Herstellung von DNA induzierten mono-/ polyklonalen Antikörpern, zur Schnelldetektion von hochpathogenen viralen Erregern und bioterroristisch relevanten Toxinen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt von

Lars Niederstadt

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

Berlin, März 2012

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Angefertigt unter Betreuung von Dr. Oliver Hohn
April 2008 bis Dezember 2011

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 11.05.2012, 14:00, Alte Bibliothek (Pflanzenphysiologie)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **8**

1.1 Bioterrorismus **8**

1.1.1 Biologische Kriegsführung in der Geschichte: Antike bis zur Moderne 8

1.1.2 Charakteristika von bioterroristisch relevanten Pathogenen 10

1.1.3 Das BiGRUDI-Projekt: Schnelldetektion von biologischen Kampfstoffen 11

1.1.4 Detektionssysteme zur ultraschnellen Risikobewertung (im Feldeinsatz) 12

1.2 Botulismus: eine altbekannte Bedrohung mit aktueller Relevanz **14**

1.2.1 Bekannte Clostridienstämme und BoNT-Toxin Serotypen 15

1.2.2 Toxizitätsmechanismen der BoNT & klinische Symptomatik der Intoxikation 16

1.3 Filoviren **18**

1.3.1 Taxonomie der Filoviridae 18

1.3.2 Historie der filoviralen Epidemien in Europa und Afrika (1960-2008) 19

1.3.3 Morphologie der Filoviren 20

1.3.4 Das filovirale Glykoprotein 21

1.3.5 Infektion & Replikation 22

1.3.6 Pathogenese der Filoviren: Hämorrhagische Fiebererkrankungen 23

1.4 Strategien zur Entwicklung von Antikörpern gegen BT-Pathogene **24**

1.4.1 DNA-Immunisierung: *in vivo* Transfektion von Versuchstieren mit synthetischen kodierenden Sequenzen 24

1.4.2 Induktion der humoralen Immunantwort 25

1.4.3 Koapplikation von Zytokinen als stimulierende Immunmodulatoren (genetische Adjuvantien) 26

1.4.4 Induzierbare Antikörperklassen in Säugetieren 26

1.4.5 Class switch recombination: Diversifizierung des B-Zell-Pools 28

1.4.6 *In vitro* Erzeugung von immortalisierten hybriden Zelllinien (Hybridomfusion) 29

1.5 Monoklonale Antikörper: vielseitiges Werkzeug in Medizin und Wissenschaft **30**

2. Zielsetzung **31**

3. Material & Methoden **32**

3.1 Nährmedien, Geräte & Verbrauchsmittel **32**

3.1.1 Nährmedien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen 32

3.1.2 Nährmedien für die Kultivierung prokaryontischer Zellen 33

3.1.3 Laborgeräte 34

3.1.4 Chemikalien 35

3.1.5 Seren 35
3.1.6 Antibiotika 35
3.1.7 Enzyme 35
3.1.8 Präzipitationsmatrizen 36
3.1.9 Kommerzielle Antikörper 36
3.1.10 Verwendete Kits 36
3.1.11 Bakterienstämme 37
3.1.12 Primer 37

3.2 Methoden 38

3.2.1 Rekombinante DNA Technologie 38

3.2.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion 38
3.2.1.2 „*touchdown*“- Polymerase-Kettenreaktion 39
3.2.1.3 Fusion-Polymerase-Kettenreaktion 40
3.2.1.4 „Kolonien-Polymerase-Kettenreaktion“ aus bakteriellen Kolonien (*E.coli*) 41
3.2.1.5 Single- / Multimutagenese-Polymerase-Kettenreaktion 42
3.2.1.6 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion nach Sanger 44
3.2.1.7 Transformation von prokaryontischen Zellen mit Expressionsvektoren 45
3.2.1.8 „*heatshock*“-Transformation von chemokompetenten *E.coli* 45
3.2.1.9 Elektroporation von elektrokompetenten *E.coli* 45
3.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus prokaryontischen Zellen 46
3.2.1.11 Spezifische Spaltung von DNA mittels TypII- Restriktionsendonukleasen 46
3.2.1.12 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese 47
3.2.1.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese 48
3.2.1.14 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten 48
3.2.1.15 Herstellung von ballistischer Munition für die DNA- Immunisierung 49

3.2.2 Immunhistochemie 50

3.2.2.1 Denat. SDS-Gelelektrophorese & Proteinanalytik mittels *western-blotting* 50
3.2.2.2 Immunfluoreszenz-Analyse transfizierter Zellen 52
3.2.2.3 Immunpräzipitation 53
3.2.2.4 Der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) 53
3.2.2.4.1 Antigennachweis im indirekten ELISA 53
3.2.2.4.2 Antigennachweis im *capture* ELISA (*antigen trapping*) 54
3.2.2.4.3 Antigennachweis im *capture* ELISA mit Präinkubation 55
3.2.2.4.4 Quantifizierung von VLP-Produktion durch p24- *capture* ELISA 55
3.2.2.5 Präparation von Probenmaterial für die Elektronenmikroskopie 56
3.2.2.5.1 Einbettung und Kontrastierung für die Transmissionselektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten 56
3.2.2.5.2 Präparation von Zellen für die Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie 56
3.2.2.6 Korrelative Mikroskopie durch Probentransfer von cLSM zu REM 57

3.2.2.7 Affinitätsmessung durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) 57
3.2.3 Zellkultur/ Virologische Methoden 58
3.2.3.1 Kultivierung und Zellkulturerhalt für immortalisierte Zelllinien.....58
3.2.3.4 Einfrieren von eukaryontischen Zellen zur dauerhaften Lagerung.....59
3.2.3.5 Auftauen von stickstoffgelagerten Zellproben.....59
3.2.3.6 Transfektion von euk. Zellen zur Expression von plasmidkodierten Genen 59
3.2.3.7 Transfektion mittels Ca_2PO_4-Methode.....60
3.2.3.8 Chemische Lyse eukaryontischer Zellen.....60
3.2.4 Reinigung von Fusionsproteinen und Antikörpern aus Zellkulturüberständen 61
3.2.4.1 Aufreinigung und Konzentrierung von AK aus Hybridomüberständen 62
3.2.4.2 Biotinylierung von Proteinen.....62
3.2.5 Pseudotypisierung & Herstellung von *„virus like particles“* 62
3.2.5.1 Ultrazentrifugation von Kulturüberständen zur Sedimentierung von VLP 63
3.2.5.2 Infektionsversuche mit pseudotypisierten Reporterviren.....63
3.2.5.3 Antikörpervermittelte Neutralisation von Reporterviren 63
3.2.6 Immunisierungen.....64
3.2.6.1 DNA-Immunisierung durch die Gene Gun.....64
3.2.6.2 Verabreichung von Proteinantigen 64
3.2.7 Hybridomproduktion: Fusion von Spleenozyten mit Myelomzellen.....64
3.2.7.1 Extraktion von Spleenozyten nach Milzentnahme aus Versuchstieren 65
3.2.7.2 Präparation von kultivierten Myelomzellen zum Fusionseinsatz.....65
3.2.7.3 Präparation von *„feeder“*-Zellen aus Thymusgewebe.....66
3.2.7.4 Die Hybridom-Fusionsreaktion.....66
3.2.7.5 Subklonierung von Hybridomen zur Sicherstellung der Klonalität.....67
3.2.7.6 Entwöhnung generierter Hybridome von Wachstumszusätzen 67

4. Ergebnisse 68
4.1 Entwicklung von Immunisierungvektoren zur Verabreichung von nativem, nicht toxischem BoNT-A1 68
4.1.1 Inaktivierung von BoNT-A1 durch Mutation, unter Verlust der Zink Bindung 68
4.1.2 Strategien zur Steigerung der Induktion polyklonaler Antikörper in.....70
Gallus gallus: rekombinante Herstellung genetischer Zytokinadjuvantien.....70
4.1.3 Immunisierung von Legehennen mit erzeugten Immunisierungsvektoren für BoNT-A1 (Toxoid) und genetischen Adjuvantien 73
4.1.4 Vergleichende Entwicklung BoNT-spezifischer, polyklonaler IgY-Titer unter Verwendung genetischer Adjuvantien.....74
4.2 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen BoNT-A1 zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern 75
4.2.1 Immunpräzipitation von nativem BoNT-A1 Toxoid durch induzierte Mausseren 77

4.2.2 Fusion von BoNT-A1 reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome 78
4.2.3 Charakterisierung der Detektionsparameter von identifizierten monoklonalen BoNT-A1-spezifischen Antikörpern 81
4.2.3.1 Evaluation der Kombinierbarkeit generierter BoNT-Detektionsantikörper in *capture* Detektionsassays 82
4.2.3.2 Bestimmung der Nachweisgrenze des BoNT-A1-ELISA gegen Antigen in wässriger Lösung unter Verwendung generierter monoklonaler Antikörper 84
4.2.3.3 Messung der Bindungsaffinität zwischen generierten monoklonalen Antikörpern und BoNT-A1 (RYM) 86
4.2.3.4 Untersuchung der Kreuzreaktivität induzierter monoklonalen Antikörper gegen verschiedene BoNT-Iso-/ Serotypen 89
4.3 Entwicklung von Immunisierungsvektoren zur Verabreichung von nativen filoviralen Glykoproteinen 90
4.3.1 Kodonoptimierung und Synthese von kodierenden Sequenzen zur Expression von EboV-/MarV-Glykoproteinen 91
4.3.2 Analyse der Expression erzeugter Glykoprotein-Immunisierungsvektoren in eukaryontischen Zellkulturlinien 92
4.3.3 Analyse der Proteinstruktur nach Expression von Immunisierungs-konstrukten in eukaryontischer Zellkultur: SDS-PAGE/ Westernblot 93
4.3.4 Funktionsprüfung der filoviralen MarV- /EboV-Glykoproteine durch Reporterviren (VLP-Pseudotypen) 94
4.4 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen MarV-/EboV-Gp zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern 97
4.5 Entwicklung eines nativen Testsystems zur Selektion Filovirus-Gp-reaktiver Antikörper 99
4.5.1 Design von gerichtet immobilisierbarem, filoviralem Antigen 99
4.5.2 Modifikation und Klonierung von MarV-/ EboV-Gp-Fc Fusionsproteinen 99
4.5.3 Produktion und Aufr. von filoviralen Fusionsproteinen im mg-Maßstab 101
4.5.4 Etablierung und Validierung eines EboV-GP *screening* ELISA 102
4.5.5 Fusion von EboV-Gp-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome 104
4.5.6 Charakterisierung der Detektionsparameter von identifizierten monoklonalen EboV-GP-spezifischen Antikörpern 106
4.5.7 Evaluierung neutralisierender Eigenschaften generierter monoklonaler IgM 107
4.6 Generierung von Expressionsvektoren zur Herstellung von filoviralen Standards (VLP) 109

5. Diskussion **113**
5.1 Erzeugung von nicht toxischem BoNT-A1 Antigen durch synthetische Vektorkonstrukte **114**
5.2 Evaluierung von genetischen Zytokinadjuvantien zur stimulierenden Immunmodulation in *Gallus gallus* **115**
5.3 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen BoNT-A1 zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern **116**
5.3.1 Fusion von BoNT-A1-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome & Charakterisierung resultierender monoklonaler Antikörper 117
5.4 Entwicklung von Immunisierungsvektoren zur Verabreichung von nativen filoviralen Glykoproteinen **121**
5.4.1 Kodonoptimierung und Synthese von kodierenden Sequenzen zur Expression von EboV-/MarV-Glykoproteinen 122
5.4.2 Funktionsprüfung der filoviralen MarV- /EboV-Glykoproteine durch Reporterviren (VLP-Pseudotypen) 123
5.4.3 Entwicklung eines nativen Testsystems zur Selektion Filovirus-Gp-reaktiver Antikörper 123
5.4.4 Fusion von EboV-Gp-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome 124
5.5 Generierung von Expressionsvektoren zur Herstellung von filoviralen Standards (VLP) **127**
5.6 Ausblick **129**

6. Zusammenfassung **130**

7. Abkürzungsverzeichnis **133**

8. Literaturverzeichnis **135**

A. Anhang ..... **I**
A.1. Oligonukleotidprimer ..... **II**
A.2. Sequenzen ..... **V**

B. Danksagung ..... **XVI**

C. Eigenständigkeitserklärung ..... **XVII**

Curriculum Vitae ..... **XVIII**

1. Einleitung

1.1 Bioterrorismus

1.1.1 Biologische Kriegsführung in der Geschichte: Antike bis zur Moderne

Im Laufe der Geschichtsschreibung lassen sich schon früh Hinweise auf die Planung, oder Durchführung von Kriegshandlungen unter Verwendung von Krankheitserregern oder Toxinen biologischen Ursprunges finden. Historische Dokumente des Autors Gabriele De`Mussi aus dem 14. Jahrhundert dokumentieren erstmals plausibel eine frühe, effiziente Anwendung von *Yersinia pestis* als biologische Waffe. In dem lateinischen Schriftstück wird beschrieben, wie 1346 n. Chr. die mongolischen Belagerer der Hafenstadt Kaffa, auf der heutigen Krim, die Kadaver von Opfern der Beulenpest mit Katapulten über die Stadtmauern schleuderten, um Panik und die Seuche in der Bevölkerung zu verbreiten. Unter Historikern wird vermutet, dass dieser Angriff eine der Schlüsselbegebenheiten darstellt, die im Spätmittelalter zur massiven Ausbreitung der Pest in Europa geführt haben könnte (Wheelis, 2002).

Abb.1: Spätmittelalterlicher Holzschnitt mit Darstellung von Opfern des „schwarzen Todes“. Rekonstruktion eines Kunstwerkes der Toggenburg Bibel Anno 1411. Die Darstellung zeigt Opfer der Plage mit charakteristischen Symptomen darniederliegend, während das Unheil aus dem Himmel hereinbricht.

Weitere Beispiele finden sich in Schriftwechseln von 1763 n. Chr., zur Zeit des siebenjährigen Krieges in Nordamerika, in denen Angehörige des britischen Militärs

die Verwendung von Variola kontaminierten Decken aus Krankenlagern zur Infektion von amerikanischen Ureinwohnern um Fort Pitt mit Pocken berieten (O'Connell, 1991). Über die Zeit des Kalten Krieges werden zunehmend Informationen über biologische Waffenprogramme des US- und Soviet-Militärs bekannt, jedoch sind keine tatsächlichen Zwischenfälle unter Einsatz von biologischen Kampfstoffen einwandfrei dokumentiert. Die schwere Kontrollierbarkeit der Dynamik von Epidemien und die enorme moralische Verwerflichkeit der Anwendung von biologischen Massenvernichtungswaffen mögen dazu geführt haben, dass heutzutage ein allgemeiner Konsens über die Ablehnung der Entwicklung und Verwendung von biologischen Kampfstoffen besteht. Im Jahr 1972 wurde im Zuge eines multilateralen Abkommens das Verbot von biologischen Waffen beschlossen und zwischen den EU- und NATO-Staaten 1975 in Kraft gesetzt (Die Vereinten Nationen (Genfer Konvention, 1972)).

Tab.1: Chronologische Auflistung der dokumentierten Anwendungen biologischer Kampfstoffe von der Antike bis zum 21. Jahrhundert (Al-Agamy, 2011)

Epoche	Jahr	Anwender	Zielnation	Pathogen
Antike	1320-1000 v. Chr.	Israeliten/ Kanaaniter	Palästina	Pest
	430-426 v. Chr.	Sparta	Griechenland	Pest
	590 v. Chr.	Amphiktyonen	Phoker (Krissa)	Nieswurz (*Helleborus*)
	130 v. Chr.	Römer	div.	vergiftete Wasserversorgung
	400 n. Chr.	Skythen	div.	Schlangentoxin, Fäzes, Blut als Pfeilgift
Mittelalter	1300-1400 n. Chr.	Tartaren	Genueser (Kaffa)	Pest
	1710 n. Chr.	Russland	Schweden	Pest
Moderne	1754-1767 n. Chr.	Britische Armee	US-Ureinwohner	Orthopocken
	1914-1918 n. Chr.	Deutschland	div.	*Burkholderia malleus*
	1914-1918 n. Chr.	Japan	n.d.	Tularämie, Antrax, Brucellose, Botulismus
	1941 n. Chr.	Japan (okkup. China)	China	Antrax, Pest , Meningitis , Cholera
	1939-1945 n. Chr.	Deutschland	Großbritannien	Typhus, Pest
	1948 n. Chr.	Israel	Palästina	Salmonellen
21. Jahrhundert	1990-1995 n. Chr.	Aum Shinrikyo	Japan	Anthrax, Botulismus
	2001 n. Chr.	Terrorismus	USA	Anthrax

Die Gründe, die dazu geführt haben, dass biologische Waffen im Einsatz durch Wehrkräfte flächendeckend abgelehnt werden, prädestinieren diese Stoffe geradezu für den Einsatz durch den modernen Terrorismus. Entsprechendes Fachwissen vorausgesetzt, sind biologische Kampfstoffe relativ leicht herzustellen und freizusetzen. Die Berichterstattung über tatsächliche terroristische Attentate ist meist lückenhaft, da aufgrund mangelnder Diagnostik terroristische Anschläge oftmals

nicht als solche erkannt werden können. Ein entsprechendes und wenig erfolgreiches Beispiel wurde bekannt, als Mitglieder der Aum Shinrikyo Sekte zwischen 1990 und 1995 mehrfach den Versuch unternahmen, durch Aerosolbildung mit Zerstäubern US-Stützpunkte in Japan mit Botulinumtoxin anzugreifen (Arnon et al., 2001).
Seit den Anschlägen des 11. Septembers 2001 ist die Bedrohung des internationalen Terrorismus ins zentrale Interesse der Öffentlichkeit gerückt. In Folge der Anschläge kam es vermehrt zu Angriffen gegen US-Botschaften und Ministerien bei denen, mit weißem Pulver gefüllte Briefe versendet wurden, die Sporen von *Bacillus anthracis* enthielten. Aus realen Anschlägen gegen öffentliche Einrichtungen und Erkenntnisse der Vergangenheit sind einige Modellpathogene für die Anwendung als biologische Kampfstoffe identifiziert worden. Anhand dieser Agenzien sind notwendige Charakteristika für BT-Stoffe bekannt, wodurch eine Gruppierung in Risikoklassen erfolgten konnte.

1.1.2 Charakteristika von bioterroristisch relevanten Pathogenen

In Folge des 11. Septembers 2001 wurde durch das *Centre of Disease Control* der US-Regierung eine Klassifizierung von Erregern vorgenommen, um eindeutige Merkmale für die Einschätzung der Brisanz von verschiedenen BT-Kampfstoffen festzulegen (Centres-of-Disease-Control-and-Prevention, 2011, National-Institute-of-Allergy-and-Infectious-Disease, 2011). Diese Einteilung erfolgte durch Zuordnung von bekannten Pathogenen in Kategorien von A bis C.

Kategorie A:
Erreger der Klasse A sind verhältnismäßig leicht von Person zu Person zu übertragen. Bei einer hypothetischen Exposition resultieren hohe Sterberaten der betroffenen Personen, wobei die Versorgung der Patienten eine wesentliche Belastung der medizinischen Infrastruktur darstellt. Darüber hinaus ist eine spezielle Vorsorge zur Behandlung betroffener Patienten durch spezialisierte medizinische Einrichtungen erforderlich.
Bei massiver Freisetzung von Kategorie A Stoffen ist eine öffentliche Panik und ein möglicher Zusammenbruch der öffentlichen Ordnung zu erwarten.

Beispiele: Anthrax, Botulismus, Beulenpest, Pocken, Tularämie, virale hämorrhagische Fieber (MarV, EboV, Lassa-, Machupo-, Hantavirus, Rifttalfieber, Denguefieber)

Kategorie B:

Agenzien der zweiten Klasse sind, unter Einschränkungen, leicht zu verbreiten, besitzen mäßig hohe Ansteckungsraten oder geringe Sterberaten und stellen erhöhte Anforderungen an die diagnostischen Kapazitäten des jeweiligen betroffenen Gesundheitssystems.

Beispiele: Brucellose, Epsilontoxin (Clostridium perfingens), Bedrohungen der Lebensmittelsicherheit (Salmonellen, E.coli, Shigellen), Maliasmus, Melioidose, Psittakose, Q-Fieber, Rizin, Thyphus, virale Enzephalitis, Bedrohungen der Wasserversorgung (Vibro cholerae, Kryptosporidien)

Kategorie C:

Erreger der dritten Stufe sind leicht verfügbar, einfach zu kultivieren und / oder leicht freizusetzen. Sie sind in der Lage, fatale Krankheitsverläufe zu verursachen und bedürfen der Behandlung durch medizinische Einrichtungen.

Beispiele: Gelbfieber, Tuberkulose, Influenza, Tollwut, SARS, Prionenerkrankungen, Chikungunyafieber, etc.

Die Vorbereitung einer Abwehr gegen bioterroristische Angriffe, zur Aufrechterhaltung der öffentlichen Sicherheit, wurde durch mehrere Nationen als essentiell eingeschätzt. Zu diesem Zweck wurden in Deutschland Finanzmittel bereitgestellt, um eine zuverlässige, international unabhängige BT- Diagnostik ins Leben zu rufen.

1.1.3 Das BiGRUDI-Projekt: Schnelldetektion von biologischen Kampfstoffen

Im Falle einer Freisetzung von potentiell bioterrorverdächtigen Stoffen ist es notwendig, bis zur einwandfreien Bestätigung der Ungefährlichkeit von einer infektiösen oder toxischen Probe auszugehen. Herkömmliche Verfahren zur Identifikation von BT-Agenzien erfordern die Anzucht von in der Probe enthaltenen Keimen oder eine mikro-/ spektroskopische Identifikation des Agens in spezialisierten Einrichtungen. Der Transport und die Diagnostik sind bei diesem Verfahren mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Daher ist es zwingend notwendig, Nachweissysteme zu entwickeln, die eine Risikobewertung durch die Einsatzkräfte vor Ort ermöglichen.

Das im Jahr 2008 durch eine Ausschreibung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung ins Leben gerufene Verbundprojekt BiGRUDI (Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien) sollte durch die Entwicklung und

Bereitstellung solcher Systeme zum Schnellnachweis die benötigten Testverfahren gegen Bioterrorstoffe zur Verfügung stellen. Die Modellorganismen, die im Verbund zur Bearbeitung ausgewählt wurden, umfassten *B. anthracis*, *F. tularensis*, Filoviren, Orthopockenviren und die Toxine Rizin sowie Botulinumtoxin A & B. Im Zuge des Projektes wurden für die Entwicklung von spezifischen Detektionsantikörpern im Fachgebiet 18 die in der Projektskizze enthaltenen Filoviren (MarV / EboV) und das Botulinumneurotoxin A1 für die Durchführung dieser Arbeit ausgewählt.

1.1.4 Detektionssysteme zur ultraschnellen Risikobewertung (im Feldeinsatz)

Die Entwicklung von schnellen und spezifischen "vor Ort"-Detektionssystemen hat, beispielsweise im Fall der Drogenfahndung, die effiziente „vor Ort"-Einschätzung notwendiger Maßnahmen von Einsatzkräften des Zolls und der Polizei bis zum heutigen Zeitpunkt erleichtert. Die Verwendung von sogenannten *lateral flow* Systemen, im Teststreifenformat, erlaubt in diesem Zusammenhang eine unkomplizierte Anwendung durch „nicht wissenschaftlich geschultes" Personal, zu einer Bewertung der Sachlage noch am Einsatzort. Nach dem Lösen des Analyts in einer Pufferlösung und dem Auftropfen der Reagenzien auf einen Testträger erfolgt die zeitnahe Auswertung über einen Farbumschlag des Testareals.
In Anlehnung an diese Entwicklung wurden durch Vertreter der Industrie Systeme entwickelt, die eine Schnelldetektion von biologischen Risikomaterialien und Erregern ebenso einfach wie komfortabel ermöglichen sollen. Die Detektion von biologischem Material, oder Strukturantigenen auf Basis der Proteinstruktur, kann hierbei auf unterschiedliche Weise erfolgen. Im Verbund des BiGRUDI-Projektes wurden aus den vier verfügbaren Testsystemen zwei unterschiedliche Verfahren ausgewählt, um eine robuste Schnellerkennung durch antikörperbasierende Plattformen kommerziell verfügbar zu machen.

1.1.4.1 Das Abicap®-System: immunofiltrierender Durchflusstest (3D-ELISA)

Das Abicap®-System wurde durch die Senova GmbH (Jena, Deutschland) entwickelt und basiert auf dem Verfahren der 3D-Immunofiltration. Die gelöste Probe wird über eine Säulenmatrix, mit großer Oberfläche, filtriert und detektiert. Die Exposition erfolgt bei einer ca. 5 cm langen Kartusche auf einer extrapolierten Fläche der Säulenmatrix von 40 cm^2, auf der spezifische Fängerantikörper immobilisiert

werden. Die eigentliche Detektion von potentiellen BT-Agenzien erfolgt nach dem Schema eines 3D-ELISA im Durchfluss durch Gravitation.

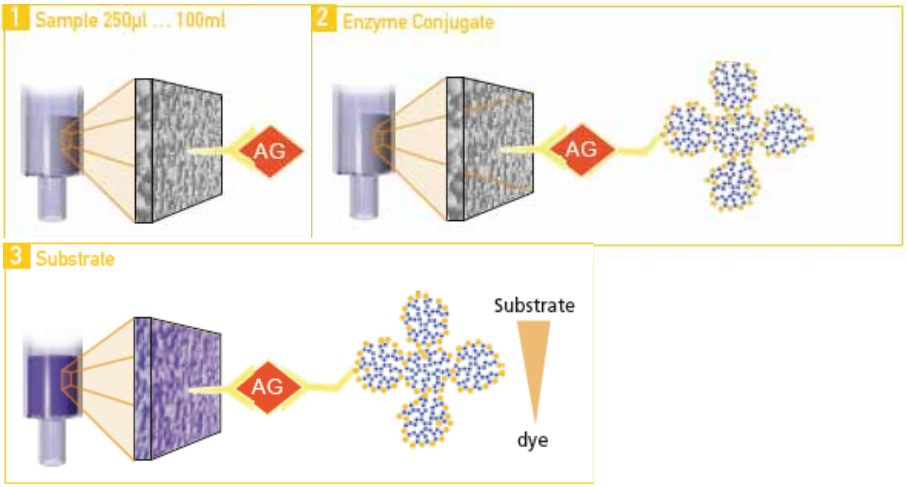


Abb.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Abicap®- Detektionssystems auf Basis einer säulengestützten Immunofiltration / 3D-ELISA (Senova-AG, 2002)

Nach der Immobilisierung des Verdachtsstoffs durch die spezifische Bindung an einen Fängerantikörper erlaubt die Anheftung eines zweiten, Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörpers die Visualisierung der Reaktion. Die Katalyse eines kolorimetrischen Substrats, durch monomere oder polymere Formen der kovalent gebundenen Meerrettichperoxidase, ermöglicht eine semiquantitative Auswertung des Ergebnisses visuell oder mittels eines Photometers. Eine Schichtung von nicht kreuzreaktiven Antikörpern unterschiedlicher Spezifität ermöglicht zusätzlich eine Multiplex-Kapazität der Anwendung. Dadurch besteht die Möglichkeit, verschiedene BT-Antigene oder Mischungen von BT-Proben aus Vollblut, Speichel, Stuhl, Urin, Tränenflüssigkeit oder heterogenen Umweltproben parallel zu detektieren (Senova-AG, 2002).

1.1.4.2 Das Approve-B®-System: fluoreszenzbasierter Biochip *(microarray dot* ELISA)

Der zweite integrale Bestandteil der Detektionsplattformen im BiGRUDI-Verbund wird durch die Firma Zenteris AG (Jena, DBR) unter dem Produktnamen Approve-B® vertrieben. Das Approve-B®-System basiert auf der Methode des Microarray Dot ELISA und ist in einem Biochip Format dimensioniert. In mehreren hundert Punkten werden Fängerantikörper auf Glaschips aufgetropft (*gespottet*), und nach Befüllung des Reaktionsraums mit potentiellem Antigen, mit Detektionsantikörper überspült. Der Detektionsantikörper trägt in der Regel ein Fluorophor als Konjugat,

um eine erfolgreiche Detektion nach dem Abziehen der Detektionlösung zu ermöglichen. Der Assay kommt hierbei ohne die Anwendung von Waschschritten aus und ermöglicht darüber hinaus eine simultane Detektion multipler Antigene. Die simultane Auswertung im Chipformat erfolgt durch das Auslesen der konzentrierten Fluoreszenz auf der Glasoberfläche des Biochips. Hierfür wurden spezielle Kartuschen entwickelt, die nach Injektion der Probe und der Auswertung in dem vorgesehenen Lesegerät eine schnelle Bewertung durch die Software in einem eindeutigen Ampelsystem ermöglichten.

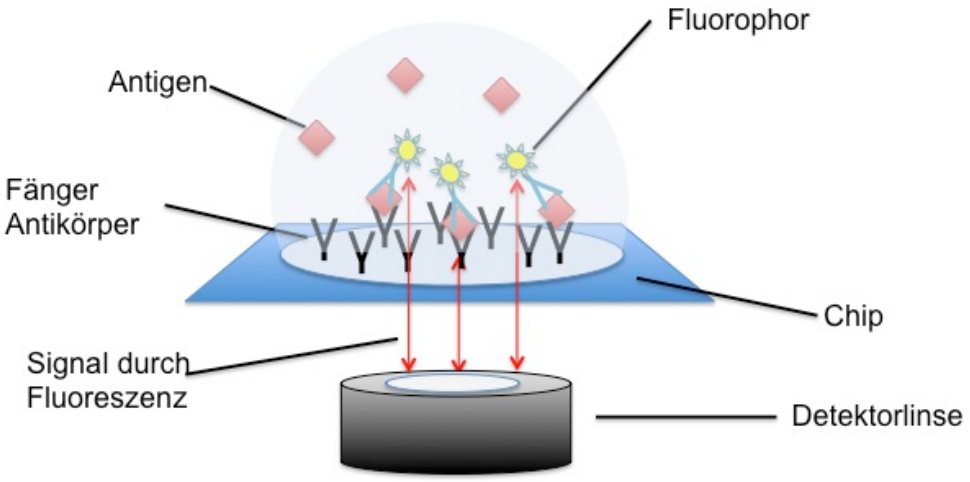


Abb.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Approve B®- Detektionssystems auf Basis eines biochip-„*OneDot*“-ELISA

1.2 Botulismus: eine altbekannte Bedrohung mit aktueller Relevanz

Das kausative Agens der klassischen Lebensmittelvergiftung, *Clostridium botulinum*, wurde erstmals 1895 isoliert und in Bezug auf die damalige Quelle, getrockneter Schinken, mit *botulus,* dem lateinischen Begriff für Wurst gekennzeichnet (Arnon et al., 2001). Die Klasse der *Clostridien* zählt zu den anaeroben, gram negativen Bazillen und ist in nahezu allen Lebensräumen verbreitet. Diese Gruppe von Bodenbakterien besitzt die Fähigkeit, Dauersporen zu bilden, die in der Lage sind, selbst äußerst lebensfeindliche Bedingungen zu überstehen. Darüber hinaus verdankt der Keim seine Berühmtheit der Eigenschaft, Botulinum Neurotoxin zu bilden, welches nach heutigem Kenntnisstand zu den giftigsten bekannten Einzelsubstanzen biologischen Ursprungs gehört (Arnon et al., 2001, World-Health-Organisation, 2002).

Diese Umstände haben in der Vergangenheit häufig dazu geführt, dass die Lagerung von erdnah kultivierten Nahrungsmitteln unter Sauerstoffausschluss ein Wachstum der Keime begünstigte und deren Konsum zu schweren Vergiftungen und Tod

führte. Durch Verbesserungen von Sterilisationsverfahren und allgemeiner Hygiene in der Lebensmittelherstellung konnte bis zum heutigen Tage ein starker Rückgang der Inzidenz von Botulismus erreicht werden. Die meisten zu verzeichnenden Fälle gehen auf privat eingekochte Lebensmittel und den Verzehr von kontaminiertem Wild und Fisch zurück (World-Health-Organisation, 2002).

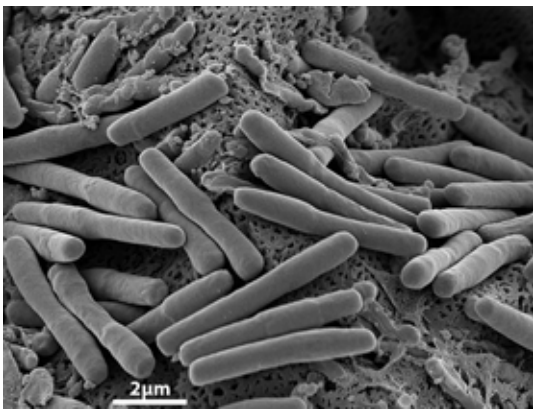


Abb.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kultur von *Clostridium botulinum*; bereitgestellt durch Lars Möller (RKI, ZBS4)

1.2.1 Bekannte Clostridienstämme und BoNT-Toxin Serotypen

Die bisher bekannten Botulinum Neurotoxine (BoNT) besitzen Ähnlichkeit mit dem, von Wundstarrkrampf bekannten Tetanus Toxin (*Clostridium tetani*) und lassen sich grob in sieben Serotypen von A bis G einteilen. Innerhalb der Toxintypen konnten darüber hinaus weitere Differenzierungen in Subtypen wie zum Beispiel A1 bis A5 klassifiziert werden (Smith et al., 2007). Die Toxine der Typen A, B, E, F und in selteneren Fällen G (*Clostridium argentinense*) sind im Menschen wirksam und können bei Ingestion oder Inhalation schwere Krankheitssymptome hervorrufen (World-Health-Organisation, 2002). Alle beschriebenen Toxine besitzen eine vergleichbare Grundstruktur, weisen jedoch ausreichende Divergenz in der Aminosäureabfolge auf, um immunologisch unterschieden werden zu können. BoNTs sind zinkabhängige Endoproteasen, deren Vorläuferprotein mit einer Masse von 150 kDa gebildet wird. Dieses beinhaltet eine schwere Kette von 100 kDa und eine leichte Kette von 50 kDa, die teils von *clostridialen*- , teils von Wirtsproteasen in die aktive Form gespalten werden können. Die Funktion der schweren Kette besteht darin, die Anheftung an spezifische Rezeptoren neuralen Gewebes zu vermitteln, und Kanalstrukturen durch die Membran von Axonen zu bilden. Somit wird eine Translokation der enzymatisch aktiven leichten Kette in die Zielzellen begünstigt.

Natürlich vorkommende Toxine sind in der Regel durch Hämagglutinin (HA) und „nicht toxische nicht HA Proteine“ (NTNHA) umhüllt und zu Komplexen hoher molekularer Masse verbunden (12s, 16s, 19s). Diese Komplexstruktur erlaubt einen hohen Grad der Stabilität des Toxins gegen Degradation, wodurch der Komplex eine Passage der Magensäure bei Ingestion in der Regel unbeschadet übersteht.

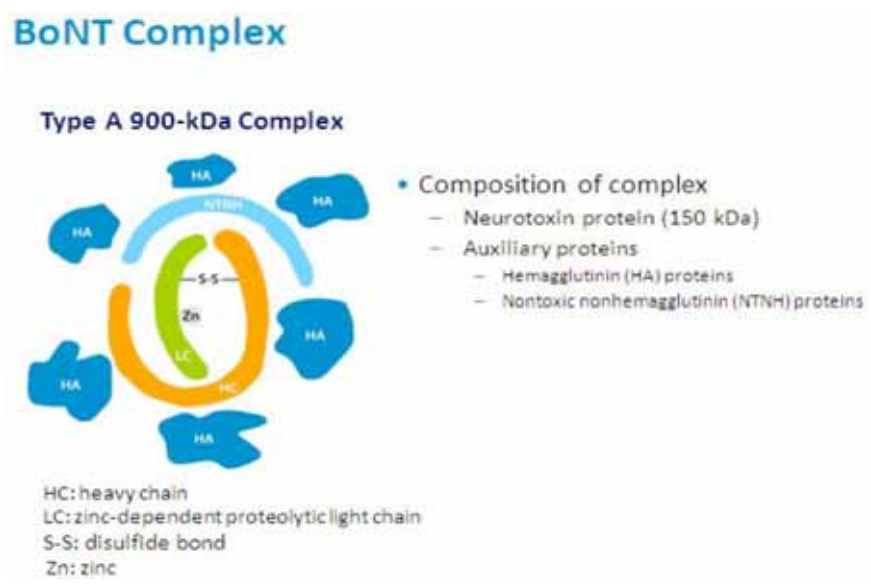


Abb.5: Schematische Abbildung des sezernierten BoNT-Komplexes anhand des BoNT-A. Das Toxin bestehend aus leichter (LC) und schwerer Kette (HC), bildet mit „nicht toxischen Hämagglutinin Proteinen (NTNHA) und Hämagglutininproteinen einen Komplex von ca. 900 kDa; LC und HC bleiben über eine Disulfidbindung verbunden; LC weist die enzymatische Funktion als Metalloprotease auf. Hierfür ist die Bindung an Zink notwendig (Monheit, 2010).

1.2.2 Toxizitätsmechanismen der BoNT & klinische Symptomatik der Intoxikation

Botulismus zählt zu den neuroparalytischen Erkrankungen mit potentiell fatalem Ausgang. Bei massiver Vergiftung treten umfassende Lähmungserscheinungen bei den betroffenen Patienten auf. 12 bis 36 Stunden nach Aufnahme des Toxins lassen sich Symptome wie Schwächeanfälle, Müdigkeit, verschwommene Sicht, Schwindelgefühl und Atemnot verzeichnen (World-Health-Organisation, 2002). Nach dem Eindringen des Toxins (leichte Kette) in das Neuron beginnt die Endoprotease des BoNT katalytisch aktiv zu werden. Die Spanne der Substrate der verschiedenen BoNT-Serotypen, aus der Familie der Syntaxine, reicht hierbei von SNARE über VAMP bis zu SNAP-25 (Arnon et al., 2001). Alle diese Proteine sind integraler Teil der zellulären Membran-/ Vesikelfusionsmaschinerie.

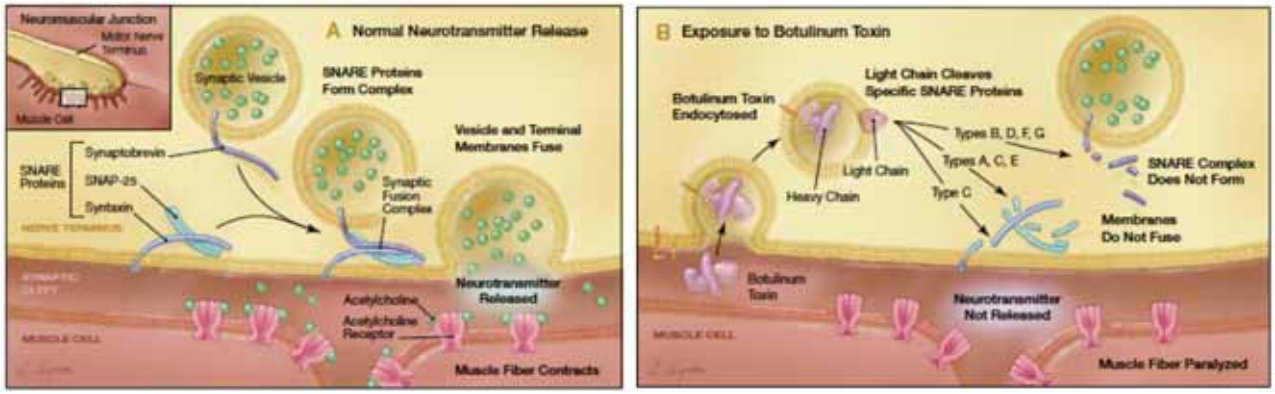


Abb.6: Schematische Darstellung der Vesikelfusion zur Freisetzung von Neurotransmittern in motoneuronalen Synapsen sowie deren Inhibition durch die katalytische Spaltung der Vesikelfusionsmaschinerie durch verschiedene BoNT- Subtypen (Arnon et al., 2001)

Daher kommt es bei effektiver Substratdegradation zu einem Verlust der Vesikelausschüttung in den betroffenen Nervenzellen. Durch diesen Umstand wird am präsynaptischen Spalt eine Ausschüttung von Neurotransmittern unterbunden und somit eine Reizübertragung unmöglich. Dies erklärt die zu beobachtenden umfangreichen Lähmungserscheinungen, die bei einer Progression der Erkrankung bis zum Atemstillstand der Patienten führen können. Die frühe Verabreichung von Antitoxin (passive Impfung mit equinem anti-BoNT-Serum) ist in den meisten Fällen ausreichend, um eine Genesung der Patienten zu erreichen. In besonders schweren Fällen ist eine künstliche Beatmung bis zum Abklingen der respiratorischen Lähmung erforderlich.

Aufgrund der enormen Toxizität (LD 50: ca. 1,3 - 2,1 ng/kg Körpergewicht) und der erforderlichen intensivmedizinischen Betreuung von Botulismuspatienten durch medizinisches Personal ist die Anwendung von BoNT als Bioterrorstoff als realistisch einzustufen (Arnon et al., 2001). Botulinumtoxin ist unter geringem Aufwand zu produzieren und auch als kruder Extrakt *clostridialer* Kulturen hoch toxisch. Die Isolierung aus Bodenproben ist aufgrund der beinahe ubiquitären Verbreitung der Sporen unkompliziert und die hohe Säurestabilität der Sporen sowie des Toxins erlauben ein Auskeimen bzw. eine Intoxikation selbst nach längeren Zeiträumen der Lagerung von kontaminierten Lebensmittelkonserven. Ein Einbringen von großen Mengen des Toxins in die Nahrungskette, beispielsweise durch Kontamination der Frischmilchproduktion, hätte dramatische Konsequenzen und macht somit zuverlässige diagnostische Werkzeuge notwendig.

1.3 Filoviren

1.3.1 Taxonomie der Filoviridae

Die Familie der Filoviren wird taxonomisch aufgrund ihrer Genomorganisation den *Mononegavirales* zugeordnet. Die einzigen bisher bekannten Vertreter der Familie umfassen das Marburg-Virus und verschiedene Stämme des Ebola-Virus. Entsprechend der Orte der ersten verzeichneten Ausbrüche, wurden das *Lake Viktoria* Marburg Virus und vier Stämme des Ebola Virus unterschieden: *Zaire, Sudan, Ivory Coast, Budibugyo* und *Reston* (Kuhn et al., 2010). Die Viren der Stämme *Lake Viktoria* MarV, EboV: *Zaire, Sudan, Ivory Coast* und *Budibugyo* treten in Menschen und Primaten als Pathogene auf und sind in der Lage sogenannte hämorrhagische Fiebererkrankungen zu verursachen. Für die Filoviren im Allgemeinen wird eine Verbreitung durch Fledermäuse und einige Flughundarten postuliert (Pourrut et al., 2005). Eine Übertragung durch Arthropoden wird darüber hinaus nicht ausgeschlossen. Das Ausbleiben von hämorrhagischen Symptomen in Fledermäusen und Nagetieren ist dokumentiert und wird durch die Integration von Filovirus-artigen Genomelementen in das Erbgut resistenter Taxa erklärt. Trotz diesem Umstand ist es möglich, Filoviren an Meerschweine oder Mäuse durch Kokultivierung in Zellkultur zu adaptieren, um Pathogenitätsmechanismen der hoch virulenten Erreger zu untersuchen (Razumov et al., 2010).

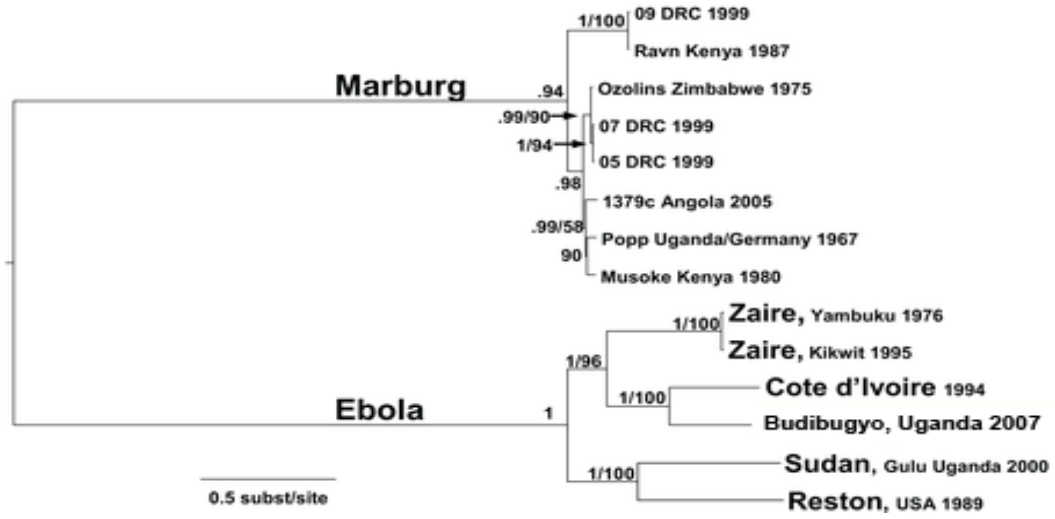


Abb.7: Phylogenie der Filoviren mit phylogenetischer Gruppierung der bislang differenzierten Stämme von MarV- und EboV-Isolaten verschiedener Ausbrüche in Zentralafrika; Charakterisierung anhand Nukleinsäuresubstitutionen im Volllängengenom (Bayesian analysis), Stand 2008 (Towner et al., 2008)

1.3.2 Historie der filoviralen Epidemien in Europa und Afrika (1960-2008)

Die erste in der westlichen Welt dokumentierte Epidemie durch eine Marburg-Virus-Infektion trat 1967 in der hessischen Stadt Marburg an der Lahn auf (Fields *Virology* 5th Edition). Drei Laboranten infizierten sich durch den Kontakt mit Organproben einer afrikanischen grünen Meerkatze mit dem Virus, was zu einer kleinen Epidemie mit 32 Infizierten und 23 Todesfällen führte. In den Jahren 1998-2000 und 2004-2005 kam es zu zwei weiteren großen Epidemien in der Demokratischen Republik Kongo und Angola mit Mortalitätsraten von bis zu 90% (Fields, WHO, 2002). Der jüngste tragische Fall im Sommer 2008 betonte im Besonderen die Risiken der Verbreitung von Infektionskrankheiten durch den internationalen Tourismus, als eine holländische Touristin sich bei der Besichtigung einer Fledermaushöhle mit dem Marburg-Virus infizierte und nach Ihrer Rückkehr in die Niederlande der Krankheit erlag (WHO, 2002).
Im Falle von EboV traten die ersten bekannten Ausbrüche 1976 simultan im Sudan (EboV-S) und der Demokratischen Republik Kongo auf (EboV-Z). Die Ausbrüche hatten weitreichende Folgen und forderten die Leben von bis zu 88% der Zaire EboV infizierten Bevölkerung (Fields). Seit diesem massiven Auftreten konnten zwischen 1995 und 2008 immer wieder Epidemien im Kongo, in Gabun und Uganda beobachtet werden. Die Ausbrüche von *Zaire* EboV 1995 und *Sudan* EboV im Jahr 2000 überstiegen in ihrer Schwere hierbei noch die der anfänglichen Epidemien.

Die hohe dokumentierte Ansteckungsrate bei bisherigen Ausbrüchen mit einem hohen Maß an letalen Krankheitsverläufen, die abschreckende Symptomatik sowie eine relativ leichte Freisetzung und Verbreitung durch Kontakt-, Tröpfchen- und Schmierinfektion sprechen für die Eignung der Filoviren als BT-Kampfstoff. In dem hypothetischen Fall der Freisetzung in der Bevölkerung, beispielsweise im öffentlichen Nahverkehr, ist durch die kurze Inkubationszeit und die hohe Transferierbarkeit der Krankheit eine kurzfristige Eindämmung als schwierig einzustufen. Es ist bekannt, dass die Aum Shinrikyo den Versuch unternommen haben Filoviren freizusetzen, jedoch nicht in der Lage waren, waffenfähige Isolate in ihren Besitz zu bringen (Bray, 2003).

1.3.3 Morphologie der Filoviren

Die Partikel von Filoviren sind membranumhüllt, mit einem Durchmesser von 80 nm und einer Länge von bis zu 14 μm. Die Viren besitzen eine charakteristische filamentöse Struktur, die morphologisch stark jener der Rhabdoviren ähnelt, obwohl diese nicht annähernd die Länge der Filoviren erreichen. Das einzelsträngige, negativ orientierte RNA-Genom umfasst 19 Kilobasen und kodiert in sieben teils überlappenden Leserastern die Strukturproteine Np, Vp35, Vp40, Gp, Vp40, Vp24 und L.

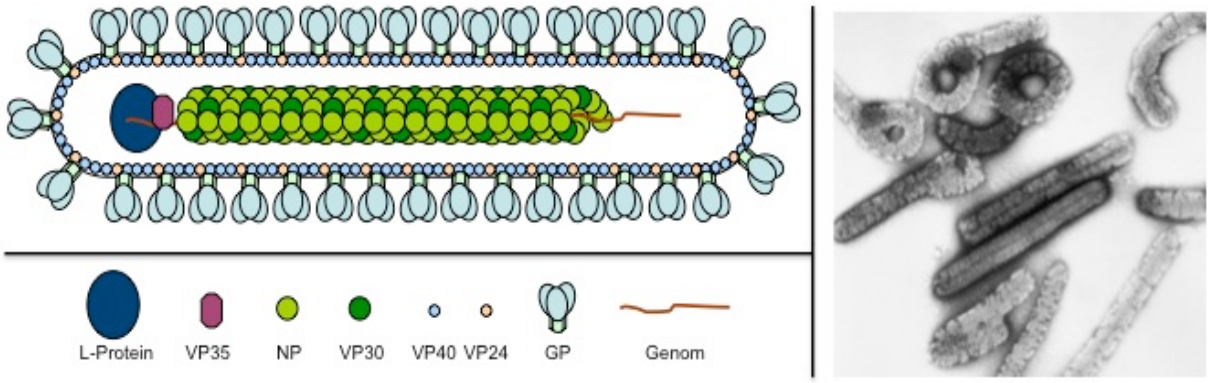


Abb.8: Schematische Darstellung eines filoviralen Partikels unter Berücksichtigung der Zusammensetzung an strukturellen Proteinen (links). Transmissionselektronen-mikroskopische Aufnahme filoviraler Partikel nach Knospung aus Vero E6 -Zellen in negativer Kontrastierung. Gereinigt über Sukrose Gradient. Vergrößerung ca. 100000x (rechts) (Palmer and Regnery, 1981)

Im Partikel setzt sich das virale Nukleokapsid aus den genomassoziierten Proteinen Np, Vp30, Vp35 und L zusammen. Die verbleibenden Hauptstrukturproteine VP40 und Gp, in Kombination mit der viralen Hüllmembran, bilden den viralen „*envelope*“. Obwohl Filoviren enorme Längendimensionen erreichen können, wurde eine optimale Infektiösität bei Partikelgrößen von 860-1200nm bestimmt. Zusätzlich zu diesen filamentösen Formen existiert ebenfalls eine sphärischen Morphologie des Virus, die jedoch aller Vermutung nach kein virales Genom enthält (Geisbert and Jahrling, 1995). Für die Entstehung solcher virusartigen Partikel (VLP) ist die Expression von Vp40 in Partikel-produzierenden Zellen bereits ausreichend (Liu et al., 2010, Johnson et al., 2006).

