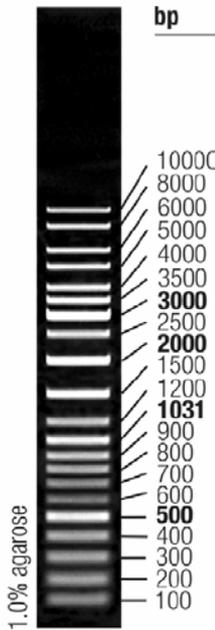
- rgp120 HIV Vaccine Study Group
Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection
J Infect Dis 2004, 191:654-65
- Robert-Guroff M, Kaur H, Patterson L J, Leno M, Conley A J, McKenna P M, Markham P D, Richardson E, Aldrich K, Arora K, Murty L, Carter L, Zolla-Pazner S, Sinangil F,
Vaccine protection against a heterologous, non-syncytium-inducing, primary human immunodeficiency virus
J Virol 1998, 72(12):10275-80
- Rose N F, Marx P A, Luckay A, Nixon D F, Moretto W J, Donahoe S M, Montefiori D, Roberts A, Buonocore, Rose J K,
An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants
Cell 2001, Vol. 106, 539-549
- Ruprecht R M, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure H M,
Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge
Vaccine 2003, 21(24):3370-3
- Samson M, Libert F, Doranz B J, Rucker J, Liesnard C, Farber C M, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth R J, Collman R G, Doms R W, Vassart G, Parmentier M,
Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene
Nature 1996, 382(6593):722
- Scanlan C N, Pantophlet R, Wormald M R, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson I A, Katinger H, Dwek R A, Rudd P M, Burton D R,
The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1->2 mannose residues on the outer face of gp120
J Virol 2002, 76(14):7306-21
- Schagger H, von Jagow G,
Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Analyt Biochem 1987, 166(2):368-79
- Schibli D J, Montelaro R C, Vogel H J,
The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles
Biochemistry 2001, 40(32):9570-8
- Schmolke M,
Wirkmechanismus und Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1
Dissertation 2004
- Schnöller C,
Induktion und Charakterisierung von Antikörpern gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV und Gammaretroviren
Diplomarbeit 2004
- Siewert K,
Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren
Diplomarbeit 2006
- Sparkes A H,
Feline leukemia virus: a review of immunity and vaccination
J Small Anim Pract 1997, 38:187-94

- Specke V, Rubant S, Denner J,
Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses
Virology 2001a, 285(2):177-180
- Specke V, Tacke S, Boller K, Schwendemann J, Denner J,
Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models
J Gen Virol 2001b, 82(4):837-44
- Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Boller K, Denner J,
Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of
transmission to minks in vivo
Arch Virol 2002a, 147(2):305-19
- Specke V, Schuurman H J, Plesker R, Coulibaly C, Ozel M, Langford G, Kurth R, Denner J,
Virus safety in xenotransplantation: First exploratory in vivo studies in small laboratory animals and
non-human primates
Transpl Immunol 2002b, 9(2-4):281-8
- 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):2019-25
- 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):274-8
- Switzer W M, Michler R E, Shanmugam V, Matthews A, Hussain A I, Wright A, Sandstrom P,
Chapman L E, Weber C, Safley S, Denny R R, Navarro A, Evans V, Norin A J, Kwiatkowski P,
Heneine W,
Lack of crossspecies transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate
recipients of porcine cells, tissues, or organs
Transplantation 2001, 71(7):959-65
- Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss R, Banerjee P, Tissier P L, Stoye J,
Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus
J Virol 1998, 72(12):9986-9991
- Thali M, Moore J P, Furman C, Charles M, Ho D D, Robinson J, Sodroski J,
Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes
exposed upon gp120-CD4 binding
J Virol 1993, 67(7):3978-88
- Tissier P L, Stoye J, Takeuchi Y, Patience C, Weiss R,
Two sets of human-tropic pig retrovirus
Nature 1997, 389:681-682
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J,
Immunoblotting in the clinical laboratory
J Clin Chem Clin Biochem 1989, 27(8):495-501
- Turner B G, Summers M F,
Structural biology of HIV
J Mol Biol 1999, 285(1):1-32
- UNAIDS
Global summary of the HIV and AIDS epidemic, 2005
www.unaids.org