1.3.4 Das filovirale Glykoprotein

Das filovirale Glykoprotein ist das Protein, über welches das Eindringen des Virus in die Wirtszelle gesteuert wird. MarV Gp umfasst 681 Aminosäuren und wird durch einen einzelnen ORF kodiert. Im Falle von EboV Gp trennt sich die kodierende Information in zwei überlappende Leseraster auf. In 70% der Transkriptionsvorgänge findet das erste Leseraster Verwendung, wodurch eine trunkierte und soluble Form, das sGp, gebildet wird, welches sich strukturell stark von dem Volllängen Glykoprotein unterscheidet. (Volchkova et al., 1998) (Mehedi et al., 2011). Das sGp gilt als Nichtstrukturprotein mit bisher nicht bekannter Funktion. Zur Produktion des vollständigen Gp findet in 30% der Transkriptionen eine Leserasterverschiebung durch die virale RNA-Polymerase in +1 Richtung statt, wodurch das sogenannte Gp0 (unprozessiert) in Volllänge gebildet werden kann. Die Verschiebung wird durch eine sogenannte *slippery site* aus sieben aufeinanderfolgenden Uridinen begünstigt, die „Kopierfehler“ durch das transkribierende Enzym provoziert (Volchkova et al., 2011). Das Glykoprotein der Filoviren besitzt ein Signalpeptid zur Lokalisation ins ER und einen Membrananker im C-terminalen Bereich des Proteins. Im Zuge der Reifung des Proteins erfolgt eine Spaltung des Vorläufers Gp0 in die Derivate Gp1 und Gp2, die über Schwefelbrückenbindungen verbunden bleiben und so zu ihrer finalen membranständigen Peplomerstruktur reifen. Es ist bekannt, dass diese proteolytische Spaltung nicht essentiell für die Fusogenität des Gp ist (Volchkov et al., 1998, Neumann et al., 2007). Im Zentrum des Gp- Proteins befindet sich die sogenannte mucinartige Region. Dieser Abschnitt weist einen hohen Grad an N- und O-Glykosylierungen auf, die zu einer starken Zunahme der Proteinmasse im gereiften Protein führen. Der starke Grad der Verzuckerung steht im Verdacht, ähnlich dem gp120 bei HIV, als Glykanschild zu dienen (Raska et al., 2010). Diese Art der immunologischen Maskierung verhindert durch die geringe Immunogenität von Kohlenhydraten die Erkennung von „verwundbaren“ Epitopen des Proteins durch das Immunsystem (Lee and Saphire, 2009a).

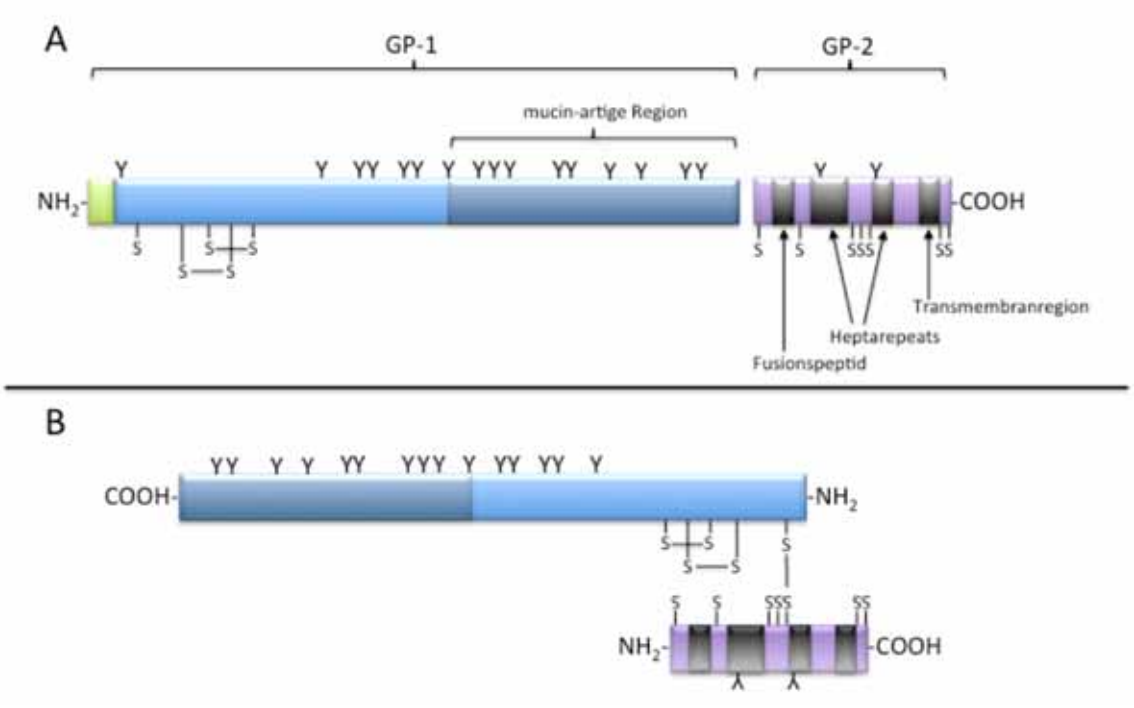


Abb.9: Schematische Darstellung vom Aufbau des filoviralen Glykoproteins (EboV) vor (A) Spaltung und Prozessierung des Gp0-Vorläuferproteins. Abgebildet in Grün ist das Signalpeptid am N-Terminus; die Darstellung in Blau zeigt Bereiche mit Zugehörigkeit zur Gp1-Untereinheit (Dunkelblau = mucinartige Region); in Violett abgebildet: Gp2 mit Heptarepeatregionen. Zusätzlich gekennzeichnet: N/O-Glykosylierungsstellen (Y) und Schwefelbrückenbindungen (S) zur intramolekularen Strukturgebung. Abbildung B kennzeichnet die Interaktion von Gp1 und Gp2 zur heterodimeren Konformation, die in trimerer Form den Gp-Komplex bildet. (Frei nach Fields Virology 5th Edition, 2006)

1.3.5 Infektion & Replikation

Filoviren besitzen innerhalb ihres Wirtsspektrums einen breit gefächerten Zelltropismus. Der spezifische Weg der Anheftung und Penetration von Zielzellen durch das Glykoprotein ist nicht vollständig geklärt, jedoch stehen die Gruppe der β1-Intergrine (Takada et al., 2000), der Folat-Rezeptor (Chan et al., 2001), verschiedene Arten von C-Typ-Lektinen und Rezeptor-Thyrosinkinasen im Verdacht, als zelluläre Rezeptoren für den Eintritt von Filoviren zu dienen (Matsuno et al., 2010). Nach Anheftung des Partikels wird eine Aufnahme in die Zelle durch Endozytose in Clathrin-beschichtete Vesikel eingeleitet. Nach Ansäuerung des Vesikels erfolgt eine gerichtete Degradation des Glykoproteins durch Kathepsine zur Freilegung des Fusionspeptids. Diese so verkürzte Form des Gp besitzt fusogene Eigenschaften, wodurch ein Übertritt des viralen Kapsids in das Zytoplasma der

Wirtszelle möglich wird. Die genomassoziierten Proteine L und Vp35 werden als Polymerase-Komplex-Proteine bezeichnet. Das *large* Protein L besitzt RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität, bei der Vp35 als Polymereasekofaktor fungiert. Die ersten viralen Translationsprodukte sind 7 bis 18 Stunden nach Freisetzung des eingebrachten Genoms detektierbar. Zur Vollendung des kompletten Replikationszyklus werden durchschnittlich 24 Stunden benötigt (Sanchez and Kiley, 1987).

1.3.6 Pathogenese der Filoviren: Hämorrhagische Fiebererkrankungen

Die Symptomatik einer klassischen Infektion mit Filoviren unterscheidet sich nicht bei MarV und EboV. Nach einer Latenzzeit von 2 bis 21 Tagen treten in den betroffenen Patienten grippeartige Symptome mit Fieber, Kopfschmerzen und Muskelschmerzen auf. Im Verlauf der Progression kommt es zur Einbeziehung multipler Organsysteme, wodurch Übelkeit, Erbrechen, Unterleibsschmerzen, Durchfall, Schwindelgefühle, Kurzatmigkeit, Kreislaufschwäche und Infarkte bis zum Einsetzen eines Komas auftreten können. Im finalen Stadium kommt es aufgrund des Verlustes von großen Teilen des Endothels zu schwerwiegenden Hämorrhagien, die zu einer dramatischen Abnahme des zirkulierenden Plasmavolumens führen. Diese sogenannte Hypovolämie führt in Woche 2 nach dem Auftreten der ersten Symptome in der Regel zu einem Schockzustand mit tödlichem Multiorganversagen (Bente et al., 2009). Für die als BSL4 klassifizierten Filoviren steht derzeit keine zugelassene Prophylaxe oder Therapie zur Verfügung. In Einzelfällen wurden experimentelle VLP-Impfstoffe, die in Säugetieren erfolgreiche Resultate lieferten, eingesetzt, um einen Ausbruch der Krankheit nach Exposition mit Virus zu verhindern. (Warfield and Aman, 2011b, Warfield et al., 2007b, hei/Dpa, 2009)

Durch die meist fatalen Auswirkungen und mangelnde therapeutische Mittel gegen BT-Agenzien besteht eine unzureichende Verfügbarkeit von antikörperbasierenden Nachweisverfahren. Mit modernen rekombinanten immunologischen Systemen, wie der DNA-Immunisierung, sind mittlerweile Werkzeuge verfügbar, um diese Missstände auszuräumen.

1.4 Strategien zur Entwicklung von Antikörpern gegen BT-Pathogene

1.4.1 DNA-Immunisierung: *in vivo* Transfektion von Versuchstieren mit synthetischen kodierenden Sequenzen

Die Verabreichung von einzelnen, hochreinen Antigenen zur Immunisierung von Versuchstieren gestaltet sich in der Praxis meist schwierig. Durch die Aufreinigung und Präparation des Antigens besteht die Gefahr, denaturierte Proteine zu verabreichen oder Peptidmixturen zu applizieren, die bakterielle Proteine oder ungewünschte Stellstoffe enthalten. Die Immunisierung durch kodierende Nukleinsäuren (DNA-Immunisierung) bietet sich als komfortable Möglichkeit an, um solche experimentellen Schwierigkeiten zu umgehen. Als Weiterentwicklung der DNA-Injektion wurde die ursprüngliche Methode der ballistischen Transfektion 1987 durch Wolf, Allen, Sanford und Klein zur Herstellung von transgenen Pflanzen, mittels einer stationären Apparatur entwickelt und bis zum heutigen Tage konsequent weiter verbessert (Sanford et al., 1987). Der Austausch der Edelmetallträgermaterialien für Nukleinsäuren (Wolfram gegen Gold) und die Verwendung von modernen Magnetventilsystemen haben zur Entwicklung der heutigen Gene Gun geführt. Mit diesem tragbaren System ist es möglich, die Methode der DNA-Immunisierung, im Vergleich zur Methode der Injektion von Nukleinsäuren in wässriger Lösung, effizienter an höheren Wirbeltieren einzusetzen, um Immunreaktionen zu induzieren.

Hierbei werden mittels Gasdruck mit Expressionsplasmiden beschichtete Goldpartikel in die oberen Schichten der Epidermis eingebracht, welche durchdrungene Zellen in ihrer Flugbahn mit dem gewünschten Erbgut transfizieren. Unter Kontrolle eines meist starken konstitutiven Promoters werden antigen-kodierende Gene abgelesen und translatiert. In Säugerzellen tragen die gebildeten Proteine alle posttranslationalen Modifikationen, die beispielsweise bei viralen Antigenen im Verlauf einer natürlichen Infektion vorgenommen werden würden. Daher besitzen diese Antigene eine zum Wildtyp analoge Konformation. Je nach Beschaffenheit werden die Immunogene entweder durch die transfizierten Zellen sezerniert oder durch Apoptose transfizierter Zellen freigesetzt (Barry et al., 1994). Bei der Transfektion von Langerhans`schen Zellen in der Epidermis ist dieser Effekt um ein Mehrfaches verstärkt, da diese als spezialisierte Antigen-präsentierenden Zellen einen potenteren Einfluss auf die Immunstimulation haben (Akbari et al.,

1999). Somit ist die DNA-Immunisierung in der Lage, sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort in Versuchstieren zu aktivieren (Donnelly et al., 1997).

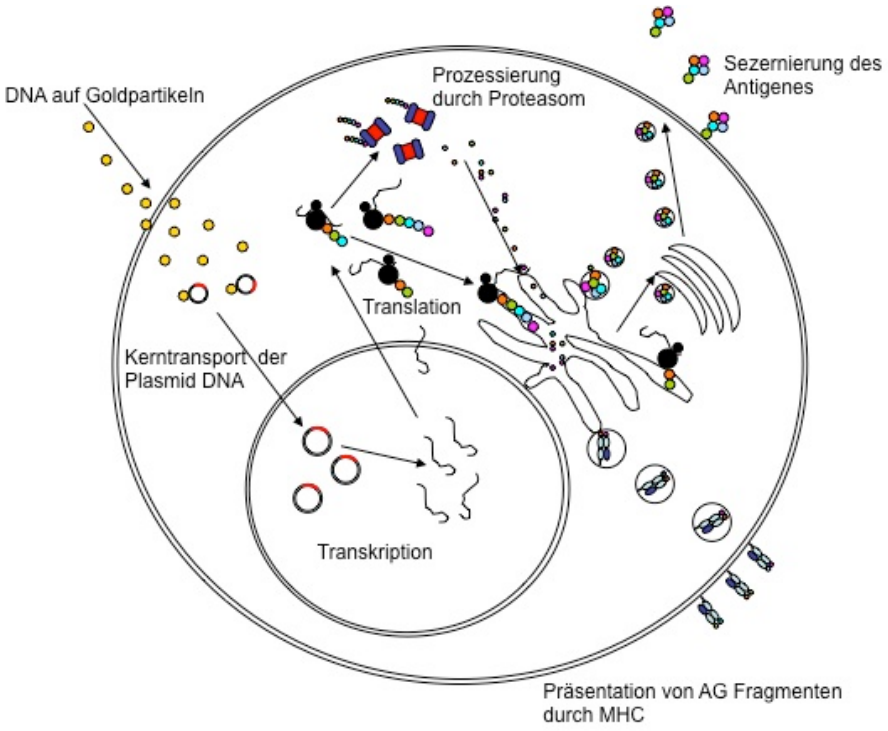


Abb.10: Schematische Darstellung der DNA-Immunisierung auf zellulärer Ebene. DNA-beschichtete Goldpartikel dringen mittels Gasdruck in die Zelle ein. Enthaltene Gene der frei werdenden Vektor-DNA werden im Nukleus exprimiert. Die resultierenden Proteine gelangen auf dem sekretorischen Stoffwechselweg in den extrazellulären Raum oder werden nach Degradation durch das Proteasom als Peptide auf MHC-Rezeptoren präsentiert. Frei nach (Bolhassani and Yazdi, 2009)

1.4.2 Induktion der humoralen Immunantwort

Bei einer Verfügbarkeit des Antigens im lymphatischen System und Serum des Versuchstieres kann es zur Induktion der humoralen Immunantwort kommen. Naive B-Zellen werden hierbei direkt durch das soluble Antigen, oder in sekundären lymphatischen Organen durch den Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen wie DC, FDC oder Makrophagen aktiviert (Batista and Harwood, 2009).

Nach Aktivierung über den spezifischen B-Zell-Rezeptor proliferieren die Zellen stark in einem Primärfokus, woraus Plasmazellen hervorgehen, die große Mengen des solublen B-Zell-Rezeptors als Immunglobulin ausscheiden. In Folge dieser Prozesse bilden sich in primären Lymphfollikeln Keimzentren, in denen die aktivierten B-Zellen durch Affinitätsreifung und somatische Hypermutation eine Verbesserung der Antigenbindung der sezernierten Antikörper erreichen können (Allen et al., 2007, Brachtel et al., 1996).

1.4.3 Koapplikation von Zytokinen als stimulierende Immunmodulatoren (genetische Adjuvantien)

Einen weiteren wichtigen Anteil der angeborenen Immunität stellt die endokrine oder parakrine Signalübertragung von aktivierten Leukozyten durch Zytokine dar. Im Mausmodell werden Zytokine wie GM-CSF seit Längerem erfolgreich zur zusätzlichen Stimulation der DNA-induzierten Immunantwort eingesetzt (Li et al., 2011). Da bei Verabreichung von DNA-Antigenen keine konventionellen Adjuvantien wie Freund's unvollständiges bzw. komplettes Adjuvant oder bakterielles LPS eingesetzt werden, empfiehlt sich die Koapplikation von genetischen Immunmodulatoren. Ein gezielter Einsatz von Zytokinen wie IL-6 ermöglicht hierbei die unterstützende Proliferation von Leukozyten und stellt ein wirkungsvolles Werkzeug zur Steigerung induzierter Antikörpertiter dar (Svanborg et al., 1999, Larsson et al., 1999). Bei Verwendung in Hühnern ist zu beachten, dass im aviären Immunsystem zu bekannten Säugetierproteinen analoge Zytokine im Vergleich zu Säugetieren abweichende Effektorfunktionen besitzen können (Wang et al., 2003, Wu et al., 2007, Wu et al., 2008).

1.4.4 Induzierbare Antikörperklassen in Säugetieren

In einem Zeitraum von 2 bis 3 Wochen, nach dem primären Kontakt des Immunsystems mit einem Antigen, wird in der Regel der höchste Titer an initialem Antikörper des Isotyps IgM verzeichnet. Diese pentamere Immunglobulinklasse ist die erste Reaktion der humoralen Antwort, deren Spezifität gegen das eingebrachte Antigen im Verlauf der Differenzierung der Leukozyten weiter verfeinert wird. Im Zuge der Reifung von aktivierten B-Zellen finden Prozesse der somatischen Hypermutation und ein Klassenwechsel (*CSR, class switch recombination*) der antikörperproduzierenden Zellen statt, wodurch in der Regel eine starke Verbesserung der Antigenbindung erreicht wird. Durch die sogenannte *class switch recombination* werden zusätzlich die initialen IgM-Isotypen in andere Subklassen wie IgA_1, IgA_2, IgD, IgE sowie IgG_1, IgG_2, IgG_3 und IgG_4 überführt. Schon nach der dritten Woche lässt sich eine Abnahme des IgM-Titers unter der gleichzeitigen Zunahme von IgG beobachten (Berek and Milstein, 1987, Cumano and Rajewsky, 1986). Die verschiedenen Isotypen unterscheiden sich teils stark in ihrer Morphologie und charakteristischen Funktion.

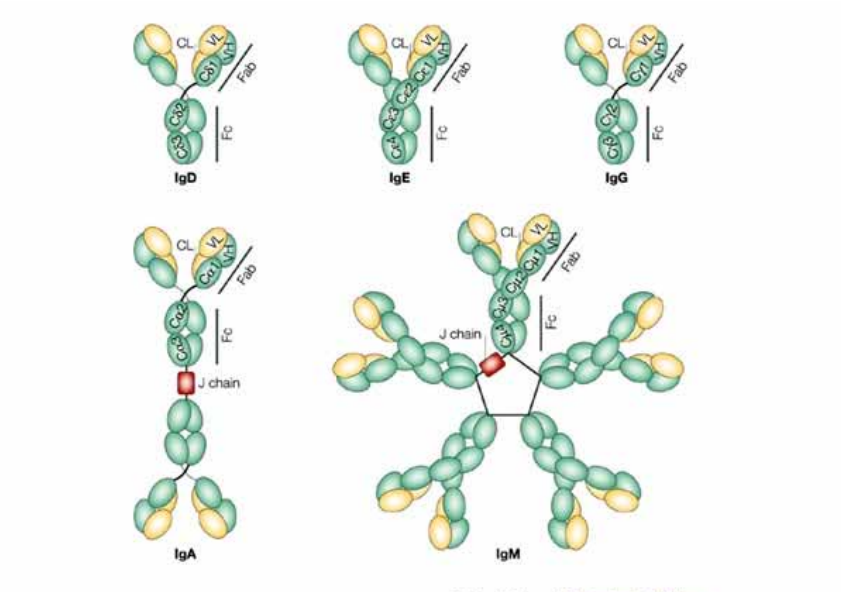


Abb.11: Schematische Darstellung der Struktur verschiedener Immunglobulinklassen (Säugetiere); Darstellung von schweren Ketten in Grün und leichten Proteinketten in Gelb; bei Verbindung zu multimeren Einheiten (IgA; IgM) sind J-Ketten rot gekennzeichnet. (Rojas and Apodaca, 2002)

Immunglobuline des Typs IgG werden erst spät nach dem Antigenkontakt gebildet und lassen sich noch lange nach der Eliminierung des Immunogens im Serum nachweisen. Als Monomere sind sie in der Lage, beispielsweise die plazentale Barriere durch selektive Transportmechanismen zu überwinden, und weisen aufgrund der Affinitätsreifung eine hochspezifische Bindeaffinität zum Antigen auf. Aufgrund der meist hohen Bindungsaffinität und einer geringen Masse werden IgG-Antikörper gerne für immunhistochemische Nachweisverfahren eingesetzt.

Tab.2: Auflistung der Immunglobulinklassen nach Serumanteil, Masse und bekannter Funktion bei Säugern (Murphy et al., 2009)

Antikörper Isotyp	Serumanteil	Masse	Funktion
IgG	70-75%	146 kDa	Hauptserum Ig
IgM	10%	970 kDa	B-Zell Rezeptor; erste Antwort
IgA	10-15%	385 kDa	mukosale Abwehr etc.
IgD	>1%	180 kDa	Unbekannt
IgE	Spuren	190 kDa	Abw. helminthischer Parasiten

1.4.5 Class switch recombination: Diversifizierung des B-Zell-Pools

Ein Wechsel der Isotypen-Klasse erfolgt durch einen nicht homologen Prozess der somatischen Rekombination in der vDJ-Region der kodierenden Region der konstanten schweren Kette der Gene des Immunglobulins. Wie heute bekannt ist, sind die Rekombination sowie die somatische Hypermutation von einem Schlüsselenzym, der aktivierungsinduzierten Cytidindeaminase (AID), abhängig (Muramatsu et al., 2000). Bei differenzierenden B-Zellen ist dieses Enzym hoch exprimiert, inaktiviert sich jedoch im Zuge der somatischen Hypermutation durch den Einbau von vorzeitigen Stopkodons in den kodierenden Bereichen des B-Zell-Genoms. Bei stabilen, gereiften Plasmazellen ist das Enzym nicht oder gering exprimiert, was die Wahrscheinlichkeit eines spontanen Klassenwechsels reduziert. Wie gezeigt werden konnte, ist dieser Prozess durch die transiente Expression von AID revertierbar, wodurch auch statische Antikörperproduzenten zur Überführung in einen abweichenden Isotyp gezwungen werden können (Iglesias-Ussel et al., 2006).

1.4.5.1 Phylogenetische Unterschiede im aviären Immunsystem

Aufgrund der großen phylogenetischen Distanz zwischen Säugetieren und Vögeln lassen sich einige Unterschiede in der Evolution der Immunsysteme verschiedener Taxa aufzeigen. 1969 beschrieben Leslie et al. eine Immunglobulinklasse in Hühnern, die analoge Eigenschaften zum säugetierspezifischen IgG aufweist, jedoch ausschließlich in Vögeln, Reptilien und Amphibien auftritt: das IgY. IgY, benannt nach *yolk*, dem englischen Wort für Eidotter, besitzt gegenüber dem Säuger IgG verlängerte schwere Ketten, wodurch ein Molekül mit ca. 180 kDa entsteht. Wie die Namensgebung schon impliziert, besteht die Besonderheit des IgY darin, dass der Antikörper, über die Verfügbarkeit im Serum hinaus, in den Dotter der produzierten Eier transportiert wird und dort in hohen Konzentrationen vorliegt (Warr et al., 1995). Dieser Umstand erlaubt eine für die Versuchstiere nicht invasive Entnahme und Präparation der induzierten polyklonalen Antikörper aus dem Gelege von Legehennen der Art *Gallus gallus.* Die großen Mengen an unter geringem Aufwand zu isolierenden Antikörpern machen die Methode der IgY-Technologie zu einem vielversprechenden Werkzeug für moderne maßgeschneiderte Immunisierungsverfahren im industriellen und medizinischen Umfeld (Schade et al., 2005).

1.4.6 *In vitro* Erzeugung von immortalisierten hybriden Zelllinien (Hybridomfusion)

Hochaffine und spezifische Antikörper sind in der modernen Molekularbiologie, durch die umfangreiche Anwendung in Immunoassays, aus dem Labor heutzutage nicht mehr wegzudenken. Veränderungen in der Qualität und Spezifität zwischen unterschiedlichen Antikörperchargen sind in der Lage, die Reproduzierbarkeit von Experimenten stark zu beeinflussen. Daher ist eine hohe Konstanz der Eigenschaften von Antikörpern wünschenswert und notwendig. Im Jahre 1975 wurde durch Milstein und Köhler eine Methode entwickelt, um die Eigenschaften von Antikörpern durch die *in vitro* Produktion von monoklonalen Antikörper-produzenten zu konservieren: die Hybridoma Technologie.

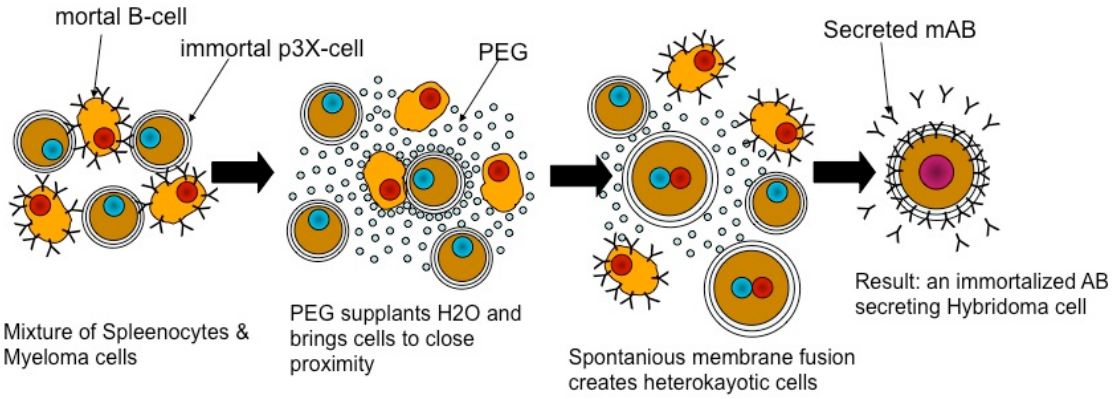


Abb.12: Schematische Darstellung der Fusion von Spleenozyten und Myelomzellen zu Hybridomzellen mit der Eigenschaft, unter Verlust einer Limitierung der Proliferation Antikörper zu sezernieren. Die Verschmelzung des Erbguts der zwei fusionierten Kerne ist durch den Farbübergang von rot und blau zu violett dargestellt.

Durch die spontane Membranfusion von Spleenozyten und Myelomzellen, bei interzellulärer Verdrängung von Wassermolekülen unter Einsatz von PEG, konnten chimäre Zellen, sogenannte Hybridome erzeugt werden. Diese anfänglich synzytialen Zellen enthielten die Erbinformation von extrahierten, antikörper-produzierenden B-Zellen und Myelomzellen. Die resultierenden Hybridome erhielten somit die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der entarteten Zellen und waren in der Lage, hohe Mengen des B-Zell-kodierten Antikörpers in das umgebende Nährmedium abzugeben (Kohler and Milstein, 1975). Die zugrundeliegende Methode der Hybridomfusion ist bis zum heutigen Tage weitestgehend unverändert geblieben. Es bestehen Bestrebungen, die Selektion von erfolgreich produzierten Hybridomen zu automatisieren und die Fusionsreaktion durch elektrische Impulse

in ihrer Effizienz zu steigern (Elektrofusion). Die wesentlichen experimentatorischen Protokolle sind jedoch durch die Jahrzehnte erhalten geblieben.

1.5 Monoklonale Antikörper: vielseitiges Werkzeug in Medizin und Wissenschaft

Durch die präzise Planung und Durchführung der Induktion und Testung monoklonaler Antikörper ist es möglich, eine gezielte Selektion von Immunglobulinen mit den für die Anwendung gewünschten Eigenschaften vorzunehmen. Somit können für spezialisierte Assays, Therapien und Verfahren maßgeschneiderte monoklonale Antikörper erzeugt werden. Die gleichbleibende Qualität und hohe Ausbeute der Hybridomkultur eröffnet hierbei weitreichende Perspektiven und Möglichkeiten für die Anwendung der Hybridomtechnologie. Heutzutage werden monoklonale Antikörper in vielen Bereichen der medizinischen Diagnostik beispielsweise gegen seroprävalente Pathogene oder Tumorantigene angewendet (Paul-Ehrlich-Institut, 2011). Die passive Immunisierung von mit Respiratory-Syncytial-Virus erkrankten Kindern oder immunsupprimierten Patienten mit monoklonalen Antikörpern zeigt die vielversprechende Möglichkeit der Anwendung von monoklonalen Antikörpern als therapeutisches Mittel (Ledford, 2008). Weitere zukunftsweisende Studien, unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Blockade von Kokain in der Blutbahn, lassen erahnen, wie vielseitig sich diese hochspezifischen Antikörper einsetzen lassen (Norman et al., 2007). Der unschätzbare Wert von monoklonalen Reagenzien für die Diagnostik macht deutlich, dass es notwendig ist, einen Fundus von diagnostischen Antikörpern im Zusammenhang mit Bioterrorstoffen zu erzeugen und nutzbar zu machen. Die gesicherte Detektion von BT-Stoffen würde hierbei das umgehende Ergreifen von Gegenmaßnahmen und eine schnelle Versorgung von eventuell betroffenen Personen ermöglichen.

2. Zielsetzung

Die politische Lage des 21. Jahrhunderts stellt die Weltöffentlichkeit vor neue Sicherheitsbedrohungen durch den internationalen Terrorismus. Neben bekannten Szenarien terroristischer Anschläge wird vermutet, dass biologische Gefahrenstoffe in Zukunft vermehrt eine Rolle spielen werden. Zur frühzeitigen Erkennung solcher biologischen Gefahrenlagen sind zuverlässige antikörperbasierende Testsysteme zur Detektion von „Bioterror (BT)“-Stoffen unabdingbar. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten nur wenige für BT-Stoffe spezifische Antikörper erfolgreich generiert werden, die gegen native Antigenstrukturen gerichtet sind, da aufgrund der hohen Pathogenität infektiöse oder toxische native Agenzien nicht zur klassischen Proteinimmunisierung eingesetzt werden können.

Durch die Methode der DNA-Immunisierung soll im Zuge dieser Arbeit den Schwierigkeiten der klassischen Proteinimmunisierung im Umgang mit hochpathogenen Agenzien (BoNT-A1, Filoviren) begegnet werden. Die erzeugten Immunisierungsvektoren sollen gering modifiziert werden, um äquivalente, nicht-toxische BT-Antigene mit nativer 3D-Struktur zu generieren. Durch die *in vivo* Expression nach Gene Gun Applikation von kodierenden Sequenzen für BT-Antigene im Versuchstier sollen Antikörper gegen native Antigene erzeugt werden, die durch herkömmlich inaktivierte Proben nicht induzierbar sind.

Durch Hybridomatechnologie gewonnene monoklonale Antikörper sollen nach Etablierung der Hybridomkulturen aufgereinigt und in Bezug auf charakteristische Eigenschaften für die Anwendung als Detektionsantikörper evaluiert werden. Die Bewertung der Qualität soll durch die Charakterisierung der Antigenspezifität, spezifischer Nachweisgrenzen, Antikörper-Antigen-Affinität und die Kombinierbarkeit in Fänger-/Detektorkombinationen erfolgen. Es soll untersucht werden, ob eine Kreuzreaktivität der erzeugten Antikörper mit weiteren hochpathogenen BoNT-A-Serotypen besteht, um die gewünschte effiziente Toxindetektion der BoNT-A Serotypgruppe erreichen zu können.

Für die Herstellung von monklonalen Antiköpern gegen die nativen Oberflächen-proteine des Ebola-Virus sollte analog verfahren werden, wobei hier als Vorraussetzung eine Selektionsstrategie unter nativen Bedingungen durch die Erzeugung von rekombinanten Proteinen oder Ebolavirus-Partikeln für die Analyseverfahren zu schaffen war. Schließlich soll im ELISA, als Simulation der „vor Ort“-Detektionsplattformen, die Eignung der Antikörper demonstriert werden.

3. Material & Methoden

3.1 Nährmedien, Geräte & Verbrauchsmittel

3.1.1 Nährmedien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) & Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)

Die Kultivierung der verwendeten eukaryontischen Zelllinien erfolgte in kommerziell erworbenen Trockenmedien der Firma Gibco GmbH (Gaithersburgh, USA). Nach Rekonstitution und Sterilisation wurden Nähr- und Selektionsmittel zugesetzt, um das Medium auf die kultivierte Zelllinie abzustimmen.

Tab.3: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die Anzucht und Kultur von eukaryontischen Zellen

Nährmedium HEK-293T/ Vero-E7/ HUH-7	**D-MEM, FKS, QPS**
5% Foetales Kälberserum (FKS),	*(PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DBR)*
5 mM Glutamin (Q),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
100 U / ml Penicillin (P),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
0,1 mg / ml Streptomycin (S),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*

Nährmedium Hybridome R20F+ (vor Entw.)	**RPMI, FKS, QPS, ß-ME, IL-6**
20% Foetales Kälberserum (FKS),	*(PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DBR)*
5 mM Glutamin (Q),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
100 U / ml Penicillin (P),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
0,1 mg / ml Streptomycin (S),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
100 µM β- Mercaptoethanol (99%),	*(Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, DBR)*
500 Units / ml rekombinantes Maus IL-6	*(Gibco, Gaithersburg, USA)*

Nährmedium Myelome „p3X63Ag8.653" R10F-	**RPMI, Q, FKS, ß-ME**
10% Foetales Kälberserum (FKS),	*(PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DBR)*
5 mM Glutamin (Q),	*(PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT)*
100 µM β- Mercaptoethanol (99%),	*(Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, DBR)*
Zur Selektion nach Fusion wurde zusätzlich Azaserin Hypoxanthin als selektives Argens eingesetzt.	

3.1.2 Nährmedien für die Kultivierung prokaryontischer Zellen

LB- Nährmedium (Lysogeny broth)

Zur Anzucht von prokaryontischen Zellen wurde durch den Fachbereich bereitgestelltes LB-Nährmedium verwendet.

Tab.4: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien für die Anzucht und Kultur von prokaryontischen Zellen (Angabe pro Liter Kulturmedium)

Lysogeny broth, flüssig	Lysogeny broth, fest
10 g/l Trypton	10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt	5 g/l Hefeextrakt
10 g/l $NaCl_2$, pH 7,5	10 g/l $NaCl_2$
ad H_2O bidest	15 g/l Agar- Agar
	ad H_2O bidest

2x Yeast/ Trypton, flüssig	2x Yeast/ Trypton, fest
16 g/l Trypton	16 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt	10 g/l Hefeextrakt
5 g/l $NaCl_2$, pH 7,5	5 g/l $NaCl_2$
ad H_2O bidest	15 g/l Agar- Agar
	ad H_2O bidest

LB-fest-Medium wurde nach dem Autoklavieren in Mikrowellenöfen aufgekocht und auf „Händwärme“ abgekühlt. Bei Temperaturen unter 50° C konnten selektive Antibiotika zugegeben werden. Die so präparierten Selektivmedien wurden in 25 ml Aliquots auf Petrischalen verteilt und in ausgehärtetem Zustand bei 4° C luftdicht gelagert.

3.1.3 Laborgeräte

Tab.5: Auflistung der für die Arbeit verwendeten Laborgeräte, unter Herstellerangabe und Typenbezeichnung

Gerätebezeichnung	Geräteart	Hersteller
NuAire Class II Type A/B3 Hera Safe KS 12 Heraeus HSP 18	Laminar flow Sterilbank	*Thermo Fisher Scientific Ltd, Waltham, USA*
Labotect C200 Heracell 2110	Inkubator (CO_2)	*Thermo Fisher Scientific Ltd, Waltham, USA*
Axiovert 40 CFC invers LSM 780 LSM 510 Eclipse TE 2000-E	Lichtmikroskop /invers (LM) konfokales laser scanning Mikroskop (cLSM) Lifecellimaging cLSM	*Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland* *Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland*
Nanodrop ND-1000	Kompaktphotometer	*Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen, Deutschland*
Megafuge 1.0R BC Optima L-100K Rotor- 32Ti Mikro 200R	Zentrifuge (Festwinkel/Ausschwung) Ultrazentrifuge (UZ) UZ- Rotor (Ausschwung) Mini- Zentrifuge	*Thermo Fisher Scientific Ltd, Waltham, USA* *Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland* *Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland*
Powerpac HC Transblot SD- Transfer cell Mini Protean Tetra Cell	Netzteil 300W Semi-Dry Westernblotsystem SDS-Gelkammersystem	*BioRad, Hercules, USA*
DNA- Engine	PCR- Thermocycler	*BioRad, Hercules, USA*
Ultraspec 2000	Photometer	*Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich*
Tecan Sunrise Skan Washer 300	ELISA Photometer ELISA Washer	*Tecan Ltd., Männedorf, Schweiz* *Skatron Instruments, Lier, Norwegen*
Helios Genegun® Tubing Prep Station	Ballistische Genegun Rotationsbeschichter	*BioRad, Hercules, USA*
X100 ÄKTA Explorer P-900	Biacore Interaktions Analyse FPL-Chromatographiegerät	*GE Healthcare GmbH, Freiburg, Deutschland*
Pump P1	Peristaltische Pumpe	*Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich*
H4 basic	Temperierbares Wasserbad	*IKA- Werke GmbH, Staufen, Deutschland*
Gene Pulser Xcell	Elektroporator	*BioRad, Hercules, USA*
Berthold Centro LB 960	Mikroplatten Luminometer	*Titertek Instruments, Huntsville, USA*

3.1.4 Chemikalien

Die in den Experimenten verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen Carl Roth GmbH & Co.Kg *(*Karlsruhe, *DBR*) und die Sigma Aldrich Co. (St.Louis, USA) bezogen.

3.1.5 Seren

Tab.6: Auflistung der für die Herstellung von Nährmedien verwendeten Seren, unter Angabe des Herstellers

Serum	Zulieferer
Fetal Bovine Serum IgG stripped	*PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT*
Fetal Bovine Serum Superior	*Biochrom AG, Berlin, DBR*

3.1.6 Antibiotika

Tab.7: Auflistung der in pro-/ eukaryontischer Zellkultur eingesetzten Selektionsmittel und Antibiotika

Selektionsmittel	Zulieferer
Penicillin / Streptomycin	*PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT)*
Ampicillin	*Biochrom AG (Berlin, DBR)*
Kanamycin	*Carl Roth GmbH (Kalrsruhe, DBR)*
Gentamycin	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*
Azaserin Hypoxanthin	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*

3.1.7 Enzyme

Tab.8: Auflistung der für die Arbeit verwendeten Enzyme und experimentatorischen Verbrauchsmittel, unter Angabe des Herstellers und der Produktbezeichnung

Enzyme / Verbrauchsmittel	Zulieferer
BigDye 3.1	*Applied Biosystems (Foster City, USA)*
dNTP-Mix	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Agarose, gold standard	*Peqlab GmbH (Erlangen, DBR)*
Generuler 1 kb Ladder Plus	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Generuler 100 bp Ladder	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Cold water fish gelatine ≅45%	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*
PageRuler *prestained protein ladder*	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Complete mini Protease Inhibitor Mix	*Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DBR)*
Restriktionsenzyme	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Sukrose	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*
T4- DNA- Ligase	*Fermentas Inc. (Burlington, CDN)*
Turbo Pfu –AD- Polymerase	*Agilent Technologies GmbH (Waldbronn, DBR)*
Hot Star Taq- Polymerase	*Qiagen GmbH (Hilden, DBR)*
Streptavidin-HRP	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*

3.1.8 Präzipitationsmatrizen

Tab.9: Auflistung der für die Immunpräzipitation und Aufreinigung von Proteinen bzw. Antikörpern verwendeten Affinitätsmatrizen, unter Herstellerangabe und Typenbezeichnung; Angabe der durchschnittlichen Bindekapazität

Reagenz	Zulieferer	Bindekapazität
Protein G Sepharose 4 fast flow	*GE Healthcare (München, DRB)*	20mg IgG / ml
Protein L–Agarose aus *Peptostreptococcus magnus*	*Sigma Aldrich (St. Louis, USA)*	3-10mg / ml
Protein G Agarose	*Sigma Aldrich (St. Louis, USA)*	20mg / ml

3.1.9 Kommerzielle Antikörper

Tab.10: Auflistung der für die Arbeit verwendeten kommerziellen primären und speziesspezifischen Antikörper, unter Angabe des Herstellers und der Ursprungsspezies.

Antikörper	Zulieferer	Spezies
α-V5-HRP	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*	Maus
α-V5	*AbD Serotec AG (Martinsried DBR)*	Maus
α-V5-Cy3	*Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA)*	Maus
K47 (polyklonal)	*ZBS3 (RKI Berlin, DBR)*	Kaninchen
mAK 1688 / 2 (monokonal)	*ZBS3 (RKI Berlin, DBR)*	Maus
α-IgY-HRP	*AbD Serotec AG (Martinsried DBR)*	Ziege
α-Maus-H+L-HRP	*Dianova GmbH (Hamburg, DBR)*	Ziege
AlexaFluor® 488αMaus-IgG	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*	Ziege
AlexaFluor® 594αMaus-IgG	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*	Ziege
α-Kaninchen-HRP	*AbD Serotec AG (Martinsried DBR)*	Ziege
α-Maus-Fcγ-HRP	*Dianova GmbH (Hamburg, DBR)*	Ziege
α-Human-IgG-HRP	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*	Ziege
α-Human-IgG	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*	Ziege

3.1.10 Verwendete Kits

Tab.11: Auflistung der für die Arbeit verwendeten Kits unter Herstellerangabe und Typenbezeichnung

Kitbezeichnung	Zulieferer
ECL Detektionsreagenz	*GE Healthcare*
TMA 6 / Super ECL	*Amersham*
Luciferase Assay System	*Promega Co (Madison, USA)*
Endo-free Plasmid Maxi Kit	*Qiagen GmbH (Hilden, DBR)*
Quikchange® Multi Site directed Mutagenesis	*Stratagene GmbH (Basel, CH)*
Polyfect Transfection Reagent	*Qiagen GmbH (Hilden, DBR)*
QIAquick PCR Purification	*Qiagen GmbH (Hilden, DBR)*
QIAquick Gel Extraction	*Qiagen GmbH (Hilden, DBR)*
Isostrip® Isotyping Kit	*Roche Applied science AG (Bern, CH)*
BCA Protein Assay Reagent	*Thermo Scientific (Rockfort, USA)*

3.1.11 Bakterienstämme

Tab.12: Auflistung der im Zuge der Experimente verwendeten Bakterienstämme (*E.coli*), unter Herstellerangabe und kommerzieller Kennzeichnung des Zulieferers

Bakterienstamm	Zulieferer
E.coli Top 10	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*
One Shot® Top 10 chemo Komp.	*Invitrogen GmbH (Kalrsruhe, DBR)*

3.1.12 Primer

Eine Liste der verwendeten, durch die Invitrogen GmbH (Karlsruhe, DBR) hergestellten Oligonukleotide zur Amplifikation und Synthese von Nukleinsäure-sequenzen ist im Anhang beigefügt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden in Aqua bidest. gelöst und in einer Arbeitskonzentration von 100 µM verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Rekombinante DNA Technologie

3.2.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer oder Plasmid-DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Hierbei wird ein definierter Sequenzabschnitt durch die Verlängerung kurzer, spezifisch komplementärer Oligonukleotidsequenzen (20-30 Nukleotide) auf beiden Mutterträngen, im Zuge der Reaktion, durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq, Pfu) komplementär kopiert und dadurch amplifiziert. Die Schritte der Reaktion teilen sich in die Annealingphase (Hybridisierung der Oligonukleotidprimer mit dem Mutterstrang), die Elongationsphase (Veränderung des Primers am 3`- OH Ende des Moleküls durch die hitzestabile Polymerase) und die Denaturierungsphase in der die Mutterstänge vom Amplifikat abgeschmolzen werden um die nächste Runde der Kettenreaktion zu ermöglichen. (Mullis and Faloona, 1987, Saiki et al., 1985)

Für einen Standard PCR-Ansatz wurden folgende Parameter verwendet:

- 50-100 ng DNA-Template
- 5 µl 10x Reaktionspuffer (polymerasespezifisch)
- 4 µl dNTP (5pmol)
- je 1 µl *forward-* & *reverse* Primer (15pmol)
- 2,5 Units Polymerase
- Ad H_2O-bidest

Die Programmierung des benötigten *thermocyclers* erfolgte nach folgendem Standardprogramm:

Init. Strangtrennung:	Step1:	95°C	für 120 Sek.	
Denaturierung:	Step2:	95°C	für 30 Sek.	← 35x
Annealing:	Step3:	55-66°C	für 30 Sek.	
Elongation:	Step4:	72°C	für X Sek. (60 Sek./kb Amplifikat)	
Finale Elongation:	Step5:	72°C	für 600 Sek.	
	Step6:	4°C	für ∞	

3.2.1.2 „*touchdown*“- Polymerase-Kettenreaktion

Bei mangelndem Erfolg der Amplifikation in regulären PCR-Ansätzen durch schwache Bindung nicht substituierbarer Primer wurde die Standard-PCR durch eine „*touchdown*“- Voramplifikation ergänzt. Hierbei wird in einem vorgeschalteten Programm die Annealingtemperatur in jedem der Voramplifikationszyklen um 1° C reduziert, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass ein optimaler Temperaturbereich passiert wird.
Das so erzeugte Voramplifikat kann in der nachfolgenden spezifischen Amplifikation effektiv vermehrt werden.

Für einen „*touchdown*“-PCR-Ansatz wurden folgende Parameter verwendet:

- 50-100 ng DNA-Template
- 5 µl 10x Reaktionspuffer (polymerasespezifisch)
- 4 µl dNTP (5pmol)
- je 1 µl *forward*- & *reverse* Primer (15pmol)
- 2,5 Units Polymerase
- Ad H_2O-bidest

Die Programmierung des benötigten *thermocyclers* erfolgte nach folgendem Standardprogramm:

Voramplifikation:	Step1:	95°C	für 120 Sek.	
	Step2:	95°C	für 10 Sek.	44x je Zyklus -1°C
	Step3:	72°C	für 20 Sek.	
Spezifische Amplifikation	Step4:	95°C	für 60 Sek.	35 x
	Step5:	55°C	für 30 Sek.	
	Step6:	72°C	für 60 Sek.	
	Step7:	72°C	für 600 Sek.	
	Step8:	4°C	für ∞	

3.2.1.3 Fusion-Polymerase-Kettenreaktion

Um eine *denovo* Synthese von DNA-Sequenzen, zum Beispiel zur artifiziellen Generierung von modifizierten Expressionskonstrukten, erreichen zu können, wurde die Methode der Fusion-PCR eingesetzt. Bei dieser Form der PCR werden verschiedene Konzentrationen partiell überlappender Oligonukleoidprimer ohne den Einsatz von *template* verwendet, um durch die hitzestabile Polymerase die Verschmelzung zu einem durchgehenden linearen Doppelstrang zu erzielen.
Um eine optimale Konzentration der Oligonukleotidprimer zu ermitteln, wurden Ansätze mit verschiedenen Primerkonzentrationen parallel verwendet.

Exemplarischer Ansatz der Fusion PCR:

Verdünnung:	1	1/10	1/100	1/1000
◦ (Primer)	260pmol	26pmol	2,6pmol	260fmol
Einsatz von 13 fw-Primern & 13 rv-Primern; Zugabe je 5µl Top- & Bottom- Mix				
◦ Polymerase:	2,5 Units	2,5 Units	2,5 Units	2,5 Units
◦ Reaktionspuffer*(10x)*:	5µl	5µl	5µl	5µl
◦ dNTP:	12,5 pmol	12,5 pmol	12,5 pmol	12,5 pmol
◦ H_2O- bidest:	ad to 50µl	ad to 50µl	ad to 50µl	ad to 50µl

Die Programmierung für den exemplarischen Ansatz lautete wie folgt:

Voramplifikation:	Step1:	95°C	für	10 Sek.	44x je Zyklus -1°C
	Step2:	95°C	für	30 Sek.	
Spezifische Amplifikation	Step3:	95°C	für	20 Sek.	29 x
	Step4:	60°C	für	20 Sek.	
	Step5:	72°C	für	60 Sek.	
	Step6:	4°C	für	∞	

Nach Abschluss der Fusionsreaktion (PCR) wurde eine reguläre Amplifikation mit den „randständigen“ Primern des linearen fusionierten Abschnittes durchgeführt, um die Menge an spezifischem Volllängenamplifikat zu erhöhen. Die am Rande des Konstruktes gelegenen Primer wurden jeweils um eine Restriktionsschnittstelle ergänzt, um die Klonierung des Einzelstranges in einem Expressionsvektor unter der Kontrolle eines viralen Promoters zu erlauben.

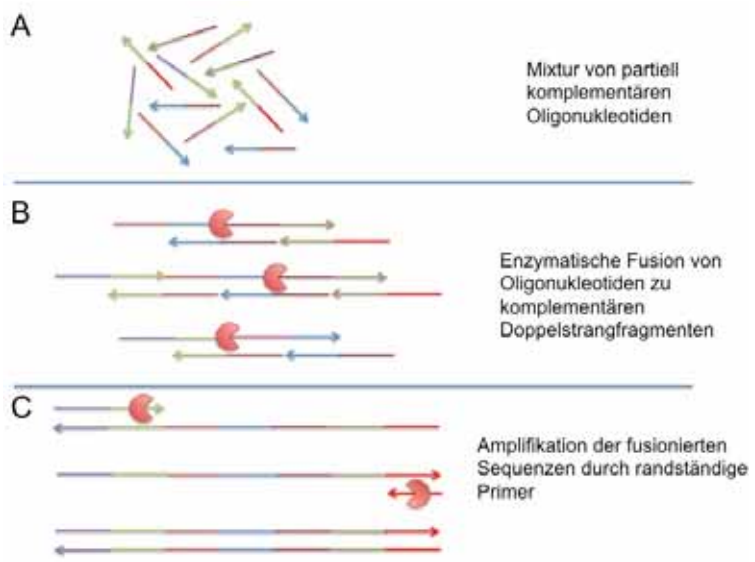


Abb.13: Schematische Darstellung der Fusionspolymerasekettenreaktion; partiell überlappende Primersegmente (A) werden in einer PCR-Reaktion zu komplementären Sequenzen verbunden; die erfolgreich fusionierten Abschnitte werden in einer zweiten PC- Reaktion durch randständige Oligonukleotidprimer amplifiziert und kloniert (C)

3.2.1.4 „Kolonien-Polymerase-Kettenreaktion“ aus bakteriellen Kolonien (*E.coli*)

Um den Arbeitsaufwand der DNA-Präparation für Klonierungsreaktionen mit einer hohen Rate an falsch positiven Kolonien nach Transformation in *E.coli* und Selektion durch antibiotikahaltige Kulturmedien zu umgehen, wurde bei einem großen Probenaufkommen die Methode der Kolonie-PCR angewandt. Hierbei werden Aliquots der kultivierten plasmidtragenden Bakterienkultur direkt in einem PCR Ansatz eingesetzt und durch die initiale Inkubation bei 95° C lysiert. Die so freiwerdende DNA kann in der folgenden PCR amplifiziert und dadurch zeitsparend auf Veränderungen in der Zielsequenz untersucht werden ohne zuvor eine Plasmidpräparation oder Restriktionsanalyse durchführen zu müssen.

Exemplarischer Ansatz der Kolonien-PCR:

- n.d. ng DNA-Template
- 2,5 µl 10x Reaktionspuffer (polymerasespezifisch)
- 0,5 µl dNTP (5pmol)
- je 1,25 µl *forward* & *reverse* Primer (15pmol)
- 0,25 Units red taq Polymerase (hotstart)
- Ad to 25 µl H_2O-bidest

Zur Zugabe des Templates wird eine 10 µl (kristall) Eppendorfspitze in die Kolonie einer zu testenden *E.coli*-Kultur eingestochen, kurz in dem PCR-Reaktionsansatz geschwenkt und im Anschluss in frisches LB-Medium überführt, um das Anwachsen einer Vorkultur parallel zur PCR zu gewährleisten. Die Menge der überimpften Zellen ist in der Regel ausreichend für eine erfolgreiche Amplifikation durch die PCR.

Init. Lyse der Zellen & akt. der Polymerase	Step1:	95°C	für 600 Sek.	
Denaturierung:	Step2:	95°C	für 30 Sek.	29x
Annealing:	Step3:	51°C	für 60 Sek.	
Elongation:	Step4:	72°C	für 120 Sek.	
Finale Elongation:	Step5:	72°C	für 420 Sek.	
	Step6:	4°C	für ∞	

3.2.1.5 Single- / Multimutagenese-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Modifikation von Einzelbasen, Kodons oder kurzen DNA-Abschnitten, sowie Deletions- oder Insertionsmutagenesen wurden Mutagenese-PCRs eingesetzt. Bei dieser Form der PCR werden nicht vollständig komplementäre Primer eingesetzt, deren Zentrum einen mutagenisierenden *„missmatch"*-Bereich trägt. Die Primer werden so gewählt, dass flankierend zu dem nicht paarenden Abschnitt jeweils mindestens 20 Basen komplementär zur Ursprungssequenz vorliegen. Somit wird sicher gestellt, dass der Primer trotz „Fehlbasen" stabil in der Ursprungssequenz binden kann. Mittels einer hitzestabilen Polymerase mit *„proofreading"* (pfu) erfolgt die Amplifikation des vollständigen, einzelsträngigen, zirkulären Mutterstranges. Das resultierende Amplifikat trägt die im Primer enthaltene Veränderung gegenüber der Ursprungssequenz und ist dank der *in vitro* Synthese durch die Polymerase frei

von Dam-Methylierungen. Nach Abschluss der PC-Reaktion erfolgt die Entfernung des unveränderten Mutterstranges durch einen Verdau mit der Endonuklease DpnI (20 *units*) für 1h bei 37° C. Aufgrund der Methylierungs-Spezifität von DpnI muss zur Degradation des Templates die Plasmid-DNA des Mutterstranges zuvor aus Dam- Methylierungskompetenten Prokaryonten gewonnen worden sein. Das Resultat der Restriktion besteht in den mutierten und amplifizierten Einzelsträngen, die nach Transformation in *E.coli* zu vollständigen modifizierten DNA-Doppelsträngen komplettiert werden können.

Der Unterschied zwischen Single- und Multimutagenese besteht in der Komposition der verwendeten Primer. Bei der Singlemutagenese wird nur ein Einzelabschnitt mit komplementären *forward*- und *reverse*-Primern verändert, während bei der Multimutagenese bis zu fünf Sequenzabschnitte simultan mit Einzelprimern verändert werden können. Die Primer hierfür liegen jedoch ausschließlich in *forward* oder *reverse*-Orientierung vor.

Exemplarischer Ansatz der Mutagenese- PCR:

- 1 µl DNA- Template (4-100ng)
- 5 µl 10x Reaktionspuffer (Pfu turbo AD)
- 1 µl dNTP (5pmol)
- 1,25 µl *forward*- & *reverse* Primermix (15pmol)
- 1,0 µl Units Polymerase (Turbo pfu AD)
- Ad to 50 µl H_2O- bidest.

	Step1:	95°C	für 30 Sek.	
Denaturierung:	Step2:	95°C	für 30 Sek.	18x
Annealing:	Step3:	55°C	für 60 Sek.	18x
Elongation:	Step4:	65°C	für X Sek. (120 Sek. /kb Amplifikat)	18x
Finale Elongation:	Step5:	72°C	für 720 Sek.	
	Step6:	4°C	für ∞	

3.2.1.6 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion nach Sanger

Für die Ermittlung von DNA-Sequenzinformationen wurde die Sequenzierung mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger angewandt. Die Reaktionsmixtur wurde zur direkten Anwendung kommerziell bei Applied Biosystems (Carlsbad, USA) erworben. Der sogenante ABI-Terminatormix enthält neben einer AmpliTaq-DNA-Polymerase unmarkierte dNTPs und eine fluoreszenzmarkierte Mixtur von 2`,3`-Didesoxynukleosidtriphoshaten, die in der PCR, im Falle des Einbaus, zum Abbruch der Polymerisation des zu amplifizierten Stranges und zu einer spezifischen Farbmarkierung in Abhängigkeit zum eingebauten ddNTP führen. Da die statistische Wahrscheinlichkeit für den Einbau bei einer entsprechenden Menge an Amplifikationen für jede Nukleotidposition gleich wahrscheinlich ist, können in einer Sequenzierungs-PCR-markierte Fragmente mit einem Abbruch an jeder Nukleotidposition erzeugt werden. Diese Amplifikate können bis zu einer Größe von 1000 Basenpaaren im Sequenziergel nach Größe getrennt und mittels Laser in einem Kapillar-Sequenzautomaten zuverlässig ausgelesen werden.

Exemplarischer Ansatz der Sequenzierungs- PCR:

- 1 µl DNA- Template (100-300ng)
- 1 µl 5x ABI- Puffer
- 2 µl Big- Dye (Terminator Mix)
- 0,5µl Sequenzierung Primer (10 µM)

Ad to 10 µl H_2O- bidest

	Step1:	95°C	für 120 Sek.	
Denaturierung:	Step2:	95°C	für 10 Sek.	25x
Annealing:	Step3:	53°C	für 10 Sek.	
Elongation:	Step4:	60°C	für 240 Sek.	
Finale Elongation:	Step6:	4°C	für ∞	

3.2.1.7 Transformation von prokaryontischen Zellen mit Expressionsvektoren

Um konstruierte oder zu *in vivo* zu vermehrende Vektor-DNA in bakteriellen Zellen zu amplifizieren, mussten Zielzellen mit den gewünschten Nukleinsäuren transformiert werden. Das Einbringen der DNA bei diesem Prozess kann auf verschiedene Arten erfolgen.

3.2.1.8 „*heatshock*"-Transformation von chemokompetenten *E.coli*

Bei der Hitzeschock-Methode werden Aliquots (50 μl) durch $CaCl_2$ permeabilisierter Bakterien auf Eis für 40 min mit einer verfügbaren Menge der Ziel-DNA inkubiert. Das Volumen der gelösten DNA ist hierbei kein limitierender Faktor, da selbst die Zugabe von kompletten PCR-Ansätzen (50 μl) den Vorgang nicht negativ beeinflusst. Die Vektor-DNA lagert sich während der Inkubation an die Zellwand der Zellen an. Durch einen kurzen Hitzeschock (90 Sek.) bei 42° C erweitern sich die, durch die chemische Behandlung erzeugten Poren und erleichtern das Eindringen der DNA in die Zelle. Eine erneute rapide Abkühlung für 5 min auf Eis verhindert im Anschluss die Umkehr des Prozesses. Um den Stress der Behandlung für die transfizierten Zellen zu verringern, schließt sich an die Transformation eine Inkubation für 30 min in reichhaltigem Vollmedium (600 μl/ SOC) ohne selektives Antibiotikum bei 37° C an. In dieser Zeit beginnen die erfolgreich modifizierten Bakterien, die auf dem Vektor kodierten Antibiotikaresistenzgene abzulesen. Dadurch wird es nach Abschluss der Regenerationsphase möglich, die Kultur auf Selektions-LB-Platten auszustreichen um die transformierten Zellen (Klone) selektiv zu kultivieren. Sollte die zu erwartende Transformationsrate gering sein, kann vor dem Ausstreichen die Kultur bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert werden, um die Kultur in einem geringeren Medienvolumen zu resuspendieren. Der Bewuchs in Form von Kolonien kann an den folgenden Tagen durch PCR oder Restriktionsanalyse ausgewertet werden.

3.2.1.9 Elektroporation von elektrokompetenten *E.coli*

Im Gegensatz zu chemisch kompetenten Zellen sind elektrokompetente *E.coli* strukturell unbeeinflusst und durch die Präparation lediglich salzfrei. Bei Zugabe der DNA ist darauf zu achten, dass die Menge der zugegebenen DNA die Salzkonzentration nicht so stark ansteigen lässt, dass es zu einem Kurzschluss

kommen kann (i.d.R. max. 2-6 µl PCR-Ansatz). Der Transformationsansatz wird zur Transformation in, auf 0° C vorgekühlte, 2 mm Elektroporationsküvetten überführt. Durch Anlegung eines Spannungspulses bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω mittels Elektroporator wird die, an die Zellmembran angelagerte Plasmid-DNA in die Zelle transferiert. Unmittelbar nach dem Puls ist es notwendig, 250 µl SOC-Medium zuzugeben und die Zellen für 60 min bei 37° C zu inkubieren. Bei korrekter Durchführung sichert dieses Vorgehen ein Überleben der behandelten Zellen und eine effiziente Transformation selbst bei geringen DNA-Konzentrationen. Nach Abschluss der Inkubation können die Zellen wie zuvor beschrieben, selektiv kultiviert und getestet werden. (Panja et al., 2008)

3.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus prokaryontischen Zellen

Die Präparation von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Maßstäben erfolgte über alkalische Lyse und Säulenaffinitätsreinigung der Plasmid-DNA mittels kommerziell verfügbarer Plasmidpräparationskits der Firma Qiagen (Hilden, DBR). Die Präparation größer Mengen an DNA beinhaltete hierbei einen Schritt zur Degradation von bakteriellem Endotoxin. Die verwendeten Kits „QIAprep Spin Miniprep“ und „Endo- free Plasmid Maxi Kit“ wurden nach Herstellerangaben und unter Zuhilfenahme der mitgelieferten Standardprotokolle verwendet.

3.2.1.11 Spezifische Spaltung von DNA mittels TypII- Restriktionsendonukleasen

Um die Identität vorhandener Plasmid-DNA grob charakterisieren zu können (Testverdau) oder selektiv Sequenzabschnitte oder Vektoren für die Religation zur Generierung neuer Expressionskonstrukte (Klonierung) vorzubereiten, wurde die DNA durch die Behandlung mit Typ II Restrikionsendonukleasen spezifisch gespalten. Die verwendeten Enzyme besitzen je nach Typ Erkennungssequenzen unterschiedlicher Länge (4 bis 6 Basen) mit palindromischer Charakteristik, in denen sie auf beiden Strängen spezifische Einzelstrangbrüche erzeugen können. Je nach Enzym kann hierbei eine Spaltung mit Strangüberhang sogenannte „*sticky ends*“ oder ein gerader Doppelstrangbruch „*blunt end*“ erfolgen. Für das Einklonieren einer Zielsequenz (z.B. PCR-Produkt) in einen Expressionsvektor (Plasmid) sollten die Enzyme so gewählt werden, dass die Konfiguration des Schnittproduktes eine neue Verbindung mit dem Zielvektor ermöglicht.

Zum Verdau von Substrat-DNA wurden als Standard 2,5 *units* pro μg DNA eingesetzt. Trotz eines erwarteten Umsatzes von 1μg DNA / Unit Enzym in einer Stunde bei 37° C wurde die Reaktionszeit in der Regel auf 2 h angesetzt. Bei einem simultanen Verdau mit mehreren Endonukleasen wurden die Reaktionspuffer für einen Doppelverdau nach Herstellerangaben angepasst. Bei einer reduzierten Aktivität eines der Enzyme in dem verwendeten Restriktionspuffer wurde die eingesetzte Menge Enzym auf 1,5x bis 2x erhöht, ohne einen Enzymanteil von 10% (v/v) des Reaktionsansatzes zu überschreiten.

3.2.1.12 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Gewinnung von Informationen über die Länge und Integrität enthaltener DNA-Fragmente wurden zu analysierende Restriktions- oder PCR-Ansätze durch Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Hierbei wurden DNA-Fragmente beim Durchdringen einer Gelmatrix im elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt. Größere Fragmente migrieren hierbei langsamer als vergleichbar kleinere Nukleinsäurefragmente. Je nach Konzentration der im Gel eingesetzten Agarose kann hierbei eine größere Auflösung in unterschiedlichen Größenbereichen ermöglicht werden. Zur Herstellung des Gels wurden 0,8 - 1,5 % (w/v) reine Agarose in TAE- Puffer eingewogen und stark erhitzt, um die feste Komponente vollständig zu lösen. Nach Abkühlung auf Handwärme wurden zum Ansatz 0,5 μg/ml Ethidiumbromid zugegeben und durch kreisendes Schwenken homogen verteilt. Der so vorbereitete Gelansatz wurde mit ca. 60° C in vorbereitete Gelkammern überführt, um eine Polymerisation in gewünschter Form zu erreichen.
Der Probenauftrag erfolgte in 6x DNA Ladepuffer und die Auftrennung der DNA bei einer Spannung von 70 - 100 V. Die erfolgreiche Separierung der enthaltenen Fragmente konnte im Anschluss in UV-Transluminatoren fluorimetrisch im Vergleich mit simultan aufgetrennten DNA-Größenstandards ausgewertet werden. Je nach erwarteten Fragmentgrößen wurden „Generuler"- Standards 1kb Ladder oder 100bp Ladder der Firma Fermentas (St.Leon-Roth, DBR) eingesetzt.

Tab.13: Puffer und Reagenzien für Agarose – Gelelektrophorese

Pufferbezeichnung	Rezeptur
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,2
DNA-Ladepuffer 6x	60mM EDTA; pH 8,0; 60% Glycerin (v/v); 0,2% Orange G (v/v)

3.2.1.13 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Um eine Reinigung von spezifischen PCR-Produkten definierter Größe oder eine Extraktion von bereinigten Restriktionsfragmenten erreichen zu können, wurden Nukleinsäuren über Gelelektrophorese aufgetrennt. Die via Transluminator identifizierte Bande des Zielfragmentes wurde hierbei mit einem gereinigten Skalpell aus dem Gel ausgelöst und mittels „QIAquick Gel Extraction“ Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

3.2.1.14 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten

Enzymatisch „geschnitte“ und gereinigte Nukleinsäurefragmente mussten zur Erzeugung von intakten Plasmidexpressionsvektoren neu verbunden werden. Hierzu wurde eine Ligationsreaktion unter Einsatz der T4- DNA- Ligase durchgeführt. Das Enzym ist in der Lage, unter Verwendung von ATP, freie 3`OH-Enden der Fragmente mit 5`Phosphatgruppen zu verbinden, um eingefügte Strangbrüche im Phosphatrückrat der DNA zu beseitigen.
Um die Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern, wurden bei den zur Ligation eingesetzten Vektoren freie Photphatgruppen nach Restriktion durch Inkubation für 15 min bei RT mit alkaliner Phosphatase (10 Units) entfernt.

Exemplarischer Ansatz einer Ligationsreaktion:

- 1 Teil: Vektor DNA (80 ng)
- 5 Teile: Insert DNA (x ng)
- 1 µl ATP- haltiger Ligasepuffer (10x)
- 0,5 µl T4 DNA- Ligase (100 Units)
- Ad H_2O to 10 µl

3.2.1.15 Herstellung von ballistischer Munition für die DNA- Immunisierung

Um die konstruierten Expressionsvektoren für eine ballistische Immunisierung von Versuchstieren einsetzen zu können, mussten die Zielkonstrukte zur Herstellung von ballistischer Munition für die Helios-Gene Gun® verwendet werden.
Zur Fertigung der Munition werden 25 mg kolloidale Goldpartikel (Ø=1μm) mit Spermidinlösung inkubiert. Die Zugabe der DNA aus Spermidin sättigt DNasen ab und verhindert im Anschluss eine Degradation der kodierenden Expressionsvektoren. Nach Homogenisierung im Ultraschallbad für 5 Sek. erfolgte die Zugabe von 50 - 100 μg der Ziel-DNA (100 μg bei Doppelbeschichtung). Durch die tropfenweise Zugabe von 100 μl $CaCl_2$-Lösung auf einem Vortexer und die 10-minütige Inkubation bei RT wurde die DNA auf die Oberfläche des Goldes präzipitiert. In der Zwischenzeit wurde ein Ethylen-Tetrafluorethylen-Schlauch (Tefzel) in eine Tubing-Prep-Station (BioRad) eingespannt und unter Gasdurchfluss mit N_2 getrocknet. Nach Abschluss der Präzipitation wurde das Goldpulver in einer Picofuge für 20 Sek. pelletiert, in 1ml abs. EtOH gewaschen und durch Ultraschallbehandlung für 10 Sek. homogenisiert. Nach zweimaliger Wiederholung des Waschvorganges wurde der Überstand entfernt und das Goldpellet in 1,9 ml PVP-haltigem abs. EtOH aufgenommen und gleichmäßig in den vorbereiteten Tefzel-Schlauch aufgesaugt. Nach Absenkung des Goldstaubes durch die Schwerkraft konnte der Alkohol abgezogen und der Goldstaub rotierend unter N_2-Fluss getrocknet werden. Resulierend entsteht eine durchgehende Goldbeschichtung der Schlauchinnenseite. Zur Immunisierung konnten die eingetrockneten Partikel durch einen Heliumimpuls von der Oberfläche gelöst und beschleunigt werden.

Tab.14: Puffer und Reagenzien für die Herstellung von ballistischer Munition für die Gene Gun

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Spermidinlösung	2,5 mM Spermidin in H_2O
$CaCl_2$-Lsg.	1M $CaCl_2$
PVP-Arbeitslsg.	50 ng PVP K90 /ml in EtOH abs.

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese & Proteinanalytik mittels *western-blotting*

Zur Untersuchung von Proteinfraktionen oder Zelllysaten wurden zu analysierende Proben durch SDS-Gelelektrophorese nach Masse und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt.
Die Gele wurden in zwei Phasen mit Sammel- und Trenngel aufgebaut. Das Sammelgel dient der Retardation des Probendurchtritts bei einem großen Porendurchmesser, um den Inhalt der Probentaschen auf eine möglichst zweidimensionale Bandendimension zu bringen. Nach Übertritt der „gesammelten" Probe in das Trenngel erfolgt eine schnellere Migration kurzer Polypeptidketten, wodurch eine Auftrennung in Proteinbanden unterschiedlicher Masse erreicht wird. Die Rezeptur des Trenngels beinhaltet je nach Größe der zu erwarteten Proteine 10-12% (v/v) Acrylamid. Zur Auftrennung von Proteinen hoher Masse (90-150 kDa) wurden geringere Acrylamidkonzentrationen von 8% (v/v) eingesetzt, um eine stärkere Auflösung im Interessenbereich zu bewirken. Das Sammelgel wurde mit 5 % (v/v) Acrylamid bemessen.
Zur Einleitung der Polymerisation des monomeren Acrylamides wurde der Gelansatz mit Ammoniumpersulfat unter Katalyse durch N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin versetzt.
In Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit 2x oder 4x Proteinladepuffer nach Laemmli versetzt und bei 94° C für 5 min denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol führt hierbei zur Reduktion von Schwefelbrückenbindungen, während eine hohe Konzentration an SDS eine Renaturierung des linearisierten Polypeptides verhindert und eine uniforme Ladung erzeugte. Die Elektrophorese erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 100 – 180 V für eine Dauer von 1 - 2,5 h. Bei Auftragung eines vorgefärbten Proteinstandards bekannter Größe (Proteinladder) konnte eine die Auftrennung schon während dem Lauf überwacht und beurteilt werden. Um die Auftrennung der Proben letztlich sichtbar zu machen, wurden die erzeugten SDS-Gele im Anschluss in Western-Blot-Analysen eingesetzt.

Tab.15: Puffer und Reagenzien für die denaturierende SDS–Gelelektrophorese

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Sammelgel	5% (v / v) Acrylamid; 0,05M Tris in H_2O; TEMED; APS (10%)
Trenngel	8-12% (v / v) Acrylamid; 0,15M Tris in H_2O; TEMED; APS (10%)
Laemmlipuffer 4x	200mM Tris, pH6,8; 400mM 1,4 Dithiothreitol; 8% SDS (w / v); 0,4% Bromphenolblau; 40% Glyzerol (v / v); H_2O
SDS- Gel-Laufpuffer	2,5mM Tris, pH8.3; 19,2mM Glyzin; 0,1% SDS; H_2O

Beim Westernblotting werden die aufgetrennten Proteinfraktionen aus dem SDS- Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, um sie so zugänglich für die Detektion mit spezifischen Antikörpern zu machen. Um eine effiziente Übertragung zu ermöglichen, wurde das Trenngel isoliert und für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Parallel wurde die zugeschnittene PVDF- Membran zur Aktivierung für 5 min in 96 % Methanol eingelegt und anschließend mit Transferpuffer benetzt. Die Proteinübertragung wurde im „*semi-dry blotting*“-Verfahren erreicht. Hierzu werden Transferpuffer-getränkte Filterpapiere im *sandwich* mit Membran und Gel gestapelt und luftblasenfrei in einen Semi-dry-Blotter eingespannt. Das angelegte elektrische Feld erreichte eine Mobilisierung und den Transfer der Proteinbanden bei 10-20V für 60-30 min. Um nach Abschluss des Blottings die unspezifische Bindung von Proteinen und Antikörpern auf der PVDF-Matrix zu verhindern, wurden die Blotmembranen für 1h bei RT in Blockingpuffer inkubiert. Die nachfolgende Detektion mit proteinspezifischen Antikörpern erfolgte durch Inkubation von verdünnten AK in Blockingpuffer für 1h bei RT. Ungebundene Antikörper wurden nach Abschluss der Inkubation durch 6x waschen mit PBS-T für 5 min entfernt. Bei Notwendigkeit eines sekundären AK wurde der Inkubations- und Waschvorgang mit dem zweiten AK wiederholt. Bei enzymatischer Kopplung eines der AK mit Meerrettichperoxidase (HRP) wurde eine chemiluminescente Detektion mit ECL-Reagenz durchgeführt. Durch die HRP-Substratdegradation, unter Emmission von Photonen, konnte ein hochsensitiver Nachweis von selbst geringen Mengen gebundener AK über die Schwärzung eines Röntgenfilmes (X-Ray Retina, Fotochemische Werke Berlin GmbH) erreicht werden.

Tab.16: Puffer und Reagenzien für Proteintransferreaktionen im „*semidry*“-Transblot-System

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Transferpuffer	2,5mM Tris; 19,2mM Glyzin pH 8.3; 20% Methanol (v / v); H_2O
Blockingpuffer	2% Magermilchpulver (w / v) in PBS; 0,1% Tween 20 (v / v)
Phosphat gepufferte Saline PBS-T	136 mM $NaCl_2$; 2,6 mM KCl; 1,8 mM Na_2HPO_4; H_2O; pH 7.4 PBS; 0,1% Tween 20 (v / v)

3.2.2.2 Immunfluoreszenz-Analyse transfizierter Zellen

Für die Testung von reaktiven Immunseren und die *in situ* Detektion von zellulär gebildetem Protein wurden mikroskopisch Fluoreszenzanalysen transfizierter Zellen durchgeführt.
Hierfür wurden Zellen adhärenter Zelllinien wie HEK-293T oder HUH-7 in geringer Dichte auf Deckgläsern ausgesät (1,5 x 10^5 in 12well), kultiviert und nach 24 Stunden transfiziert. 12-48 h nach Transfektion wurden die Überstände der Zellen entfernt, diese 2x vorsichtig mit PBS gewaschen und durch 800 μl Paraformaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Überschüssiges PFA wurde durch 3x waschen mit je 1ml PBS entfernt. Bei beabsichtigter intrazellulärer Färbung wurden die Zellen auf Eis (0° C) mit 800 μl einer 0,5% Triton X-Lsg. für 15 min permeabilisiert und erneut in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der einzusetzenden AK zu minimieren wurden die fixierten Zellen für 1h bei 37° C mit 1ml Blockierungspuffer blockiert. Die blockierten Proben wurden unter Zuhilfenahme einer Pinzette aus den Kavitäten entfernt und in einer Feuchtekammer auf Parafilm abgesetzt. Eine spezifische Färbung erfolgte unter diesen Bedingungen durch eine Inkubation mit 80-100 μl einer verdünnten AK-Lsg. in Blockierungspuffer (dunkel) für 1h bei 37° C. Bei Mehrfachfärbungen wurde der Färbungsvorgang wiederholt, wobei nach Abschluss jeder Inkubation überschüssiger und ungebundener AK durch 5x waschen mit PBS entfernt wurde. Zur Untersuchung und dauerhaften Lagerung der Proben wurden die Deckgläser invertiert auf einem luftblasenfreien Tropfen Mowiol abgesetzt und über Nacht bis zur Polymerisation des Einbettmediums bei 4° C inkubiert. Für eine dauerhafte Versiegelung konnten die Präparate mit handelsüblichem Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Auswertung vor Austrocknung bewahrt werden.

Tab.17: Puffer und Reagenzien für die Immunfluoreszenzpräparation

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Paraformaldehyd	2,5% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Triton X Lsg.	0,5% Triton X (v/v) in H_2O
Blockingpuffer	1% Magermilchpulver (w/v) in PBS; 0,1% Tween 20 (v/v)
Phosphat gepufferte Saline	136 mM $NaCl_2$; 2,6 mM KCl; 1,8 mM Na_2HPO_4, H_2O

3.2.2.3 Immunpräzipitation

Die Bestätigung einer Antikörper- / Antigenbindung unter nativen Bedingungen wurde durch Immunpräzipitationsversuche erreicht. Zur stabilen Bindung wurden antigenhaltige Überstände oder mit Antigen versetztes PBS mit 10 μg /ml antigenspezifischem Antikörper versetzt und für 2 Stunden „über Kopf" bei 4° C rotiert. Um gebildete Immunkomplexe zu präzipitieren, wurden 25 μl Protein-G-Sepharose pro Ansatz zugegeben und für weitere 4 Stunden bei 4° C unter Rotation inkubiert. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Antigenes an das Säulenmaterial wurde ein Kontrollansatz ohne die Zugabe von Antikörper mit der Präzipitationsmatrix inkubiert.
Nach Abschluss der Präzipitation wurden alle Ansätze 5x durch Zentrifugation pelletiert und mit IP-Waschpuffer gereinigt. Das durch die finale Zentrifugation entstandene Pellet wurde durch Abpipettieren des Überstandes vollkommen trocken gesaugt, mit auf 95° C vorgeheiztem 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für SDS- Gelelektrophorese eingesetzt.

Tab.24: Puffer und Reagenzien für die Methode der Immunpräzipitation

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Phosphat gepufferte Saline	136 mM $NaCl_2$; 2,6 mM KCl; 1,8 mM Na_2HPO_4; H_2O
IP-Waschpuffer	1% Glycerol; 20mM Tris, pH8.0; 135mM $NaCl_2$
Laemmlipuffer 2x	100mM Tris, pH6,8; 200mM 1,4 Dithiothreitol; 4% SDS (w/v); 0,2% Bromphenolblau; 20% Glyzerol (v/v); H_2O

3.2.2.4 Der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

Der ELISA als Nachweismethode ermöglicht mit geringem Aufwand die Testung eines hohen Probendurchsatzes durch die antikörpervermittelte Detektion eines martixgebundenen Antigenes. Unterschieden hierbei werden der klassische, indirekte ELISA und die spezifische Immobilisierung eines Antigenes durch den *capture* ELISA.

3.2.2.4.1 Antigennachweis im indirekten ELISA

Im indirekten ELISA wird ein Zielantigen in einer Konzentration von 500ng /ml zur direkten Bindung an die, zur Proteinhaftung optimierte Plastikoberfläche in einer 96well ELISA-Platte (Maxisorb^{tm}, Nunc) in PBS-BSA über Nacht bei 4° C inkubiert.

Die Beimengung von BSA minimiert hierbei die Scherkräfte der bindenden Plattenoberfläche auf das Zielantigen und unterstützt somit den Erhalt einer nativen Faltung des Proteinantigenes.
Nach Abschluss des „*coatings*“ wird ungebundenes Antigen durch das 3x Waschen mit PBS-T eliminiert. Analog zu beschriebenen Immunoassays wird die Oberfläche der Platten durch Inkubation für 1h bei RT mit Bockierungspuffer durch unspezifisches Protein abgesättigt. Nach 3x Waschen mit 200 μl PBS-T erfolgt die Detektion des Antigenes für 1h bei RT durch Antikörper z.B. aus verdünnten Immunseren, Hybridomüberständen oder gereinigten AK-Präparationen. Erneutes 3x Waschen des Ansatzes entfernt ungebundenen AK und erlaubt den Nachweis der gebundenen prim. AK durch Inkubation mit speziesspezifischem, HRP-konjugiertem sek. AK für 1h bei RT. Der finale Waschvorgang wird mit 5x Spülung durch PBS-T durchgeführt, um restlos ungebundene Immunglobuline zu eliminieren. Für quantitative Aussagen über die Menge an gebundenem Antigen erfolgt der kolorimetrische Nachweis einer stabilen Antikörperbindung durch die Zugabe von 50 μl o-Phenylenediamine in PBS (1mg /ml in PBS, pH 6,0, H_2O_2) für 30 min bei RT. Der Substratumsatz durch HRP kann nach Abschluss der Reaktion in einem ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 495/620 nm ausgelesen werden.

Tab.18: Puffer und Reagenzien für den Antigennachweis im indirekten ELISA

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
PBS-BSA	PBS; 0,1ng/ml BSA
PBS-T	PBS; 0,1% Tween 20 (v/v)
Blockingpuffer	1% Magermilchpulver (w/v) in PBS; 0,1% Tween 20 (v/v)
OPD- H_2O_2-Substrat	1mg /ml OPD in PBS, pH 6.0; 9µl H_2O_2 (40%)

3.2.2.4.2 Antigennachweis im *capture* ELISA (*antigen trapping*)

Das Prinzip des *capture* ELISA entspricht im Wesentlichen dem des direkten oder indirekten ELISA. Diese Form des Assays wird verwendet, wenn ein Antigen nicht effizient direkt an die Kavitätenmatrix gebunden werden kann, oder die Deformation der Antigenstruktur eine anschließende Erkennung verhindert. In diesen Fällen erfolgt das *coating* mit 50 µl der Verdünnung eines Antigen- oder Tag-spezifischen *capture*-Antikörpers (10 μg/ml in PBS) ÜN bei 4° C. Nach 3x Waschen schließt sich nachfolgend die Immobilisierung des Antigenes für 2h bei RT an. Der verbleibende Ablauf entspricht dem beschriebenen Vorgehen beim indirekten ELISA.

3.2.2.4.3 Antigennachweis im *capture* ELISA mit Präinkubation

Im Zuge des Antigentrappings mit polyklonalen Immunseren kann es zur Blockierung von Epitopen durch das *capture*-Serum kommen, die die Effizienz der sukzessiven Erkennung des Antigenes durch den Detektionsantikörper verringert oder vollständig verhindert. In diesem Fall erfolgt die Detektion des ungebundenen Antigenes in Lösung, durch die einstündige Präinkubation mit einer Verdünnung des Detektionsantikörpers als Vorstufe des Antigentrappings. Der übrige Vorgang der Detektion entspricht dem Vorgang des *capture* ELISA.

3.2.2.4.4 Quantifizierung von VLP-Produktion durch p24- *capture* ELISA

Um eine Evaluation der Produktion von HIV- artigen *„virus like particles"* zu erlauben wurde eine spezielle Form des *„antigen trapping"*-Assays eingesetzt. Zum Nachweis von enthaltenen VLP in Zellkulturpräparationen oder Pellets nach Ultrazentrifugation wurden 100 μl Aliquots der Proben für 10 min bei RT mit Inaktivierungslösung behandelt, um die Partikel zu inaktivieren und die Membran der umhüllten VLP durch Mizellenbildung zu zerstören. Parallel wurden die mit Anti-Gag-AK (α-HIV; Ag3 1:100) beschichteten Maxisorbplatten unter Einsatz von Blockierungspuffer für 1h bei RT blockiert. Die folgenden Schritte des Waschens, der Antigenimmobilisierung und Detektion erfolgten wie zuvor für den *capture* ELISA beschrieben. Zum Nachweis der Partikel wurde polyklonales anti-HIV-Poolserum in einer 1:1000-Verdünnung und als sek. AK ein anti-humaner-IgG-spez., HRP-konjugierter AK 1:2500 eingesetzt.

Tab.19: Puffer und Reagenzien für die Virusantigenquantifizierung via p24-ELISA

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Inaktivierungslösung	0,2% Triton X 100 in PBS

3.2.2.5 Präparation von Probenmaterial für die Elektronenmikroskopie

Zur Bearbeitung des zu analysierenden Probenmaterials für bildgebende Verfahren mussten in Abhängigkeit der angestrebten Mikroskopiemethode unterschiedliche Verfahren zur Probenaufbereitung angewandt werden.

3.2.2.5.1 Einbettung und Kontrastierung für die Transmissionselektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten

Zu präparierende Zellen wurden vorsichtig von Kulturoberflächen abgelöst und in Fixans (2,5M GA) über Nacht bei 4° C fixiert. Nach Fixierung wurden die Zellen bei 14.000 rpm pelletiert und mit 0,05 M HEPES gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 3% Agarose aufgenommen und nach dem Aushärten der Gelmatrix in Würfel von 1 mm Kantenlänge aufgeteilt. In einer Alkoholreihe mit aufsteigender Ethanolkonzentration (30%, 50%, 70%, 95%) wurden die Proben entwässert, in Propylenoxyd eingebettet und durch Uranylacetat kontrastiert. Aus den Harzblöcken wurden nach „Trimmen“ und „Justieren“ der Präparate, mit einem Ultramikrotom, Dünnschnitte mit einer Schnittdicke von 50-70 nm hergestellt. Diese Präparate konnten nach dem Aufbringen auf Kupferträger elektronenmikroskopisch im TEM untersucht werden.

3.2.2.5.2 Präparation von Zellen für die Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zu analysierende Zellen wurden durch den Einsatz von 2,5% Paraformaldehyd in PBS, für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Areale von Interesse wurden mittels eines Skalpells ausgeschnitten und mit dem Kunststoffboden des Kulturgefäßes auf einen Trägerstift aufgeklebt. Um schädigende Effekte der Oberflächenspannung bei Trocknung der Probe zu verhindern wurde die Methode der Kritischen-Punkt-Trocknung eingesetzt (H_2O / CO_2). Die so vorbereiteten Proben wurden mit einem Goldfilm beglimmt und durch Rasterelektronenmikroskopie analysiert.

3.2.2.6 Korrelative Mikroskopie durch Probentransfer von cLSM zu REM

Bei der korrelativen Mikroskopie wurden die zu analysierenden Zellen in *μ-dishes* der Ibidi GmbH (Madison, USA) kultiviert und durch 2,5 % PFA in PBS fixiert. Nach konfokaler Mikroskopie der Präparate wurden die Schalen wie zuvor beschrieben für die REM präpariert und im REM mikroskopiert. Durch das Koordinatenraster der *μ-dishes* konnte eine Korrelation der cLSM und REM-Aufnahmen erreicht werden.

3.2.2.7 Affinitätsmessung durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Die Bestimmung der Antikörper-/ Antigenaffinität wurde über die Methode der SPR-Spektroskopie *(surface plasmon resonance spectroscopy)* ermittelt. Hierbei wird nach dem Durchleuchten eines Prismas mit transversal-magnetisch polarisiertem Licht über die Totalreflektion an einer Goldschicht der Reflektionswinkel bestimmt.
Bei Anheftung des Analyten an die Oberfläche eines mit einer Dextranmatrix beschichteten Glaschips ändert sich die Schichtdicke der Oberfläche und somit das Resonanzverhalten der Plasmaschwingung der Goldschicht. Somit kann in Echtzeit über die Wandlung des Reflektionswinkels die Veränderung der Schichtdicke und somit die Interaktion zwischen Oberfläche (Antikörper) und Analyt dokumentiert werden.
Die SPR-Messungen wurden mit einem X-100 Biacore-Gerät der Firma GE-Healthcare GmbH (Freiburg, DBR) durchgeführt. Zur Messung der Interaktion zwischen verschiedenen Antikörpern und Analyt (BoNT) wurden auf der Dextranmatrix des CM5-Chips speziesspezifische Antikörper (α-Maus) mittels eines Maus-Capture-Kits (#BR-1008-38, GE Healthcare) immobilisiert.
Im Zuge der Messzyklen wurden Verdünnungen der monoklonalen Antikörper (2.5, 5 oder 10μg/ml) bei einer Flussrate von 30μl/ Min. über den Chip geführt und durch den Fängerantikörper immobilisiert und mit verschiedenen Konzentrationen des Analyts überspült (100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM, 6.25nM, 0nM) und nachfolgend eluiert. Kalkulation der Kinetiken und *fitting* der Bindemodelle erfolgte in Bezug auf die naive Referenzzelle des CM5-Chips. Durchführung der Messungen und Zusammensetzungen der gerätespezifischen Puffer erfolgte nach Vorgaben des Herstellers GE-Healthcare GmbH.

3.2.3 Zellkultur/ Virologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung und Zellkulturerhalt für immortalisierte Zelllinien

Zur Expandierung und konstanten Verfügbarkeit von Zellen für Transfektion und Infektionsansätze wurden adhärente Zellen verschiedener Zelllinien (HEK-293T, HUH-7, VERO-E6) bei 37° C und 98% Luftfeuchtigkeit unter Pufferung durch 5% CO_2 -Begasung kultiviert. Der Zustand der Kultur wurde täglich mikroskopisch auf Viabilität, Adhärenz, Konfluenz und mögliche Hinweise auf Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze überwacht.

3.2.3.2 Kultur von adhärenten Zelllinien

Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurde die Kultur i.d.R. alle 3 Tage umgesetzt. Hierzu wurde der Überstand der Kulturen entfernt, die Kultur 2x mit 10 ml PBS gespült und im Anschluss mit 2 ml Trypsin/ EDTA überdeckt. Nach dem vollständigen Benetzen der Kultur mit der Protease-Lsg. wurde der Überstand entfernt und die Kultur bis zum visuell observierbaren Verlust der Adhärenz geschwenkt. Verbleibende Zellansammlungen wurden nun mit 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium abgespült und vorsichtig homogen resuspendiert.
Je nach Rate der Zellteilung der Kultur wurde die Zellsuspension 1:5 bis 1:10 auf eine Konfluenz von 10-20% verdünnt, um ein optimales Wachstum der Kultur zu sichern.

3.2.3.3 Kultur von Suspensionszelllinien

Suspensionszellen wurden zum optimalen Zellwachstum bei einer Dichte von 1,5-3 x 10^5 Zellen /ml kultiviert. Bei Überschreitung der idealen Konzentration wurde die Kultur durch vorsichtiges Resuspendieren vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, in 50 ml Falconröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 900 g für 6 min pelletiert. Der weitestgehend zellfreie Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet mit einer entsprechenden Menge Medium auf 1-1,5 x 10^5 Zellen /ml konzentriert.

3.2.3.4 Einfrieren von eukaryontischen Zellen zur dauerhaften Lagerung

Für eine dauerhafte Aufbewahrung lebensfähiger Zellen wurden Aliquots von Kulturen bei optimalem Wachstum bei 900 g für 5 min durch Zentrifugation pelletiert und von Überstand befreit. Um die Bildung von schädlicher Eiskristallisation zu mindern, wurden die pelletierten Zellen in Einfriermedium resuspendiert, in 2 ml Kryoröhrchen überimpft und bei -80° C für 24 h gelagert. Die Verwendung eines mit 100% Isoproylalkohol gefüllten Kryocontainers („Mr.Frosty“, Nalgene) stellt hierbei sicher, dass die Abkühlung der Kultur eine Rate von 1° C / min nicht überschreitet. Nach Abschluss des Einfriervorgangs werden die gefrorenen Aliquots in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff überführt, wo die Proben bei einer Temperatur in der Stickstoffgasphase bei -178° C dauerhaft stabil bleiben.

Tab.20: Reagenz zur dauerhaften Stickstofflagerung von Zellkulturzelllinien

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Einfriermedium	10% DMSO in FKS

3.2.3.5 Auftauen von stickstoffgelagerten Zellproben

Für die Kultivierung wurden eingefrorene Zellen aus dem Stickstoff entfernt und umgehend im Wasserbad bei 37° C aufgewärmt. Sobald die Probe aufgetaut war wurden sie in 10 ml PBS verdünnt und resuspendiert um das enthaltene zytotoxische DMSO zu entfernen. Das durch die Zentrifugation bei 900 g für 5 min erzeugt Pellet wurde nach Verwurf des Überstandes in frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und bei 37° C wie zuvor beschrieben kultiviert.

3.2.3.6 Transfektion von eukaryontischen Zellen zur Expression von plasmidkodierten Genen

Um die Expression von synthetischen Genen oder Klonierungskonstrukten in Zellkultur zu erreichen, wurden eukaryontische Zellen unterschiedlichen Ursprungs mit Plasmid-DNA transfiziert. Bei dieser Methode werden definierte Konzentrationen von Plasmid-DNA in Kalziumkristalle oder Dendrimerstrukturen eingebettet und von Zellen aufgenommen. Die rezipierenden Zellen beginnen ähnlich wie bei einer Virusinfektion die, i.d.R. durch einen viralen Promotor gesteuerte Expression der kodierten Gene.

3.2.3.7 Transfektion mittels Ca_2PO_4-Methode

Bei der Ca_2PO_4-Methode werden 15 - 30 μg DNA in 450 μl H_2O verdünnt, mit 50μl 2,5 M $CaCl_2$ versetzt und durch Vortexen gemischt. Bei langsamem Vortexen (Stufe 3-4) von 500 μl 2x HBS-Puffer werden mittels einer Pipette einzelne Tropfen des DNA-Gemisches in den Puffer eingebracht, um eine Bildung von feinen Kalziumsalzkristallen zu erreichen, die leicht durch die zu transfizierenden Zellen aufgenommen werden können. Durch eine Inkubation des Ansatzes für 45 min bei RT wurde die Kristallisation abgeschlossen. Zur homogenen Verteilung wurde der Transfektionsansatz gevortext und vorsichtig auf 2,4 x 10^6 Zielzellen in Ø=10 cm Zellkulturschalen pipettiert.
Da die Kultivierung von Zellen mit Ca_2PO_4 zu zytotoxischen Effekten führen kann, wurden überschüssige Kristalle durch einen Wechsel des Zellkulturüberstandes nach 6-12 h entfernt.

Tab.21: Puffer und Reagenzien für die Ca_2PO_4-Transfektion von eukaryontischen Zellen

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
HEPES gepufferte Saline	50mM Hepes; 280mM $NaCl_2$; 1,5mM Na_2HPO_4; ad. H_2O
$CaCl_2$	2,5M $CaCl_2$; 1mM Tris, pH 7,5; 0,1 mM EDTA; ad H_2O

3.2.3.8 Chemische Lyse eukaryontischer Zellen

Zur Gewinnung von rekombinant hergestellten Proteinen aus Lysaten transfizierter Zellen wurden 12-48h nach Transfektion die Überstände transfizierter Zellen abgenommen und diese 2x mit PBS überspült. Je nach Größe des Ansatzes wurden die Zellen mit 100-400 µl Lysepuffer (enthält Protease-Inhibitor) überschichtet und für 15 min bei 0° C auf Eis inkubiert.
Nach vollständiger Lyse der Zellen wurden verbleibende Zellreste mit einem sterilen Zellschaber abgelöst, mit dem Überstand an Lysepuffer in Eppendorfgefäße überführt und bei 4° C für 10 min bei 5000g zentrifugiert, um Zelltrümmer aus dem Überstand zu sedimentieren. Die zellfreien Proteinüberstände wurden in ein neues Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei -24° C gelagert.

Tab.22: Puffer und Reagenzien zur Lyse von eukaryontischen Zellen

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Zelllysepuffer	140mM $NaCl_2$; 5mM $MgCl_2$, 20mM Tris pH 7,6; 1% Triton X 100; ad H_2O

3.2.4 Reinigung von Fusionsproteinen und Antikörpern aus Zellkulturüberständen

Die Aufreinigung von Fusionsproteinen aus filoviralem Gp und humanem IgG-Fc erfolgte mittels Affinitätschromatographie durch eine Protein G-Säule aus Protein G gekoppelter kolloidaler Agarose. Protein G ist in der Zellwand der Familie der *Strepptococcaceae* verbreitet und in der Lage Serumproteine und insbesondere die Fc-Abschnitte der Antikörper verschiedener Spezies zu binden.
Für die Aufreinigung von Fusionsprotein wurden proteinhaltige Zellkulturüberstände mit Proteaseinhibitoren versetzt und ÜN bei 4° C in Dialyseschläuchen (MWCO 12 kDa) mit Bindepuffer dialysiert. Parallel wurde das Säulenmaterial (5 ml) mit Bindepuffer äquilibriert. Nach dreimaligem Wechsel des Bindepuffers im Dialyseansatz wurden die Überstände unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe, mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min, durch das Säulenmaterial gepumpt und so das enthaltene Protein gebunden. Bei großen Volumina wurde der Überstand über Nacht mehrfach zirkuliert, um eine optimale Bindung zu erreichen. Nachfolgend wurde das Säulenmaterial mit 50ml Bindepuffer gespült und von ungebundenem Protein befreit. In Vorbereitung der Elution wurden 12-30 vorbereitete Probengefäße jeweils mit 200 μl Neutralisationspuffer versetzt. Die Rückgewinnung des Proteins erfolgte durch die Überschichtung des Säulenmateriales mit Elutionspuffer. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde der Durchfluss des Elutionspuffers in Fraktionen aufgefangen und durch den vorgelegten Puffer neutralisiert. Die Bewertung des relativen Proteingehaltes, und somit des Erfolges der Elution, erfolgte im Anschluss durch die quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.

Tab.23: Puffer und Reagenzien zur Aufreinigung von Antikörpern und Proteinen mittels Protein A/G- Sepharose

Reagenzienbezeichnung	Rezeptur
Bindepuffer	20mM Natriumphosphat pH 7,0
Elutionspuffer	0,1M Glycinpuffer pH 2,7
Neutralisationspuffer	Neutralisation 1M Tris, pH 9,0

3.2.4.1 Aufreinigung und Konzentrierung von Antikörpern aus Hybridomüberständen

Für die Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen wurden Hybridome auf einen Maßstab von 700 ml Zellkulturmedium in 4-6 150 cm^2 Kulturflaschen expandiert und bis zum Absterben von 80% der Hybridome kultiviert. Die resultierenden Überstände wurden durch zweimalige Zentrifugation für 6 min bei 900 g geklärt und bei einer Porengröße von Ø 0,2 μm sterilfiltriert und mit Bindepuffer auf 1L aufgefüllt. Die Aufreinigung wurde mittels FPLC an einer ÄKTA-Anlage nach Herstellerangaben über eine 5ml Hitrap-MabSelect-SuRe-Säule der Firma GE Healthcare GmbH (Freiburg, DBR) erreicht.
Für die Aufreinigung von IgM-Isotypen wurde analog mit einer Protein L-Säule der Firma Thermo Scientific (Rockfort, USA) verfahren. Die gewonnenen Antikörperkonzentrate wurden nach Neutralisation gegen PBS dialysiert und nach Konzentrationsbestimmung in Aliquots bei -80° C dauerhaft gelagert.

3.2.4.2 Biotinylierung von Proteinen

Die Biotinylierung von Proteinen wurde durch den Einsatz des EZ-Link Sulfo-NHS-LC Biotin-Kits der Firma Thermo Scientific (Rockfort, USA) nach Herstellerangaben erreicht.

3.2.5 Pseudotypisierung & Herstellung von „*virus like particles*“

Um die Funktionsfähigkeit der erzeugten filoviralen Glykoproteine validieren zu können, wurden nach einem Tronolabprotokoll infektiöse „single round“-Viren in Zellkultur erzeugt. Hierzu wurden lentivirale „*second generation*“-Pseudotypisierungssysteme verwendet. Bei Kotransfektion der Plasmide psPax2, pWPXL (oder pSIvec1envLuc & pCMV-Rev im Fall von SHIV-Luziferase), welche für notwendige Strukturproteine und Reporterminigenome unter Deletion akzessorischer Gene kodieren , wurden zusätzlich filovirale Glykoproteine als viraler envelope eingesetzt. So erzeugte VLP induzierten eine Expression von GFP oder *firefly*-Luziferase nach Infektion von Zielzellen, wobei die Penetration der Empfängerzelle durch das filovirale Gp vermittelt wurde. 48 und 72h nach Transfektion wurden die Überstände transfizierter Zellen abgenommen, bei 4° C mit 5000 g für 10 min zentrifugiert, sterilfiltriert (Ø=0,2 μm) und in 600 μl Aliquots bei

-80° C eingefroren. Um eine Normalisierung der Partikelmenge zu erreichen, wurden die Proben via p24-ELISA ausgewertet und entsprechend vergleichbarer Gag-Mengen für Infektionen eingesetzt. Die Quantifizierung der Reportergenexpression erfolgte entsprechend dem verwendeten Reportersystem 72h nach Infektion durch Analyse im FACS oder Luminometer.

3.2.5.1 Ultrazentrifugation von Kulturüberständen zur Sedimentierung von VLP

Eine Analyse von gezüchteten Viruspartikeln, z.B. im Westernblot oder in der Immunopräzipitation, macht es erforderlich, die generierten Partikel durch eine Ultrazentrifugation anzureichern. Um die erforderliche Konzentration zu erzielen, wurden sterilfiltrierte Kulturüberstände mit 10μl Nanogoldpartikeln über ein 20%iges Sukrosekissen geschichtet und durch Zentrifugation bei 4° C mit 32000rpm für drei Stunden pelletiert. Das Sukrosekissen stellte hierbei eine Barriere für Zelltrümmer und größere Medienbestandteile dar. Das durch Goldpartikel sichtbare, „reine“ Viruspellet konnte nach dem Abgießen des Überstandes in 100 μl 0,05 M HEPES aufgenommen und in 20 μl Aliquots bei -24° C gelagert werden.

3.2.5.2 Infektionsversuche mit pseudotypisierten Reporterviren

Zur Infektion von Zellen mit Reporter-VLP wurden 6 x 10^5 Zellen (HEK-293T) in 6well-Zellkulturplatten ausgesät und für 12h bei 37° C kultiviert. Die Infektion erfolgte im Anschluss durch normalisierte Mengen VLP unter Zugabe von 8 μg/ml Polybren. 6 - 12 Stunden nach Infektion wurde der Überstand der infizierten Zellen entfernt und durch Zellkulturmedium substituiert. Eine Auswertung erfolgte 72 h nach Infektion.

3.2.5.3 Antikörpervermittelte Neutralisation von Reporterviren

Zur Neutralisation von VLP wurden Aliquots von UZ-Pellets der Kulturüberstände von VLP-produzierenden Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von monoklonalen Antikörpern versetzt und für 1h bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurde eine Infektion von permissiven HEK-293T wie beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der Infektionsraten wurde nach dem Protokoll des Luziferase Assay Systems der Firma Promega Co (Madison, USA) verfahren. Die Rate der Luziferaseexpression wurde über ein Mikroplattenluminometer bestimmt.

3.2.6 Immunisierungen

3.2.6.1 DNA-Immunisierung durch die Gene Gun

Zur Verabreichung von kodierenden Nukleinsäuren im Zuge der DNA-Immunisierung wurden Munitionsschläuche in das Magazin der Helios Gene Gun® eingesetzt und in die Apparatur der Gene Gun eingespannt. Um die Gene Gun in Betrieb zu nehmen, wurde eine 9 Volt Blockbatterie in die Gene Gun eingesetzt und die Apparatur an eine Helium Druckgasflasche der Reinheitsstufe N5.0 angeschlossen. Mittels eines Druckreglers wurde der Helium Arbeitsdruck auf konstante 200psi eingepegelt.
Vor der Verabreichung des DNA-Immunogens wurde das zu behandelnde abdominale Areal des Versuchstiers von Fell oder Federflaum, durch Rasieren oder Zupfen befreit, um einen ungehinderten Eintritt der Goldpartikel in die Epidermis zu ermöglichen.
Zur Immunisierung wurde die Mündung der Gene Gun mit dem verbundenen Abstandshalter auf die Haut des Versuchtiers aufgesetzt und ein Gasimpuls ausgelöst. Je nach Versuchstier wurden unterschiedliche Mengen an DNA zur Immunisierung eingesetzt. Bei Mäusen (NMRI, Balb/c) wurden 0,2-2 µg Vektor-DNA pro Tier eingesetzt, Hühner erhielten 4 µg DNA.

3.2.6.2 Verabreichung von Proteinantigen

Proteinantigen wurde in gereinigter Form in PBS 1:1 mit inkomplettem Freund-Adjuvant zu einer viskosen Emulsion vermischt und intraperitoneal verabreicht. Bei Mäusen wurde eine Dosis von 150µg Proteinantigen eingesetzt.

3.2.7 Hybridomproduktion: Fusion von Spleenozyten mit Myelomzellen

Die dauerhafte Gewinnung von Antikörpern aus den B-Zellen immunisierter Versuchstiere erfordert eine Immortalisierung Antikörper-sezernierender Lymphozyten. Der Vorgang der Hybridomfusion sieht vor, die in einem kruden Extrakt von Spleenozyten enthaltenen B-Lymphocyten mit uneingeschränkt teilungsfähigen Myelomzellen *in vitro* zu verschmelzen, um sogenannte

autopolyploide Hybridome zu erhalten. Diese zu Beginn mehrkernigen Zellen weisen im idealen Fall eine Produktion des zu sezernierenden Antikörpers auf und sind durch die maligne Entartung der Myelomzellen von Einschränkungen der zellulären Proliferationsregulation befreit.