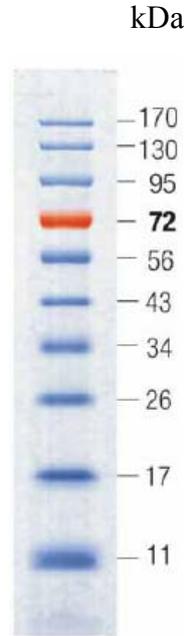
-
- Weber J,
The pathogenesis of HIV-1 infection
Br Med Bull 2001, 58:61-72
- Wei X, Decker J M, Wang S, Hui H, Kappes J C, Wu X, Salazar-Gonzalez J F, Salazar M G, Kilby J M, Saag M S, Komarova N L, Nowak M A, Hahn B H, Kwong P D, Shaw G M,
Antibody neutralization and escape by HIV-1
Nature 2003, 422(6929):307-12
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S C, Skehel J J, Wiley D C,
Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41
Nature 1997, 387(6631):426-30
- Wilson C, Wong S, Muller J, Davidson C, Rose T, Burd P,
Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells
J Virol 1998, 72(4):3082-3087
- Wilson C, Wong S, VanBrocklin M, Federspiel M,
Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus
J Virol 2000, 74(1):49-56
- Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H,
Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12
J Virol 2003, 77(7):4095-103
- Zwick M B, Wang M, Pognard P, Stiegler G, Katinger H, Burton D R, Parren P W,
Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies
J Virol 2001a, 75(24):12198-208
- Zwick M B, Labrijn A F, Wang M, Spenlehauer C, Saphire E O, Binley J M, Moore J P, Stiegler G, Katinger H, Burton D R, Parren P W,
Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41
J Virol 2001b, 75(22):10892-905

Anhang

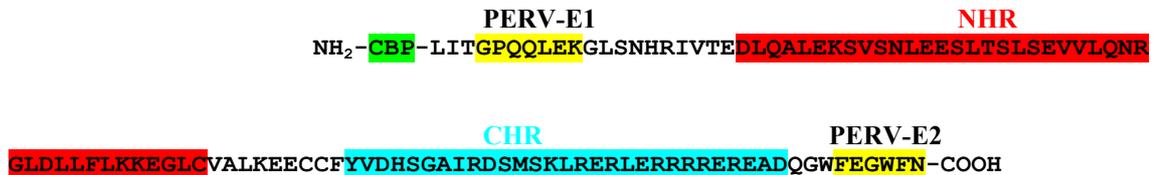
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas)



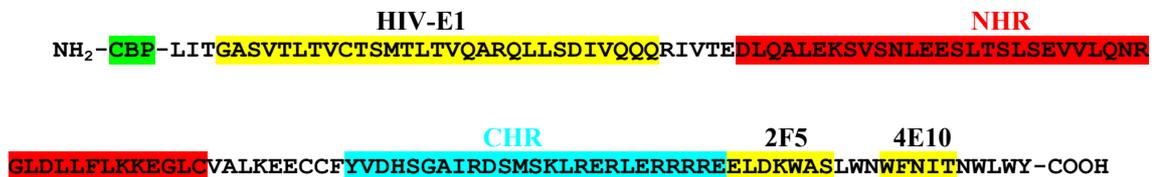
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)



rp15E



Hybrid II



Aminosäuresequenzen von rp15E von PERV und Hybrid II;

CBP = Calmodulinbindeprotein; NHR = N-terminale Helixregion; CHR = C-terminale Helixregion; PERV-E1 und PERV-E2 = von Serum einer mit rp15E immunisierten Ziege detektierte Epitope (Fiebig et al., 2003); HIV-E1 = Epitop im E1-Bereich beschrieben durch Schmolke (2004) und Fiebig et al. (2005a, b); 2F5 = Epitop des mA K 2F5; 4E10 = Epitop des mA K 4E10

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Schweder danke ich für die Übernahme der Erstkorrektur.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Uwe Fiebig für alle hilfreichen Tipps und die praktische und theoretische Betreuung im Labor.

Frau Dr. Magdalena Konczal möchte ich für die große Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit danken.

Meiner Mitstreiterin Katherina Siewert danke ich für die hilfreichen Diskussionen und die moralische, wie praktische Unterstützung im täglichen Kampf mit den kleinen und großen Laborproblemen.

Bei Frau Barbara Kropp bedanke ich mich für die Hilfe bei den Zellfusionen und die ständige Ansprechbarkeit bei Fusionsfragen.

Sandra Klein, Loan Dao Thi und der gesamten Arbeitsgruppe P13 möchte ich für die vielen praktischen Hilfestellungen und Anregungen, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und möchte mich bei allen für die zeitweilige Vernachlässigung meinerseits entschuldigen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Diplomarbeit mit dem Thema: „Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren“ selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angaben der Quelle, auch der Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Martin Kraase

Berlin, 08.10.2006