3.2.7.1 Extraktion von Spleenozyten nach Milzentnahme aus Versuchstieren

Für die Fusion wurde die Milz des immunisierten Versuchstieres nach zu verzeichnender signifikanter Titerentwicklung entnommen, von Fett befreit und in antibiotikahaltiges PBS überführt.
Zur Extraktion der Milzzellen wurde das Organ in eine sterile 10cm-Schale gelegt und die Kapsel endständig mit einer Organschere geöffnet. Das schonende Auslösen der Spleenozyten erfolgte durch die Spülung des Organes vom intakten Ende der Milz mittels einer Spritze und dem Einstechen einer Kanüle. Nach erfolgter Spülung wurde der Rest der Milz zerteilt, durch ein Organsieb homogenisiert und in ein Falcon-Gefäß überführt. Nach Sedimentation des Zellextraktes durch Zentrifugation bei 380 g für 8 min wurde das Pellet erneut in PBS-P/S aufgenommen und durch ein Feinsieb (Ø=70 μm) gefiltert, um größere Organbestandteile zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, der Milzextrakt mit Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 4 min bei RT inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Ansatz mit 36 ml PBS- P/S verdünnt, erneut gefiltert (Ø=70 μm) und zentrifugiert. Die isolierten Spleenozyten wurden in 20 ml RPMI-Medium vorsichtig aufgenommen und bis zur Verwendung bei 37° C inkubiert.

3.2.7.2 Präparation von kultivierten Myelomzellen zum Fusionseinsatz

In Vorbereitung der Fusion wurden Myelomzellen der Linie p3x63Ag8.653 in Kultur genommen und antibiotikafrei in R20F--Medium auf eine Zellzahl von 1 x 10^8 expandiert. Hierbei wurde auf einen optimalen Zustand der Kultur und täglichen Medienwechsel mit einer Suspensionszellkonzentration von 1,5 - 3 x 10^5 P3x /ml Medium Wert gelegt. Am Tag der Fusion wurden die Zellen gepoolt, bei 380 g für 8 min bei RT pelletiert und zweimalig in serumfreiem RPMI 1640 gewaschen. Das in 30ml RPMI-Medium gelöste Zellpellet wurde bis zur Verwendung bei 37° C inkubiert.

3.2.7.3 Präparation von „*feeder*“-Zellen aus Thymusgewebe

Bei starker Vereinzelung der Hybridomklone war es intitial wichtig, Feederzellen als Zytokin- und Wachtumsfaktorspender mit den Hybridomen ko zu kultivieren. Hierfür wurden die Thymi von vier, 8-12 Wochen alten Versuchstieren entnommen und über ein Organsieb in PBS- P/S homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 380g für 8 min wurden die Thymuszellen in R10F--Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 x 10^5 Zellen /ml in R10F- verdünnt.

3.2.7.4 Die Hybridom-Fusionsreaktion

Die Anzahl der isolierten Spleenozyten wurde per Zellkammersystem ermittelt und durch Myelomzellen angereichert. Das Verhältnis von Spleenozyten zu Myelomen sollte im idealen Fall 2:1 betragen. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und bei 380 g für 8 min pelletiert. Der Überstand des Pellets wurde durch Absaugen entfernt und unter Drehung durch „Anschnipsen“ gelöst.
Je 1x10^8 eingesetzter Spleenozyten wurden tropfenweise 1000 μl Polyethylenglykol unter Schwenken im 37° C -Wasserbad bei einer Tropfrate von 15 μl/ Sek. zugeführt. Das PEG verdrängt hierbei die wässrige Phase zwischen den pelletierten Zellen und begünstigt dadurch eine spontane Verschmelzung von benachbarten Zellen.
Im direkten Anschluss wurden unter den selben Bedingungen, mit einer identischen Tropfrate, 4ml RPMI 1640 je 1x10^8 zum Fusionsansatz getropft, um das PEG zu verdünnen und die fusionierten Hydridome in Lösung zu stabilisieren.
Weiterhin unter Schwenken im Wasserbad wurden zusätzliche 10ml RPMI zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 37° C in Bewegung gehalten.
Nach dem Verstreichen der 5 min wurde der Reaktionsansatz bei 500g für 5 min zentrifugiert und das Pellet, ohne erneutes Auszählen, auf eine rechnerische Konzentration von 1x10^5 Spleenozyten /ml R20F--Medium verdünnt. Zur Selektion unfusionierter P3x-Zellen wurde dem R20F--Medium Azaserinhypoxanthin zugesetzt. Der Selektionsmarker AHT hemmt hierbei Schritte der *denovo* Purinsynthese, die P3x-Zellen aufgrund einer Mutation der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase nicht umgehen kann.
Der vollständige Ansatz der Medien-Zell-Suspension wurde in Aliquots von 200 μl/ *well* in 96well-Zellkulturplatten ausgesät und bei 37° C und 5% CO_2 für 7 Tage kultiviert.

An Tag 7 wurden 100 µl des Überstandes entfernt und 150 µl frisches R20 F- „zugefüttert“. Die Prozedur wurde an Tag 8 identisch wiederholt.

Am 10., 12. und 14. Tag nach Fusion wurden die Kavitäten der Kulturplatten visuell auf das Wachstum von Klonkolonien untersucht und markiert. 60 µl der Überstände wurden abgenommen und auf spezifisch reaktive Antikörper im ELISA getestet.

„Positive“ Klone, die identifiziert werden konnten, wurden mit 100 µl R20F- aufgefüllt und vollständig in neue Kulturgefäße überführt. Die Validierung des positiven Ergebnisses erfolgte durch einen erneuten ELISA am Folgetag.

3.2.7.5 Subklonierung von Hybridomen zur Sicherstellung der Klonalität

Um die Klonalität des Hybridomes sicherzustellen und ein Überwachsen der Kultur mit instabilen Klonen ohne AK- Produktion zu vermeiden, wurden Verdünnungen der Hybridomkultur angefertigt und plattiert. Hierfür wurden die Zellzahl der Hybridomkultur ermittelt und 5400 Zellen in 18ml R20 F- -Medium verdünnt. In 1:3 Verdünnungen wurden Suspensionen mit einer Zellzahl von 300 bis 3 Zellen / ml hergestellt und in 100 µl/*well* Aliquots in 96well Kulturplatten ausgebracht und für 7 Tage kultiviert. Analog zum beschriebenen Vorgehen wurden die subklonierten Platten an Tag 7 und 8 „gefüttert“ und an Tag 10 auf die Produktion von Antikörpern getestet.
Bei einer rechnerischen Konzentration von 0,3 - 1 Zellen pro Kavität wurden die gewachsenen Klonkolonien der unteren Verdünnungen als klonal angesehen.
Zur Sicherung der tatsächlichen Klonalität wurde vor Aufreinigung der Antikörper der ausgewählte Klon ein zweites Mal wie beschrieben subkloniert.

3.2.7.6 Entwöhnung generierter Hybridome von Wachstumszusätzen

Zur Vermeidung des kostenintensiven Einsatzes von rekombinantem IL-6 und zur Reduktion der Serumkonzentration der eingesetzten Medien wurden die generierten Hybridome schrittweise durch Verdünnung von IL-6, bei permanenter Kontrolle des Wachstums der Kultur, entwöhnt. Parallel wurde die Menge an Serum in den Kulturmedien schrittweise von 20% (v/v) auf 10% (v/v) reduziert.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung von Immunisierungvektoren zur Verabreichung von nativem, nicht toxischem BoNT-A1

Eine Induktion von Antiköpern gegen natives Toxin gestaltet sich in der Regel schwierig, da die hohe Toxizität des Giftes die Verabreichung von stark verdünnten Dosen aktiven Antigens erfordert und diese ineffizient macht. Um diesem Umstand zu begegnen, wird klassisch zur Immunisierung eine denaturierende Inaktivierung mit SDS durchgeführt. Bei dieser Art der Behandlung des Antigens muss unter Umständen in Kauf genommen werden, dass wichtige konformationsabhängige Epitope des Proteins durch die Denaturierung zerstört werden. Da das natürlich vorkommende, von *Clostridien* produzierte BoNT meist von Hüllproteinen bedeckt wird, ist es wichtig, so viele der zugänglichen Epitope wie möglich für die Antikörperinduktion zu konservieren, um die Erkennung von nativem Toxin in Detektionssystemen zu ermöglichen.

4.1.1 Inaktivierung von BoNT-A1 durch Mutation, unter Verlust der Zink Bindung

Wie durch Pier et al. 2008 beschrieben, ist es möglich, die enzymatische Aktivität der Metalloprotease BoNT-A1 durch zwei gezielte Aminosäureaustausche R363A und Y365F zu unterbinden. Durch diese Modifikation bleibt die Kristallstruktur des Proteins weitestgehend unverändert, was das so erzeugte Toxoid zum idealen Antigen macht (Pier et al., 2008, Baldwin et al., 2005). Zur Erzeugung eines BoNT-A1-Toxoid (RY-Mutation =RYM) exprimierenden Immunisierungsvektors wurde die kodierende Sequenz für BoNT-A1 *in silico* analysiert und durch die zwei beschriebenen Punktmutationen ergänzt. Die Inaktivierung wurde durch die gezielte Substitution der Aminosäuren **R**362A und **Y**365F im aktiven Zentrum des Toxins erreicht.

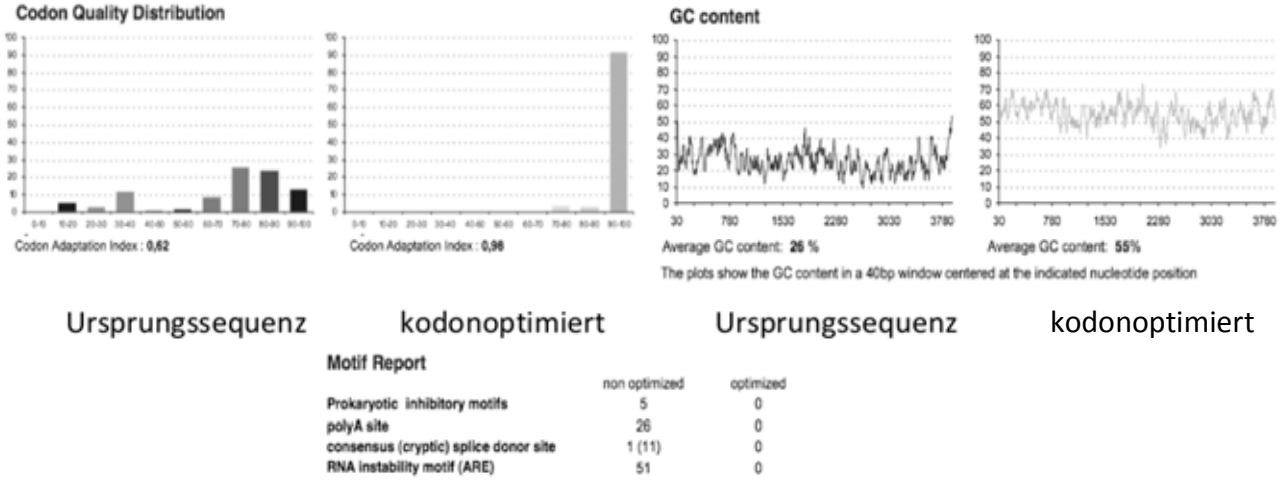


Abb.14: Übersicht der durchgeführten Kodonoptimierung des BoNT-A1-Toxoids. Links im Bild dargestellt: Nutzung der Kodons in der Ursprungssequenz mit Darstellung der Optimierung (CAI); rechts im Bild Modifikation des GC-Gehaltes von Ø 25% auf 55%; zusätzliche Angabe der Entfernung von inhibitorischen Motiven und Sequenzen der Ursprungssequenz (Analyse, Geneart GmbH).

Zur optimalen Expression der zu generierenden Sequenz wurde die Verwendung der in der Wildtypsequenz enthaltenen Kodons auf die präferenziellen Kodons, der in Säugerzellen am häufigsten vertretenen tRNAs, eingestellt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass bei der Optimierung keine unerwünschten Restriktionsschnittstellen in die Sequenz eingesetzt wurden. Durch die Modifikation konnte der *codon adaption index* (CAI) der BoNT-kodierenden Sequenz von 0,62 auf 0,98 angehoben werden. Die Expression der BoNT-Gene außerhalb von *clostridialen* Zellen wird im Allgemeinen als ineffizient und schwierig beschrieben (Yari et al., 2011). Dies ist möglicherweise eine Folge des außerordentlich niedrigen GC-Gehaltes der Nukleinsäureabfolge von 25%, welcher mutmaßlich die Halbwertszeit der transkribierten mRNA deutlich herabsetzt. Im Zuge der Optimierung wurde dieser Parameter ebenfalls auf ein für Säugerzellen optimales Verhältnis von 55% angehoben. Die so erzeugte Sequenz wurde durch die Firma Geneart AG (Regensburg, DBR) synthetisiert und in den Expressionsvektor pTH mit einem C-terminalen V5-Tag einkloniert.

Die Untersuchung der exprimierten Konstrukte nach Transfektion in HEK-293T Zellen ergab nach 24h eine deutliche, spezifische Bande auf Höhe des nicht proteolytisch prozessierten BoNT-A1-Vorläufertoxoids (150 kDa), bei Verwendung von Lysaten transfizierter Zellen im Westernblot, abgebildet in Abb.15 Spur 2. Die Spaltung des BoNT kann sowohl im *Clostridium* als auch im Organismus des

Rezipienten erfolgen und ist in geringem Maße auch in den eingesetzten Lysaten erkennbar.

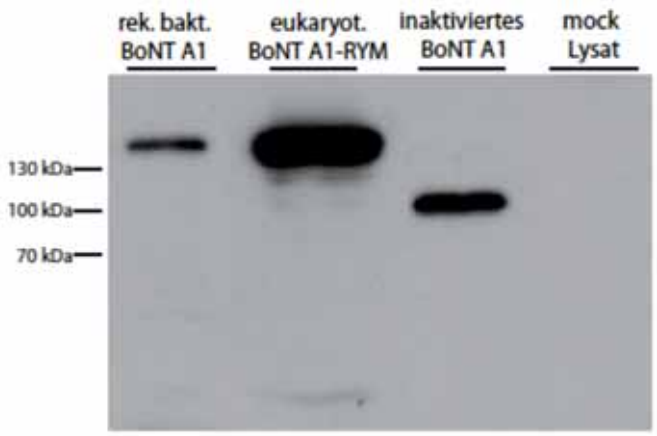


Abb.15: SDS-PAGE / Westernblot zur vergleichenden Analyse von in HEK-293T exprimiertem BoNT-A1-Toxoid (150 kDa) und kommerziellem Toxoid aus *E.coli* (150 kDa); zusätzlich abgebildet: aktives *clostridiales* BoNT-A1 in gepaltener Form (100 kDa). Kontrolllysat: zelluläres Lysat aus HEK-293T; Detektion: K47-Serum mit Erkennung der BoNT-A1-HC

Die Detektion erfolgte durch ein BoNT-reaktives, polyklonales Serum (Spezifität: schwere Kette des BoNT-A1), welches durch SDS- inaktiviertes BoNT-A1 induziert wurde. In Spur 1 der Abbildung 15 ist ebenfalls eine deutlich sichtbare Reaktion des Serums mit dem, in *Escherichia coli* erzeugten, ungespaltenen Vorläuferprotein des BoNT-A1 der Firma Toxogene GmbH (Hannover, DBR) bei 150 kDa erkennbar. Bei Einsatz der isolierten schweren Kette des denaturierten, aktiven Toxins in Spur 3 zeigt sich eine spezifische Bande bei 100 kDa (Metabiologics Inc., Madison, USA).

4.1.2 Strategien zur Steigerung der Induktion polyklonaler Antikörper in *Gallus gallus:* rekombinante Herstellung genetischer Zytokinadjuvantien

Bisher spielte die Immunisierung zur Induktion von Antikörpern in Vögeln in der Immunologie eine eher untergeordnete Rolle. Jedoch prädestiniert die Fähigkeit, große Mengen an Antikörpern in den Eidotter zu transportieren, hochleistende Legehennen zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern des Isotyps IgY. Im Fachbereich wurden bereits mit Erfolg genetische Adjuvantien wie GM-CSF in Säugetieren eingesetzt. Zur Übertragung dieser Strategie ins aviäre Tiermodell und um die Produktion von spezifischen Antikörpern im aviären System zusätzlich durch Adjuvantien stimulieren zu können, wurden durch Fusion-PCRs die

kodierenden Sequenzen für IL-1β und IFN-γ aus *Gallus gallus* in kodonoptimierter Form erzeugt.

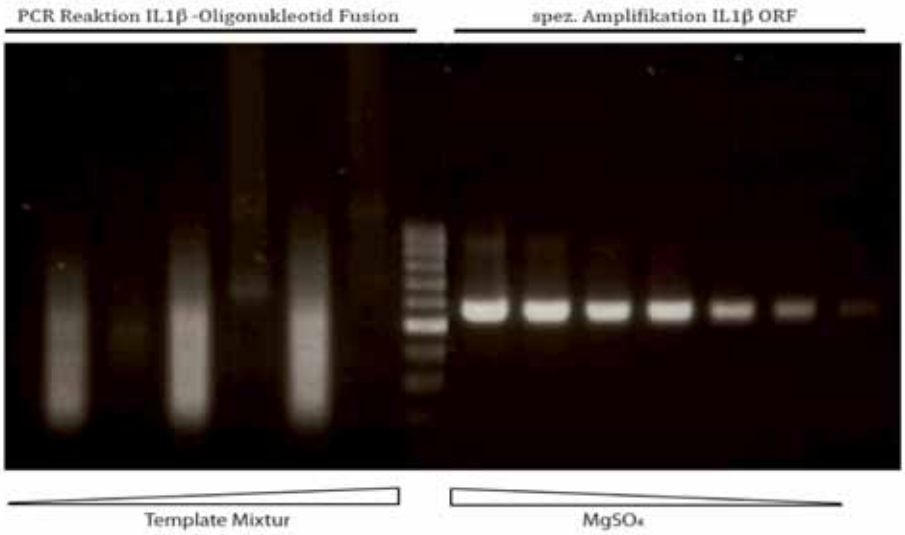


Abb.16: Agarose Gelelektrophorese (1%) von PCR-Produkten aus Fusion-PC Reaktionen zur Synthese von IL-1β. Links abgebildet: Produkte aus Fusionsreaktion unter Verwendung ansteigender Oligonokleotidprimerkonzentration. Der „Schlier“ gibt Hinweis auf Fusionsprodukte unterschiedlicher Länge. Rechts im Bild: Resultat der Amplifikation von Fusionsprodukten in Volllänge durch randständige Oligonukleotidprimer.

Nach Fusion der partiell komplementären Oligonukleotidfragmente ließen sich verbundene Nukleinsäureabschnitte im Agarosegel als Schlier nachweisen. Durch eine weitere Amplifikationsreaktion mit den randständigen Primern des Endkonstrukts ließ sich eine Vermehrung der Sequenzen in voller Länge von 1107 bp für IL-1β und 495 bp für IFN-γ erreichen. Die Synthese von IL-6 wurde durch die Firma Genescript GmbH (Regensburg, DBR) übernommen. Mit ergänzenden, flankierenden Primern in der finalen Amplifikationsrunde wurden die Sequenzen der Zytokingene zusätzlich mit Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Hind*III und *BamH*I versehen, um diese in den Expressionsvektor pTH einfügen zu können. Die Schnittstellen wurden hierbei so gewählt, dass die Konstrukte im offenen Leseraster durch einen V5-Tag ergänzt wurden.

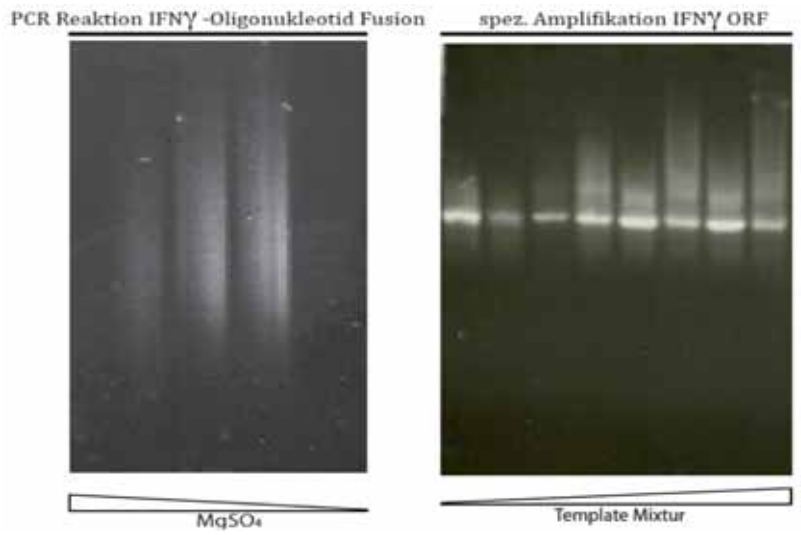


Abb.17: Agarose Gelelektrophorese (1%) von PCR-Produkten aus Fusion-PC-Reaktionen zur Synthese von IFN-γ. Links abgebildet: Produkte aus Fusionsreaktion unter Verwendung ansteigender Oligonukleotidprimerkonzentration. Rechts im Bild: Resultat der Amplifikation von Fusionsprodukten in Volllänge durch randständige Oligonukleotidprimer.

Eine nachfolgende Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation aus den Überständen von HEK-293T-Zellen, die mit den erzeugten Konstrukten transfiziert worden waren, zeigte deutlich nachweisbare Banden bei Detektion mit einem V5-reaktiven Antikörper. Die Signale der spezifischen Detektion, dargestellt in Abb.18, deckten sich exakt mit der errechneten Masse für die gewünschten Zielproteine IL-1β, IL-6 und IFN-γ. Die Negativkontrollen, unter Verwendung von mit Leervektor transfizierten Zellen, ergaben keine nachweisbare Reaktion.

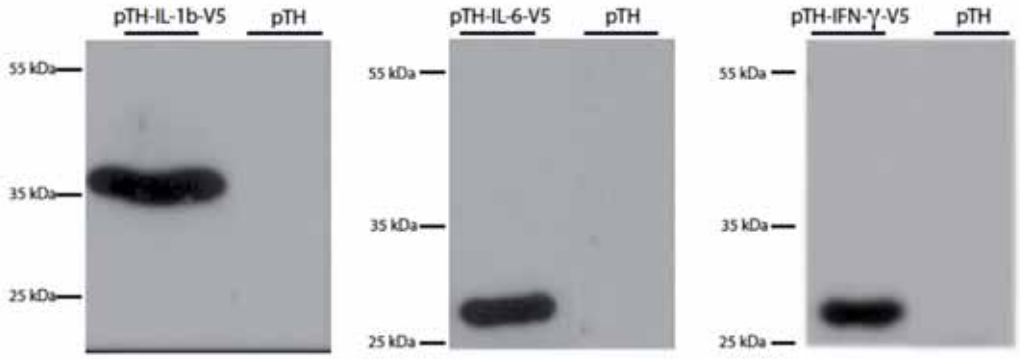


Abb.18: SDS-PAGE / Westernblot von Immunpräzipitation aus HEK-293T-Kulturüberständen. Nach Transfektion konnten IL-6, IL-1β und IFN-γ via V5-Tag nachgewiesen werden. Negativkontrolllysate: pTH-leervektor-transfizierte HEK-293T

Die Nachweisbarkeit im Überstand weist auf die erfolgreiche Sezernierung der erzeugten Peptidhormone hin, wodurch ein Einsatz der Konstrukte im Tierversuch für sinnvoll erachtet wird. Eine zusätzliche Kodonoptimierung in Bezug auf *Gallus gallus* wurde in Erwägung gezogen, jedoch aufgrund der hohen Übereinstimmung präferentieller Kodons im Vergleich zu Säugetieren nicht als sinnvoll erachtet.

4.1.3 Immunisierung von Legehennen mit erzeugten Immunisierungsvektoren für BoNT-A1 (Toxoid) und genetischen Adjuvantien

Die Induktion von spezifischen polyklonalen IgY sollte durch eine reine DNA-*prime/ boost*-Strategie erreicht werden. Die eingesetzten Gruppen von Hühnern im legefähigen Alter wurden einleitend mit DNA immunisiert und in einem Abstand von 4 Wochen mit DNA 14-mal folgeimmunisiert. Aufgrund von Limitationen der Kohortengröße durch den Umfang der Kooperation konnte keine Gruppe für die Stimulation durch IFN-γ gebildet werden. Daher wurden nur IL-6 und IL-1β zur vergleichenden Immunisierung mit nicht stimulierten Tieren eingesetzt.

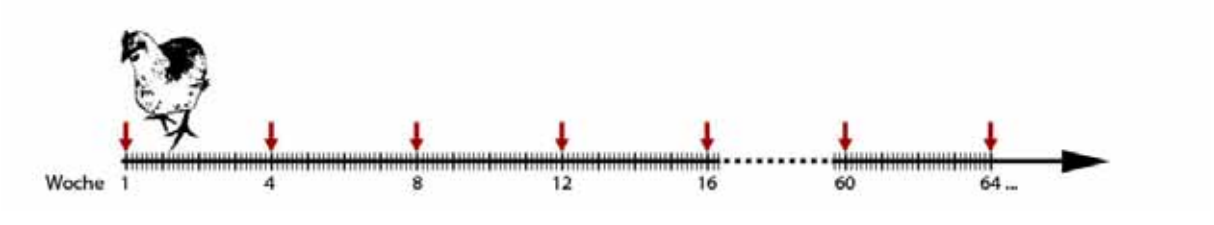


Abb.19: Darstellung des Immunisierungsschemas für die Immunisierung von Hühnern zur Induktion von BoNT- reaktivem IgY; Immunisierungen erfolgten kontinuierlich in einem Abstand von 4 Wochen

Von den täglich gesammelten Eiern erfolgte in jeder Woche eine Präparation von IgY durch eine Polyethylenglykol-Fällung (PEG), und somit über den vollständigen Verlauf der Immunisierung eine Aufzeichnung des spezifischen Titers.

Tab.25: Schema der Verabreichung von verschiedenen Adjuvant- / Antigenkombinationen.

Immunisierte Tiere	Antigen (DNA) / Adjuvant (DNA)
Huhn 96; Huhn 97	BoNT-A1-RYM; kein
Huhn 98; Huhn 99	BoNT-A1-RYM; IL-6
Huhn 100; Huhn 101	BoNT-A1-RYM; IL-1β

4.1.4 Vergleichende Entwicklung BoNT-spezifischer, polyklonaler IgY-Titer unter Verwendung genetischer Adjuvantien

Die zu beobachtende Reaktivität der extrahierten IgY zeigte deutliche Unterschiede zwischen individuellen Hühnern und den Gruppen der Versuchstiere. Die Hühner H96 und H97, welche ohne genetisches Adjuvant immunisiert wurden, zeigten eine sehr geringe Reaktivität der isolierten IgY gegen BoNT-A1 im *capture* ELISA, mit wiederkehrenden Einbrüchen des Titers unter die Nachweisgrenze.

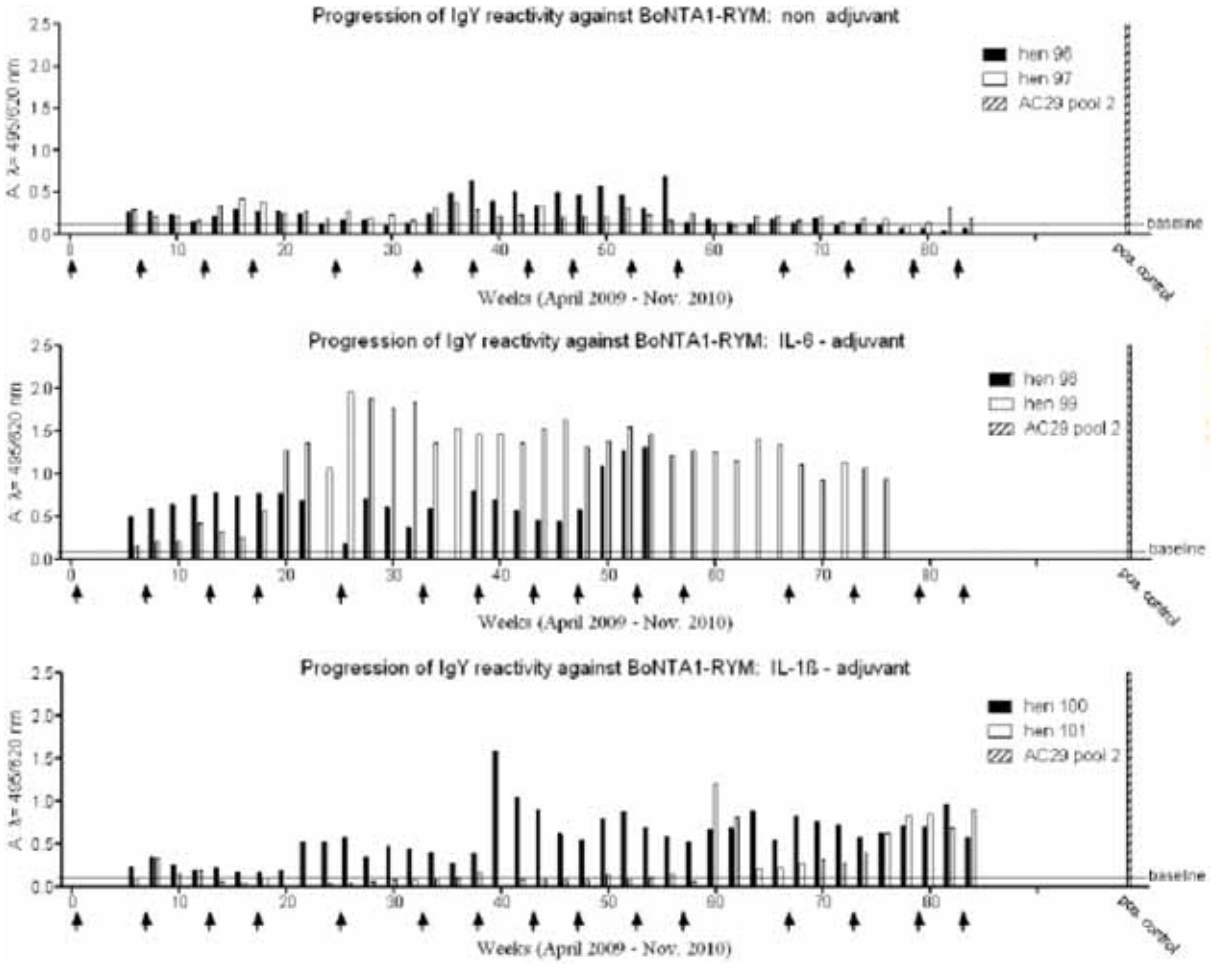


Abb.20: Darstellung des spezifischen Titerverlaufes von IgY der immunisierten Kohorten; Darstellung der Absorbtion (A) gegen den Entnahmezeitraum. Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Boosterimmunisierungen an; pos. Kontrolle: IgY-Kontrollserum AC29 = spezifisch gegen BoNT-A1, induziert durch Proteinantigen.

Im Kontrast zu diesen Beobachtungen zeigten die Hühner H98 und H99 unter Verabreichung von aviärer IL-6-DNA im *„titermonitoring“* zu Beginn einen kontinuierlichen Anstieg der Signalstärke mit einem leichten Rückgang im Verlauf der Aufzeichnung. Die Datenerhebung musste für das Versuchstier H98 in der 28.

Woche beendet werden, da das Huhn die Eiablage vollständig einstellte. Die mit IL-1β-DNA behandelten Hühner zeigten, vergleichbar mit den Kontrollhühnern ohne Adjuvant, eine späte Reaktion auf die Immunisierung mit einer signifikanten Stabilisierung der Titerreaktion nach der 5. Immunisierung. Nach einem initial starken Anstieg in der Reaktivität ließ sich ein deutlicher Rückgang unter gleichzeitiger Stabilisierung der Signalstärke beobachten. Die erreichte Reaktivität lag deutlich unterhalb der durch IL-6 induzierten Signalstärke, wies jedoch eine höhere Konstanz im Zeitverlauf der Aufzeichnung auf. Somit konnten in der Summe die IgY-Präparationen mit der höchsten Reaktivität gegen BoNT-A1 in Hühnern induziert werden, die mit IL-6 als Adjuvant behandelt wurden. Die Gruppe mit Verabreichung von IL-1β-Adjuvant zeigte im Vergleich mit IL-6 eine schwächere Reaktivität gegen BoNT-A1. Verglichen mit den Hühnern ohne Anwendung von Adjuvant, konnten in allen Kontrollgruppen erhöhte spezifische Titer nachgewiesen werden. Dies gibt Hinweis auf eine erfolgreiche Adjuvantswirkung der verwendeten Zytokine.

4.2 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen BoNT-A1 zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Parallel zur Induktion der polyklonalen Seren in Hühnern wurde die Immunisierung von Versuchstieren für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die eingesetzten Balb/c- Mäuse wurden analog zur Hühnerstudie mit kodierender DNA für BoNT-A1 (Toxoid) immunisiert und in einem Abstand von ca. 4 Wochen *„geboostet“*.

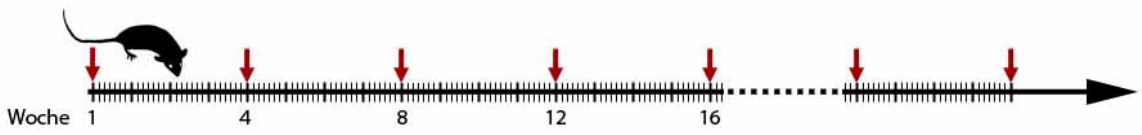


Abb.21: Darstellung des Immunisierungsschemas für die Immunisierung von Mäusen zur Induktion von BoNT-reaktivem IgG zur Vorbereitung von Hybridomfusionen; Immunisierungen erfolgten kontinuierlich in einem Abstand von 4 Wochen

Nach Abschluss der fünften Immunisierung wurde der spezifische Titer der Versuchstiere nach retrobulbärer Entnahme von 50 μl Vollblut getestet.

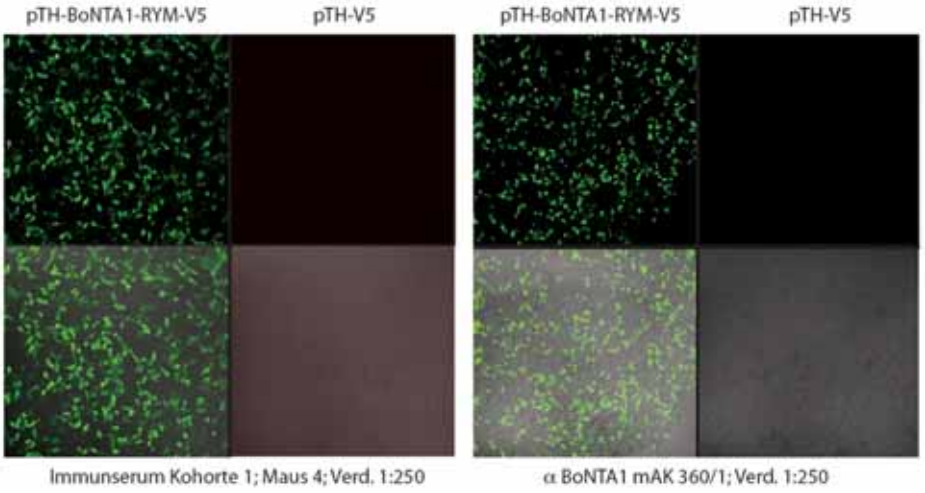


Abb.22: Mikroskopische Aufnahme der Immunfluoreszenspräparation von pTH-BoNT-A1-RYM-V5 transfizierten HEK-293T; Vergrößerung 100x; Darstellung des Fluoreszenskanals (grün, oben) und des Transmissionskanals (merge, unten). Rechts abgebildet: Präparationen nach Transfektion mit pTH Leervektor. Die linke Abbildung zeigt die Färbung unter Einsatz von Mausimmunseren; Die rechte Abbildung zeigt die Färbung unter Einsatz monoklonalen AKs 360 / 1

Der Einsatz von Hämokrit-bereinigten Seren der Versuchstiere in der Immunfluoreszenzanalyse mit pTH-BoNT-A1-RYM-V5 transfizierten HEK-293T-Zellen (Abb.22) zeigte eine deutliche spezifische Reaktion des eingesetzten Serums gegen das erzeugte Expressionskonstrukt. Im Vergleich mit einem etablierten BoNT-A1 spezifischen monoklonalen Antikörper, erzeugt durch den Einsatz SDS inaktivierten Toxins, ließ sich kein Unterschied in der spezifischen Färbung der Zellen erkennen (Pauly et al., 2009). Die weiterführende Charakterisierung durch eine Westernblotanalyse (Abb.24) gab zusätzlich Aufschluss über die Spezifität der induzierten Mausseren.

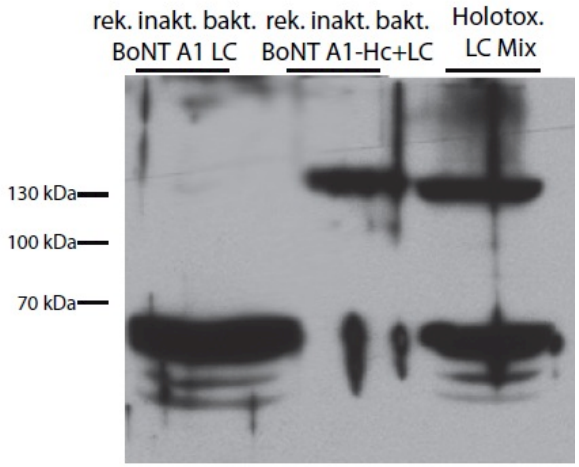


Abb.23: SDS-PAGE/ Westernblot zum Nachweis von BoNT-A1 durch induzierte Immunseren aus Balb/c; Einsatz von BoNT-A1-LC aus *E.coli* (links); *E.coli* Holotoxin (Mitte); Pool aus Holotoxin und LC (rechts)

Aufgrund des geringen Volumens der entnommenen Blutpräparationen wurde ein Pool aller verfügbaren Seren einer Mauskohorte (Gruppe 1) zum Nachweis eingesetzt. Die Detektion im Westernblot bei Auftrennung verschiedener Referenzproben: leichte Kette BoNT-A1 (RYM-Toxoid, Spur1); BoNT-A1 in Volllänge aus *E.coli* (Spur2) und einem Gemisch der zwei Präparationen (RYM-Toxoid, Spur3) zeigte einen effizienten Nachweis von Proteinbanden mit einer Masse von 50 kDa und 150 kDa. Dies entspricht präzise den zu erwartenden Massen für die leichte Kette des BoNT-A1 und dem ungespaltenen Toxin-Vorläufer von BoNT-A1.

4.2.1 Immunpräzipitation von nativem BoNT-A1 Toxoid durch induzierte Mausseren

Um sicherstellen zu können, dass die Spezifität der generierten Immunseren eine Erkennung des Antigens im Bezug auf eine native Proteinfaltung des BoNT erlaubt, wurden Immunpräzipitationen unter Einsatz des nativen Proteins in Volllänge durchgeführt und die gewonnenen Präzipitate einer Westernblot-Analyse zugeführt. In Abbildung 24 sind die Resultate der Immunfällung dargestellt. In Spur 1 war unter Einsatz des Immunserums der Kohorte 1, in Kombination mit den Lysaten mock transfizierter HEK-293T Zellen (Einsatz von Leervektor), kein Signal detektierbar. Im Gegensatz dazu ergab die Präzipitation des BoNT-A1-Toxoids in Spur 2, 3 und 4 deutliche Signale nach Detektion durch das eingesetzte BoNT-A1-spezifische Kaninchenserum (ZBS3) und dessen Sekundärantikörper.

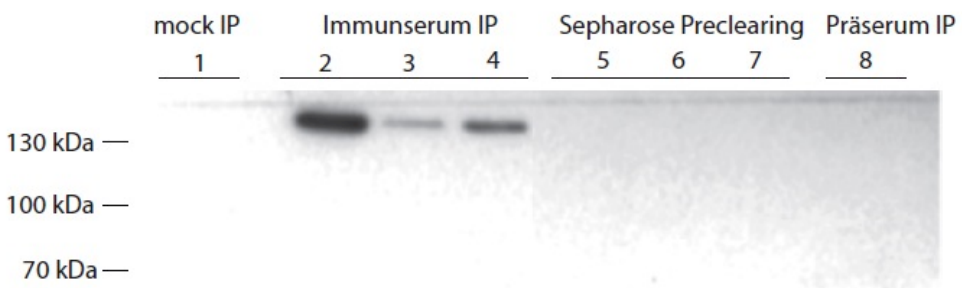


Abb.24: SDS-PAGE / Westernblot, Immunpräzipitation von BoNT-A1-Toxoid in Suspension. IP von Lysaten mit Leervektor transfizierter HEK-293T- Zellen (Spur1); Präzipitation von BoNT-A1-Toxoid mit PGS und spez. AK (mAK1688 / Spur 2; Poolserum Kohorte 1 / Spur 3; Poolserum Kohorte 2 / Spur 4); Spur 4-7 *preclearing* PGS ohne AK; Spur 8: Präzipitation PGS + gepoolte Präimmunseren.

In Spur 2 wurde der monoklonale Antikörper mAK1688 / 2 zur Fällung eingesetzt. Die Spuren 3 und 4 enthielten BoNT-Präzipitationen unter Verwendung der gepoolten Immunseren aus Mauskohorte 1 und 2. Die Gegenkontrollen unter Einsatz der Sepharose ohne Fängerantikörper (Spur 5-7) und die Verwendung von vereinten Präimmunseren der zwei Mauskohorten zeigte ebenfalls kein detektierbares Präzipitat. Durch diese Tatsache können unspezifische Reaktionen der eingesetzten Seren oder eine „Klebrigkeit“ der Affinitätsmatrix ausgeschlossen werden.

4.2.2 Fusion von BoNT-A1 reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome

Die Fusionsreaktion unter Einsatz von 6 x 10^7 extrahierten Milzzellen (nach Ausschluss von Erythrozyten) des immunisierten Versuchstiers ergab bei 4128 ausgesäten Kavitäten einen Bewuchs von 46,4% der Kulturansätze. Die Überstände dieser 1914 Zellpopulationen wurden bei ausreichender Größe (50-75% Bewuchs der Kavität) des „Klons“ in *capture* ELISAs unter Einsatz von nativem BoNT-A1 eingesetzt. Aus der Gesamtheit der getesteten Klone konnten 39 Populationen isoliert werden, die eine stabile, spezifisch reproduzierbare Antikörperproduktion gegen BoNT-A1 aufwiesen. Zur Absicherung gegen unspezifische Reaktionen der Überstände wurde zusätzlich eine Gegenselektion der Überstände gegen Nährmedium und Serumalbumin aus Rindern (BSA) vorgenommen. Aus diesem

Fundus wurden 3 Klone ausgewählt und durch sequentielle Verdünnung der Kultur auf Einzelzellniveau gebracht und in Folge vermehrt (Subklonierung).

Tab.26: Tabellarische Auflistung der Resultate der Testung der BoNT- Fusion II; Angabe der getesteten Klone pro *screening*-Runde; Isolierte spezifische Klone nach Bestätigung durch *rescreening;* Gegentestung der Klone erfolgte gegen BSA

Fusion gegen Zielantigen: BoNTA1	Screen I	Screen II	Screen III	Screen IV	gesamt
Anzahl der resultierenden Klonpopulationen	387	418	493	616	1914
Klone reaktiv gegen BoNT-A1 (IgG)	10	7	19	3	39
Gegenselektion: Klone mit Reaktivität gegen BSA	0	0	0	0	0

Die resultierenden Kulturen der vereinzelten Hybridomklone wurden nach 10 Tagen erneut optisch auf Bewuchs kontrolliert. Bei einer Abdeckung der Kavität von 50-75% mit Hybridomzellen wurden 15 Subklone ausgewählt und mittels *capture* ELISA auf die stabile und kontinuierliche Reaktivität des Kulturüberstands gegen aktives BoNT-A1 getestet.

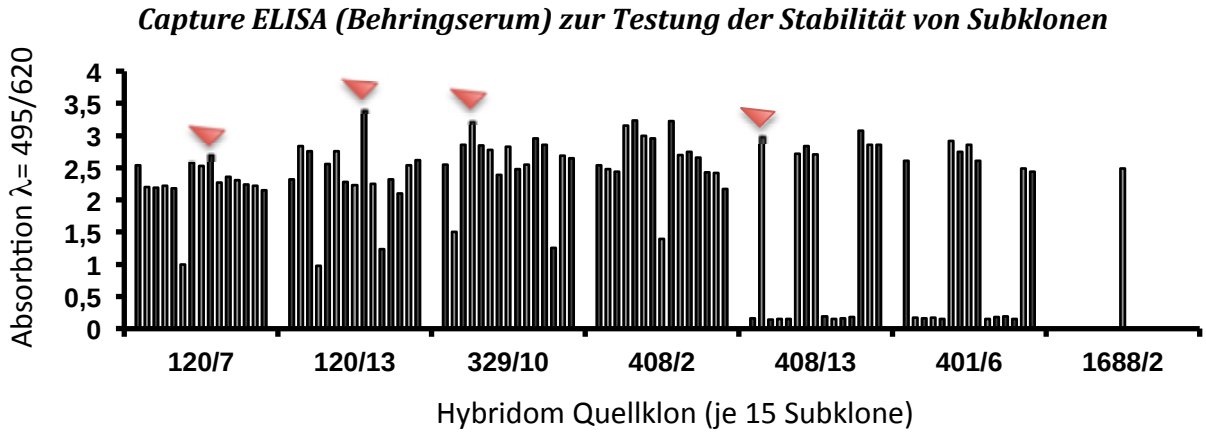


Abb.25: Abbildung *screening* ELISA nach zweiter Subklonierung selektierter Hybridome. Auftragung der Überstände von je 15 Subklonen der angegebenen Klone (SKII) gegen Absorbtion des kolorimetrischen Substrats; Farblich markiert: Subklone zur weiteren Kultur und Testung; Kontrollantikörper: mAK 1688/2

Wie in Abb.25 erkennbar, weisen die gewonnenen Subklone, zweiten Grades (zweite Subklonierung), der verschiedenen Mutterklonlinien deutliche Unterschiede in der Signalstärke gegen das eingesetzte Antigen BoNT-A1 auf. Eine hohe Anzahl der Abkömmlinge der Subklone 120/7, 120/13, 324/10 und 401/2 zeigen weiterhin eine hohe Reaktivität im ELISA, während große Teile der Folgepopulationen der Subklone 401/13 und 401/6 keine spezifischen Signale aufweisen. Um eine

genetische Instabilität der Kulturen weitestgehend ausschließen zu können, wurden die Zellpopulationen der Subklone des zweiten Grades durch Fluoreszenz gestützte zytometrische Analyse (FACS) untersucht. Für eine finale Auswahl an „stabilen“ Klonen mussten die Zellen in Bezug auf die Expression von murinen Immunglobulinen untersucht und angefärbt werden.

Die Hybridomkulturen mit der höchsten stabilen Produktion von Immunglobulin sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Für diese augewählten Subklone wurde mittels eines kommerziellen „*lateral flow*“-Tests (Isostrip) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, DBR) eine Bestimmung des sezernierten Immunglobulin Isotyps vorgenommen.

Tab.27: Liste der selektierten Klone zur weiteren Testung, unter Angabe des mittels Isostrip Kit ermittelten Ig-Isotyps

Hybridom Bezeichnung	Ig-Isotyp
120 / 7 / 9	IgG_1;k-LC
120 / 11 / 9	IgG_1;k-LC
329 / 10 / 4	IgG_1;k-LC
408 / 13 / 2	IgG_1;k-LC

Alle Klone der präferierten Populationen weisen eine Produktion von Immunglobulinen des Isotyps IgG_1 mit κ- leichten Ketten auf. Dies ermöglicht eine unkomplizierte Aufreinigung der Antikörper durch Affinitätschromatographie. Unter Einsatz einer FPLC-Anlage (Äkta Explorer), in Kombination mit einer Protein-G gekoppelten Sepharose-Matrix, im Säulenmaßstab (HiTrap®-Fastflow; 5ml), wurde die Isolierung, Reinigung und Konzentrierung der Antikörper aus Kulturüberständen im Litermaßstab mit Ausbeuten von 30-40 mg IgG_1/l Medium erreicht.

Resultierende Antikörperkonzentrate wurden geteilt und zu 50% unter Verwendung eines Sulfo-NHS-LC-Biotinylierungskits der Firma Thermo Scientific (Rochfort, USA) mit Biotin konjugiert. Die Biotinylierung erlaubte mAK, der selben Spezies, in Kombination im ELISA einsetzen zu können, ohne die Notwendigkeit eines speziesreaktiven Sekundärantikörpers. Zur spezifischen Detektion der Bindung, und zum enzymatischen Substratumsatz konnte bei Biotinylierung HRP-konjugiertes Streptavidin eingesetzt werden.

Tab.28: Tabellarische Auflistung der gewonnenen, ÄKTA-gereinigten Antikörper unter Angabe der Hybridom Bezeichnung; Angabe der totalen Ausbeute per Liter Hybridomüberstand und der Kopplungsrate nach Biotinylierung.

Hybridom-Bezeichnung	Konzentration	Biotin-Konjugation (mol-Biotin/mol-IgG$_1$)
120/7/9	1mg/ml (total 32 mg)	2,49
120/11/9	1mg/ml (total 40 mg)	9,93
329/10/4	1mg/ml (total 33 mg)	4,30
408/13/2	1mg/ml (total 31 mg)	9,06

Die Überprüfung durch einen HABA-Verdrängungsassay ermöglichte die Quantifizierung der Inkorporation von Biotin in die eingesetzten Immunglobuline. Wie in Tabelle 28 dargestellt war die Kopplungsreaktion in Bezug auf die eingesetzten Antikörperpräparationen unterschiedlich effizient. Die Kopplungsrate reichte von rechnerisch 2,5 bis zu 9 Biotin-Molekülen pro eingesetztem Antikörper-Molekül. Es wird erwartet, dass die erfolgreiche Kopplung von einem einzelnen Biotin-Molekül für die angestrebten Folgeversuche ausreichend ist. Eine höhere Rate ermöglicht eine zusätzliche Signalverstärkung bei der Detektion biotinylierter Antikörper durch enzymgebundenes Streptavidin.

4.2.3 Charakterisierung der Detektionsparameter von identifizierten monoklonalen BoNT-A1-spezifischen Antikörpern

Zur Bestimmung der Epitopspezifität der isolierten monoklonalen Antikörper in Bezug auf die Untereinheiten des BoNT-A1 wurden die Isolate der vier monoklonalen Antikörper in Westernblotanalysen eingesetzt. Die Isolate aus den Hybridomen 120/7/9, 120/11/9 produzierten in Konsistenz mit einem BoNT-A1 Referenzantikörper (mAK1688/2) spezifische Signale bei ca. 150 kDa (BoNT-A1-Holotoxoid). Da bei Verwendung von BoNT-A1-LC keine Signale festgestellt werden konnten, wird eine Spezifität dieser Antikörper gegen die schwere Kette des BoNT-A1 angenommen. Der Einsatz des Antikörpers 329/10/4 zeigte keine Reaktivität im Westernblot, wogegen das Isolat des Hybridoms 408/13/2 ein Signal bei 50 kDa erzeugte, was der erwarteten Masse für die leichte Kette des BoNT-A1 entspricht. Die Analyse der Negativkontrolle unter Verwendung von Lysaten *mock*-transfizierter HEK-293T–Zellen ergab keine zu verzeichnende Reaktion der verwendeten Antikörper.

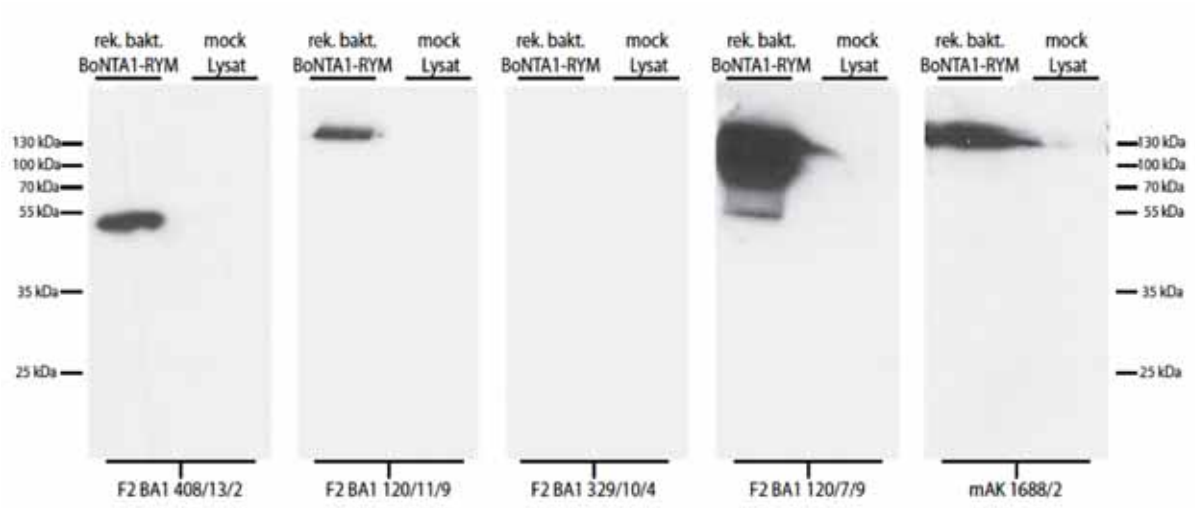


Abb.26: SDS-PAGE/ Westernblot zum Nachweis der Reaktivität generierter monoklonaler Antikörper gegen BoNT-A1-Toxoid; Auftrag von BoNT-A1-RYM-LC oder BoNT-A1-RYM-Toxoid aus *E.coli*; Negativkontrolle: *mock*- transfizierte zelluläre Lysate; Kontrollreaktion: Einsatz von mAK1688/2

Das Fehlen einer Reaktion des Antikörpers 329/10/4 lässt eine Konformations-abhängigkeit der Epitoperkennung vermuten. Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, zeigt das Isolat eine zuverlässige Detektion des Antigens im *capture* ELISA, die unter denaturierenden Bedingungen im Westernblot nicht nachweisbar ist. Die spezifische Reaktion der Antikörper 120/7/9, 120/11/9 und 408/13/2 im Westernblot gibt Hinweis auf die Erkennung von linearen Epitopen des BoNT-A1. Die Tatsache, dass in Folge alle Antikörper zuverlässig unter nativen Bedingungen im *capture* ELISA getestet werden konnten, lässt den Schluss zu, dass diese linearen Epitope im nativ gefalteten Protein zugänglich sind.

4.2.3.1 Evaluation der Kombinierbarkeit generierter BoNT-Detektionsantikörper in *capture* Detektionsassays

Eine Bewertung der Kombinierbarkeit der generierten monoklonalen Antikörper in ELISA-Anwendungen wurde durch die Verwendung der Reagenzien in jeder möglichen Fänger-/Detektorkombination vorgenommen. Hierzu wurden ungekoppelte monoklonale Antikörper als Fänger mit biotinylierten monoklonalen Antikörpern als Detektoren eingesetzt. Wie aus Tab.29 ersichtlich, sind zum effizienten Nachweis von BoNT-A1 die Antikörper aus 401/13/2 und 324/10/4 frei untereinander und mit den Antikörpern 120/11/9 und 120/7/9 kombinierbar. Die Kombination der monoklonalen Antikörper mit biotinylierten Antikörpern der

selben Charge sowie die Kombination von Derivaten des Mutterklones 120 ergaben keine zu verzeichnende spezifische Detektion.

Tab.29: Tabellarische Auswertung der Pärchenkompatibilität der eingesetzten mono-/ polyklonalen Antikörper im *capture* ELISA gegen BoNT-A1-RYM; Auftrag: Fänger-Antikörper/ gegen Detektor- AK

	120/7/9	120/11/9	329/10/4	408/13/2	mAK 1688	K47
120/7/9	-	-	+	+	+	+
120/11/9	-	-	+	+	+	+
329/10/4	+	+	-	+	+	+
408/13/2	+	+	+	-	+	+
mAK 1688	+	+	+	+	-	+
K47	+	+	+	+	+	+

Die aufgrund der Polyklonalität des, als Fänger eingesetzten K47-Serums waren alle getesteten monoklonalen Antikörper mit dem BoNT-A1-spezifischen Kaninchen-serum kombinierbar. Die beobachtete Blockierung von identischen Epitopen durch zwei unterschiedliche Antikörper, wie beispielsweise bei 120/11/9 und 120/7/9, konnte hier nicht beobachtet werden.

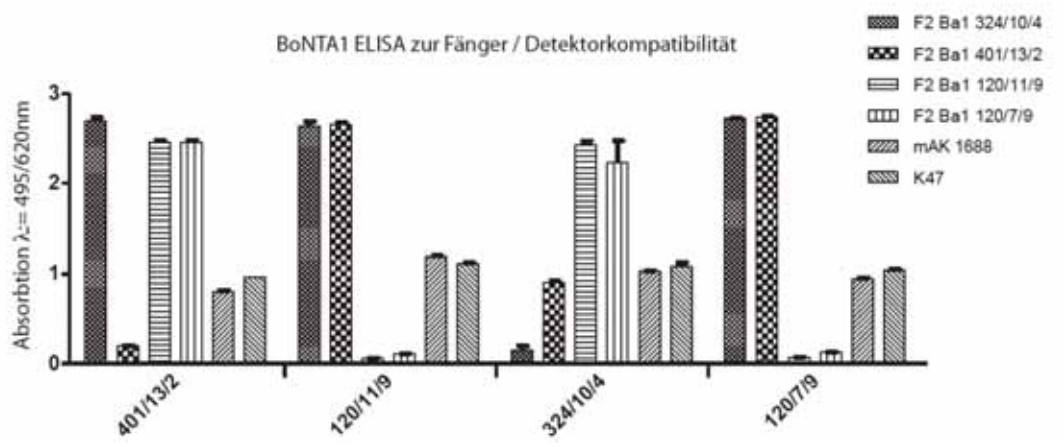


Abb.27: *capture* ELISA zur Ermittlung der Kombinierbarkeit der generierten Antikörper als Pärchen in Kombination als Fänger und Detektor. Verwendet wurden jeweils unkonjugierte Isolate mit biotinylierten Proben unter Nutzung von HRP gekoppeltem Steptavidin zum Substratumsatz. Kontrollreagenzien: α-BoNT-A1-Serum K47 und mAK 1688/2

4.2.3.2 Bestimmung der Nachweisgrenze des BoNT-A1-ELISA gegen Antigen in wässriger Lösung unter Verwendung generierter monoklonaler Antikörper

Essentiell für die Bewertung der Qualität von Detektionsantikörpern ist der Parameter des Detektionslimits. Zur Einschätzung der Nachweisgrenze der generierten monoklonalen Antikörper wurden *capture* ELISAs erneut unter Verwendung des K47-Serums als Fängerreagenz durchgeführt. Unter Einsatz einer definierten Antikörper und Antigenverdünnung wurden individuell die Nachweisgrenzen der einzelnen Antikörper bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 aufgeführt. Bei den durchgeführten Testungen reichten die Antikörperkonzentrationen von 100 mg/ml bis zu 500 ng/ml. Für die Präparationen von 120/13/9 und 120/7/9 konnten im ELISA positive Signale bis zum Einsatz von 25pg BoNT-A1/ml detektiert werden. Die Isolate 324/10/4 und 401/13/2 wiesen im Test stark positive Signale für eine Antigenkonzentration von bis zu 8,5 pg Antigen/ml auf. Die Konzentration der eingesetzten Antikörper hatte innerhalb der überprüften Spanne nur einen geringen Einfluss auf die Signalintensität. Selbst unter Einsatz der geringsten Antikörperkonzentrationen konnten die ermittelten Nachweisgrenzen noch erreicht werden.

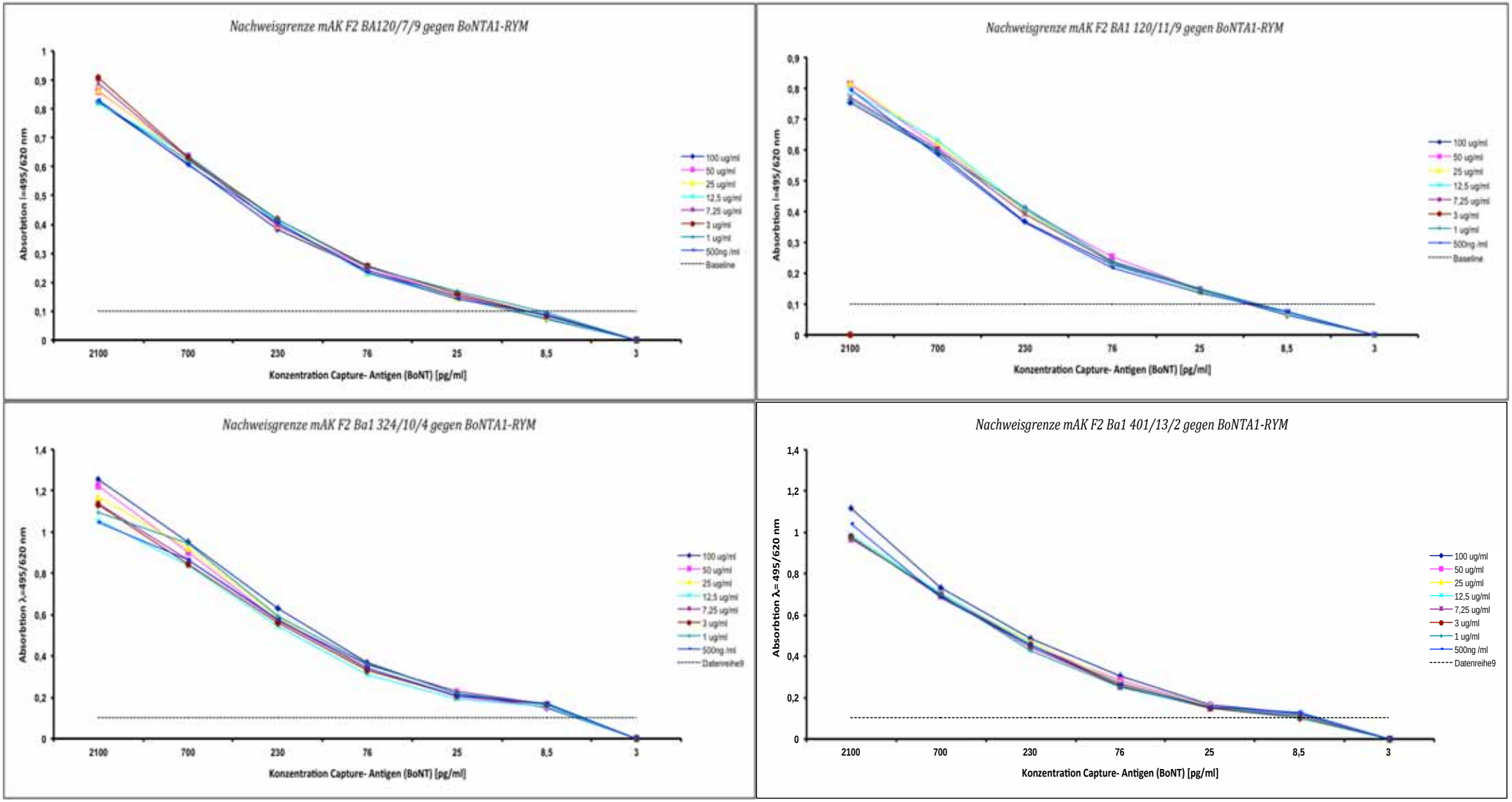


Abb.28: *capture* ELISA zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der zu charakterisierenden BoNT-A1- spezifischen Antikörper. Als Fängerantikörper diente das polyklonale K47-Serum. Detektion bei Verdünnung des Antigens in Lösung (Abszissenachse) von 2100- 3pg / ml PBS; Legende: Verdünnung des eingesetzten monoklonalen Detektions-antikörpers im Bereich von 100µg / ml bis 500ng / ml PBS.

4.2.3.3 Messung der Bindungsaffinität zwischen generierten monoklonalen Antikörpern und BoNT-A1 (RYM)

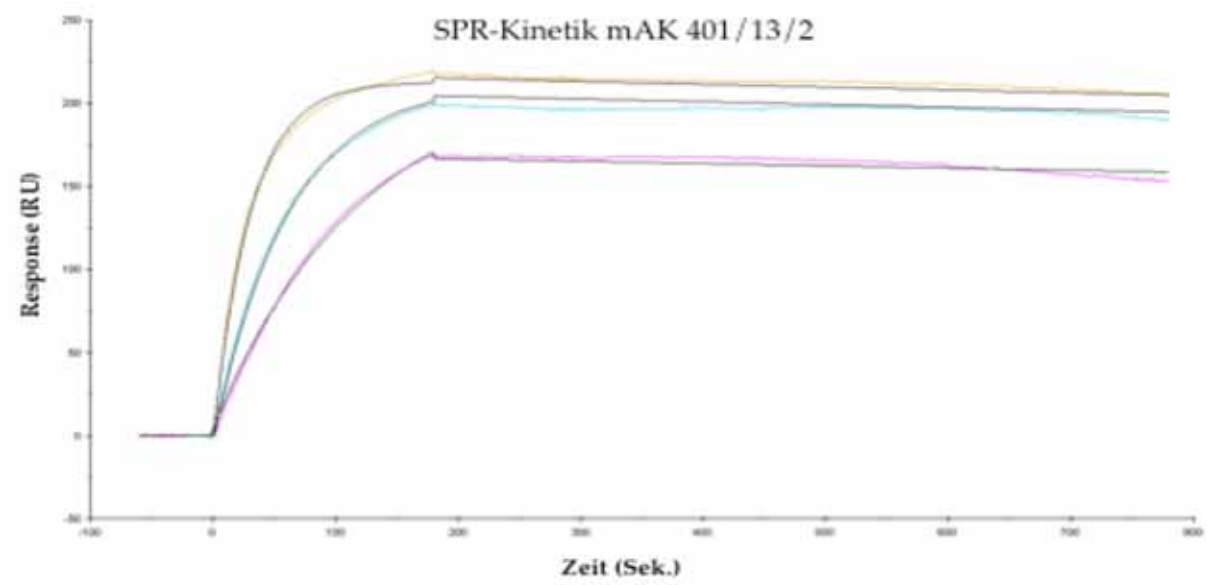
Die Bestimmung der Affinität einer Antigenbindung zwischen den generierten Antikörpern und dem BoNT-A1-Toxoid wurde über das Verfahren der SPR-Spektroskopie vorgenommen. Hierbei wurden im Versuchsaufbau mit verschiedenen Analytkonzentrationen (BoNT-A1-RYM) die Konstanten für die Assoziation von Antikörper und Antigen (on rate =Ka), die Dissoziation (off rate=Kd) und die Affinitätskonstante (KD) ermittelt. Aufgrund der nahezu identischen Masse von Analyt und Antikörper (150 kDa) wurde für die statistische Bewertung der Bindung ein 1:1 Assoziationsmodell zugrunde gelegt.
In Tabelle 30 sind die ermittelten Konstanten, sowie der Chi^2- Wert des statistischen Fittings aufgeführt. Ein niedriger Chi^2-Wert im zweistelligen Bereich gibt hierbei eine hohe statistische Übereinstimmung der Messung mit einer idealen statistischen Kinetik wieder.

Tab.30: Auflistung der ermittelten Konstanten Ka, Kd und KD sowie der Chi^2-Werte für die Affinitätsmessungen der erzeugten monoklonalen Antikörper in der Interaktionsanalyse mit BoNT-A1 (RYM) durch SPR-S.

mAK-Bezeichnung	KD-Wert (nM)	on rate (1/Ms)	off rate (1/s)	Chi^2-Wert
120/7/9	2,33 nM	$1,17x10^5$	$2,72x10^{-4}$	1,14
120/11/9	1,85 nM	$1,40x10^5$	$2,59x10^{-4}$	13,5
324/10/4	116,10 pM	$6,96x10^5$	$8,08x10^{-5}$	6,62
401/13/2	61,43 pM	$1,33x10^6$	$8,14x10^5$	8,79
mAK1688/2	3,41 nM	$1,67x10^5$	$5,70x10^{-4}$	9,92

Die ermittelten KD-Werte zeigen eine hochaffine Bindung der generierten Antikörper im einstelligen nM Bereich. In Bezug auf den proteininduzierten Antikörper mAK 1688/2 weisen die generierten monoklonalen Antikörper 120/7/9 und 120/11/9 eine vergleichbare Affinität zum BoNT-Antigen auf. Die relative Geschwindigkeit der Assoziation und Dissoziation ist mit einer „schnellen“ Assoziation und der „langsamen“ Dissoziation ebenfalls vergleichbar (siehe Abb.29). Eine Sonderstellung nehmen die Antikörper 324/10/4 und 401/13/2 ein, da die Affinität dieser Reagenzien im pM-Bereich als deutlich höher ermittelt werden konnte. Die Beobachtungen zum Antikörper 401/13/2 zeigten zusätzlich im Vergleich zu den restlichen Messungen eine deutlich langsamere Dissoziation zwischen Antikörper und Analyt.

Die der Tabelle 30 zugrunde liegenden Kinetiken sind in Abbildung 29 und 30 abgebildet. Die Messungen der verwendeten Analytverdünnungen sind farblich abgehoben. Die schwarz gefärbten Graphen in Deckung mit den farblichen Kinetiken stellen die statistische Näherung des idealen 1:1 Bindemodells dar.



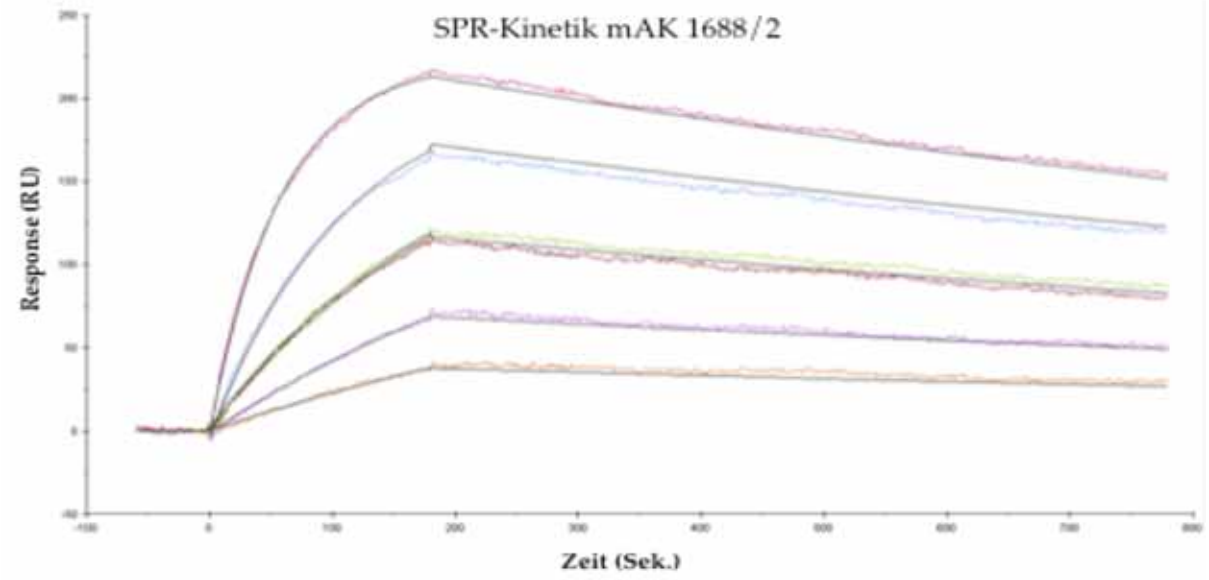


Abb.29: Darstellung der ausgewerteten Affinitätsmessung generierter monoklonalen Antikörper gegen BoNT-Analyt; Grundlage der Anpassung: 1:1 Bindemodell; dargestellt sind Kinetiken unter Einsatz verschiedener Analytkonzentrationen: Hellbraun=100nM; Dunkelblau=50nM; Rosa/Orange=25nM; Grün=12.5nM; Violett=6.25nM; Kontrollantikörper= mAK1688 (proteininduziert)

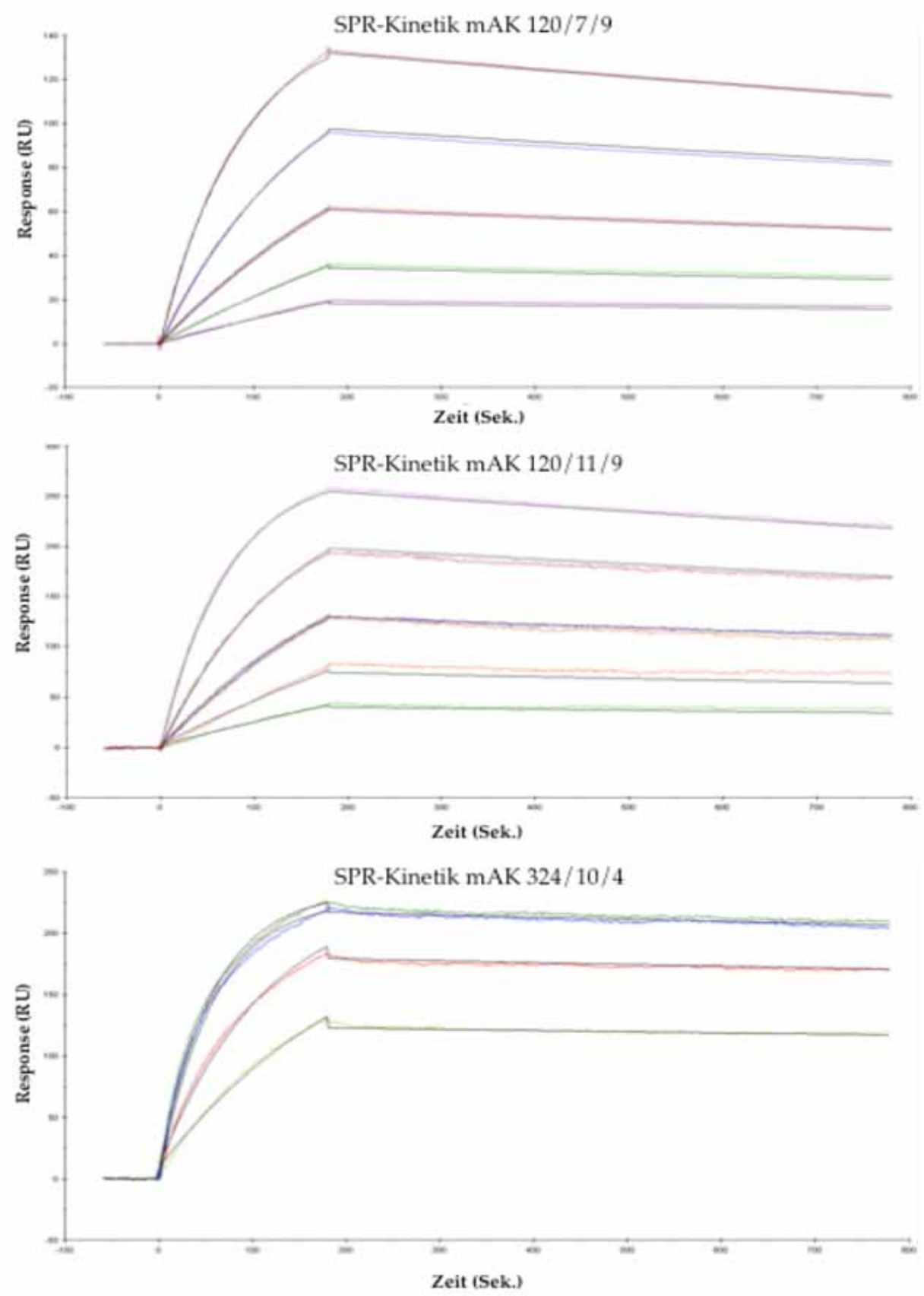


Abb.30: Darstellung der ausgewerteten Affinitätsmessung generierter monoklonalen Antikörper gegen BoNT-Analyt; Grundlage der Anpassung: 1:1 Bindemodell; dargestellt sind Kinetiken unter Einsatz verschiedener Analytkonzentrationen: Hellbraun=100nM; Dunkelblau=50nM; Rosa / Orange=25nM; Grün=12.5nM; Violett=6.25nM

4.2.3.4 Untersuchung der Kreuzreaktivität induzierter monoklonalen Antikörper gegen verschiedene BoNT-Iso-/ Serotypen

Für eine Detektion von Botulinumtoxin spielt die Epitopspezifität eines Antikörpers im Zusammenhang mit den verschiedenen, in der Natur vorkommenden BoNT-Serotypen und Subklassen eine große Rolle. Zur Ermittlung der Kreuzreaktivität der generierten monoklonalen Antikörper mit verschieden bekannten und unklassifizierten Subtypen der Toxinklasse BoNT-A wurde ein *capture* ELISA gegen verschiedene verfügbare BoNT-Stämme durchgeführt.

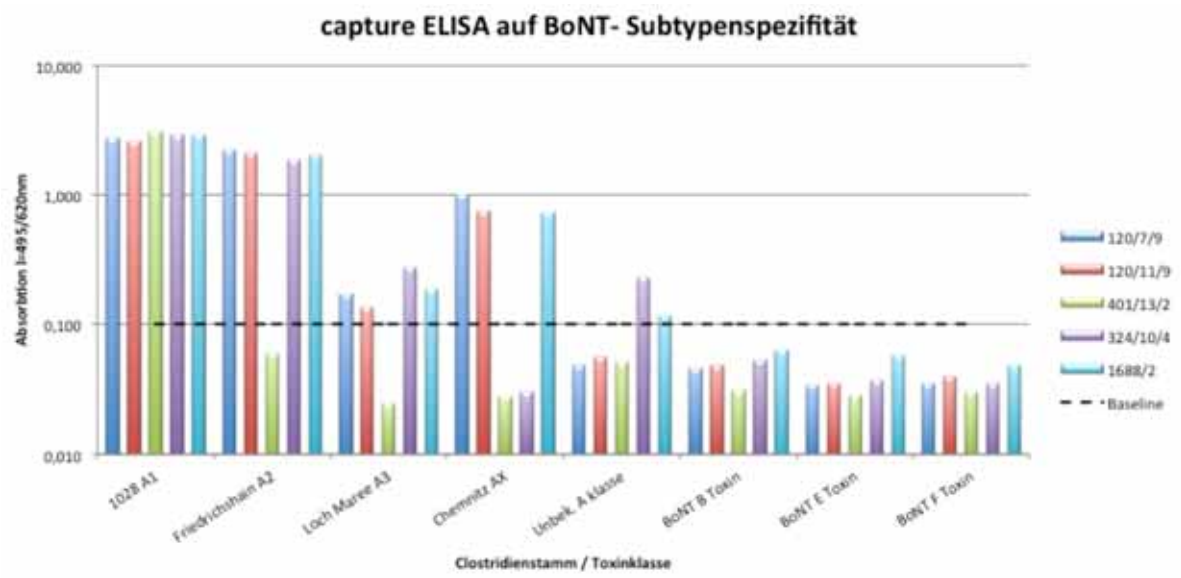


Abb.31: *capture* ELISA auf Subklassen- und Serotypenspezifität der generierten monoklonalen Antikörper. Verwendung von *clostridialen* Kulturüberständen der Subtypen A1-A3; AX (bisher nicht klassifiziert) und einer weiteren nicht klassifizierbaren Klasse (A?); Zusätzliche Testung der Serotypen B, E , F (gereinigtes Toxin); pos. Kontrollantikörper mAK1688/2

Die Darstellung des ELISA in Abbildung 31 zeigt deutlich eine starke Reaktivität aller generierten Antikörper gegen das zur Immunisierung eingesetzte BoNT-A1. Die Antikörper 120/7/9 und 120/11/9 reagierten spezifisch unter Einsatz der Toxine des Typs A1, A2, A3, und AX (Stamm *Chemnitz*). Die Präparation 324/10/4 konnte positiv mit den Subklassen A1, A2, A3 und einer bisher nicht spezifizierten A? Subklasse getestet werden. Antikörper 401/13/2 zeigte ausschließlich eine spezifische Reaktion mit dem Immunisierungsantigen BoNT-A1. Die zusätzliche Testung gegen unterschiedliche, phylogenetisch weiter entfernte BoNT-Klassen (B,E,F) zeigte keine nachweisliche Reaktion der Isolate.

Tab.31: Auflistung der nachgewiesenen Reaktivität der eingesetzten monoklonalen Antikörper in Bezug auf Abbildung 31.

	120 / 7 / 9	120 / 11 / 9	324 / 10 / 4	401 / 13 / 2	mAK 1688 / 2
BoNT A1 (*Str.1028*)	+	+	+	+	+
BoNT A2 (*Str.F`Hain*)	+	+	+	-	+
BoNT A3 (*Str.L.Maree*)	+	+	+	-	+
BoNT AX (*Str.Chemnitz*)	+	+	-	-	+
BoNT A? (*Str.unbek*)	-	-	+	-	+
BoNT B	-	-	-	-	-
BoNT E	-	-	-	-	-
BoNT F	-	-	-	-	-

4.3 Entwicklung von Immunisierungsvektoren zur Verabreichung von nativen filoviralen Glykoproteinen

Um eine Induktion von Antikörpern mit Reaktivität gegen Epitope nativer Filoviruspartikel erreichen zu können, musste eine Auswahl von Zielantigenen für eine Immunisierung getroffen werden. Die Zielproteine sollten in nativen, nicht inaktivierten Partikeln für eine Erkennung durch Immunoassays zur Verfügung stehen. Die Unterscheidung zwischen nativem, infektiösem Material und inaktiven Proben durch Detektionssysteme ist unabdingbar, um das Gefährdungspotential schon vor Ort klar einschätzen zu können.

Im Fall von infektiösem Marburg- und Ebolavirus ist die prominenteste immunogene Struktur der Oberfläche ein Komplex der viralen Hüllproteine Glykoprotein 1 und Glykoprotein 2. Weitere strukturgebende Proteine wie Vp40, Vp35 oder das Np sind zwar in größeren Stückzahlen im viralen Partikel vertreten, werden jedoch bei Unversehrtheit der umhüllenden Membran von der Erkennung durch Antikörper abgeschirmt. Bezeichnendes Merkmal der Glykoproteine Gp1 und Gp2 ist ein hoher Grad an N- und O-Glykosylierungen. Ähnlich wie bei strukturverwandten Proteinen, z.B. dem HIV gp120, bildet die starke Verzuckerung einen Glykanschild, der durch niedrig immunogene Zuckerstrukturen nur die Erkennung weniger exponierter Antigenepitope erlaubt. Das fusogene Gp2 trägt im Vergleich zu Gp1 wenige Zucker, bildet jedoch als membranständiges Homotrimer eine enge Trihelixstruktur, bei der die interagierenden Untereinheiten eine gegenseitige Abschirmung erreichen. Durch diese Umstände wird die Anzahl der möglichen Antigenepitope limitiert.

Aus diesem Grund wurden Gp1 und das membranständige Gp2 als Zielantigene für die Generierung von monoklonalen Detektionsreagenzien ausgewählt.

4.3.1 Kodonoptimierung und Synthese von kodierenden Sequenzen zur Expression von EboV-/MarV-Glykoproteinen

Für Marburg- und Ebolaviren wurden publizierte Sequenzen der kodierenden Gene für das Vorläuferglykoprotein Gp0 *in silico* analysiert. Die Auswahl der Antigene fiel hierbei auf die Stämme mit der jeweils höchsten dokumentierten Mortalitätsrate bekannter epidemischer Ausbrüche. Die Sequenzen für den Stamm *Lake Viktoria* Marburgvirus: *Musoke* (NC_001608_Lake_Victoria) und Ebolavirus: *Zaire* (NC_002549_EbolaZaire) wiesen in der Analyse eine suboptimale Komposition von Kodons mit einem *codon adaption index* von 0,72 in Säugerzellen auf.

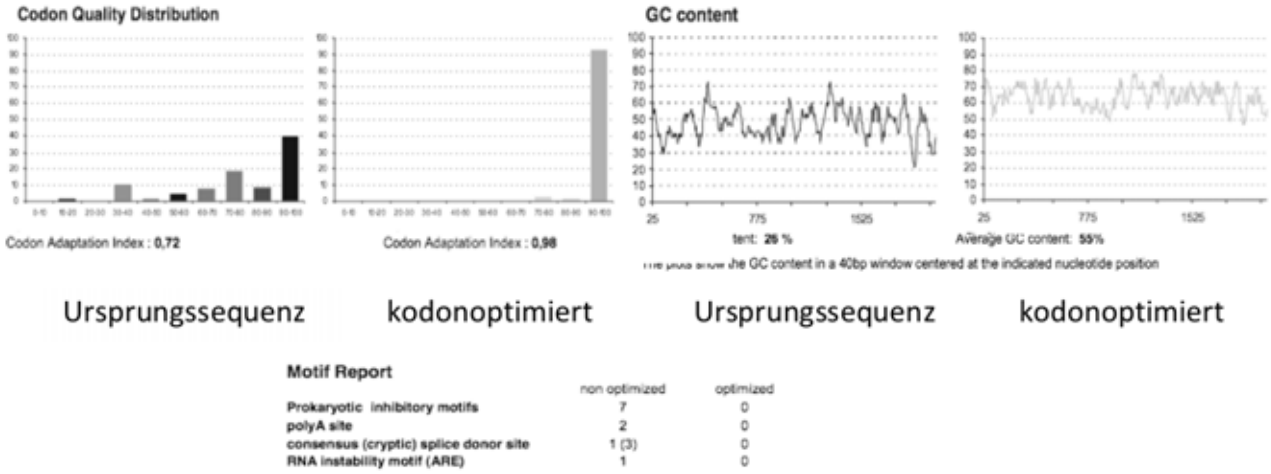


Abb.32: Übersicht der durchgeführten Kodonoptimierung des EboV-Gp4. Links im Bild dargestellt: Nutzung der Kodons in der Ursprungssequenz mit Darstellung der Optimierung (CAI); Rechts im Bild: Modifikation des GC-Gehaltes von Ø 48% auf 64%; zusätzliche Angabe der Entfernung von inhibitorischen Motiven und Sequenzen der Ursprungssequenz. (Geneart)

Zusätzlich findet im Falle von Ebolavirus beim Prozess der Transkription des Glykoproteingens in 8 von 10 Fällen eine Leserasterverschiebung der viralen RNA-Polymerase statt, die zur Synthese einer trunkierten Variante des Gp führt: dem sogenannten solublen Glykoprotein (sGp). Um im Zuge der Immunisierung überwiegend das native Glykoprotein in voller Länge und in hohen Konzentrationen bereitzustellen, wurde die Sequenz der beiden Glykoproteine für die optimale Expression in Säugerzellen kodonoptimiert. Im Verlauf dieser Überarbeitung der

Sequenz wurde die, für den Leserahmenwechsel verantwortliche „*slipperysite*“ im Bereich des Gp1 entfernt. Durch die Substitution in Säugern präferentiell genutzter Kodons, ohne Veränderung der Aminosäureabfolge, wurde der rechnerische CAI auf einen Wert von 0,98 angehoben. Darüber hinaus wurde der GC-Gehalt der Sequenzen auf ein Optimum für Säugerzellen eingestellt. Die angepassten Sequenzen wurden der Firma Geneart GmbH (Regensburg, DBR) übermittelt, dort nach zusätzlicher Prüfung auf immunmodulatorische Sequenzen synthetisiert und in das Expressionsplasmid pTH einkloniert. Die generierten Immunisierungsvektoren beinhalteten die kodierende Sequenz des Antigenes mit Ergänzung durch einen V5-Expressionstag am C-Terminus des Gp2. Durch diesen Umstand wurde eine Dokumentation der Expression der Fusionsproteine auch in Ermangelung antigenspezifischer Antikörper möglich.

4.3.2 Analyse der Expression erzeugter Glykoprotein-Immunisierungsvektoren in eukaryontischen Zellkulturlinien

Die Präparation von HEK-293T-Zellen, die mit den synthetisierten MarV- und EboV-Immunisierungsvektoren transfiziert worden waren, resultierte in einer deutlichen spezifischen Färbung durch den eingesetzten V5-Tag-spezifischen Fluoreszenz-antikörper in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

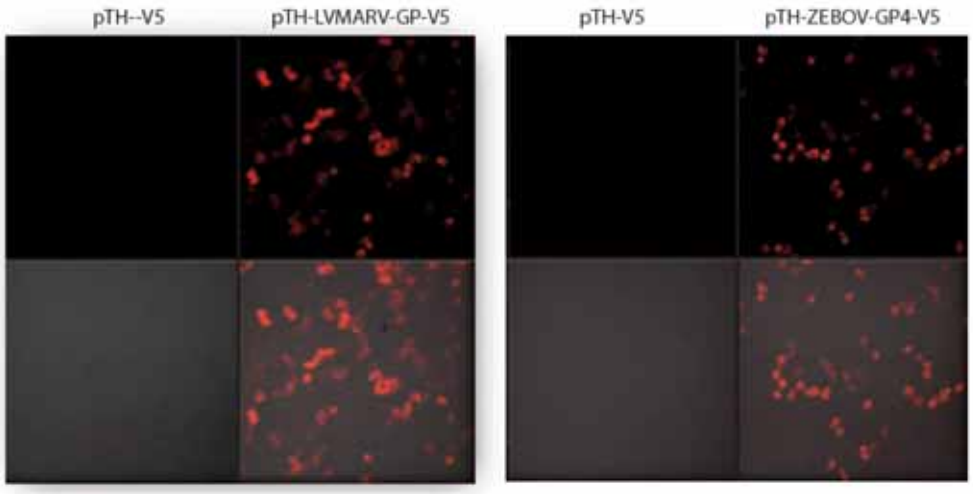


Abb.33: Mikroskopische Aufnahme der Immunfluoreszenzpräparation von pTH-EboV-Gp4-V5 und pTH-LVMARV-Gp-V5 transfizierten HEK-293T; Vergrößerung 100x; Darstellung des Fluoreszenzkanals (rot, oben) und des Transmissionskanals (merge, unten). Links abgebildet Präparationen nach Transfektion mit pTH-Leervektor. Die linke Abbildung zeigt die Färbung unter Einsatz von Mausimmunseren.

Die exprimierten Zielproteine konnten bereits 18h nach Transfektion für beide generierten Konstrukte mikroskopisch nachgewiesen werden. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion sank die Rate der fluoreszenzmarkierten Zellen deutlich, unter einem gleichzeitigen Anstieg von abgelösten Zellen (Daten nicht gezeigt).
Die parallele Untersuchung mit Leervektor *mock*-transfizierten Zellen zeigte eine geringe Rate an Ablösung der präparierten Zellen und keine detektierbare Fluoreszenz unter Verwendung des zuvor eingesetzten V5-Antikörpers.

4.3.3 Analyse der Proteinstruktur nach Expression von Immunisierungs-konstrukten in eukaryontischer Zellkultur: SDS-PAGE/ Westernblot

Die Analyse der Zelllysate transfizierter Zellen nach Auftrennung im SDS-Gel und Detektion im Westernblot, durch einen V5 reaktiven Antikörper, ergab spezifisch detektierbare Proteinbanden für beide Ansätze mit filoviralen Expressionvektoren. Die Masse der dokumentierten Proteine für MarV-Gp-V5 aus transfizierten Zellen betrug 15 kDa und 30 kDa. Bei Verwendung von Lysaten EboV-Gp-V5 transfizierter Zellen waren Banden bei 18 kDa und 56 kDa detektierbar.

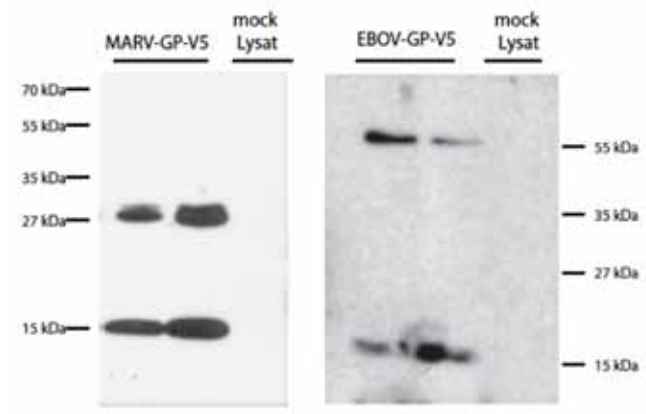


Abb.34: SDS-PAGE / Westernblot zum Nachweis der Reaktivität generierter Immunseren aus Balb/c gegen Lysate transfizierter HEK-293T; Auftrag von Lysaten transfizierter Zellen unter Verwendung je zweier Konstrukte (K1; K2) des Immunisierungsvektors; Negativkontrolle: *mock*-transfizierte-zelluläre Lysate.

Die *in silico* ermittelten Größen für Gp2 der untersuchten filoviralen Proteine, einschließlich des V5-Tags, deckten sich rechnerisch mit den kleinsten detektierten Proteinfraktionen. Die 56 kDa Proteinbande bei EboV-Gp-Lysaten entsprach rechnerisch dem Trimer eines stabilen Derivats des tri-Helixbündels aus Gp2-Einheiten: dem sogenannten Gp2-*core complex*. Für MarV-Gp konnte bei 30 kDa ein

dimeres Derivat des Gp2 *core complex* nachgewiesen werden. Aufgrund der Tag-spezifischen Detektion waren die ungetaggten Gp1 Einheiten nicht nachweisbar.

4.3.4 Funktionsprüfung der filoviralen MarV- /EboV-Glykoproteine durch Reporterviren (VLP-Pseudotypen)

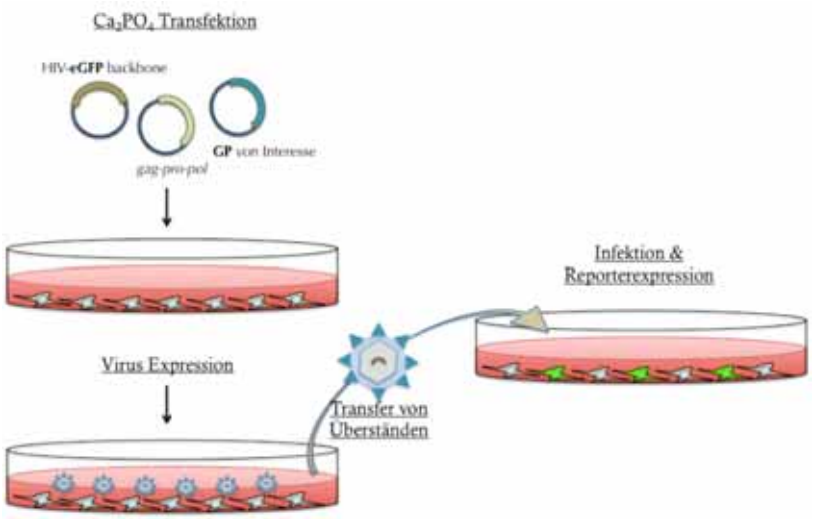


Abb.35: Schematische Darstellung der Herstellung von GFP-Reporterviren (HIV) durch Kotransfektion in eukaryontischer Zellkultur

Für die Sicherstellung der nativen Faltung von generierten Gp-Konstrukten wurden die funtionellen Eigenschaften der erzeugten viralen Hüllproteine untersucht. Der Nachweis vom Erhalt der Funktion eines Hüllproteins kann über die erfolgreiche Penetration von permissiven Zelllinien geführt werden. Zu diesem Zweck wurden Gp-haltige Reporterviren für Infektionsstudien zur Fusogenität des Glykoproteins erzeugt. Durch Kotransfektion von Plasmidvektoren, kodierend für filovirales Gp, HIV-1-Gag und HIV-1-Reportergenome, wurden Pseudotypisierungen vorgenommen. Durch dieses Vorgehen konnten HIV-*single round reporter* Viren mit den generierten Gp-Konstrukten erzeugt werden. Die eingesetzten Pseudotypisierungsvektoren der 2. Generation trugen HIV-1 Genome, mit Substitutionen der akzessorischen Gene wie *vpr, vif, vpu* und *nef* durch ein GFP- oder Luziferase-kodierendes Reportergen.

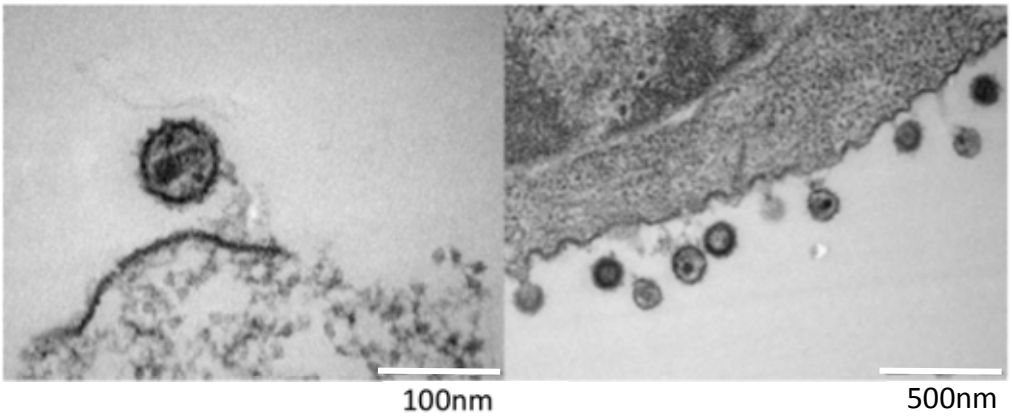


Abb.36: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Reportervirusspartikeln (HIV), unter Einsatz von filoviralem Glykoprotein, bei Knospung aus HEK-293T- Zellen in negativer Kontrastierung. Erkennbar sind Glykoproteinstrukturen durch diffuse Oberflächenstruktur der Partikel.

In Abbildung 36 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten der Transfektanten mit virusartigen Partikeln (VLP) abgebildet. 24 h nach Transfektion war eine Produktion von VLPs durch die transfizierten Zellen deutlich in den Schnitten erkennbar. Die Untersuchung, bei starker Vergrößerung, zeigt eine deutlich unregelmäßige Strukturierung der Virusoberfläche, was auf eine Inkorporation von Glykoproteinen in die Partikel hindeutet. Der eindeutige Nachweis von reifen, Gp- haltigen Partikeln prädestiniert die VLP zum Einsatz in Infektionsversuchen.

4.3.4.1 Infektionsversuche zur Fusogenität des rekombinanten filoviralen Gp mittels Reporter-VLP

Es ist bekannt, dass die Überexpression von viralen Proteinen in exprimierenden Zellen zu ER-Stress und einer Blockade der zellulären Translations- und Transportmaschinerie führen kann. Im Fall von kodonoptimierten Konstrukten besteht im besonderen die Gefahr, eine tolerable Kapazitätsgrenze der Produktion viraler Proteine zu überschreiten. Daher wurde für die Produktion von HIV-VLP-Pseudotypen eine Optimierung des Einsatzes an filoviralem Gp durchgeführt.
Zur Bestimmung der idealen zu transfizierenden Gp-Konzentration zur Erzeugung optimal infektiöser Partikel wurden Titrationen der DNA-Menge in 0,5 µg Schritten durchgeführt. Nach Normalisierung der eingesetzten Partikelmenge durch eine Quantifizierung über das HIV-Hauptstrukturprotein via p24-ELISA wurden vergleichbare Mengen an VLP zur Infektion von HEK-293T-Zellen eingesetzt. 96

Stunden nach Infektion konnte mikroskopisch eine Bewertung der Infektionsrate erfolgen.

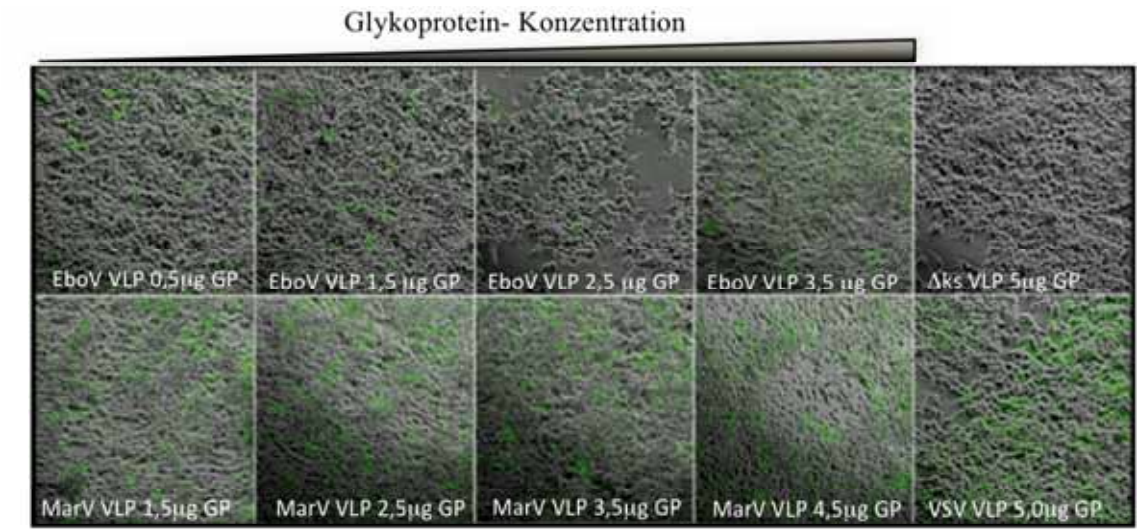


Abb.37: Mikroskopische Auswertung der Glykoprotein Titration nach Infektion von HEK-293T mit MarV- / EboV-Gp- pseudotypisierten GFP-Reporterviren; Angabe der zur Transfektion von *producer cells* eingesetzten Gp-Konzentration; Normalisierung vor Infektion durch p24-ELISA der virushaltigen Überstände.

In Abbildung 37 ist eine vergleichende mikroskopische Darstellung der Infektionsansätze bei unterschiedlichen Gp-Konzentrationen dargestellt. Rein optisch sind schon deutliche Unterschiede in der Rate der Infektion zu erkennen. Eine Quantifizierung der Ansätze mittels FACS-Analyse verdeutlichte zusätzlich die unterschiedlichen Infektionsraten.

Tab.32: Auswertung der Reportergenexpression nach Infektion von HEK-293T durch FACS-Analyse; Angabe der zur Virusproduktion eingesetzten Gp-Konzentration, der Infektionsrate (*gated*); pos. Kontrollinfektion durch VSV-Gp-pseudotypisierte Reporterviren, neg. Kontrollreaktion durch defiziente Δks-Gp pseudotypisierte Reporterviren (je 5µg Gp)

EboV	Infektion m. EboV pstyp. VLP (mg Gp / Ansatz)	0,5	1,5	2,5	3,5	Δks (5)	VSV (5)
	Anteil inf. Zellen (% GFP pos.)	3,87	5,77	3,65	2,58	0,69	58,79
MarV	Infektion m. EboV pstyp. VLP (mg Gp / Ansatz)	1,5	2,5	3,5	4,5	Δks (5)	VSV (5)
	Anteil inf. Zellen (% GFP pos.)	26,14	25,66	36,99	51,7	0,69	58,79

Die Auswertung der FACS-Analyse in Tabelle 32 zeigt eine Spannbreite der Infektionsrate der eingesetzten VLP von 2,85 bis 3,87% der vermessenen Zellpopulation für EboV-VLPs. Bei MarV-VLP zeigte sich eine noch deutlichere Verbesserung der Infektionsrate von 26,14 bis 51,7%. Die jeweils beste beobachtete

Infektiösität war bei 0,5 µg eingesetzem EboV-Gp und bei 4,5 µg für MarV-Gp zu verzeichnen.
Der signifikante Unterschied zwischen der Reporterexpression von funktionsdefizientem Δks-Gp und den eingesetzten filoviralen Hüllproteinen gibt Hinweis auf die native Struktur und Fusogenität der rekombinanten Konstrukte. Dadurch können sie für Immunisierungsstudien, zur Antikörperinduktion und für die Testung neutralisierender Eigenschaften von Immunglobulinen eingesetzt werden.

4.4 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen MarV-/EboV-Gp zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Je eine Gruppe von Balb/c, mit einer Kohortengröße von 10 Tieren, wurde für die DNA-Immunisierung ausgewählt. Jedes Einzeltier wurde in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit mit 4 µg pTH-EboV-Gp-V5 oder pTH-MarV-Gp-V5 immunisiert und insgesamt 8-mal in einem Intervall von 4 Wochen mit DNA *geboostet*.

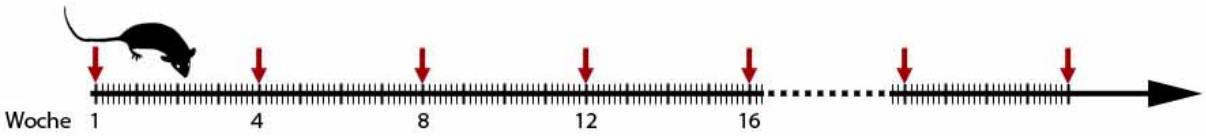


Abb.38: Darstellung des Immunisierungsschemas für die Immunisierung von Mäusen zur Induktion von Filovirus-reaktiven Immunglobulinen, zur Vorbereitung von Hybridomfusionen; Immunisierungen erfolgten kontinuierlich in einem Abstand von 4 Wochen

Aufgrund der geringen Belastbarkeit der Tiere und bisherigen Erkenntnissen über Titerentwicklungen nach DNA-Immunisierungen wurde auf eine Entnahme von Blut bis nach der 5. Immunisierung verzichtet, um einen Verlust von Versuchstieren durch Komplikationen während der Sedierung zu verhindern.
Nach retrobulbärer Entnahme wurde das Serum der Versuchstiere mittels Immunfluoreszenzanalyse transfizierter Zellen und Westernblotting auf spezifische reaktive Antikörper getestet.

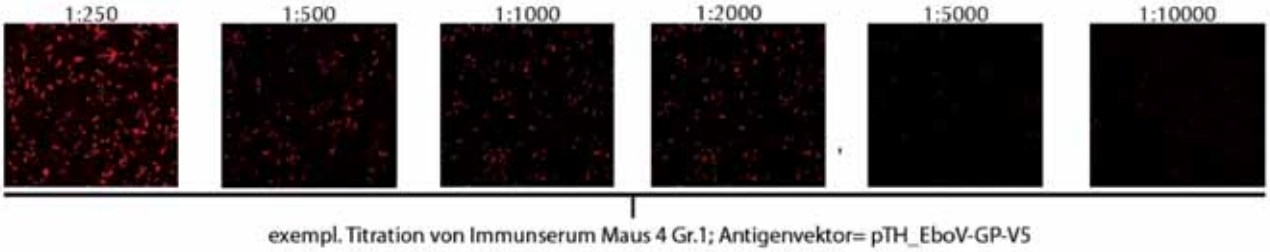


Abb.39: Mikroskopische Aufnahme der Immunfluoreszenzpräparation von pTH-EboV-Gp-V5 transfizierten HEK-293T; Vergrößerung 100x; Titration der induzierten Immunseren von 1:250 bis 1:10000 zur Bestimmung des reaktiven Ig-G-Titers.

Wie in Abbildung 39 ersichtlich, war es möglich, bei einer Verdünnung von 1:250 mit den Seren der immunisierten Tiere bis zu einer Verdünnung von 1:5000 eine spezifische Färbung Gp-transfizierter HEK-293T zu erreichen. Die strukturelle Aufklärung im Westernblot, unter Verwendung von ultrazentrifugierten Pellets pseudotypisierter VLP, zeigte eine spezifische Markierung von Banden bei 45 (Gp2-Trimer), 80 (Gp1 Glykoform) und 160 kDa (Gp1) für MarV-Gp-VLP und 56 (Gp2-Trimer), 84 (Gp1 Glykoform) und 140 kDa (Gp1) für EboV-Gp-VLP. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus den Vorversuchen mit Tag-spezifischen Antikörpern und zeigen die zusätzliche Reaktivität der polyklonalen Seren gegen das Gp1. Das Auftreten von Zwischenprodukten der Prozessierung des Glykoproteins (Glykoformen) neben den erwarteten Proteinbanden ist eine bekannte Begleiterscheinung der Ultrazentrifugation von VLP produzierenden Zellen.

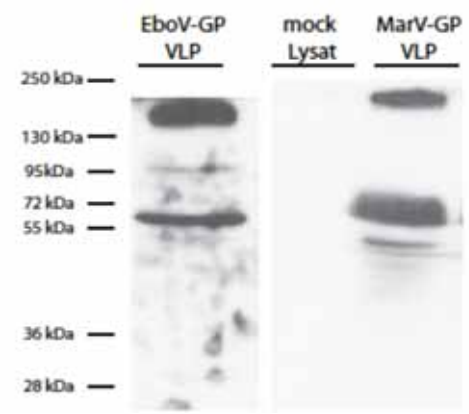


Abb.40: SDS-PAGE / Westernblot zum Nachweis der Reaktivität generierter Immunseren aus Balb/c gegen pseudotypisierte EboV-VLP; Auftrag von Aliquots aus Ultrazentrifugationen nach Filtration über ein Sukrosekissen (20%); Negativkontrolle über Ultrazentrifugationen der Überstände von Leervektor-transfizierten Zellen.

4.5 Entwicklung eines nativen Testsystems zur Selektion Filovirus-Gp-reaktiver Antikörper

Im Weiteren wurden in Vorbereitung der Hybridomafusion Versuche zur Etablierung eines Filovirus-spezifischen *screening*-Systems durchgeführt. Für die Detektion der nativen Struktur des Glykoproteins von MarV- und EboV-Gp war ein indirekter Assay aufgrund der starken Denaturierung des Proteins bei Bindung an die Polystyrolmatrix von Assayplatten nicht durchführbar. Daher wurde zur spezifischen Detektion ein *capture* ELISA gewählt.

4.5.1 Design von gerichtet immobilisierbarem, filoviralem Antigen

Die Strategie zur Immobilisierung und Aufreinigung von filoviralem Antigen in Ermangelung von spezifischen Antikörpern beinhaltete die Generierung eines Fusionsproteins der untersuchten Glykoproteine. Über einen Fusionstag sollten die aufgereinigten Glykoproteine an eine Martix immobilisierbar sein und dort in nativer Struktur erhalten bleiben.
Zur Erzeugung der *screening*-Konstrukte für MarV- und EboV-Gp sollte die kodierende Sequenz der Gp-Vorläuferproteine über einen Aminosäure-Linker durch den Fc-Teil des humanen IgG ergänzt werden. Zusätzlich wurde die Entfernung der Transmembranregion des Gp2 in einer PCR durch Deletionsmutagenese vorgenommen. Das so erzeugte Glykoprotein sollte in Volllänge gebildet und über den sekretorischen Weg in den Überstand von Zellkulturen sezerniert werden können.

4.5.2 Modifikation und Klonierung von MarV-/ EboV-Gp-Fc Fusionsproteinen

Die kodierende Sequenz für das humane IgG-Fc wurde als Fusionskonstrukt mit dem Rezeptorprotein Sdf1α durch Dr. N. Bannert bereitgestellt. Nach Identifikation der IgG zugehörigen Proteinabschnitte wurden durch Restriktionsschnittstellen ergänzte Primer für das gewünschte Segment entworfen und zur Amplifikation via PCR eingesetzt.

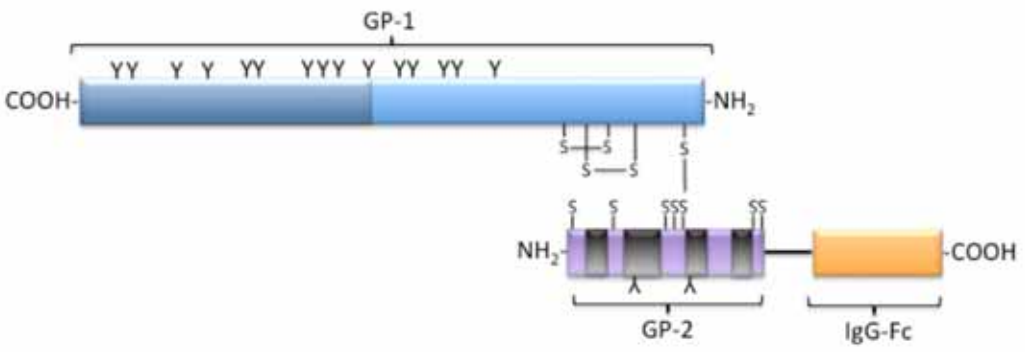


Abb.41: Schematische Darstellung vom Aufbau des modifizierten filoviralen Glykoproteins; abgebildet ist das prozessierte Glykoprotein unter Ergänzung durch einen Aminosäure- Linker und einen humanen IgG-Fusionstag am C-Terminus des Gp2; Darstellung in Blau zeigt Bereiche mit Zugehörigkeit zur Gp1-Untereinheit (Dunkelblau = mucinartige Region); in Violett abgebildet: Gp2 mit Heptarepeatregionen. Zusätzlich gekennzeichnet: N/O-Glykosylierungsstellen (Y) und Schwefelbrückenbindungen (S) zur intramolekularen Strukturgebung (Frei nach Fields Virology 5th Edition, 2006).

Die amplifizierten Abschnitte konnten erfolgreich in die Immunisierungsvektoren pTH-MarV-Gp-V5 und pTH-EboV-Gp-V5 eingefügt werden. Durch die Klonierung in einem durchgängigen Leserrahmen über *BamH1* und *Not1* wurde der vorhandene V5-Tag durch den IgG-Fc-Tag ersetzt und somit ein Fc-Fusionskonstrukt erzeugt. Um die Konzentration des Proteines in Zellen gering zu halten, und eine erleichterte Aufreinigung des *screening*-Proteins zu erlauben, wurden *single*-Mutagenese-Reaktionen mit mutagenisierenden Primern durchgeführt. Unter Bildung einer nicht komplementären Schleife des Mutterstrangs während der Amplifikation wurde der 63 bp-lange Bereich der Transmembranregion, unter Erhalt des Leserasters, vollständig entfernt. Die fehlerfreie Sequenz der Konstrukte wurde in der vollen Länge des Leserasters durch Sequenzierung bestätigt und nach Transfektion in HEK-293T durch *westernblotting* analysiert.

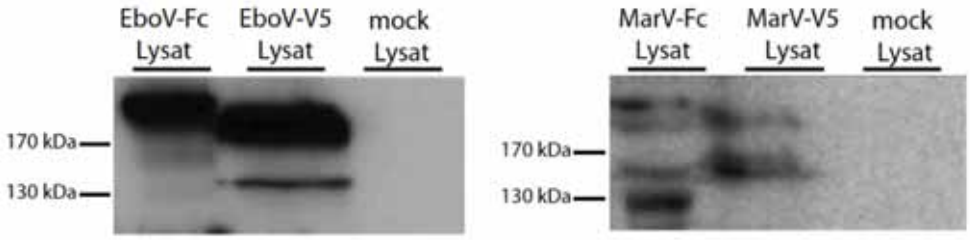


Abb.42: SDS-PAGE / Westernblot zum Nachweis der Reaktivität generierter Immunseren aus Balb/c gegen Lysate pTH-MarV-Gp-Fc und pTH-EboV-GP-Fc transfizierter HEK-293T und Urprungskonstrukte ohne Fc-Tag.; neg. Kontrolle: Leervektor transf. HEK-293T.

Wie in Abbildung 42 ersichtlich zeigt die Detektion im WB mit vereinten Immunseren (Poolserum) der immunisierten Balb/c eine deutliche Zunahme der Masse des ungespaltenen Glykoproteinvorläufers um ca. 25 kDa, im Vergleich zu den ursprünglichen V5-Konstrukten. Der Zuwachs entspricht der errechneten Masse des fusionierten humanen IgG-Fc. Aufgrund der Immunisierung der Tiere mit dem Volllängenkonstrukt waren die Poolseren in der Lage sowohl Gp1 als auch Gp2 zu detektieren.

4.5.3 Produktion und Aufreinigung von filoviralen Fusionsproteinen im mg-Maßstab

Im nächsten Schritt erfolgte die Produktion und Aufreinigung von screening-Antigen durch die Transfektion von Suspensionszellen. Die bekannten zytotoxischen Effekte von MarV- und EboV-Gp führen über die negative Regulation von Integrinen zu einem Verlust der Zelladhäsion und in deren Folge zu Apoptose der betroffenen Zellen. Um den Einfluss dieser Effekte zu umgehen, wurde zur Produktion des filoviralen Antigens die Suspensionszellline 293SF eingesetzt. Nach Transfektion mit PEI-Reagenz wurden die Zellen durch die Kultur in Rührflaschen konstant in Suspension gehalten und bei einer optimalen Zelldichte kultiviert. 36 Stunden nach Transfektion erfolgte die Aufreinigung der zellfreien Kulturüberstände über Affinitätschromatographie.

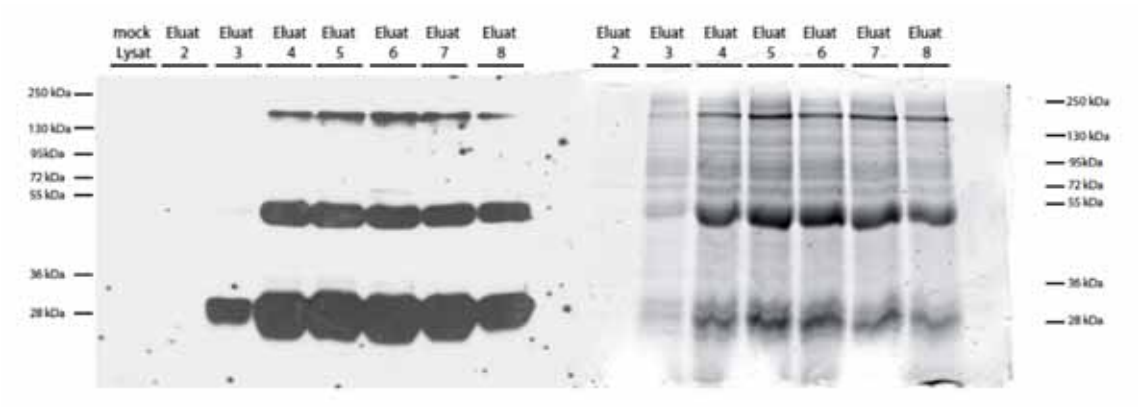


Abb.43: SDS-PAGE / Westernblot (links) exempl. zur Analyse der Elutionsfraktionen nach Aufreinigung von Ebov-Δtm-Gp-Fc durch Protein-A-Sepharose; Detektion mittels α-human-Fc spezfischem Ziegenserum (HRP); Negativkontrolle: Lysate von unbehandelten HEK-293T; Coomassie-Gel (rechts) mit korrespondierenden Proben.

Die Analyse der gereinigten Fraktionen im SDS-Gel nach Färbung mit Coomassieblau zeigte deutlich eine undegradierte Zusammensetzung aus Proteinen

unterschiedlicher Größe. Die drei Hauptfraktionen entsprechen gemäß ihrer Masse den erwarteten Gp0-Fc, Gp2-Fc und Fc-Untereinheiten. Die Isolierung des Fc-Teils mit einem kleinen Teil des Gp2 (Transmembraneinheit/ Intrazelluläre Domäne) erfolgte durch die spezifische proteolytische Spaltung über das zelluläre TACE *(tumor necrosis factor-α converting enzyme).*

Isoliertes Gp1 ist nicht zu detektieren, da eine Aufreinigung ohne Tag alleine über Proteinwechselwirkung nicht möglich zu sein scheint.

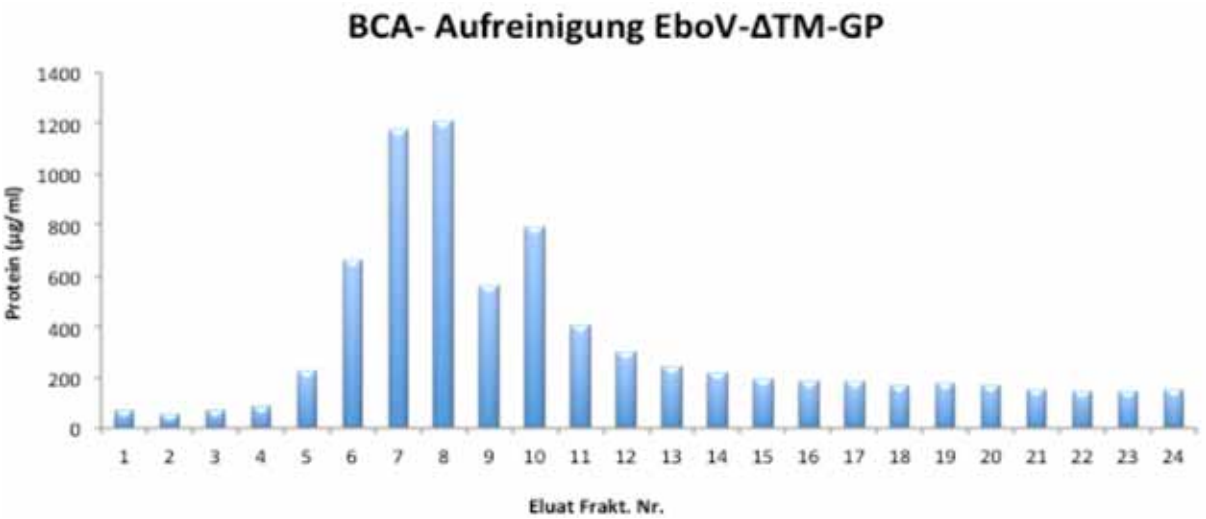


Abb.44: Proteinbestimmung von aufgereinigten Ebov-Δtm-Gp-Fc-Eluatfraktionen mittels BCA-Assay (Thermo Scientific, Rockfort, USA); Angabe der Proteinkonzentration in µg/ml

Die Bestimmung der erzielten Proteinkonzentrationen über eine Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Reagenz zeigt eine Gesamtmenge von ca. 6mg pro Transfektions-ansatz.

Die Ermittlung der durchschnittlichen Zellviabilität via Trypanblaufärbung ergab eine mit 10% geringe Rate von abgestorbenen Zellen zum Zeitpunkt der Überstand-gewinnung nach 36 Stunden. Es ist daher durchaus denkbar, die Zellpopulation in „frischem“ Medium zu resuspendieren und für die Dauer der transienten Transfektion weiteres Protein zu gewinnen.

4.5.4 Etablierung und Validierung eines EboV-GP *screening* ELISA

Unter Verwendung des gereinigten *screening*-Antigens wurde ein *capture* ELISA für Filovirus reaktive Antikörper entwickelt. Durch *coating* eines polyklonalen anti-humanen Serums mit Spezifität gegen den Fc-Teil des humanen IgG konnten die Fc-Tags des Gp- Fusionsproteins gebunden und immobilisiert werden.

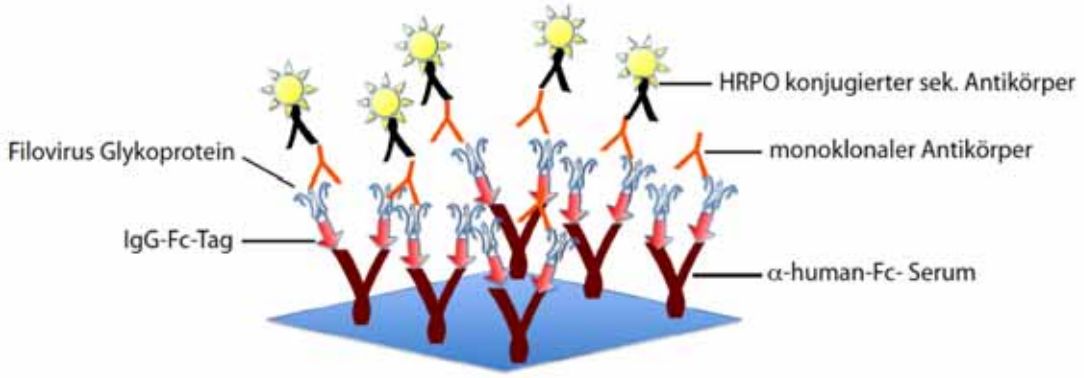


Abb.45: Schematische Darstellung des EboV-Gp-spezifischen *screening*-Systems zur Testung reaktiver Hybridomüberstände. Als Antigenfänger diente ein Serum mit Spezifität gegen humanes IgG-Fc.

Eine Titration der benötigten Menge an Antigen (Abb.46) erwies durch die eingesetzten Testseren eine optimale Konzentration des Signals bei einer Antigenkonzentration von 1,25 μg Protein/ ml der getesteten aufgereinigten Proteinfraktionen. Für den *screeningassay* war die Reaktivität der Fraktionen 3- 6 von Interesse, da diese Fraktionen in der Westernblot-Analyse einen hohen Anteil an proteolytisch unprozessiertem Gp0 aufwiesen. Somit konnte gegen Antikörper mit Epitopspezifität in Gp1 und Gp2 *gescreened* werden.

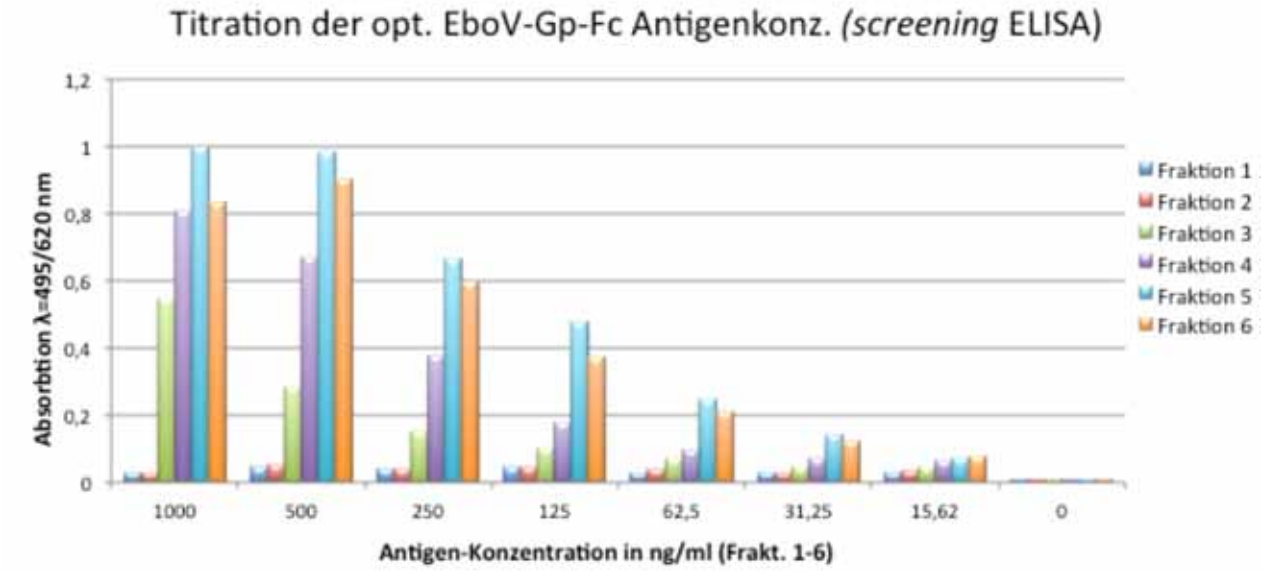


Abb.46: *capture* ELISA zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration zum Einsatz im *screening* von Hybridomüberständen. Einsatz verschiedener eluierter Fraktionen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Gp- Komponenten.

Für die folgenden Assays wurde eine Testung der Reaktivität von Immunseren unter Verwendung der als optimal ermittelten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Unter Verwendung der gepoolten Serumextrakte der DNA-immunisierten Tiere (nach 5. Immunisierung) zeigte sich eine spezifische Reaktion der Immunseren bis zu einer Verdünnung von 1:1600 bei Einsatz von Fraktion 4.

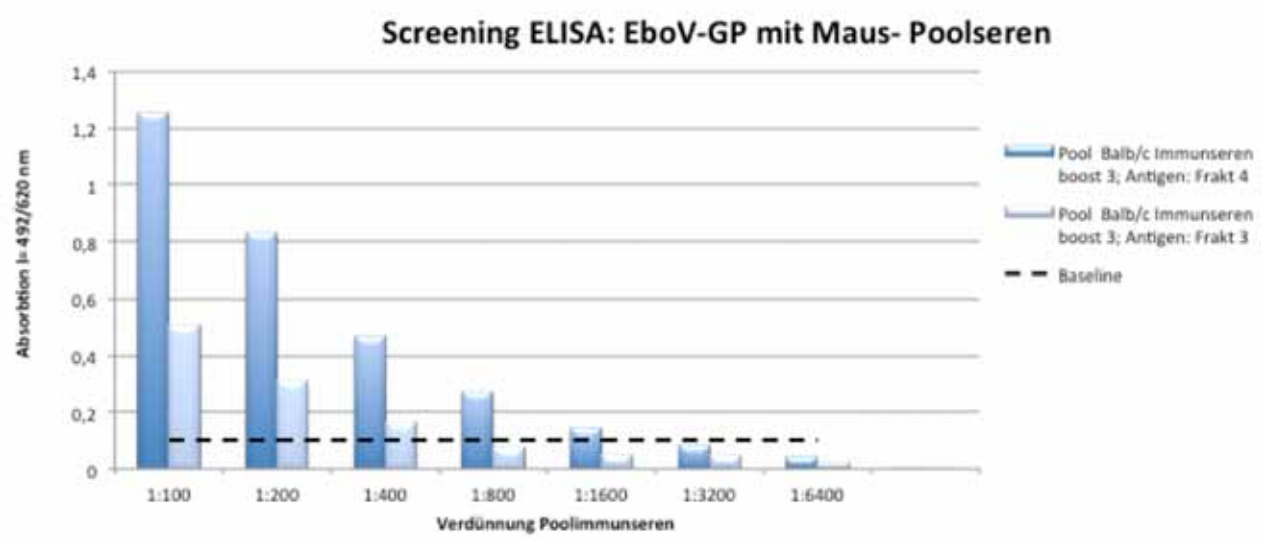


Abb.47: *capture* ELISA zur Titration generierter Immunseren im *screeningassay* unter Einsatz verschiedener Elutionsfraktionen; Mausseren wurden als Pool eingesetzt und in einem Bereich von 1:100- 1:6400 titriert. Definition der Baseline bei einer Absorbtion von 0,1

Bei Verwendung der dritten Fraktion, deren Hauptzusammensetzung im Westernblot mit Gp2 und Fc bestimmt wurde, zeigte sich eine spezifische Detektion bis 1:400. Zum Einsatz im finalen *screeningassay* wurden die zwei Fraktionen 5 und 6 mit dem höchsten Anteil an Gp0 vereint, aliquotiert und bei -80° C bis zur Verwendung gelagert.

4.5.5 Fusion von EboV-Gp-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome

Nach Bestätigung eines hohen spezifischen Titers der immunisierten Versuchstiere im *capture* ELISA wurde die Fusionsreaktion zur Gewinnung von EboV-Gp-spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Zum Einsatz in der Fusionsreaktion wurden 4,96 x 10^8 Spleenozyten präpariert und mit p3xAG Zellen zu Hybridomen fusioniert.

Tab.33: Tabellarische Auflistung der Resultate der Testung der EboV- Fusion II; Angabe der getesteten Klone pro *screening*-Runde; isolierte spezifische Klone nach Bestätigung durch *rescreening;* Gegentestung der Klone erfolgte gegen polyklonales, humanes Fc

Fusion gegen Zielantigen: EboV Gp	Screen I	Screen II	Screen III	Screen IV	gesamt
Anzahl der resultierenden Klonpopulationen	136	234	341	593	1304
Klone reaktiv gegen EboV-Gp (IgM)	0	2	4	4	10
Gegenselektion: Klone mit Reaktivität gegen BSA	0	4	1	3	8
Gegenselektion: Klone mit Reaktivität gegen IgG-Fc	0	0	1	0	1

Zur Identifikation der Antikörper-produzierenden Hybridomklone wurden 1304 Überstände der resultierenden Zellpopulationen getestet. Von diesen wiesen 10 eine spezifische Reaktion im *screeningassay* auf. Nach Verdünnung der Überstände wurde am Folgetag eine Bestätigung der Reaktion zur Sicherstellung der kontinuierlichen Antikörperproduktion durchgeführt. Von den überprüften Zellpopulationen konnte die Produktion bei 6 Mutterklonen als stabil bestätigt werden. Diese sechs Produzenten wurden zweifach subkloniert und von FKS und IL-6 bis zu einer Serumkonzentration von 10% und vollständig von IL-6 entwöhnt.

Die aus den Subklonierungen gewonnen Subklone wiesen annähernd identische Eigenschaften in der ELISA-Testung auf. Daher wurden nach anschließender Bewertung der Stabilität durch FACS-Analyse (Daten nicht gezeigt) jeweils die stabilsten Subklone zur weiteren Verwendung ausgewählt.

Zur Gewinnung von gereinigten IgM wurden die entwöhnten Klone bis zu einem Volumen von 500 ml Kulturmedium expandiert und kultiviert, bis 80% der Kultur durch Nährstoffmangel abstarben. Die zentrifugierten und sterilfiltrierten Überstände wurden für die FPLC-Aufreinigung mittels einer Protein-L-Agarose-Martix herangezogen.

Tab.34: Tabellarische Auflistung der gewonnenen, ÄKTA gereinigten, Antikörper unter Angabe der Hybridom-Bezeichnung; Angabe der totalen Ausbeute per Liter Hybridomüberstand

Hybridom-Bezeichnung	Konzentration	Ig- Isotyp
523-1	0,2 mg / ml (total 1,2mg)	M
553-3	0,2 mg / ml (total 1,8mg)	M
441-4	0,2 mg / ml (total 1,1mg)	M
420-3	0,2 mg / ml (total 2mg)	M

Die Reinigung der IgM-Überstände über Säulenchromatographie ergab eine Ausbeute von 1-2 mg gereinigtem AK / 500ml Zellkulturüberstand.

4.5.6 Charakterisierung der Detektionsparameter von identifizierten monoklonalen EboV-GP-spezifischen Antikörpern

Die Testung zur Antigenspezifität der IgM-Isolate zeigte deutliche Unterschiede der gewonnenen Antikörper. Während, wie in Abb.48 erkennbar, die Isolate der Hybridome F2 523-1, F2 553-3 und F2 420-3 in der Lage waren, die trimeren „*core complex*“-Untereinheiten des Gp2 bei 73 kDa aus konzentrierten VLP-Präzipitaten nachzuweisen, zeigte der Einsatz des Isolats F2 441-4 Signale bei der berechneten Masse des monomeren Gp1.

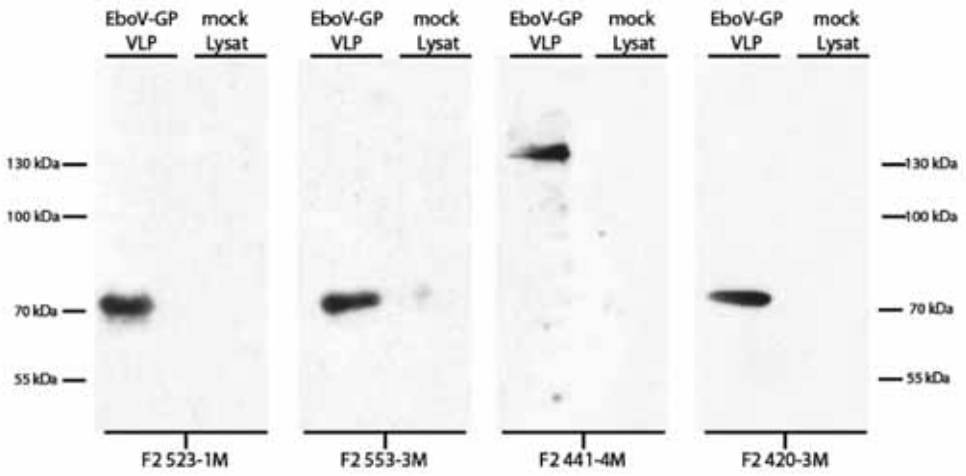


Abb.48: SDS-PAGE / Westernblot zum Nachweis der Reaktivität generierter monoklonaler Antikörper gegen EboV-Gp; Auftrag UZ-Pellets pseudotypisierter EboV-VLP (HIV); Negativkontrolle: *mock*-transfizierte zelluläre Lysate.

Bei Verwendung im *capture* ELISA gegen das isolierte *screening*-Antigen konnte mit den gereinigten IgM-Präzipitaten eine spezifische Detektion von Gp bis zu einer Detektionsantikörperverdünnung von 312,5 ng / ml für alle Antikörper, außer F2 441-4 (Nachweis bis 1250 ng / ml) erreicht werden. F2 420-3 und F2 553-3 zeigten spezifische Reaktionen bis zu einer eingesetzten Konzentration von 312 ng AK / ml. Somit ist die erfolgreiche Detektion von EboV-Gp selbst bei geringen Konzentrationen der generierten IgM-Präparationen effektiv möglich.

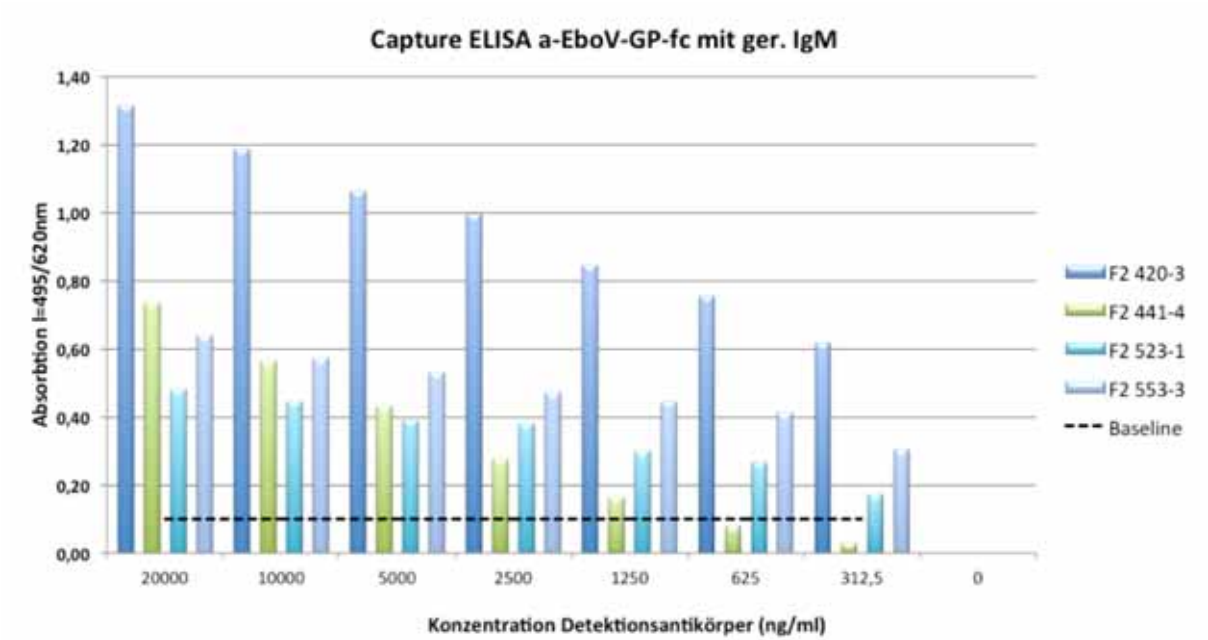


Abb.49: *capture* ELISA gegen EboV-Gp-Fc (*screeningassay*) unter Einsatz Äkta- gereinigter monoklonaler IgM; Darstellung von Verdünnung des mAK gegen die Absorbtion nach kolorimetrisch detektierbarem Substratumsatz. Baseline definiert bei einer Absorbtion von 0,1.

4.5.7 Evaluierung neutralisierender Eigenschaften generierter monoklonaler IgM

Für den therapeutischen Einsatz von Antikörpern ist die Eigenschaft der Funktionsblockade von erheblichem Interesse. Um beurteilen zu können, ob die erzeugten Antikörper in der Lage sind, die Infektion von permissiven Zellen durch pseudotypisierten VLP zu verhindern, wurden Versuche zur Neutralisation von SHIV-Luci-VLP durchgeführt. Diese hybriden VLP aus SIV und HIV wurden mit einem *firefly*-Luziferasereportergen ausgestattet, um eine möglichst sensitive Detektion von Infektionsereignissen dokumentieren zu können.

Wie in Abbildung 50 ersichtlich, waren unterschiedliche Konzentrationen der eingesetzten AK nicht in der Lage, die Infektiösität der virusartigen Partikel im Vergleich mit unbehandelten VLP zu senken. Bei hohen Konzentrationen der Isolate F2 441-4 und F2 420-3 konnte ein unterstützender Effekt der Antikörper auf die Infektion mit den verwendeten Partikeln beobachtet werden.

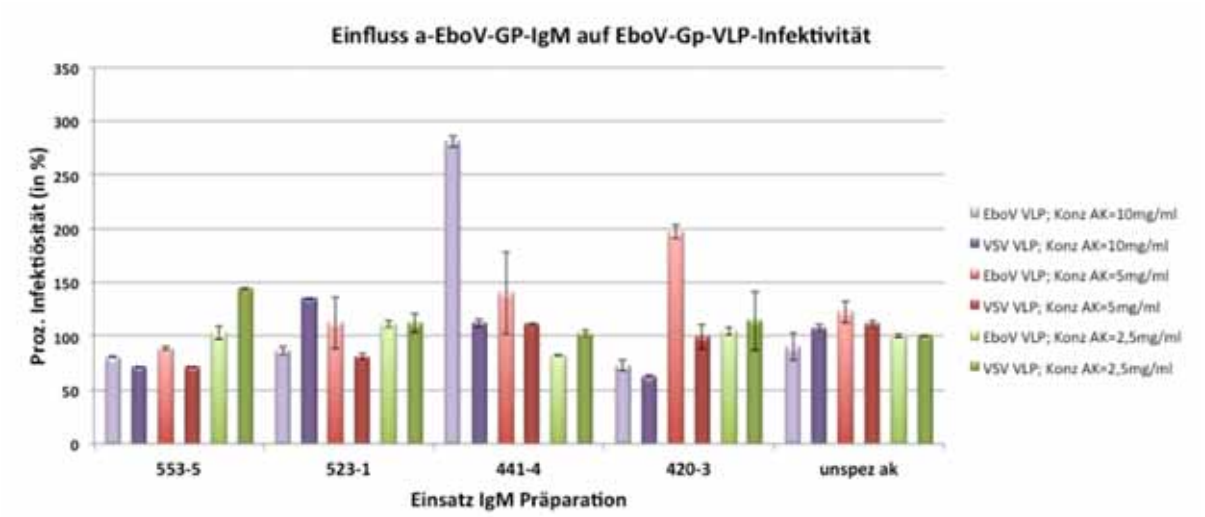


Abb.50: Bestimmung der Infektion von HEK-293T mittels Luziferase Reporterviren nach Inkubation mit Verdünnungen spezifischer und unspezifischer mAK; Rate der Veränderung der Luciferaseexpression nach erfolgreicher Infektion durch proz. Anteil gemessen an VLP ohne Antikörper Präinkubation.

Analog zum Versuch der spezifischen Inhibition der EboV-Gp-VLP-Infektion wurden zur Kontrolle VLP mit dem Glykoprotein des vesikulären Stromatitisvirus verwendet. Wie zuvor im EboV-Gp-VLP-Versuch konnte keine effiziente Reduktion der Infektiösität beobachtet werden. Im Fall von F2 553-5 und F2 420-3 wurde eine leichte Reduktion der Infektionsrate bei hohen Antikörperkonzentrationen beobachtet. Da dieser Effekt bei Verdünnung der IgM nicht beobachtet werden kann, wird von einer unspezifischen, möglicherweise sterischen Hinderung der Infektion ausgegangen.

Die mangelnde Inhibiton der Infektion durch EboV-VLP ist für die Entwicklung von Detektionsantikörpern nicht von Nachteil. Der Isotyp IgM ist aufgrund seiner großen Masse von 970 kDa und einer Bindungsaffinität, ohne Maturierung durch den Prozess der somatischen Hypermutation, nicht für die Neutralisation von Pathogenen prädestiniert. Es ist denkbar, dass der Anstieg der Infektiösität über eine räumliche Konzentrierung des Virus durch den Antikörperkomplex im Bereich der Zelloberfläche die Internalisierung des VLP erleichtert und somit die Rate der Infektion erhöht.

4.6 Generierung von Expressionsvektoren zur Herstellung von filoviralen Standards (VLP)

Zusätzlich zu den Antigenvektoren wurden die Sequenzen für das filovirale Matrixprotein Vp40 generiert und durch die Firma Geneart GmbH (Regensburg, DBR) synthetisiert. Das virale Protein Vp40 ist durch Nutzung des ESCRT-Stoffwechselweges autonom in der Lage in Wirtszellen eine Ausschleusung von filoviralen VL- Partikeln zu induzieren. Diese Erzeugung von virusartigen Partikeln wird durch die Koapplikation von viralem Glykoprotein zusätzlich gesteigert. Um die Möglichkeit zu erhalten, virusartiges Standardmaterial für eine Testung der Detektionsantikörper in den Detektionsplattformen zu erzeugen, wurden V5- getagte Expressionskonstrukte für MarV- und EboV-Vp40 in kodonoptimierter Form in den Vektor pTH kloniert und auf Expression in HEK-293T untersucht.

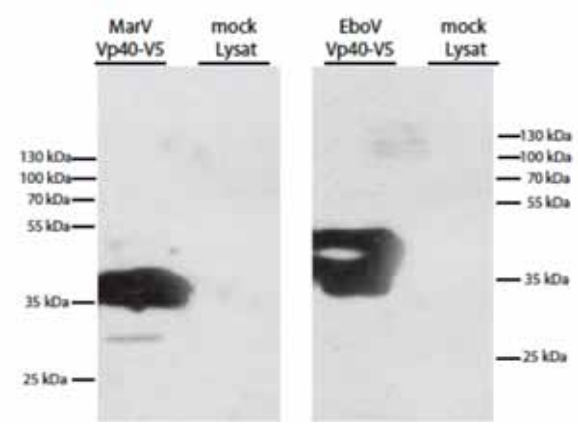


Abb.51: SDS-PAGE/ Westernblot zum Nachweis der Expression von pTH-EboV-Vp40-V5 und pTH-MarV-Vp40-V5 nach Transfektion in HEK-293T. Nachweis erfolgte über einen α-V5-HRP – Antikörper (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DBR); Neativkontrolle: Lysate von HEK-293T transfiziert mit pTH- Leervektor.

Die Kodonoptimierung der Konstrukte führte zu einer hohen Expression des Matrixproteines in transfizierten Zellen. Die hohe Zytotoxizität des Proteins wurde durch die kontinuierliche Ausschleusung nicht gemindert und führte 24-48h nach Transfektion zu Apoptose der exprimierenden Zelle.

Um die erwartete Partikelproduktion mikroskopisch dokumentieren zu können, wurde ein Fusionskonstrukt des EboV-Vp40 erzeugt, welches am C-Terminus des Proteins eine Verschmelzung mit dem autofluoreszenten Protein drFP583 aufwies. Das drFP583 oder auch dsRed ist ein 25 kDa Derivat des „*red fluorescent protein*“ aus

der Scheibenanemone *Discosoma spec.*, welches nach Anregung durch kurzwelliges Licht eine photostabile Fluoreszenz im langwelligen Bereich produziert.

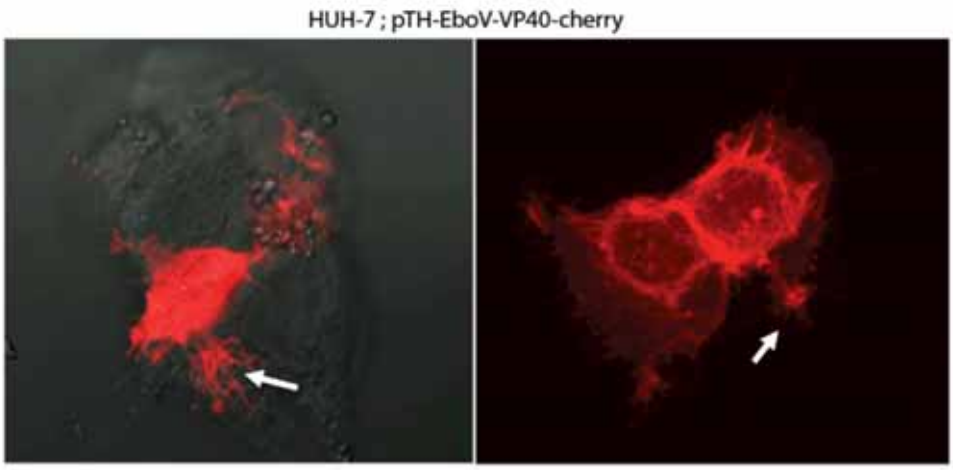


Abb.52: Autofluoreszente cLSM-Aufnahme von HUH-7-Zellen nach Transfektion mit pTH-EboV-Vp40-cherry. Fusionsproteine fluoreszieren durch die Anregung des RFP-verwandten dsRed-Proteins. Filopodienartige Ausläufer der Zellen sind durch Pfeile markiert. Abbildung, links, Vergr. 400x: Transmissionskanal in Überlagerung mit dem roten Fluoreszenskanal. Weitere untransfizierte Zellen sind sichtbar; Abbildung, rechts, Vergr. 630x: isolierter Fluoreszenskanal (rot).

Nach Transfektion in HUH-7-Zellen konnte die Expression des 65 kDa Fusionsproteins durch eine starke Fluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen werden. Die Untersuchung der durch Vp40-Konstrukte transfizierten HUH-7-Zellen zeigte die Induktion einer vermehrten Bildung von Zellausläufern oder Filopodien, die sowohl apikal als auch basal ausgebildet wurden.

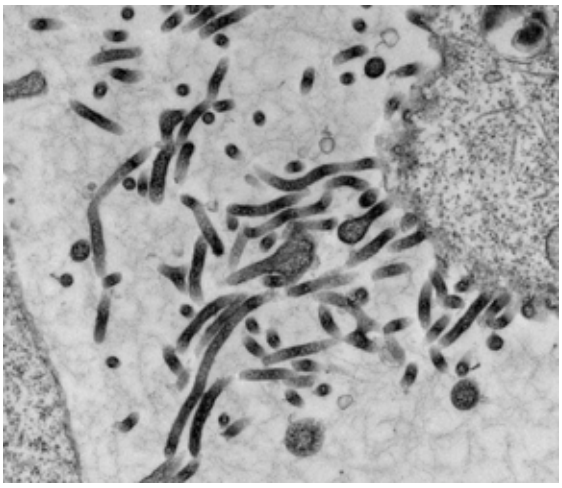


Abb.53: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme filovirusartiger VLP nach Transfektion von HEK-293T mit pTH-EboV-Gp-V5 und pTH-EboV-Vp40-V5. Ultradünnschnitte der Zellen (ca.80 nm) in negativer Kontrastierung. Vergrößerung ca. 20000x.

Eine Präparation der mit pTH-EboV-Gp-V5 und pTH-EboV-Vp40-V5 transfizierten Zellen durch Negativkontrastierung und Analyse im TEM bestätigte die Existenz von Ultrastukturen mit filovirusartiger Morphologie (Abbildung 53), was zusätzlich auf die Knospung von filoviralen Partikeln hinweist.

Die Fluoreszenz der Zellen ermöglichte eine weiterführende Feincharakterisierung der Oberflächenstruktur durch korrelative Mikroskopie. HUH-7-Zellen wurden in gerasterten μ-*dishes* (Ibidi GmbH, Deutschand) kultiviert und mit EboV-VP40-dsred und Ebola Gp-V5-Vektoren transfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurden in der mikroskopischen Analyse fluoreszierende Einzelzellen identifiziert und deren Position mittels des Koordinatensystems der Kulturplatten ermittelt. Nach Bearbeitung der Probe durch die Kritische-Punkt-Trocknung und *Besputtern* mit Goldpartikeln wurden die Präparate ins TEM transferiert und die analysierten Zellen anhand ihrer Position und Morphologie identifiziert und elektronenmikroskopisch untersucht.

Bei Zellen mit dokumentierbarer Expression des viralen Matrixproteins in Fusionseinheit mit dsRed ließ sich eine deutliche Änderung der Oberflächenstruktur beobachten. Die vermehrte Bildung von filopodienartigen Strukturen und sphärischen Buddingketten lässt auf die Knospung von filovirusartigen VLP schließen, deren Morphologie sowohl als sphärischer Partikel als auch als filamentöse Viruseinheit auftreten kann.

Die beobachteten Strukturen traten ausschließlich auf der Oberfläche von RFP exprimierenden Zellen auf. Die Oberfläche von Zellen mit Morphologie des Wildtyps zeigte eine überwiegend glatte Struktur und in einzelnen Fällen lamellopodienartige Ultrastrukturen.

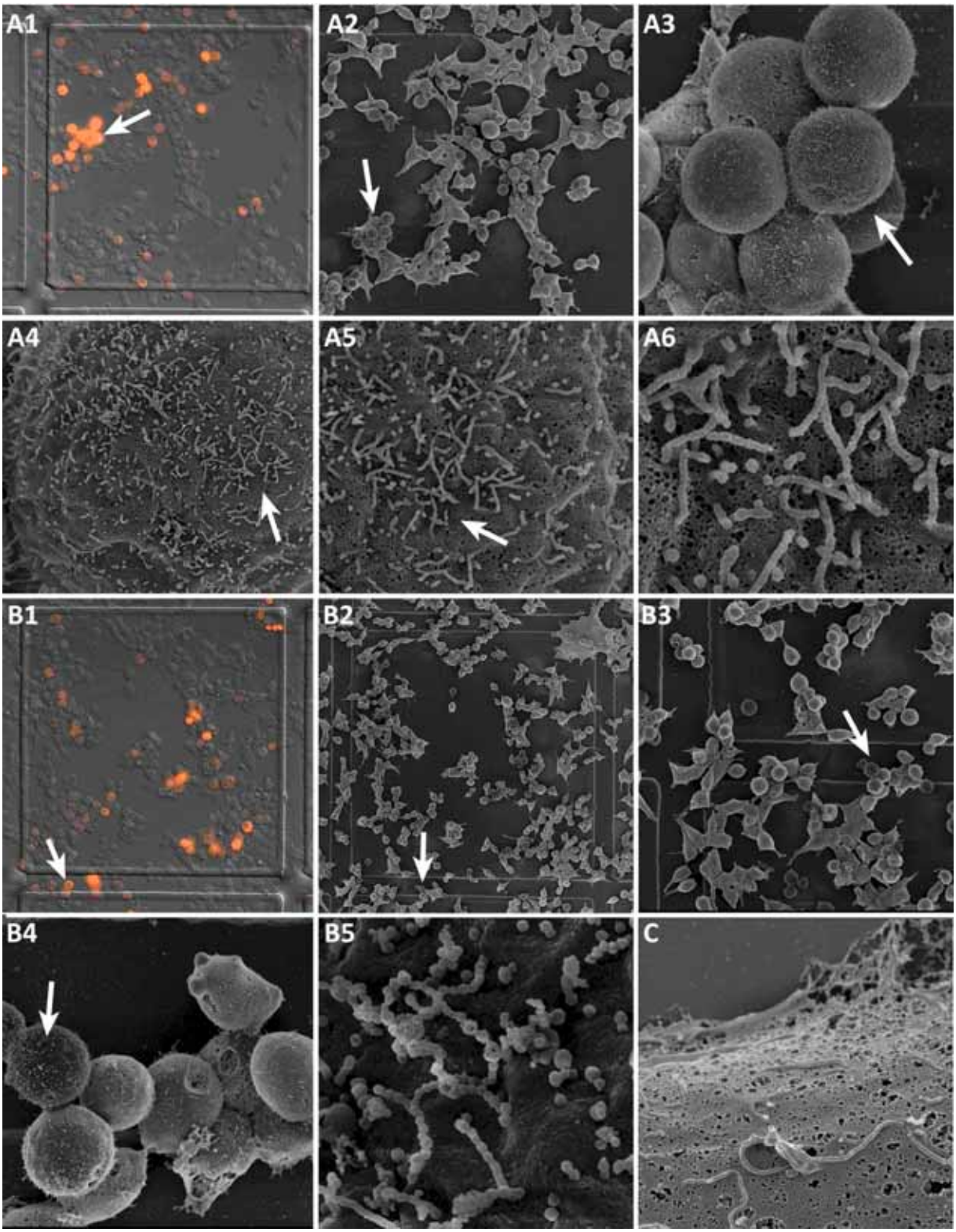


Abb.54: Korrelative Analyse von EboV-Gp und Vp40-cherry transfizierenden HEK-293T durch cLSM und REM. Abbildung A1 zeigt ein Koordinatenfeld der µ-*dishes* mit den enthaltenen transfizierten Zellen. A2 zeigt dasselbe Feld in der REM-Aufnahme. A3-A6 zeigen Vergrößerungen des identischen Ausschnittes, Zellgruppen von Interesse wurden mit Pfeilen markiert; Abbildung B1-B5 gezeigt nach identischem Schema. Sichtbar: eine Zellgruppe mit Knospung sphärischer Partikel; Abbildung C: Exemplarische REM-Aufnahme der Oberfläche untransfizierter Zellen.

5. Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit sollte die Erzeugung von Detektionsreagenzien zum spezifischen Nachweis von hochpathogenen Stoffen stehen. Durch die Beteiligung am BiGRUDI-Projekt, für die Entwicklung von ultraschnellen Nachweissystemen gegen biologische Gefahrenstoffe in einem bioterroristischen Zusammenhang, wurden im Projektverbund zwei Kategorie-A-Agenzien zur Entwicklung von monoklonalen Antikörpern ausgewählt (Filoviren, BoNT-A1).

Der Umgang mit diesen Agenzien erfordert ein hohes Maß an Vorkehrungen in Bezug auf die Arbeitssicherheit, und im Fall von MarV und EboV, spezialisierte Laboreinrichtungen zum Schutz vor Infektion und Ausbreitung des bearbeiteten Pathogenes. Die für die Arbeit mit Filoviren notwendigen BSL-4-Laboratorien sind zum Stand des Jahres 2011 nur in den Einrichtungen des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin (BNI, Hamburg) und an der Philipps-Universität in Marburg verfügbar (Bundesministerium-für-Arbeit-und-Soziales, 2011). Die extreme Begrenzung der qualifizierten und zertifizierten Einrichtungen zur Bearbeitung von Organismen der Gefährdungsstufe 4 erschwert maßgeblich die Entwicklung von Reagenzien zur Diagnostik oder Therapie in Bezug auf biologische Gefahrenstoffe. Eine erfolgreiche Substitution der immunologisch relevanten Antigene, mit für die Arbeitssicherheit unbedenklichen, biologischen Äquivalenten, zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern stellt somit einen maßgeblichen Fortschritt zur bestehenden Laborpraxis dar.

Weitere der im Verbundprojekt beteiligten Kooperationspartner, wie das Zentrum für biologische Sicherheit 3: Mikrobielle Toxine des RKI (BoNT, Rizin) und die Phillips Marburg Universität (MarV, EboV), bearbeiteten die gewählten Pathogene im Projektverlauf über den klassischen Weg der Verabreichung von inaktivierten Proteinantigenen. Auf diesem Wege sollten Antikörper gegen verschiedene BoNT-Serotypen und die Hauptstrukturproteine Vp40 des MarV und EboV erzeugt werden. Der Beitrag dieser im FG18 durchgeführten Arbeit, durch die Erzeugung von DNA-Vektoren zur Expression von Zielantigenen, erlaubte in diesem Zusammenhang die ergänzende Bearbeitung von Antigenstrukturen mit einem hohen Reinheitsgrad, unter Ausschluss einer Gefährdung für das beteiligte Laborpersonal und unter nativen Bedingungen. Durch die Kooperation der beteiligten Institute wurde es somit möglich, sowohl die Antikörpergewinnung gegen inaktive BT-Agenzien als auch die Induktion von Detektionsagenzien gegen native Antigene gemeinschaftlich zu erreichen.

5.1 Erzeugung von nicht toxischem BoNT-A1 Antigen durch synthetische Vektorkonstrukte

Im Fall von BoNT-A1 wurde durch die erfolgreiche Erzeugung eines kodierenden Immunisierungsvektors pTH-BoNT-A1-RYM-V5 die Möglichkeit geschaffen, eine kodonoptimierte Sequenz des *clostridialen* Toxoids in Versuchstieren zur Expression zu bringen. Die Versuche zur Expression des Proteins zeigten eine starke Überexpression von BoNT-A1 in eukaryontischen Zellen. Die Bestätigung der korrekten Struktur und die Identität des Proteins wurden hierbei durch BoNT-A1-spezifische Antikörper geführt.

Somit ist es als erwiesen anzusehen, dass die erzeugte Sequenz für BoNT-A1-RYM in der Lage war, ein BoNT-A1-homologes Protein zu erzeugen, welches die immunogenen Eigenschaften des nativen Toxins nachbildet.

Nach Immunisierung von Versuchstieren mit dem erzeugten Expressionsplasmid wurde der Gesundheitszustand der behandelten Tiere überwacht und in Bezug auf bekannte Symptome einer BoNT-Intoxikation bewertet. Die Mutation im aktiven Zentrums der Protease durch Austausch der Aminosäuren R363A und Y365F führte, wie bei Pier et al. 2008 beschrieben, zur vollständigen Entgiftung des Proteins. Das gängige Tiermodell zur Bestimmung der Toxizität von Botulinumneurotoxinen evaluiert, neben der Erfassung der letalen Dosis, Symptome wie Gewichtsverlust, Orientierungslosigkeit und die Ausbildung einer charakteristischen Wespentaille in Versuchstieren (Aoki et al., 2010, Montecucco and Molgo, 2005). Die Expression, sowohl in Mäusen als auch im aviären System, zeigte keinen sichtbaren Effekt der Immunisierung auf den Gesundheitszustand der Tiere. Im Besonderen bei Legehennen schlagen sich selbst geringe Veränderungen in Bezug auf Umweltbedingungen, Krankheit und den Gemütszustand in einer Verminderung der Eiablage nieder (Sirotkin and Golubev, 1983, Higashihara et al., 1987). Daher ist aufgrund einer konstant hohen Legeleistung der Versuchstiere davon auszugehen, dass das verwendete Toxoid sämtliche pathogenen Effekte durch die Veränderung der Aminosäuresequenz verloren hat.

5.2 Evaluierung von genetischen Zytokinadjuvantien zur stimulierenden Immunmodulation in *Gallus gallus*

Die Generierung von aviären Zytokinen resultierte in der erfolgreichen Konstruktion von Expressionsvektoren für die aviären Zytokine IL-6, IL-1β und IFN-γ. Die Untersuchungen der Regelkreisläufe des Zytokinnetzwerks in Vögeln haben in den letzten Jahren zu Fortschritten in dem Verständnis von stimulatorischen und inhibitorischen Effekten einzelner Peptidhormone auf die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten geführt (Erhard et al., 2000, Nishimichi et al., 2005, Wu et al., 2008, Wang et al., 2003, Wu et al., 2007). Im Vergleich zu bei Säugetieren validierten genetischen Adjuvantien, wie GM-CSF, ist die Zahl der durchgeführten Studien zu Zytokinadjuvantien in Vögeln bisher gering. Weining et al. 1998 beschreiben in ihrer Studie ein zu Säugetieren analoges Zytokin IL-1β, dessen pleiotrophe Effekte die Förderung der Reifung von B-Zellen und die Steigerung der Antikörperproduktion umfassen. Die bisher publizieren Informationen lassen den Schluss zu, dass einzelne Zytokine wie IL-1β, IL-6 und IFN-γ sich im Besonderen für die gezielte Anwendung als Adjuvants eignen. Min et al. 2001 bestätigen diese Annahme durch die Adjuvantierung einer suboptimalen DNA-Immunisierungsdosis durch die genannten Zytokine mit einer nachfolgenden Ermittlung der protektiven Effekte bei einer Infektion mit *Eimeria acervulina*. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde eine Assemblierung der publizierten Sequenzen der einzelnen Zytokine aus Oligonukleotiden durchgeführt und eine erfolgreiche Expression in Zellkultur erreicht. Die verhältnismäßig kleinen Proteine konnten durch Sekretion aus transfizierten Zellen in Kulturüberständen der Zellkultur nachgewiesen werden. Eine effektive Hormonwirkung in Versuchstieren durch humorale Verbreitung der Zytokine, über die lokale Applikationsstelle hinaus, sollte dadurch sichergestellt sein. Aufgrund der logistischen Limitierung der Studiengröße in Kooperation mit dem Klinikum Benjamin Franklin konnten in den vergleichenden Studien nur zwei der drei generierten Zytokine an Gruppen von Legehennen getestet werden. Der erwartete resultierende Adjuvantseffekt von IL-6 und IL-1β, auf die Induktion von BoNT-A1-spezifischen IgY- Antikörpern, konnte im Vergleich mit Titerverläufen von DNA- Immunisierung ohne Adjuvant bestätigt werden. Im Vergleich konnte die höchste Stimulation der spezifischen Antikörperantwort durch die Verabreichung von IL-6 kodierenden Vektoren erreicht werden, wobei der Zeitraum der Datengewinnung bei einem der Tiere deutlich kürzer ausfiel. Das Ausbleiben der Eiablage des Tieres 98 kann nicht direkt mit der Verabreichung von Zytokin

korreliert werden. Huhn 99 derselben Gruppe zeigte kein vergleichbares Verhalten. Laut Auskunft des Versuchsleiters Prof. Dr. Schade konnte nach Sektion des Versuchstieres 98 eine abnorme Anatomie des Reproduktionsapparates festgestellt werden, was zu einem schädlichen Einfluss auf die Produktion von Eiern geführt haben könnte (Schade, 2009). In Bestätigung unserer Beobachtungen belegen weitere Studien den erfolgreichen Einsatz von aviären Interleukinen zur Stimulation der antigenspezifischen Antikörperinduktion bei einer Tandemapplikation (kodiert mit Antigen im selben DNA- Vektor) (Cho et al., 2004). Im Unterschied konnte unsere Studie zeigen, dass die Koapplikation genetischer Adjuvantien mit Antigen erfolgreich Effekte in *trans* induzieren konnte.
Es ist bekannt, dass die in Mikroorganismen, wie *E.coli* amplifizierte Plasmid-DNA, Motive einer CpG-Methylierung enthalten kann. CpG-Motive stimulieren als Liganden den *toll like*-Rezeptor 9 und besitzen dadurch eine immunmodulatorische Adjuvatswirkung, die in verschiedenen Modellen bestätigt werden konnte (Kim et al., 2011b, Kim et al., 2011a, Sun et al., 2000). Die Immunisierung von Hennen durch BoNT-A1-Expressionsvektoren ohne Adjuvant führte zu einer schwachen detektierbaren Reaktion der immunisierten Tiere auf die Verabreichung, die eine deutlich geringere Wirkung des Antigens ohne zusätzliche Stimulation belegte. In diesem Zusammenhang erscheint der Einsatz von zusätzlichen genetischen Adjuvantien in Hühnern als äußerst notwendig und sinnvoll.

Im Zuge der durchgeführten Studie konnten große Mengen BoNT-A1-spezifischen IgY produziert werden. Bei einem durchschnittlichen IgY-Gehalt von 60 mg pro präpariertem Eidotter ergibt sich im Anteil eine erhebliche Menge an spezifischem Rohstoff, der beispielsweise als polyklonales Fänger oder Detektionsreagenz in Schnelldetektionen eingesetzt werden kann (Pauly et al., 2011).

5.3 Immunisierung von Balb/c- Mäusen gegen BoNT-A1 zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Im Gegensatz zu den Beobachtungen im aviären Versuchstier konnte im Säugetiermodell schon nach kurzer Zeit ein signifikanter Titer BoNT-A1-reaktiver Antikörper, ohne den Einsatz von Adjuvantien, induziert werden. Die getesteten polyklonalen Immunseren waren in der Lage, sowohl das in Säugerzellen exprimierte Antigen zu detektieren als auch das kommerziell erworbene, bakteriell exprimierte, BoNT-A1 der Firma Toxogen AG (Hannover, DBR) zu erkennen.

Zusätzlich wurde zur Absicherung der strukturellen Homologie zwischen RYM-Toxoid und nativem BoNT-A1-Toxin eine Testung von nativem BoNT-A1-Toxin durchgeführt und erfolgreich bestätigt. Der Einsatz der induzierten Immunseren in Immunpräzipitationsstudien gegen das nativ gefaltete bakterielle BoNT-A1-Toxoid zeigte eine effektive Präzipitation des eingesetzten Toxins. Daher konnte sichergestellt werden, dass die induzierten Immunseren das Antigen in seiner nativen Form erkennen konnten. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die Detektion von nativen und toxischen Proben dar. Somit wurden alle Voraussetzungen geschaffen, um Antikörper zu induzieren, die das native Antigen in einem Detektionsansatz erkennen können sollten. Wie durch Li et al. in diesem Jahr gezeigt, ist es möglich, die Immunogenität von BoNT durch den Einsatz von GM-CSF zu steigern, um in kurzen Zeitpannen eine protektive Immunreaktion zu provozieren (Li et al., 2011). Unter Umständen hat die zusätzliche Kodonoptimierung des verwendeten Immonogenes diese Art der Stimulation überflüssig gemacht, wie dies für das gp120 von HIV demonstriert werden konnte (Liu et al., 2004). Da für die Induktion von Gp-Detektionsantikörpern eine Stimulation in kurzen Zeiträumen nicht entscheidend ist, wurde für die Induktion ein klassischer Zeitrahmen für die Immunisierungen gewählt und die Titerentwicklung von BoNT-A1-reaktivem IgG im Laufe der Immunisierung durch den beschriebenen *capture* ELISA bestätigt.

5.3.1 Fusion von BoNT-A1-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome & Charakterisierung resultierender monoklonaler Antikörper

Nach der nachweislichen Entwicklung eines signifikanten Titers der Versuchstiere gegen das BoNT-A1-Antigen wurden Fusionen der extrahierten Spleenozytoen zur Hybridomproduktion durchgeführt. Als Grundlage der Bewertung des Titers wurde der Gehalt von spezifisch reaktivem IgG, in den induzierten Immunseren, durch einen fcγ-Ketten-spezifischen Sekundärantikörper dokumentiert. In der ersten durchgeführten Fusion konnten trotz dieser Tatsache keine Hybridome isoliert werden, die stabil den Isotyp IgG sezernierten. Es konnte durch Oynebraten et al. gezeigt werden, dass selbst die Anwendung einer DNA-Einzelinjektion zur erfolgreichen Generierung von monoklonalen AK führen kann (Oynebraten et al., 2011). Im Allgemeinen wird eine höhere Stabilität von Hybridomen des IgG_1-Isotyps beschrieben (Seaver, 1992), jedoch konnte ein annäherndes Verhältnis von 1:5 bis 1:10 zwischen IgG und IgM Isotypen der gewünschten Spezifität in den durchgeführten

Fusionen beobachtet werden. Unsere Beobachtungen und Erfahrungen zeigen, dass dieses Verhältnis kein exklusives Phänomen der DNA-Induktion ist. Im Zuge der durch ZBS3 durchgeführten Fusionen wurden vergleichbare Effekte beobachtet. Um das Risiko eines unzureichenden Klassenwechsels durch das Ausbleiben der CSR im Zuge der zweiten Fusion ausschließen zu können, wurden an den Tagen -3, -2 und -1 vor Fusion der extrahierten B-Zellen eine intraperitoneale Injektion des BoNT-A1-RYM in Proteinform verabreicht. Aufgrund der beabsichtigten gezielten Induktion von Antikörpern durch DNA-Immunisierungen war eine zusätzliche Induktion von Antikörpern über Proteinantigen unerwünscht. Die Immunisierung in kurzem Abstand zur Extraktion der Milz diente der kurzfristigen Stimulation der bereits erzielten Immunreaktion und birgt in der Theorie nur ein geringes Risiko, Antikörper neuer und ungewollter Spezifität durch das Proteinantigen zu induzieren.

In Folge dieser Behandlung konnten in der zweiten durchgeführten Fusion, zur Erzeugung BoNT-A1-spezifischer monoklonaler Antikörper, erfolgreich stabile Hybridome des Isotyps IgG isoliert werden. Aus dem erzeugten Fundus von 39 Mutterklonen wurden 5 Klone zur weiteren Bearbeitung ausgewählt. Von diesen Kandidatenagenzien konnten 4 stabile Zellpopulationen identifiziert werden, die hochspezifisch gegen das eingesetzte BoNT-A1 reagierten. Nach Entwöhnung und Aufreinigung der Immunglobuline wurde die Eignung der Antikörper für die angestrebte Schnelldetektion von Toxin ermittelt. Die drei vordringlichsten Merkmale für kommerziell implementierbare Antikörper sind eine hohe Antigenspezifität, die Verwendbarkeit des Antikörpers in Kombination mit weiteren Detektionsreagenzien und eine möglichst niedrige Nachweisgrenze des Antigens durch den Antikörper. Die generierten Antikörper wurden in Bezug auf diese Parameter charakterisiert und somit über eine mögliche Verwendung in den Abicap®- und Approve-B®-Systemen entschieden. Durch die erfolgreiche Anwendung der Strategie zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern konnten sowohl monoklonale Antikörper mit Epitopspezifität gegen die leichte als auch gegen die schwere Kette des BoNT-A1 erzeugt werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden, die aufgrund der toxischen Wirkung der leichten Kette nur die schwere Kette des BoNT zur Generierung von Antikörpern einsetzen, erlaubt die Methode der DNA-Immunisierung unter Verwendung des RYM-Toxoids eine vollwertige Präsentation des kompletten Toxins (Yu et al., 2007b). Der Großteil der generierten Reagenzien wies eine Spezifität gegen die schwere Kette auf. Die Ermittlung der absoluten Nachweisgrenzen für das lösliche Antigen im *capture*

ELISA, der den Goldstandard für die finale Anwendung darstellt, deutete auf eine hohe Sensitivität in Kombination mit einem polyklonalen Fänger Serum hin. Die erzielten Nachweisgrenzen, im einstelligen pg- Bereich pro ml, erlauben eine sensitive Detektion von subletalen Dosen des BoNT-A1. Die Spanne der publizierten letalen Dosen bei BoNT-A1 reicht von 1 ng/kg Körpergewicht im Fall der intravenösen Verabreichung bis zu 1 mg BoNT-A1/kg bei Ingestion (Shearer et al., 2010, Kull et al., 2010, Yu et al., 2007a). Somit ist es möglich mit den generierten Reagenzien bereits Bruchteile einer lebensgefährlichen Dosierung in wässrigen Lösungen zu detektieren. Das Erreichen von optimalen Detektionsgrenzen ist im Zusammenhang mit der Diagnostik von Umwelt und Patientenproben von enormer Wichtigkeit, da die Zusammensetzung von fraglichen Lebensmittel-, Blut- oder Urinproben durch inhibierende Inhaltsstoffe oder extreme pH-Werte die Assayqualität unter Umständen signifikant negativ beeinflussen kann (Kull et al., 2010). Durch Kombination der vier isolierten Antikörper war die Bildung von 10 unterschiedlichen Fänger-/Detektorkombinationen zur Detektion im ELISA möglich, die effektive Reaktionen im angestrebten Versuchsansatz zeigten. Die verbleibenden 6 Kombinationsansätze zeigten keine Ergebnisse, da die eingesetzten Antikörper aufgrund der klonalen Epitopspezifität mit sich selbst keine Fänger-/Detektorkombination ausbilden konnten. Ebenso war bei der freien Kombination der Antikörper des Mutterklontyps 120 keine Detektion möglich. Dies lässt vermuten, dass diese zwei Isolate, als Derivate derselben ursprünglichen Zellpopulation, denselben Klon darstellen und somit eine identische Epitopspezifität aufweisen. Um diesen Umstand zu klären und auszuschließen, dass eine sterische Hinderung unahängiger überlappender Epitope die Ursache für die Hinderung darstellt, empfiehlt sich eine Feincharakterisierung der Epitopspezifität beispielsweise mittels eines Pepscan-Mappings.

Die Messung der Bindeaffinität der erzeugten Antikörper zeigte eine starke, spezifische Bindung zwischen Antikörper und dem verwendeten BoNT-Analyt, die eine hohe Übereinstimmung mit dem statistischen Bindemodell aufwies. Die stärksten dokumentierten Affinitäten für monoklonale Antikörper wurden bisher im Bereich von 10-20 pM bestimmt (Chenail et al., 2011, Rispens et al., 2011, Boder et al., 2000). Somit weisen die erzeugten Antikörper eine hochaffine Bindung zum verwendeten BoNT-A auf. Im Vergleich mit dem durch herkömmliche Proteininduktion erzeugten Antikörper 1688 ist kein Unterschied bzw. eine höherer KD-Wert zu beobachten. Somit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Immunisierung im Vergleich zur Proteinimmunisierung wie zu erwarten Antikörper

gleicher bzw. besserer Qualität in Bezug auf die Bindungskinetiken erzeugt. Auf den jeweiligen Plattformen kann nun ausgetestet werden, ob der Antikörper 401/13/2 mit seiner schnellen Assoziation und schwachen off-Rate abweichende Eigenschaften in den 3D- oder chipbasierten Testverfahren unter gegebenen, kurzen Inkubationszeiten oder im homogenen ELISA im Vergleich mit den übrigen evaluierten Antikörper aufweist.

Eine weitere wichtige Frage, die im Zuge der Charakterisierung geklärt werden sollte, befasste sich mit der Subklassen- und Serotypenspezifität der induzierten monoklonalen Antikörper. Da die bekannten Botulinumneurotoxine deutlich unterschiedliche Grade der Toxizität erreichen, wird davon ausgegangen, dass in einer potentiellen bioterroristischen Anwendung für bestimmte Serotypen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Verwendung besteht. Die Beobachtungen der Inzidenz der dokumentierten Botulismusintoxikationen der Jahre 1980-1996 zeigt einen Anteil von 54,1% für BoNT-A, 14,8% BoNT-B, 26,7% BoNT-E, 1,5% BoNT-F und 3% für unklassifizierte Stämme (Bajohrs et al., 2004, Arnon et al., 2001). Die höhere Toxizität des BoNT-A gegenüber dem ebenfalls häufig auftretenden BoNT-E macht die Anwendung von BoNT-A als BT-Waffe plausibel. Da keine Gewissheit besteht, welcher der existierenden BoNT-A Subtypen in einem Anschlag Verwendung finden würde, ist die Detektion von möglichst vielen der bekannten A-Toxinsubtypen wünschenswert.

Die Überprüfung der Iso-/ und Subtypenspezifität der verfügbaren BoNT-Toxine ergab eine teils breite Erkennung der Subtypen A1, A2, A3, „AX“ und „A?“ (zwei bisher unklassifizierte Stämme AX=Stamm *Chemnitz*; A? bisher nicht klassifiziertes Isolat) durch Kreuzreaktivität der generierten monoklonalen Antikörper. Die hohe Identität der A-Subtypen von 84,6 - 89,7% auf der Proteinebene und eine Lokalisierung der erkennbaren Epitope in homologen Bereichen des Toxins machen dies möglich.

Da für die Ermittlung der Subtypenspezifität native Proben aus Kulturüberständen der getesteten Clostridienstämme zum Nachweis eingesetzt wurden, konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die generierten Detektionsantikörper in der Lage waren, natives Antigen in Komplexform und Verbundeinheit mit den *clostridialen* NTNHA- und HA-Proteinen zu erkennen (Miyata et al., 2009). Eine zu erwartende Maskierung der Epitope des reinen Toxins durch die Toxinhülle konnte die Detektion durch die generierten monoklonalen Antikörper nicht verhindern. Die Erkennung von komplexiertem Toxin ist für die Anwendung als Testsystem von besonderer Bedeutung, da die Freisetzung von BoNT als kruder Extrakt einer

Clostridienkultur im Fall einer bioterroristischen Anwendung als am wahrscheinlichsten gilt. Gereinigtes Toxin wird fast exklusiv in der Kosmetik und Schmerz-/ Krampftherapie eingesetzt und ist nur unter Aufwand außerhalb spezialisierter Labore herzustellen. Darüber hinaus schützen die umhüllenden Proteine das BoNT vor der Degradation im Gastrointestinaltrakt, wodurch eine höhere Toxizität durch intaktes Protein erreicht wird (Miyata et al., 2009).

Tab.35: Darstellung des *alignments* der Aminosäuresequenzen verschiedener BoNT- Iso-/Serotypen nach dem ClustalW-Algorythmus. Dargestellt sind verglichene Sequenzen unter Angabe der prozentualen Identität und Divergenz auf AS-Ebene.

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6		
1		89.7	84.6	40.2	40.2	40.5	1	BoNT A1 strain Hall
2	11.2		93.4	39.1	39.7	40.1	2	BoNT A2 strain Friedrichshain
3	17.3	6.9		39.0	39.4	40.8	3	BoNT A3 strain Loch Maree
4	110.8	115.1	115.5		38.1	40.0	4	BoNT type B
5	110.7	112.5	113.9	119.0		62.3	5	BoNT type E
6	109.4	111.2	108.4	111.5	52.0		6	BoNTType F
	1	2	3	4	5	6		

5.4 Entwicklung von Immunisierungsvektoren zur Verabreichung von nativen filoviralen Glykoproteinen

Die Generierung von Antikörpern gegen natives filovirales Material stellt sich als besondere Herausforderung dar, da die höhere Komplexität der Viruspartikel und die darüber hinaus höhere Zahl an potentiell immunogenen Strukturen für die Auswahl und Entwicklung von Antigenen berücksichtigt werden musste. Um für das gewählte filovirale Antigen Antikörper mit potentieller Spezifität gegen native Proteinstrukturen induzieren zu können, war die Verwendung der DNA-Immunisierung von besonderem Vorteil. Rekombinante Proteine, die beispielsweise in Prokaryonten oder durch Baculoviren in Insektenzellen exprimiert werden, weisen in der Regel eine fehlende oder nicht die ausreichende Komplexität der nativen Glykosylierung auf (van Oers, 2011). Um eine dem viralen Wildtyp möglichst identische Voraussetzung für die Immunisierung schaffen zu können, und das Risiko auszuschließen, die Induktion einer Immunreaktion gegen, für gewöhnlich maskierte hochimmunogene Strukturen des Gp zu provozieren, wurde

die DNA-Immunisierung gewählt. Durch diese wurde das Mittel geschaffen, voll glykosylierte Antigene immunologisch verfügbar zu machen, die den Verlauf einer Virusinfektion im Versuchstier simulieren.
Es ist bekannt, dass durch die Struktur des Glykanschilds im filoviralen Gp, eine effektive Maskierung von Gp-eigenen und benachbarten Strukturen erreicht werden kann (Reynard et al., 2009), jedoch verspricht die gewählte Strategie der Verabreichung eine hohe Authentizität gegenüber dem nativen Virusisolat. Untersuchungen zur Immunogenität des EboV-Gp von Dowling et al. unterstreichen diese Strategie der Applikation, da im Verlauf der Studie negative Auswirkungen fehlender Glykosylierungen auf die immunogenen Eigenschaften untersuchter Konstrukte gezeigt werden konnten (Dowling et al., 2007).

5.4.1 Kodonoptimierung und Synthese von kodierenden Sequenzen zur Expression von EboV-/MarV-Glykoproteinen

Die Synthese und Klonierung von filoviralen Expressionsvektoren für das MarV und EboV-Glykoprotein führte zu einer nachweislich hohen Expression von filoviralem Gp0 in eukaryontischen Zellen mit humanem Ursprung. Der Effekt der Kodonoptimierung konnte nicht mit der natürlichen Expressionsrate von *env*-Sequenzen unter Wildtypromotoren korreliert werden, jedoch konnten schon 6-12 Stunden nach Transfektion signifikante Mengen an filoviralem Protein durch IFA und Westernblot-Analysen nachgewiesen werden. Die Ernte von Lysaten musste in der Regel nach 12 Stunden erfolgen, da die verwendeten Zellen der Linie HEK-293T durch die starken zytopathischen Effekte des Glykoproteins zu späteren Zeitpunkten unter Verlust der Adhärenz und dem Effekt der einsetzenden Apoptose nicht mehr zur Detektion einsetzbar waren (Sullivan et al., 2005). Der deutlich wahrnehmbare toxische Effekt des Proteins durch die Überexpression des Gp lässt vermuten, dass die im Wildtyp suboptimale Kodonnutzung mit einem CAI von 0,72 und die Bildung von sGp bei 70% der Translationen, Strategien des Virus darstellen, um die Pathogenität für den Wirtsorganismus zu senken. In der Zeit der Koevolution zwischen Pathogen und Wirt lassen sich oft Entwicklungen verzeichnen, bei denen das Virus in der Anpassung an den Wirtsorganismus eine Form der Attenuierung akquiriert, um die Chancen der Übertragung durch eine verlängerte Latenzzeit zu vergrößern. Innerhalb dieser Entwicklung ist eine Reduktion der Expression von cytotoxischen Virusproteinen durch eine suboptimale Kodonverwendung von Vorteil (Domingo, 2011, Koonin et al., 2006).

5.4.2 Funktionsprüfung der filoviralen MarV- /EboV-Glykoproteine durch Reporterviren (VLP-Pseudotypen)

Über den reinen Erhalt der strukturellen Komposition des vollständig prozessierten Glykoproteins hinaus ist das wesentliche Attribut für die native Faltung die Gp vermittelte Infektiösität von Viruspartikeln. Die Überprüfung der Infektiösität viraler Pseudotypen unter Verwendung der filoviralen Glykoproteine ergab eine erfolgreiche Infizierbarkeit von Zielzellen sowohl durch das MarV- als auch durch das EboV-Gp ohne die Notwendigkeit einer Konzentrierung der erzeugten VLPs. Die ermittelten Infektionsraten erwiesen sich als deutlich niedriger als die des VSV-Gp vermittelten Eindringens in HEK-293T-Zellen. Die Infektionsversuche wurden sowohl in HEK-293T als auch in Vero-E6-Zellen durchgeführt, wobei keine wesentlichen Unterschiede der Resultate festgestellt werden konnten. Vero-E6 werden neben verschieden Makrophagenzelllinien standardmäßig für filovirale Infektionsstudien eingesetzt. Es kann, trotz eines breiten bisher bekannten Spektums an Rezeptoren für den Viruseintritt von Filoviren, nicht ausgeschlossen werden, dass die verfügbaren Zellen nicht die optimale Permissivität für die Infektion durch Filoviren aufwiesen (Takada et al., 2004). Trotz dieses Umstandes ist es als erwiesen anzusehen, dass die erzeugten viralen Glykoproteine durch eine native, dem Wildtyp entsprechende Struktur und Konformation die Infektion von Zellen vermitteln konnten. Somit eignen sich die Konstrukte für die Induktion von gegen native filovirale Strukturen gerichteten, monoklonalen Antikörper und konnten experimentell eingesetzt werden.
Zusätzlich bietet die Methode der Pseudotypisierung von GFP oder *firefly*-Luziferase kodierenden Reporterviren die Option, eine mögliche Funktionsblockade induzierter Antikörper zu ermitteln (Tscherne et al., 2010).

5.4.3 Entwicklung eines nativen Testsystems zur Selektion Filovirus-Gp-reaktiver Antikörper

Die weiteren vorgenommenen Modifikationen an den filoviralen Glykoproteinen durch Deletion des Transmembranankers und Ergänzung eines Fc-Tags eröffneten die Möglichkeit, die untersuchten Glykoproteine in großen Mengen eukaryontisch zu produzieren. Durch das Fehlen der Transmembrandomäne wurden die gebildeten Glykoproteine beim Erreichen der Zelloberfläche sezerniert und somit in den Kulturüberstand transfizierter Zellen abgegeben. Die beschriebenen

zytotoxischen Effekte konnten durch diesen Umstand deutlich reduziert werden, wodurch eine Kultivierung von produzierenden Zellen über Zeiträume von 48-72 Stunden möglich wurde (Francica et al., 2009). Die signifikante Verbesserung der rekombinanten Proteinproduktion ermöglichte die kontinuierliche Produktion von großen Mengen an filoviralen Antigenen zur Selektion virusspezifischer Antikörper. In Kombination mit Tag-spezifischen Antikörpern konnte somit eine neuartige Selektionsmethode für reaktive Antikörper entwickelt werden, die eine unkomplizierte und schnelle Überprüfung großer Mengen an Zellkulturüberständen erlaubte. Im Jahr 2010 wurde in der Arbeitsgruppe von Nakayama et al. parallel ein vergleichbarer Assay unter Verwendung eines Poly-Histidin-Tags entwickelt und publiziert (Nakayama et al., 2010). Der Vorteil der hier beschriebenen Methode besteht, im Gegensatz zu der publizierten Art der filovirus-bezogenen Serologie, definitiv in der im Vergleich erleichterten Aufreinigung des Antigens. Durch die Verwendung von Protein-G-Sepharose-befüllten Affinitätssäulen der Firma GE-Healthcare, in der FPLC-gestützten Aufreinigung, ist laut Hersteller eine Immobilisierung von 25 mg des Fc-Teils, bzw. Antikörpers, pro ml eingesetzten Mediums möglich. Bei einer Reihenschaltung mehrerer Säulen in der Äkta und entsprechenden Mengen an Zellkulturüberstand, beispielsweise aus Zellkultur-Fermenter-Anlagen, ist eine Produktion von Antigen im industriellen Maßstab zur standardisierten Testung denkbar, die mit 6xHis-Tag Immobilisierung durch NiNTA-Säulenmaterial nicht möglich wäre. Die Verwendung des erzeugten Antigens als Standardkontrollmaterial für die Validierung von Testsystemen bei etablierten Detektionssystemen und eine Anwendung als Antigen für die klinische Diagnostik im veterinärmedizinischen Bereich, z.B. in serologischen Antikörpersuchtests gegen Filoviren bei Primaten, sind nur einige denkbare Möglichkeiten für die zukünftige Nutzung des etablierten Systems. Unter geringem Aufwand ist es denkbar, das entwickelte System durch den Austausch des Fc-Tags gegen ein nicht humanes Immunglobulinfragment für eine Anwendung in der humanmedizinischem Diagnostik zu adaptieren.

5.4.4 Fusion von EboV-Gp-reaktiven Spleenozyten zur Erzeugung monoklonaler Hybridome

Die Auswertung der durchgeführten Hybridomafusion zur Erzeugung EboV-Gp-spezifischer Antikörper führte zur Produktion von vier stabilen Hybridomen mit

einer nachweisbaren Produktion von Gp1- oder Gp2-spezifischen Immunglobulinen des Isotyps IgM.

Die Bestimmung des Antikörpertiters in Vorbereitung der Fusion wurde durch einen Fcγ-Ketten-spezifischen Antikörper im *screeningassay* ermittelt. Somit konnte der Serumgehalt von spezifischem IgG erfolgreich bestimmt werden. Trotz des nachweisbaren Titers an IgG konnten bei der Selektion von den Überständen der resultierenden Klonpopulationen keine stabilen IgG-Produzenten identifiziert werden. Bisher ist nicht bekannt, dass der IgM-Isotyp von B-Zellen Einfluss auf die genetische Stabilität von Hybridomen nimmt, jedoch ließ sich in Durchführung des Projektes ein deutlich höherer Anteil von IgM-Produzenten in Fusionen feststellen. Trotz des zu erwartenden Serumanteils von 10% scheint durch die durchgeführte Prime-/ Boost-Strategie eine kontinuierliche Induktion von neuen IgM stattzufinden, wodurch Hybridome diesen Isotyps in Fusionen einen hohen Anteil einnehmen. Wie bereits erwähnt, konnte im Fachbereich beobachtet werden, dass diese Effekte sowohl durch die Anwendung von DNA, als auch bei klassischen Proteinimmunisierungen auftreten. Um weitere Antikörper Isotypen isolieren zu können, empfiehlt sich daher bei geringer spezifischer Anzahl von Klonen eine kontinuierliche Durchführung weiterer Fusionen bis zur erfolgreicher Isolation des gewünschten Ig-Isotyps. Die Reinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern ist ebenfalls mittels FPLC möglich und wurde durchgeführt um reine Präparationen zu gewinnen. Die Präzipitation mittels Protein-L-Agarose findet in diesem Fall über den Fab-Anteil des Immunglobulins statt und ist nicht für die Immunglobuline aller Spezies möglich. Als Vorteil dieser Methode mussten die im Serum des Nährmediums der Hybridome enthaltenen bovinen Antikörper nicht vor der Aufreinigung entfernt werden. Die absoluten Mengen des aufgereinigten Antigens betrugen ca. 2-4 mg IgM/L Hybridomüberstand, was eine Ausbeute von 5-10 % einer vergleichbaren IgG-Aufreinigung entspricht.

Die Testung der antikörpereigenen Spezifität ergab eine Reaktivität von drei der erzeugten Hybridome gegen Gp2 und einem der Antikörper gegen Gp1. Trotz der geringeren Masse des Gp2 überrascht diese Gewichtung zugunsten von Gp2 nicht, da bei der hohen Glykosylierung des Gp1 eine erschwerte Antigenerkennung zu erwarten ist (Volchkov et al., 1998). In Bezug auf die Detektion von BT-Stoffen sind beide Untereinheiten der viralen Hülle von Bedeutung. Der Vorteil des Gp1 bei der Detektion nativen Materials liegt in der Erkennung der unversehrten Struktur des Glykoproteinkomplexes. Da der zentrale Komplex des Gp2 von Gp1 und dessen Glykanschild verdeckt wird, ist die effektive Erkennung von intaktem

Probenmaterial durch Gp1-spezifische Antikörper zu erwarten. Diese Spezifität des Antikörpers eignet sich im Besonderen für die Immobilisierung auf Detektionsplattformen als Fängerreagenz. Bei Verwendung des Gp1-spezifischen IgM empfiehlt es sich, ein besonderes Augenmerk auf die Verwendung von nicht denaturierenden Pufferbedingungen zu werfen. Sollte die vorgeschaltete Inaktivierung des Probenmaterials durch Reduzierung der Schwefelbindung zwischen Gp1 und Gp2 eine Auflösung der Komplexinteraktion zur Folge haben, ist davon auszugehen, dass die Verwendung von Gp2- oder beispielsweise Vp40-spezifischen Detektoren erfolglos bleibt. Aufgrund einer mangelnden Immobilisierung von Partikeln oder Gp würde ein effektiver Nachweis verhindert.
Unter denaturierenden Bedingungen ist die Verwendung von Reagenzien mit Gp2-Spezifität zu empfehlen. Dieses erlaubt selbst unter denaturierenden Bedingungen, durch die feste Verankerung in der Virusmembran, eine Detektion in Kombination mit weiteren Antikörpern. Wie zuvor beschrieben, wurden alle bisherigen Testungen unter nicht denaturierenden Bedingungen vorgenommen. Daher wäre es von Interesse vor der finalen Anwendung in kommerziellen Assays die Antikörper mit infektiösem Material unter BSL4-Bedingungen zu testen. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, bei Bedarf, eine Kontinuität der Erkennung bei Verwendung von gängigen Inaktivierungsmethoden wie β-Propriolakton und SDS zu ermitteln.

Die Verwendung von IgM- Antikörpern als effektive Fänger, aufgrund ihrer pentameren Struktur und der daraus resultierenden hohen Avidität, und einer vorteilhaften Kreuzreaktivität zu anderen EboV-Stämmen, konnte in der Vergangenheit beschrieben werden (Macneil et al., 2011). Die deutlich feststellbare Limitierung der Reagenziengenerierung in Bezug auf die Filovirus-spezifischen Antikörper liegt in der geringen Effektivität der Aufreinigung der sezernierten IgM aus gesammelten Hybridomüberständen.
Die Untersuchung der generierten Kulturüberstände zeigte einen hohen Gehalt an Antikörpern des Isotyps IgM, von denen durch die Aufreinigung jedoch nur ein Bruchteil gewonnen werden konnte. Um diesem experimentellen „Flaschenhals“ begegnen zu können, wurden verschiedene Strategien für einen vielfältigeren Einsatz der erzeugten Isotypen erwogen. Es ist bekannt, dass erzeugte Hybridome des Isotyps IgM durch den Einfluss der *activation induced cytidine deaminase,* als Motor der CSR, in geringer Rate einen spontanen Klassenwechsel durchlaufen können. Diese abweichenden Isotypen derselben Spezifität werden in der Regel durch die umfangreiche Populationsgröße der Kulturen nicht wahrgenommen. Iglesisas-Ussels

et al. beschreiben in ihrer 2006 publizierten Arbeit eine Methode, die CSR und eine somatische Hypermutation durch die forcierte Expression in bestehenden Hybridomen zu induzieren. Durch dieses Vorgehen und eine nachfolgende Subklonierung der Population wäre es in Folge unserer Experimente möglich, die erzeugten Hybridome des Isotyps IgM in jeden gewünschten Ig- Isotyp zu überführen, ohne die Spezifität der Antikörper im Wesentlichen zu beeinflussen. Auf diesem Wege ist es möglich, die effektiven Fängereigenschaften der IgM-Antikörper sowie deren Spezifität mit den Vorteilen der simplen Aufreinigung, der erleichterten Produktion und Löslichkeit anderer Immunglobulinklassen zu kombinieren (Iglesias-Ussel et al., 2006, Kuraoka et al., 2011).

In Anlehnung an das der Diagnostik anverwandte Feld der therapeutischen Anwendung von Antikörpern, wurden die generierten Antikörper in Bezug auf funktionsblockierende Eigenschaften gegen filovirale Reporterviren getestet. Die eingesetzten Antikörper des Typs IgM konnten im Versuchsaufbau keine funktionsblockierenden Eigenschaften zeigen. Die Extrapolation der Ergebnisse auf native Filoviren gestaltet sich schwierig, da die stark abweichende Morphologie der sphärischen VLP große Unterschiede im Vergleich zu teils mm–langen EboV-Partikel aufweist. Der zusätzliche Umstand der geringen Infektionsrate der filoviral-pseudotypisierten Partikel erschwerte hierbei zusätzlich den Nachweis von Unterschieden durch den Antikörpereinsatz. Die vielversprechende Spezifität der Antikörper gegen das Fusionspeptid-enthaltende Gp2 impliziert mögliche neutralisierende Eigenschaften, die im Einsatz gegen Filovirusderivate getestet werden müssten (Lee and Saphire, 2009b).

5.5 Generierung von Expressionsvektoren zur Herstellung von filoviralen Standards (VLP)

Die Entwicklung von Detektionssystemen für biologische und chemische Stoffe ist im Sinne der Qualitätssicherung der Notwendigkeit einer konstanten Testung und Validierung unterworfen. Um qualifizierte Testungen am Produkt vornehmen zu können, besteht daher Bedarf an standardisierbaren Reagenzien, die als Qualitätsstandard eingesetzt werden können. Im Zusammenhang mit Botulinumtoxin ist dies unproblematisch möglich, da die in dieser Arbeit verwendete Toxoidvariante des BoNT-A1 in großen Mengen lyophylisiert werden kann, um als nicht toxischer Standard in der Testung von Chips oder Säulen zu

dienen. Im Falle der Filoviren besteht für die Testung von Standardmaterial derselbe Flaschenhals wie für die Immunisierung von Versuchstieren. Die Testung von nativem Material ist aufgrund der hohen Pathogenität und der damit verbundenen Gefahr für den Experimentator ausgeschlossen. Bei Inaktivierung des Materials würde im Gegenzug das Standardmaterial stark in Mitleidenschaft gezogen werden, wodurch ein Verlust von wichtigen Epitopen nativer Partikel zu erwarten wäre. Zur Bereitstellung von nativem biologischem Testmaterial, für den Einsatz in den zu entwickelnden Detektionsplattformen wurde neben dem rekombinanten filoviralen Glykoprotein, welches in großen Mengen bereitgestellt werden konnte, der Versuch unternommen, biologisches Material zu erzeugen, welches als immunologisches Äquivalent zu nativen Viruspartikeln dienen konnte.

Durch die Kotransfektion der Expressionsvektoren für das filovirale Glykoprotein, sowie das entsprechende Hauptstrukturprotein Vp40 konnte eine Produktion von virusartigen Partikeln mit filovirustypischer Morphologie erreicht werden. Wie zuvor beschrieben werden konnte, ist der Einsatz der zwei genannten Proteine ausreichend um eine Produktion von filamentösen VLP in Zellkultur auszulösen. Vergleichbare VLP wurden in der Vergangenheit in analoger Form vielversprechend zur protektiven Vakzinierung von Versuchstieren eingesetzt (Warfield and Aman, 2011a, Warfield et al., 2007a, Kallstrom et al., 2005). Die Analyse der von uns erzeugten VLP zeigt, dass eine Aufreinigung der Partikel in vergleichbarer Weise zu der Erzeugung konzentrierter Filoviruspräparationen durch die Ultrazentrifugation über einen Dichtegradienten genutzt werden könnte (Daten nicht gezeigt).

Im Zuge der durchgeführten Arbeiten wurden die durch das Projekt vorgegebenen Zielvorgaben im vollen Umfang erreicht. Durch die Generierung mehrerer sensitiver Nachweise und Testmethoden sowie die Erzeugung von ungefährlichen Standardmaterialien konnten alle vorbereitenden Erfordernisse erfüllt werden, um die Testung und den Nachweis der bearbeiteten BT-Reagenzien (Filoviren, Botulinumtoxin) in einem kommerziellen Schnelltestverfahren zu ermöglichen.

5.6 Ausblick

Nachdem im Zuge der durchgeführten Arbeiten erfolgreich Antikörper sowohl gegen BoNT-A1 als auch gegen das EboV-Glykoprotein generiert und charakterisiert werden konnten, werden diese Detektionsreagenzien den assoziierten Firmen (Senvoa GmbH; Zenteris GmbH) zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten zur Implementierung in die Plattformsysteme Approve-B® und Abicap® werden durch die Projektpartner durchgeführt und in Folge der Evaluierung durch die erzeugten biologischen Standards (BoNT-RYM; EboV-VLP) als kommerzielle diagnostische Systeme vertrieben. Im Fall der Filovirusdiagnostik wurde ein vollständiges IgM-basierendes Detektionssystem für Ebolavirus generiert. Zusätzlich wurden alle notwendigen Arbeiten für die Erzeugung von MarV-reaktiven Hybridomen und die Selektion MarV-reaktiver monoklonaler Antikörper abgeschlossen. Als weiterführende Arbeit ist geplant, zusätzliche MarV- /EboV-reaktive Antikörper des IgG- Isotyps zu erzeugen, um den Fundus an kommerziell verfügbaren Detektionsantikörpern zusätzlich zu erweitern. Darüber hinaus gilt es die Frage zu beantworten, ob durch die entwickelte DNA-basierte Immunisierung Antikörper mit neutralisierenden Eigenschaften für die therapeutische Anwendung gewonnen werden können. In diesem Zusammenhang besteht ebenfalls Bedarf die generierten BoNT-A1-LC- spezifischen monoklonalen Antikörper durch den Einsatz in Maus-Bioassays (Toxizitätsassay) zu testen, um eventuelle funktionsblockierende Eigenschaften zu evaluieren.

6. Zusammenfassung

Bioterroristisch verwendbare Agenzien haben gemeinsam, dass sie schwere gesundheitliche Auswirkungen im Falle der Infektion oder Intoxikation verursachen. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass trotz der unmittelbaren Bedrohung durch den Bioterrorismus bis zum heutigen Tage nur wenige zuverlässige diagnostische Mittel zur Detektion von nativen Bioterrorstoffen verfügbar sind. Im Zuge der Arbeit wurden durch die rekombinante DNA-Technologie synthetische Vektoren geschaffen, die eine Expression von nativen Proteinkonformationen für zwei Kandidatenagenzien, BoNT und die Glykoproteine (GP) der Filoviren MarV und EboV, ermöglichten. Die synthetischen Nukleinsäuresequenzen wurden hierbei für den Einsatz in Säugern kodonoptimiert und für eine optimale Verwendung durch Mutation der Ursprungssequenz modifiziert. Für BoNT A1 wurden zwei Modifikationen der Aminosäureabfolge vorgenommen, um durch die Inhibition der Zink-Bindung eine vollständige Entgiftung des Enzyms zu erreichen.

Die filoviralen GP-Konstrukte wurden durch Entfernung einer *slipperysite* (EboV) auf die Expression des Volllängenglykoproteins Gp0 optimiert. Nach dem Aufbau und der Evaluierung von nativen Selektionssystemen, durch einen *capture* Assay, unter Verwendung eines GP-Fc-Fusionsproteins, wurden die so erzeugten Konstrukte erfolgreich zur Immunisierung und Induktion von mono-/ polyklonalen Antikörpern eingesetzt.

Vier monoklonale Antikörper des Isotyps IgG gegen BoNT A1 und vier monoklonale Antikörper des Isotyps IgM gegen EboV Gp wurden in Bezug auf Detektionseigenschaften feincharakterisiert und z.T. zur Bildung von 14 autonomen Detektionspaaren eingesetzt. Das Repertoire der generierten Antikörper umfasste Antikörper mit Spezifität gegen die leichte und schwere Kette des BoNT A1, das Gp1 und Gp2 des EboV Gp, sowie zwei Antikörper mit Konformationsabhänigkeit der Epitope. Die Testung der generierten monoklonalen Reagenzien gegen BoNT zeigte eine effiziente Erkennung bis zu Nachweisgrenzen im Bereich von 8,5 - 25 pg BoNT A1/ ml und eine hochaffine Bindung nativen BT-Antigens. Die Überprüfung der Kreuzreaktivität ermittelte eine spezifische Detektion von nativen hochtoxischen BoNT-Komplexen der Toxinsubtypen A1-A3, aus *clostridialen* Kulturüberständen, durch drei der vier monoklonalen Detektionsantikörper.

Zusätzlich konnten erfolgreich Versuchsreihen durchgeführt werden, um neuartige genetische Zytokinadjuvantien im aviären System zu testen und zu etablieren, was

zu einer effizienten Steigerung der spezifischen IgY-Titer und der Gewinnung von reaktiven IgY- Präparationen im Gramm-Bereich führte.
Ein im Zuge der Arbeit entwickelter Selektionstest für filovirusreaktive Antikörper zeigte verlässliche Eigenschaften im Einsatz als diagnostischer Antikörpersuchtest. Das Verfahren bietet eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger antikörperbasierter klinischer Filovirus-Nachweissysteme.

Conclusion

The unifying characteristic of bioterroristic agents is their capacity to cause severe injury to health upon infection or ingestion. Despite the threat of bioterrorist attacks, only a few reliable diagnostic systems for the detection of native bioterror agents are to date commercially available. During the course of this project, synthetic expression vectors were created by recombinant DNA-technology that permit the expression of proteins with native conformation from two candidate agents: BoNT A1 and the glycoproteins of the *Filoviridae* MarV & EboV. The synthetic nucleic acid sequences were engineered for optimal expression through mammalian codon-optimization and minor mutations. In addition, the BoNT A1 was rendered completely non-toxic by the introduction of two codon modifications that inhibit the enzyme's zinc binding capability.
Filoviral Gp- constructs were optimized for expression of the full-length glycoprotein Gp0 through elimination of a slippery site (EboV). Following production and evaluation of a native screening system by a capture assay employing a Gp-fc fusion protein, the vector DNA was used to immunize laboratory animals to facilitate the preparation of monoclonal and polyclonal antibodies.
Four IgG monoclonal antibodies specific for BoNT A1 and four IgM specific for EboV Gp were characterized in detail and used to set up 14 autonomous detection pairs.
The antibodies generated included some recognizing the light and heavy chains of BoNT A1, others recognizing the Gp1 and Gp2 of the EboV Gp and two antibodies suspected to bind conformational epitopes. The monoclonal reagents specific for BoNT A1 could detect as little as 8.5 – 25 pg BoNT A1 / ml and had a high affinity for the native BT-antigen. An analysis of cross-reactivity revealed a specific detection of highly toxic native BoNT complexes of the toxin subtypes A1-A3 from clostridial culture supernatants by three of the four monoclonal antibodies. Additionally, a series of animal trials was performed to evaluate and establish novel genetic cytokine

adjuvants in the avian system that resulted in a significant enhancement of specific IgY titers and facilitated the production of IgY in high quantities. During the course of this work, a filovirus-reactive antibody screening assay was developed and was shown to be versatile and reliable for application as a diagnostic antibody screening test. The assay has features that make it suitable for use as clinical diagnostic test and could form the basis for the development of a novel filovirus antibody detection procedure.

7. Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestilliert	kb	kilobasen
AHT	Azaserin Hypoxanthin	L	Liter
AID	activation induced cytidindeaminase	LB	lysogeny broth
AK	Antikörper	LC	light chain
AUT	Österreich	LD	lethal dose
B. anthracis	Bacillus anthracis	LM	Lichtmikroskop
BCA	Bradfort Assay	LPS	Lipopolysaccharid
BoNT	Botulinumneurotoxin	MarV	Marburgvirus
bp	Basenpaar	MHC	major histocompatibility complex
BT	Bioterror	MWCO	molecular weight cutoff
ca.	circa	n	nano
CAI	codon adaption index	n. Chr.	nach Christus
CDN	Kanada	n.d	not determined
CH	Schweiz	NATO	north atlantic treaty organisation
cLSM	confocal laser scanning microscope	neg.	negativ
cm	Zentimeter	NTNHA	non toxic not hämagglutinin
CSR	class switch recombination	okkup.	okkupiert
D-MEM	Dulbecco's modified eagle medium	ORF	open reading frame
DBR	Deutsche Bundesrepublik	p	pico
DC	dendritic cells	PBS	phosphatgepufferte Saline
div.	diverse	PCR	polymerase chain reaction
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEG	Polyethylenglykol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
dNTP	Nukleosidtriphosphate	pos.	positiv
E.coli	Escherichia coli	PVDF	Polyvinylidenfluorid
EboV	Ebolavirus	Q	Glutamin
ECL	enhanced chemiluminescent reagent	QPS	Penicillin/ Streptomycin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	REM	Rasterelektronenmikroskop
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	RKI	Robert Koch-Institut
Entw.	Entwicklung	RPM	Rotationen pro Minute
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport	RT	Raumtemperatur
EU	Europäische Union	RYM	RY-Mutation
f	femto	SDS	Natriumlaurylsulfat
FACS	*fluorescence activated cell sorting*	Sek.	Sekunde
FKS	fötales Kälberserum	SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
FPLC	*Fast protein liquid chromatography*	SOC	Super Optimal Broth

GA	Glutaraldehyd	ß-ME	ß-Mercaptoethanol
GAG	Group-specific antigen	TACE	*tumor necrosis factor-α converting enzyme*
GFP	green fluorescent protein	TEM	Transmissionselektronenmikrosko p
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	ÜN	über Nacht
h	hour	US	united states
HA	Hämagglutinin	UZ	Ultrazentrifugation
HC	heavy chain	v/v	volume to volume
HIV	Humane Immundefizienz-Virus	VAMP	vesikelassoziiertes Membranprotein
HRP	horseradischperoxidase	VLP	virus like particle
i.d.R.	in der Regel	VSV	Vesicular stomatitis virus
IFA	Immunfluoreszenzanalyse	w/v	weight to volume
IFN	Interferon	WB	westernblot
Ig	Immunglobulin	WHO	world health organisation
IL	Interleukin	z.B.	zum Beispiel
IP	Immunpräzipitation	ZBS	Zentrum für biologische Sicherheit

8. Literaturverzeichnis

AKBARI, O., PANJWANI, N., GARCIA, S., TASCON, R., LOWRIE, D. & STOCKINGER, B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med,* 189**,** 169-78.

AL-AGAMY, M. 2011. Tools of Biological Warfare. *Research Journal of Microbiology,* 6**,** 193-245.

ALLEN, C. D., OKADA, T., TANG, H. L. & CYSTER, J. G. 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science,* 315**,** 528-31.

AOKI, K. R., SMITH, L. A. & ATASSI, M. Z. 2010. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Critical reviews in immunology,* 30**,** 167-87.

ARNON, S. S., SCHECHTER, R., INGLESBY, T. V., HENDERSON, D. A., BARTLETT, J. G., ASCHER, M. S., EITZEN, E., FINE, A. D., HAUER, J., LAYTON, M., LILLIBRIDGE, S., OSTERHOLM, M. T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T. M., RUSSELL, P. K., SWERDLOW, D. L. & TONAT, K. 2001. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA : the journal of the American Medical Association,* 285**,** 1059-70.

BAJOHRS, M., RICKMAN, C., BINZ, T. & DAVLETOV, B. 2004. A molecular basis underlying differences in the toxicity of botulinum serotypes A and E. *EMBO reports,* 5**,** 1090-5.

BALDWIN, M. R., TEPP, W. H., PIER, C. L., BRADSHAW, M., HO, M., WILSON, B. A., FRITZ, R. B., JOHNSON, E. A. & BARBIERI, J. T. 2005. Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. *Infection and immunity,* 73**,** 6998-7005.

BARRY, M. A., BARRY, M. E. & JOHNSTON, S. A. 1994. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *BioTechniques,* 16**,** 616-8, 620.

BATISTA, F. D. & HARWOOD, N. E. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol,* 9**,** 15-27.

BENTE, D., GREN, J., STRONG, J. E. & FELDMANN, H. 2009. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis Model Mech,* 2**,** 12-7.

BEREK, C. & MILSTEIN, C. 1987. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunological reviews,* 96**,** 23-41.

BODER, E. T., MIDELFORT, K. S. & WITTRUP, K. D. 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proceedings of the National Acedemy of Sciences of the United States of America,* 97**,** 79-81.

BOLHASSANI, A. & YAZDI, S. R. 2009. DNA Immunization as an Efficient Strategy for Vaccination. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology,* 1.

BRACHTEL, E. F., WASHIYAMA, M., JOHNSON, G. D., TENNER-RACZ, K., RACZ, P. & MACLENNAN, I. C. 1996. Differences in the germinal centres of palatine tonsils and lymph nodes. *Scand J Immunol,* 43**,** 239-47.

BRAY, M. 2003. Defense against filoviruses used as biological weapons. *Antiviral research,* 57**,** 53-60.

BUNDESMINISTERIUM-FÜR-ARBEIT-UND-SOZIALES. 2011. *RE: Auskunft über BSL4 Einrichtungen nach Biostoffverordnung und Infektionsschutzgesetz.*

CENTRES-OF-DISEASE-CONTROL-AND-PREVENTION. 2011. *Bioterrorism Agents/Diseases* [Online]. CDC / USA.

CHAN, S. Y., EMPIG, C. J., WELTE, F. J., SPECK, R. F., SCHMALJOHN, A., KREISBERG, J. F. & GOLDSMITH, M. A. 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell,* 106**,** 117-26.

CHENAIL, G., BROWN, N. E., SHEA, A., FEIRE, A. L. & DENG, G. 2011. Real-time analysis of antibody interactions with whole enveloped human cytomegalovirus using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry,* 411**,** 58-63.

CHO, S. H., LOEWEN, P. C. & MARQUARDT, R. R. 2004. A plasmid DNA encoding chicken interleukin-6 and Escherichia coli K88 fimbrial protein FaeG stimulates the production of anti-K88 fimbrial antibodies in chickens. *Poultry science,* 83**,** 1973-8.

CUMANO, A. & RAJEWSKY, K. 1986. Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP. *The EMBO journal,* 5**,** 2459-68.

DIE VEREINTEN NATIONEN (GENFER KONVENTION, N. 1972. Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction.

DOMINGO, E. 2011. Paradoxical interplay of viral and cellular functions. *Viruses,* 3**,** 272-7.

DONNELLY, J. J., ULMER, J. B., SHIVER, J. W. & LIU, M. A. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol,* 15**,** 617-48.

DOWLING, W., THOMPSON, E., BADGER, C., MELLQUIST, J. L., GARRISON, A. R., SMITH, J. M., PARAGAS, J., HOGAN, R. J. & SCHMALJOHN, C. 2007. Influences of glycosylation on antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of ebola virus GP DNA vaccines. *Journal of virology,* 81**,** 1821-37.

ERHARD, M. H., SCHMIDT, P., ZINSMEISTER, P., HOFMANN, A., MUNSTER, U., KASPERS, B., WIESMULLER, K. H., BESSLER, W. G. & STANGASSINGER, M. 2000. Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon-gamma on the humoral immune response of chickens. *Poultry science,* 79**,** 1264-70.

FRANCICA, J. R., MATUKONIS, M. K. & BATES, P. 2009. Requirements for cell rounding and surface protein down-regulation by Ebola virus glycoprotein. *Virology,* 383**,** 237-47.

GEISBERT, T. W. & JAHRLING, P. B. 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res,* 39**,** 129-50.

HEI/DPA 2009. Ebola- Verdacht in Hamburg. *Spiegel Online.*

HIGASHIHARA, M., HIRUMA, M., HOUDATSU, T., TAKAI, S. & MATUMOTO, M. 1987. Experimental infection of laying chickens with egg-drop syndrome 1976 virus. *Avian diseases,* 31**,** 193-6.

IGLESIAS-USSEL, M. D., FAN, M., LI, Z., MARTIN, A. & SCHARFF, M. D. 2006. Forced expression of AID facilitates the isolation of class switch variants from hybridoma cells. *Journal of immunological methods,* 316**,** 59-66.

JOHNSON, R. F., BELL, P. & HARTY, R. N. 2006. Effect of Ebola virus proteins GP, NP and VP35 on VP40 VLP morphology. *Virology journal,* 3**,** 31.

KALLSTROM, G., WARFIELD, K. L., SWENSON, D. L., MORT, S., PANCHAL, R. G., RUTHEL, G., BAVARI, S. & AMAN, M. J. 2005. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay. *Journal of virological methods,* 127**,** 1-9.

KIM, D., KWON, H. J. & LEE, Y. 2011a. Activation of Toll-like receptor 9 and production of epitope specific antibody by liposome-encapsulated CpG-DNA. *BMB reports,* 44**,** 607-12.

KIM, D., KWON, S., AHN, C. S., LEE, Y., CHOI, S. Y., PARK, J., KWON, H. Y. & KWON, H. J. 2011b. Adjuvant effect of liposome-encapsulated natural phosphodiester CpG-DNA. *BMB reports,* 44**,** 758-63.

KOHLER, G. & MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature,* 256**,** 495-7.

KOONIN, E. V., SENKEVICH, T. G. & DOLJA, V. V. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology direct,* 1**,** 29.

KUHN, J. H., BECKER, S., EBIHARA, H., GEISBERT, T. W., JOHNSON, K. M., KAWAOKA, Y., LIPKIN, W. I., NEGREDO, A. I., NETESOV, S. V., NICHOL, S. T., PALACIOS, G., PETERS, C. J., TENORIO, A., VOLCHKOV, V. E. & JAHRLING, P. B. 2010. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol,* 155**,** 2083-103.

KULL, S., PAULY, D., STORMANN, B., KIRCHNER, S., STAMMLER, M., DORNER, M. B., LASCH, P., NAUMANN, D. & DORNER, B. G. 2010. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry,* 82**,** 2916-24.

KURAOKA, M., MCWILLIAMS, L. & KELSOE, G. 2011. AID expression during B-cell development: searching for answers. *Immunologic research,* 49**,** 3-13.

LARSSON, B. M., LARSSON, K., MALMBERG, P. & PALMBERG, L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation,* 23**,** 217-30.

LEDFORD, H. 2008. Monoclonal antibodies come of age. *Nature,* 455**,** 437.

LEE, J. E. & SAPHIRE, E. O. 2009a. Neutralizing ebolavirus: structural insights into the envelope glycoprotein and antibodies targeted against it. *Curr Opin Struct Biol,* 19**,** 408-17.

LEE, J. E. & SAPHIRE, E. O. 2009b. Neutralizing ebolavirus: structural insights into the envelope glycoprotein and antibodies targeted against it. *Current opinion in structural biology,* 19**,** 408-17.

LI, N., YU, Y. Z., YU, W. Y. & SUN, Z. W. 2011. Enhancement of the immunogenicity of DNA replicon vaccine of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A by GM-CSF gene adjuvant. *Immunopharmacology and immunotoxicology,* 33**,** 211-9.

LIU, F., MBOUDJEKA, I., SHEN, S., CHOU, T. H., WANG, S., ROSS, T. M. & LU, S. 2004. Independent but not synergistic enhancement to the immunogenicity of DNA vaccine expressing HIV-1 gp120 glycoprotein by codon optimization and C3d fusion in a mouse model. *Vaccine,* 22**,** 1764-72.

LIU, Y., COCKA, L., OKUMURA, A., ZHANG, Y. A., SUNYER, J. O. & HARTY, R. N. 2010. Conserved motifs within Ebola and Marburg virus VP40 proteins are important for stability, localization, and subsequent budding of virus-like particles. *J Virol,* 84**,** 2294-303.

MACNEIL, A., REED, Z. & ROLLIN, P. E. 2011. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG antibodies to five species of Ebola virus. *PLoS neglected tropical diseases,* 5**,** e1175.

MATSUNO, K., KISHIDA, N., USAMI, K., IGARASHI, M., YOSHIDA, R., NAKAYAMA, E., SHIMOJIMA, M., FELDMANN, H., IRIMURA, T., KAWAOKA, Y. & TAKADA, A. 2010. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol,* 84**,** 5140-7.

MEHEDI, M., FALZARANO, D., SEEBACH, J., HU, X., CARPENTER, M. S., SCHNITTLER, H. J. & FELDMANN, H. 2011. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol,* 85**,** 5406-14.

MIYATA, K., YONEYAMA, T., SUZUKI, T., KOUGUCHI, H., INUI, K., NIWA, K., WATANABE, T. & OHYAMA, T. 2009. Expression and stability of the nontoxic component of the botulinum toxin complex. *Biochemical and biophysical research communications,* 384**,** 126-30.

MONHEIT 2010. Aesthetic Treatment With Neurotoxins: Options and Individualized Treatment: Botulinum Neurotoxin Clinical Background. *Medscape Education*.

MONTECUCCO, C. & MOLGO, J. 2005. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. *Current opinion in pharmacology,* 5**,** 274-9.

MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol,* 155**,** 335-50.

MURAMATSU, M., KINOSHITA, K., FAGARASAN, S., YAMADA, S., SHINKAI, Y. & HONJO, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell,* 102**,** 553-63.

MURPHY, K. M., TRAVERS, P. & WALPORT, M. 2009. *Janeway Immunologie,* Spektrum Akademischer Verlag.

NAKAYAMA, E., YOKOYAMA, A., MIYAMOTO, H., IGARASHI, M., KISHIDA, N., MATSUNO, K., MARZI, A., FELDMANN, H., ITO, K., SAIJO, M. & TAKADA, A. 2010. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and vaccine immunology : CVI,* 17**,** 1723-8.

NATIONAL-INSTITUTE-OF-ALLERGY-AND-INFECTIOUS-DISEASE, N. 2011. *Biodefense and Emerging Infectious Diseases*

NIAID Category A, B, and C Priority Pathogens [Online]. Available: http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/pages/cata.aspx.

NEUMANN, G., GEISBERT, T. W., EBIHARA, H., GEISBERT, J. B., DADDARIO-DICAPRIO, K. M., FELDMANN, H. & KAWAOKA, Y. 2007. Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates. *J Virol,* 81**,** 2995-8.

NISHIMICHI, N., AOSASA, M., KAWASHIMA, T., HORIUCHI, H., FURUSAWA, S. & MATSUDA, H. 2005. Biological activity of recombinant chicken interleukin-6 in chicken hybridoma cells. *Veterinary immunology and immunopathology,* 106**,** 97-105.

NORMAN, A. B., TABET, M. R., NORMAN, M. K., BUESING, W. R., PESCE, A. J. & BALL, W. J. 2007. A chimeric human/murine anticocaine monoclonal antibody inhibits the distribution of cocaine to the brain in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics,* 320**,** 145-53.

O'CONNELL, R. L. 1991. *Of Arms and Men: A History of War, Weapons, and Aggression,* Oxford University Press; Reprint.

OYNEBRATEN, I., LOVAS, T. O., THOMPSON, K. & BOGEN, B. 2011. Generation of antibody-producing hybridomas following one single immunization with a targeted DNA vaccine. *Scand J Immunol.*

PALMER, E. & REGNERY, R. 1981. Transmission electron micrograph of the Marburg virus. Dr. Erskine Palmer, Russell Regnery, Ph.D., 1981. Public domain. Available online in higher resolution at [http://phil.cdc.gov/phil/home.asp Public Health Image Library], ID# 275. CDC Atlanta.

PANJA, S., AICH, P., JANA, B. & BASU, T. 2008. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of Escherichia coli? *Mol Membr Biol,* 25**,** 411-22.

PAUL-EHRLICH-INSTITUT. 2011. *Monoklonale Antikörper* [Online]. Available: http://www.pei.de/DE/arzneimittel/immunglobuline/monoclonals/monoclonals-node.html__nnn=true.

PAULY, D., CHACANA, P. A., CALZADO, E. G., BREMBS, B. & SCHADE, R. 2011. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of visualized experiments : JoVE.*

PAULY, D., KIRCHNER, S., STOERMANN, B., SCHREIBER, T., KAULFUSS, S., SCHADE, R., ZBINDEN, R., AVONDET, M. A., DORNER, M. B. & DORNER, B. G. 2009. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex

matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *The Analyst,* 134**,** 2028-39.

PIER, C. L., TEPP, W. H., BRADSHAW, M., JOHNSON, E. A., BARBIERI, J. T. & BALDWIN, M. R. 2008. Recombinant holotoxoid vaccine against botulism. *Infection and immunity,* 76**,** 437-42.

POURRUT, X., KUMULUNGUI, B., WITTMANN, T., MOUSSAVOU, G., DELICAT, A., YABA, P., NKOGHE, D., GONZALEZ, J. P. & LEROY, E. M. 2005. The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect,* 7**,** 1005-14.

RASKA, M., TAKAHASHI, K., CZERNEKOVA, L., ZACHOVA, K., HALL, S., MOLDOVEANU, Z., ELLIOTT, M. C., WILSON, L., BROWN, R., JANCOVA, D., BARNES, S., VRBKOVA, J., TOMANA, M., SMITH, P. D., MESTECKY, J., RENFROW, M. B. & NOVAK, J. 2010. Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J Biol Chem,* 285**,** 20860-9.

RAZUMOV, I. A., KAZACHINSKAIA, E. I. & CHEPURNOV, A. A. 2010. [Antigenic differences in wild-type and guinea pig-adapted Ebola virus strains]. *Vopr Virusol,* 55**,** 35-8.

REYNARD, O., BOROWIAK, M., VOLCHKOVA, V. A., DELPEUT, S., MATEO, M. & VOLCHKOV, V. E. 2009. Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins. *Journal of virology,* 83**,** 9596-601.

RISPENS, T., VELTHUIS, H. T., HEMKER, P., SPEIJER, H., HERMENS, W. & AARDEN, L. 2011. Label-free assessment of high-affinity antibody–antigen binding constants. Comparison of bioassay, SPR, and PEIA-ellipsometry. *Journal of immunological methods,* 365**,** 50-57.

ROJAS, R. & APODACA, G. 2002. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 3**,** 944-55.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* 230**,** 1350-4.

SANCHEZ, A. & KILEY, M. P. 1987. Identification and analysis of Ebola virus messenger RNA. *Virology,* 157**,** 414-20.

SANFORD, J. C., KLEIN, T. M., WOLF, E. D. & ALLEN, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology,* 5**,** 27-37.

SCHADE, R. 2009. *RE: Einfluss von abnormer Anatomie des Reproduktionstraktes auf die Kapazität der Eiablage von Legehennen.* Type to NIEDERSTADT, L.

SCHADE, R., CALZADO, E. G., SARMIENTO, R., CHACANA, P. A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J. & TERZOLO, H. R. 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim,* 33**,** 129-54.

SEAVER, S. S. 1992. Enhancing monoclonal antibodies and hybridoma cell lines. *Cytotechnology,* 9**,** 131-9.

SENOVA-AG. 2002. *The Abicap System* [Online]. Available: http://www.senova.de/index.php?option=com_content&view=article&id=66&Itemid=85&lang=de.

SHEARER, J. D., VASSAR, M. L., SWIDERSKI, W., METCALFE, K., NIEMUTH, N. & HENDERSON, I. 2010. Botulinum neurotoxin neutralizing activity of immune globulin (IG) purified from clinical volunteers vaccinated with recombinant botulinum vaccine (rBV A/B). *Vaccine,* 28**,** 7313-8.

SIROTKIN, A. V. & GOLUBEV, A. K. 1983. [Circadian changes in the sensitivity of hens to exogenous hormones affecting molting and reproduction]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii,* 19**,** 565-70.

SMITH, T. J., HILL, K. K., FOLEY, B. T., DETTER, J. C., MUNK, A. C., BRUCE, D. C., DOGGETT, N. A., SMITH, L. A., MARKS, J. D., XIE, G. & BRETTIN, T. S. 2007. Analysis of the neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. *PloS one,* 2**,** e1271.

SULLIVAN, N. J., PETERSON, M., YANG, Z. Y., KONG, W. P., DUCKERS, H., NABEL, E. & NABEL, G. J. 2005. Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway. *Journal of virology,* 79**,** 547-53.

SUN, S., ZHANG, X., TOUGH, D. & SPRENT, J. 2000. Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons. *Springer seminars in immunopathology,* 22**,** 77-84.

SVANBORG, C., GODALY, G. & HEDLUND, M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Current opinion in microbiology,* 2**,** 99-105.

TAKADA, A., FUJIOKA, K., TSUIJI, M., MORIKAWA, A., HIGASHI, N., EBIHARA, H., KOBASA, D., FELDMANN, H., IRIMURA, T. & KAWAOKA, Y. 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of virology,* 78**,** 2943-7.

TAKADA, A., WATANABE, S., ITO, H., OKAZAKI, K., KIDA, H. & KAWAOKA, Y. 2000. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology,* 278**,** 20-6.

TOWNER, J. S., SEALY, T. K., KHRISTOVA, M. L., ALBARINO, C. G., CONLAN, S., REEDER, S. A., QUAN, P. L., LIPKIN, W. I., DOWNING, R., TAPPERO, J. W., OKWARE, S., LUTWAMA, J., BAKAMUTUMAHO, B., KAYIWA, J., COMER, J. A., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G. & NICHOL, S. T. 2008. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog,* 4**,** e1000212.

TSCHERNE, D. M., MANICASSAMY, B. & GARCIA-SASTRE, A. 2010. An enzymatic virus-like particle assay for sensitive detection of virus entry. *Journal of virological methods,* 163**,** 336-43.

VAN OERS, M. M. 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of invertebrate pathology,* 107 Suppl**,** S3-15.

VOLCHKOV, V. E., FELDMANN, H., VOLCHKOVA, V. A. & KLENK, H. D. 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 95**,** 5762-7.

VOLCHKOVA, V. A., DOLNIK, O., MARTINEZ, M. J., REYNARD, O. & VOLCHKOV, V. E. 2011. Genomic RNA editing and its impact on ebola virus adaptation during serial passages in cell culture and infection of Guinea pigs. *J Infect Dis,* 204 Suppl 3**,** S941-6.

VOLCHKOVA, V. A., FELDMANN, H., KLENK, H. D. & VOLCHKOV, V. E. 1998. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology,* 250**,** 408-14.

WANG, R., MILLAM, J. R. & KLASING, K. C. 2003. Distribution of interleukin-1 receptor in chicken and quail brain. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology,* 136**,** 663-71.

WARFIELD, K. L. & AMAN, M. J. 2011a. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *The Journal of infectious diseases,* 204 Suppl 3**,** S1053-9.

WARFIELD, K. L. & AMAN, M. J. 2011b. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J Infect Dis,* 204 Suppl 3**,** S1053-9.

WARFIELD, K. L., SWENSON, D. L., OLINGER, G. G., KALINA, W. V., AMAN, M. J. & BAVARI, S. 2007a. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *The Journal of infectious diseases,* 196 Suppl 2**,** S430-7.

WARFIELD, K. L., SWENSON, D. L., OLINGER, G. G., KALINA, W. V., AMAN, M. J. & BAVARI, S. 2007b. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis,* 196 Suppl 2**,** S430-7.

WARR, G. W., MAGOR, K. E. & HIGGINS, D. A. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today,* 16**,** 392-8.

WHEELIS, M. 2002. Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerging infectious diseases,* 8**,** 971-5.

WORLD-HEALTH-ORGANISATION. 2002. *Botulism Fact sheet N°270* [Online]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/.

WU, Y. F., LIU, H. J., CHIOU, S. H. & LEE, L. H. 2007. Sequence and phylogenetic analysis of interleukin (IL)-1beta-encoding genes of five avian species and structural and functional homology among these IL-1beta proteins. *Veterinary immunology and immunopathology,* 116**,** 37-46.

WU, Y. F., LIU, H. J., SHIEN, J. H., CHIOU, S. H. & LEE, L. H. 2008. Characterization of interleukin-1beta mRNA expression in chicken macrophages in response to avian reovirus. *The Journal of general virology,* 89**,** 1059-68.

YARI, K., FATEMI, S. S. & TAVALLAEI, M. 2011. High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of Escherichia coli. *Bioprocess and biosystems engineering.*

YU, Y. Z., SUN, Z. W., WANG, S. & YU, W. Y. 2007a. High-level expression of the Hcc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A in Escherichia coli and its immunogenicity as an antigen. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology,* 23**,** 812-7.

YU, Y. Z., ZHANG, S. M., SUN, Z. W., WANG, S. & YU, W. Y. 2007b. Enhanced immune responses using plasmid DNA replicon vaccine encoding the Hc domain of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A. *Vaccine,* 25**,** 8843-50.

A. Anhang

A.1. Oligonukleotidprimer

A.1.1. Mutageneseprimer

A1.1.1. Deletion der Transmembrandomäne

Tab.S1: Auflistung der verwendeten Mutageneseprimer zur Modifikation der Gp-Konstrukte unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

pTH_EbovGP4V5_deltaTm_fw	ACAGGCTGGCGGCAGTGCAAGTTCGTGTTC
pTH_EbovGP4V5_deltaTm_rv	GAACACGAACTTGCACTGCCGCCAGCCTGT
pTH_EbovGP4 V5_deltaTm Primer rv mk2	TCGTCCATGAACACGAACTTGCACTGCCGCCAGCC TGTCCACCAGT
pTH_EbovGP4 V5_deltaTm Primer fw mk2	ACTGGTGGACAGGCTGGCGGCAGTGCAAGTTCGTG TTCATGGACGA
pTH_MarvGP4V5_deltaTm_fw	AGCTGCATCTGCCGGTGGTGGACCAGCGAC
pTH_MarvGP4V5_deltaTm_rv	CCGGCAGATGCAGCTGTCGCTGGTCCACCA
pTH_MarvGP1,2V5_deltaTm Primer rv mk2	GTGAAGATCCGGCAGATGCAGCTGTCGCTGGTCCA CCACTTGCCGC
pTH_MarvGP1,2V5_deltaTm Primer fw mk2	GCGGCAAGTGGTGGACCAGCGACAGCTGCATCTGC CGGATCTTCAC

A1.1.2. Generierung von *cherry*-Fusionsproteinen (dsRed)

Tab.S2: Auflistung der verwendeten Mutageneseprimer zur Klonierung von dsRed-Fusionskonstrukten unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

EBOLA mutation cherry 83.1	GATGACCTAGGATCCCACCGGGTCGCCACCATGGT GAGCA
EBOLA mutation cherry 83.1 rev	TGCTCACCATGGTGGCGACCCGGTGGGATCCTAGG TCATC
MARV mutation cherry 82	ACCTAGGATCCACCGGGTTCGCCACCATGGTGAGC AAGGG
MARV mutation cherry 82 rev	CCCTTGCTCACCATGGTGGCGAACCCGGTGGATCC TAGGT

A.1.2. Klonierungsprimer

A1.2.1. Isolierung des IgFc-Teils aus Sdf1α-Fusionskonstrukten

Tab.S3: Auflistung der verwendeten Klonierungsprimer zur Isolierung der IgG-Fc-Sequenz unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

Sdf1a IgFc Isolation pTH fw	GTACGTAGATCTGGATCCAGGGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
Sdf1a IgFc Isolation pTH rv	TACGTAGCGGCCGCCCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG

A1.2.2. Klonierung des IgFc-Teils als Gp-Fusionskonstrukt

Tab.S4: Auflistung der verwendeten Klonierungsprimer zur Generierung von Fc-Fusionskonstrukten unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

Ebov GP fc add Bam site fw	CTGGTGGACAGGCTGCGGATccGATTCCTGCCGGCATCG
Ebov GP fc add Bam site rv	CGATGCCGGCAGGAATCGGATCCGCAGCCTGTCCACCAG
Marv GP fc add Bam site fw	GGCAAGTGGTGGACCCAGGGATCCGGGCGTGCTGACCAACC
Marv GP fc add Bam site rv	GGTTGGTCAGCACGCCCGGATCCCTGGGTCCACCACTTGCC

A.1.3. Sequenzierprimer

Tab.S5: Auflistung der verwendeten spezifischen Sequenzierprimer unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

pTH_EbovGP4 V5_deltaT testprimer fw mk2	ACTGGTGGACAGGCTGGCGG
pTH_MarvGP1,2V5_deltaTmem testprimer fw mk2	GCGGCAAGTGGTGGACCAGCG
MARV_EBOV GP4 delta tm Seq rev kontrollp(imfc)	GGTGCCCCCGCGAGTTCAGGTGC

A.1.4. Primer zum Einsatz in Fusions-PCR

Tab.S6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Generierung von der CDS von aviärem IFN-γ unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

chIFN-g co: whole Sequence: 546	
top strand:	
Seg: 1-40	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGACCTGCC

Seg: 41-80	AGACCTACAACCTGTTCGTGCTGTCCGTGATCATGATCTA
Seg: 81-120	CTACGGCCACACCGCCTCCTCCCTGAACCTGGTGCAGCTG
Seg: 121-160	CAGGACGACATCGACAAGCTGAAGGCCGACTTCAACTCCT
Seg: 161-200	CCCACTCCGACGTGGCCGACGGCGGCCCCATCATCGTGGA
Seg: 201-240	GAAGCTGAAGAACTGGACCGAGCGCAACGAGAAGCGCATC
Seg: 241-280	ATCCTGTCCCAGATCGTGTCCATGTACCTGGAGATGCTGG
Seg: 281-320	AGAACACCGACAAGTCCAAGCCCCACATCAAGCACATCTC
Seg: 321-360	CGAGGAGCTGTACACCCTGAAGAACAACCTGCCCGACGGC
Seg: 361-400	GTGAAGAAGGTGAAGGACATCATGGACCTGGCCAAGCTGC
Seg: 401-440	CCATGAACGACCTGCGCATCCAGCGCAAGGCCGCCAACGA
Seg: 441-480	GCTGTTCTCCATCCTGCAGAAGCTGGTGGACCCACCTTCC
Seg: 481-520	TTCAAGCGCAAGCGCTCCCAGTCCCAGCGCCGCTGCAACT
Bottom strand reverse: (rev,comp)	
546-500	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATGCAGTTGCAGCGGCGCTGGGAC
499-460	TGGGAGCGCTTGCGCTTGAAGGAAGGTGGGTCCACCAGCT
459-420	TCTGCAGGATGGAGAACAGCTCGTTGGCGGCCTTGCGCTG
426-380	GATGCGCAGGTCGTTCATGGGCAGCTTGGCCAGGTCCATG
379-340	ATGTCCTTCACCTTCTTCACGCCGTCGGGCAGGTTGTTCT
339-300	TCAGGGTGTACAGCTCCTCGGAGATGTGCTTGATGTGGGG
299-260	CTTGGACTTGTCGGTGTTCTCCAGCATCTCCAGGTACATG
259-220	GACACGATCTGGGACAGGATGATGCGCTTCTCGTTGCGCT
219-180	CGGTCCAGTTCTTCAGCTTCTCCACGATGATGGGGCCGCC
179-140	GTCGGCCACGTCGGAGTGGGAGGAGTTGAAGTCGGCCTTC
139-100	AGCTTGTCGATGTCGTCCTGCAGCTGCACCAGGTTCAGGG
99-60	AGGAGGCGGTGTGGCCGTAGTAGATCATGATCACGGACAG
59-20	CACGAACAGGTTGTAGGTCTGGCAGGTCATGGTGGCGGCG

Tab.S7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Generierung von der CDS von aviärem IL1β unter Angabe der Bezeichnung und Sequenz

chIL1ß_V5_co: Whole Sequence: 855	
top strand:	
Seg: 1-40; chIL1ß_V5_co_fw1	GTACGTAAGCTTAGATCTCCCGCCGCCACCATGGCCTTCG
Seg: 41-80; chIL1ß_V5_co_fw2	TGCCTGACCTGGACGTGCTGGAGAGCAGCAGCCTGAGCGA
Seg: 81-120; chIL1ß_V5_co_fw3	GGAGACCTTCTACGGCCCTAGCTGCCTGTGCCTGCAGAAG
Seg: 121-160; chIL1ß_V5_co_fw4	AAGCCTCGCCTGGACAGCGAGCACACCACCGTGGACGTGC
Seg: 161-200; chIL1ß_V5_co_fw5	AGGTGACCGTGCGCAAGGGCCGCGGCGCCCGCAGCTTCCG
Seg: 201-240; chIL1ß_V5_co_fw6	CCGCGCCGCCGTGCTGGTGGTGGCCATGACCAAGCTGCTG
Seg: 241-280; chIL1ß_V5_co_fw7	CGCCGCCCTCGCAGCCGCGACTTCGCCGACAGCGACCTGA
Seg: 281-320; chIL1ß_V5_co_fw8	GCGCCCTGCTGGAGGAGGTGTTCGAGCCTGTGACCTTCCA
Seg: 321-360; chIL1ß_V5_co_fw9	GCGCCTGGAGAGCAGCTACGCCGGCGCCCCTGCCTTCCGC
Seg: 361-400; chIL1ß_V5_co_fw10	TACACCCGCAGCCAGAGCTTCGACATCTTCGACATCAACC
Seg: 401-440; chIL1ß_V5_co_fw11	AGAAGTGCTTCGTGCTGGAGAGCCCTACCCAGCTGGTGGC
Seg: 441-480; chIL1ß_V5_co_fw12	CCTGCACCTGCAGGGCCCTAGCAGCAGCCAGAAGGTGCGC
Seg: 481-520; chIL1ß_V5_co_fw13	CTGAACATCGCCCTGTACCGCCCTCGCGGCCCTCGCGGCA
Seg: 521-560; chIL1ß_V5_co_fw14	GCGCCGGCACCGGCCAGATGCCTGTGGCCCTGGGCATCAA
Seg: 561-600; chIL1ß_V5_co_fw15	GGGCTACAAGCTGTACATGAGCTGCGTGATGAGCGGCACC
Seg: 601-640; chIL1ß_V5_co_fw16	GAGCCTACCCTGCAGCTGGAGGAGGCCGACGTGATGCGCG
Seg: 641-680; chIL1ß_V5_co_fw17	ACATCGACAGCGTGGAGCTGACCCGCTTCATCTTCTACCG
Seg: 681-720; chIL1ß_V5_co_fw18	CCTGGACAGCCCTACCGAGGGCACCACCCGCTTCGAGAGC
Seg: 721-760; chIL1ß_V5_co_fw19	GCCGCCTTCCCTGGCTGGTTCATCTGCACCAGCCTGCAGC
Seg: 761-800; chIL1ß_V5_co_fw20	CTCGCCAGCCTGTGGGCATCACCAACCAGCCTGACCAGGT
Seg: 801-840; chIL1ß_V5_co_fw21	GAACATCGCCACCTACAAGCTGAGCGGACGCATGGATGA
Bottom strand reverse: (rev,comp)	
855-821; chIL1ß_V5_co_rv1	ACGTACGGATCCTAGGTCATCCATGCGTCCGCTCA
820-781; chIL1ß_V5_co_rv2	GCTTGTAGGTGGCGATGTTCACCTGGTCAGGCTGGTTGGT
780-741; chIL1ß_V5_co_rv3	GATGCCCACAGGCTGGCGAGGCTGCAGGCTGGTGCAGATG
740-701; chIL1ß_V5_co_rv4	AACCAGCCAGGGAAGGCGGCGCTCTCGAAGCGGGTGGTGC
700-661; chIL1ß_V5_co_rv5	CCTCGGTAGGGCTGTCCAGGCGGTAGAAGATGAAGCGGGT

660-621; chIL1ß_V5_co_rv6	CAGCTCCACGCTGTCGATGTCGCGCATCACGTCGG CCTCC
620-581; chIL1ß_V5_co_rv7	TCCAGCTGCAGGGTAGGCTCGGTGCCGCTCATCAC GCAGC
580-541; chIL1ß_V5_co_rv8	TCATGTACAGCTTGTAGCCCTTGATGCCCAGGGCCA CAGG
540-501; chIL1ß_V5_co_rv9	CATCTGGCCGGTGCCGGCGCTGCCGCGAGGGCCG CGAGGG
500-461; chIL1ß_V5_co_rv10	CGGTACAGGGCGATGTTCAGGCGCACCTTCTGGCT GCTGC
460-421; chIL1ß_V5_co_rv11	TAGGGCCCTGCAGGTGCAGGGCCACCAGCTGGGT AGGGCT
420-381; chIL1ß_V5_co_rv12	CTCCAGCACGAAGCACTTCTGGTTGATGTCGAAGAT GTCG
380-341; chIL1ß_V5_co_rv13	AAGCTCTGGCTGCGGGTGTAGCGGAAGGCAGGGG CGCCGG
340-301; chIL1ß_V5_co_rv14	CGTAGCTGCTCTCCAGGCGCTGGAAGGTCACAGGC TCGAA
300-261; chIL1ß_V5_co_rv15	CACCTCCTCCAGCAGGGCGCTCAGGTCGCTGTCGG CGAAG
260-221; chIL1ß_V5_co_rv16	TCGCGGCTGCGAGGGCGGCGCAGCAGCTTGGTCA TGGCCA
220-181; chIL1ß_V5_co_rv17	CCACCAGCACGGCGGCGCGGCGGAAGCTGCGGGC GCCGCG
180-141; chIL1ß_V5_co_rv18	GCCCTTGCGCACGGTCACCTGCACGTCCACGGTGG TGTGC
140-101; chIL1ß_V5_co_rv19	TCGCTGTCCAGGCGAGGCTTCTTCTGCAGGCACAG GCAGC
100-61; chIL1ß_V5_co_rv20	TAGGGCCGTAGAAGGTCTCCTCGCTCAGGCTGCTG CTCTC
60-21; chIL1ß_V5_co_rv21	CAGCACGTCCAGGTCAGGCACGAAGGCCATGGTGG CGGCG

A.2. Sequenzen

Sequenz *gallus gallus* Interleukin-1β (Y15006)

ATGGCGTTCGTTCCCGACCTGGACGTGCTGGAGAGCAGCAGCCTCAGCGAAGAGACCTTCTACG
GCCCCTCCTGCCTCTGCCTGCAGAAGAAGCCTCGCCTGGATTCTGAGCACACCACAGTGGACGT
GCAGGTGACGGTGCGGAAGGGACGTGGTGCCCGGAGCTTTCGGCGGGCCGCCGTGCTGGTGG
TGGCCATGACCAAACTGCTGCGGAGGCCGAGGAGCAGGGACTTTGCTGACAGCGACCTGAGCG
CGCTCCTGGAGGAGGTTTTTGAGCCCGTCACCTTCCAGCGGCTGGAGAGCAGCTACGCCGGGG
CGCCCGCCTTCCGCTACACCCGCTCACAGTCCTTCGACATCTTCGACATCAACCAGAAGTGCTTC
GTGCTGGAGTCACCCACCCAGCTGGTGGCCCTGCACCTCCAGGGGCCCTCCTCCAGCCAGAAA
GTGAGGCTCAACATTGCGCTGTACCGGCCCCGAGGCCCACGGGGCAGCGCTGGAACTGGGCA
GATGCCAGTGGCACTGGGCATCAAGGGCTACAAGCTCTACATGTCGTGTGTGATGAGCGGCACC
GAGCCCACACTGCAGCTGGAGGAAGCCGACGTCATGCGGGACATCGACAGCGTCGAGCTGACC
CGCTTCATCTTCTACCGCCTGGACAGCCCGACTGAGGGCACCACGCGCTTCGAGTCGGCCGCC
TTCCCCGGGTGGTTCATCTGCACCTCCCTGCAGCCCCGGCAGCCCGTGGGCATCACCAACCAAC
CCGACCAGGTCAACATCGCCACCTACAAGCTAAGTGGGCGCTGA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGGCCTTCGTCCCAGATCTCGATGTCCTGGAGTCGTCTTCCCTGTCTGAGGAGACTTTCTATGG
CCCATCCTGCTTGTGTCTGCAGAAGAAACCCAGACTTGACTCGGAGCACACCACCGTCGACGTC
CAGGTGACCGTGCGTAAGGGCCGCGGAGCCCGATCTTTCAGACGCGCCGCGGTCCTGGTGGTG
GCCATGACTAAGCTGCTGCGTAGGCCGAGATCGCGTGACTTCGCCGATTCGGACTTGTCCGCCC

TCTTAGAAGAGGTCTTCGAGCCCGTCACTTTCCAGCGGCTGGAGAGCAGCTACGCCGGGGCTCC
CGCATTCCGCTATACCCGGTCCCAGTCGTTCGACATCTTCGATATTAACCAGAAGTGCTTCGTGC
TGGAATCGCCAACACAGCTGGTGGCATTGCACCTGCAAGGGCCATCGTCCTCGCAGAAGGTGC
GCCTCAACATCGCCCTGTATCGGCCCCGCGGGCCGCGGGGCTCCGCGGGCACTGGCCAGATG
CCCGTGGCCCTGGGCATCAAGGGGTACAAGCTCTATATGAGTTGTGTAATGTCTGGTACCGAGC
CTACACTGCAGCTGGAAGAGGCCGACGTGATGCGTGACATCGATTCCGTGGAGCTAACCCGCTT
CATCTTCTATCGGCTGGATTCCCCGACCGAGGGCACTACCCGATTCGAGAGTGCCGCCTTCCCC
GGCTGGTTTATCTGTACATCCCTGCAGCCCAGACAACCCGTTGGTATTACTAACCAGCCCGACCA
GGTTAACATCGCTACCTACAAGCTGTCCGGAAGGTGA

Sequenz *gallus gallus* Interferon γ (AAR98863)

ATGACTTGCCAGACTTACAACTTGTTTGTTCTGTCTGTCATCATGATTTATTATGGACATACTGCAA
GTAGTCTAAATCTTGTTCAACTTCAAGATGATATAGACAAACTGAAAGCTGACTTTAACTCAAGTC
ATTCAGATGTAGCTGACGGTGGACCTATTATTGTAGAGAAACTGAAGAACTGGACAGAGAGAAAT
GAGAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTTCGATGTACTTGGAAATGCTTGAAAACACTGACAA
GTCAAAGCCGCACATCAAACACATATCTGAGGAGCTCTATACTCTGAAAAACAACCTTCCTGATG
GCGTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGACCTGGCCAAGCTCCCGATGAACGACTTGAGAATCCA
GCGCAAAGCCGCGAATGAACTCTTCAGCATCTTACAGAAGCTGGTGGATCCTCCGAGTTTCAAAA
GGAAAAGGAGCCAGTCTCAGAGGAGATGCAATTGCTAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGACGTGTCAGACCTACAACCTGTTCGTCCTCTCGGTCATCATGATTTACTACGGACACACCGC
CTCGTCCCTGAACCTGGTGCAGCTGCAGGACGATATTGATAAACTCAAGGCGGACTTCAACTCCT
CCCACTCGGACGTGGCCGATGGCGGGCCTATCATAGTCGAGAAGCTCAAGAACTGGACCGAGC
GGAATGAAAAACGCATCATCCTGAGCCAGATCGTCTCCATGTACCTAGAGATGCTTGAAAATACC
GATAAGTCAAAGCCCCACATCAAGCACATCAGCGAGGAGCTGTACACCCTGAAAAACAATCTGCC
AGACGGCGTAAAGAAGGTGAAGGACATCATGGACCTGGCGAAGCTGCCCATGAATGATCTGAGA
ATCCAGCGGAAGGCCGCAAACGAGCTGTTTTCGATCCTGCAGAAGCTCGTCGATCCCCCCTCCT
TCAAGCGGAAGAGATCACAGTCGCAGAGAAGGTGTAACTGCTAA

Sequenz *gallus gallus* Interleukin 6 (AJ309540):

ATGAACTTCACCGAGGGCTGCGAGGCGACGGGACGGCGGCCGGGGAGCGCCGGGAGCCGCC
GCCGGAGAGCGCCCCGTCCCGGCCCCGTCGCGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTG
CCGCCCGCCGCCGCCGTCCCGCTGCCCGCCGCCGCGGACTCGTCCGGAGAGGTTGGGCTGGA
GGAGGAGGCGGGGGCGCGGCGGGCGCTGCTCGACTGCGAGCCGCTGGCCCGGGTGCTGCGC
GACCGCGCCGTCCAGCTGCAGGACGAGATGTGCAAGAAGTTCACCGTGTGCGAGAACAGCATG
GAGATGCTCGTCCGGAACAACCTCAACCTGCCCAAGGTGACGGAGGAGGACGGCTGCCTGCTC
GCCGGCTTCGACGAGGAGAAATGCCTGACGAAGCTCTCCAGCGGCCTGTTCGCCTTTCAGACCT
ACCTGGAATTCATTCAAGAGACTTTCGATAGCGAAAAGCAGAACGTCGAGTCTCTGTGCTACAGC
ACAAAGCACCTGGCGGCCACGATCCGGCAGATGGTGATAAATCCCGATGAAGTGGTCATCCCAG
ACTCGGCCGCCCAGAAATCCCTCCTCGCCAATCTGAAGTCAGATAAGGACTGGATAGAGAAAAT
CACCATGCACCTCATCCTCCGAGACTTTACTTCGTTTATGGAGAAGACCGTGAGGGCCGTTCGCT
ATTTGAAAAAGACCAGGAGTTTCAGTGCCTGA

Botulinum Neurotoxin A1 (strain Hall ATCC 3502)

ATGCCATTTGTTAATAAACAATTTAATTATAAAGATCCTGTAAATGGTGTTGATATTGCTTATATAAA
AATTCCAAATGCAGGACAAATGCAACCAGTAAAAGCTTTTAAAATTCATAATAAAATATGGGTTATT
CCAGAAAGAGATACATTTACAAATCCTGAAGAAGGAGATTTAAATCCACCACCAGAAGCAAAACA
AGTTCCAGTTTCATATTATGATTCAACATATTTAAGTACAGATAATGAAAAAGATAATTATTTAAAG
GGAGTTACAAAATTATTTGAGAGAATTTATTCAACTGATCTTGGAAGAATGTTGTTAACATCAATAG
TAAGGGGAATACCATTTTGGGGTGGAAGTACAATAGATACAGAATTAAAAGTTATTGATACTAATT
GTATTAATGTGATACAACCAGATGGTAGTTATAGATCAGAAGAACTTAATCTAGTAATAATAGGAC
CCTCAGCTGATATTATACAGTTTGAATGTAAAAGCTTTGGACATGAAGTTTTGAATCTTACGCGAA
ATGGTTATGGCTCTACTCAATACATTAGATTTAGCCCAGATTTTACATTTGGTTTTGAGGAGTCACT

TGAAGTTGATACAAATCCTCTTTTAGGTGCAGGCAAATTTGCTACAGATCCAGCAGTAACATTAGC
ACATGAACTTATACATGCTGGACATAGATTATATGGAATAGCAATTAATCCAAATAGGGTTTTTAAA
GTAAATACTAATGCCTATTATGAAATGAGTGGGTTAGAAGTAAGCTTTGAGGAACTTAGAACATTT
GGGGGACATGATGCAAAGTTTATAGATAGTTTACAGGAAAACGAATTTCGTCTATATTATTATAAT
AAGTTTAAAGATATAGCAAGTACACTTAATAAAGCTAAATCAATAGTAGGTACTACTGCTTCATTAC
AGTATATGAAAAATGTTTTTAAAGAGAAATATCTCCTATCTGAAGATACATCTGGAAAATTTTCGGT
AGATAAATTAAAATTTGATAAGTTATACAAAATGTTAACAGAGATTTACACAGAGGATAATTTTGTT
AAGTTTTTTAAAGTACTTAACAGAAAAACATATTTGAATTTTGATAAAGCCGTATTTAAGATAAATAT
AGTACCTAAGGTAAATTACACAATATATGATGGATTTAATTTAAGAAATACAAATTTAGCAGCAAAC
TTTAATGGTCAAAATACAGAAATTAATAATATGAATTTTACTAAACTAAAAAATTTTACTGGATTGTT
TGAATTTTATAAGTTGCTATGTGTAAGAGGGATAATAACTTCTAAAACTAAATCATTAGATAAAGGA
TACAATAAGGCATTAAATGATTTATGTATCAAAGTTAATAATTGGGACTTGTTTTTTAGTCCTTCAG
AAGATAATTTTACTAATGATCTAAATAAAGGAGAAGAAATTACATCTGATACTAATATAGAAGCAGC
AGAAGAAAATATTAGTTTAGATTTAATACAACAATATTATTTAACCTTTAATTTTGATAATGAACCTG
AAAATATTTCAATAGAAAATCTTTCAAGTGACATTATAGGCCAATTAGAACTTATGCCTAATATAGA
AAGATTTCCTAATGGAAAAAAGTATGAGTTAGATAAATATACTATGTTCCATTATCTTCGTGCTCAA
GAATTTGAACATGGTAAATCTAGGATTGCTTTAACAAATTCTGTTAACGAAGCATTATTAAATCCTA
GTCGTGTTTATACATTTTTTTCTTCAGACTATGTAAAGAAAGTTAATAAAGCTACGGAGGCAGCTAT
GTTTTTAGGCTGGGTAGAACAATTAGTATATGATTTTACCGATGAAACTAGCGAAGTAAGTACTAC
GGATAAAATTGCGGATATAACTATAATTATTCCATATATAGGACCTGCTTTAAATATAGGTAATATG
TTATATAAAGATGATTTTGTAGGTGCTTTAATATTTTCAGGAGCTGTTATTCTGTTAGAATTTATACC
AGAGATTGCAATACCTGTATTAGGTACTTTTGCACTTGTATCATATATTGCGAATAAGGTTCTAACC
GTTCAAACAATAGATAATGCTTTAAGTAAAAGAAATGAAAAATGGGATGAGGTCTATAAATATATA
GTAACAAATTGGTTAGCAAAGGTTAATACACAGATTGATCTAATAAGAAAAAAAATGAAAGAAGCT
TTAGAAAATCAAGCAGAAGCAACAAAGGCTATAATAAACTATCAGTATAATCAATATACTGAGGAA
GAGAAAAATAATATTAATTTTAATATTGATGATTTAAGTTCGAAACTTAATGAGTCTATAAATAAAGC
TATGATTAATATAAATAAATTTTTGAATCAATGCTCTGTTTCATATTTAATGAATTCTATGATCCCTT
ATGGTGTTAAACGGTTAGAAGATTTTGATGCTAGTCTTAAAGATGCATTATTAAAGTATATATATGA
TAATAGAGGAACTTTAATTGGTCAAGTAGATAGATTAAAAGATAAAGTTAATAATACACTTAGTACA
GATATACCTTTTCAGCTTTCCAAATACGTAGATAATCAAAGATTATTATCTACATTTACTGAATATAT
TAAGAATATTATTAATACTTCTATATTGAATTTAAGATATGAAAGTAATCATTTAATAGACTTATCTA
GGTATGCATCAAAAATAAATATTGGTAGTAAAGTAAATTTTGATCCAATAGATAAAAATCAAATTCA
ATTATTTAATTTAGAAAGTAGTAAAATTGAGGTAATTTTAAAAAATGCTATTGTATATAATAGTATGT
ATGAAAATTTTAGTACTAGCTTTTGGATAAGAATTCCTAAGTATTTTAACAGTATAAGTCTAAATAAT
GAATATACAATAATAAATTGTATGGAAAATAATTCAGGATGGAAAGTATCACTTAATTATGGTGAAA
TAATCTGGACTTTACAGGATACTCAGGAAATAAAACAAAGAGTAGTTTTTAAATACAGTCAAATGAT
TAATATATCAGATTATATAAACAGATGGATTTTTGTAACTATCACTAATAATAGATTAAATAACTCTA
AAATTTATATAAATGGAAGATTAATAGATCAAAAACCAATTTCAAATTTAGGTAATATTCATGCTAGT
AATAATATAATGTTTAAATTAGATGGTTGTAGAGATACACATAGATATATTTGGATAAAATATTTTAA
TCTTTTTGATAAGGAATTAAATGAAAAAGAAATCAAAGATTTATATGATAATCAATCAAATTCAGGT
ATTTTAAAAGACTTTTGGGGTGATTATTTACAATATGATAAACCATACTATATGTTAAATTTATATGA
TCCAAATAAATATGTCGATGTAAATAATGTAGGTATTAGAGGTTATATGTATCTTAAAGGGCCTAG
AGGTAGCGTAATGACTACAAACATTTATTTAAATTCAAGTTTGTATAGGGGGACAAAATTTATTATA
AAAAAATATGCTTCTGGAAATAAAGATAATATTGTTAGAAATAATGATCGTGTATATATTAATGTAG
TAGTTAAAAATAAAGAATATAGGTTAGCTACTAATGCATCACAGGCAGGCGTAGAAAAAATACTAA
GTGCATTAGAAATACCTGATGTAGGAAATCTAAGTCAAGTAGTAGTAATGAAGTCAAAAAATGATC
AAGGAATAACAAATAAATGCAAAATGAATTTACAAGATAATAATGGGAATGATATAGGCTTTATAG
GATTTCATCAGTTTAATAATATAGCTAAACTAGTAGCAAGTAATTGGTATAATAGACAAATAGAAAG
ATCTAGTAGGACTTTGGGTTGCTCATGGGAATTTATTCCTGTAGATGATGGATGGGGAGAAAGGC
CACTGTAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGCCCTTCGTGAACAAGCAGTTCAACTACAAGGACCCCGTGAACGGCGTGGATATCGCCTACA
TCAAGATCCCCAACGCCGGCCAGATGCAGCCCGTGAAGGCCTTCAAGATCCACAACAAGATCTG
GGTGATCCCTGAGCGGGACACCTTCACCAACCCCGAGGAAGGCGACCTGAACCCCCCTCCTGA
GGCCAAGCAGGTGCCCGTGTCCTACTACGACTCCACCTACCTGAGCACCGACAACGAGAAGGAC
AACTACCTGAAGGGCGTGACCAAGCTGTTCGAGCGGATCTACAGCACCGACCTGGGCAGAATGC
TGCTGACCAGCATCGTGCGGGGCATCCCTTTTTGGGGCGGCAGCACCATCGACACCGAGCTGA
AAGTGATCGACACCAACTGCATCAACGTGATCCAGCCCGACGGCAGCTACAGAAGCGAGGAACT
GAACCTGGTGATCATCGGCCCCAGCGCCGACATCATCCAGTTCGAGTGCAAGAGCTTCGGCCAC

GAGGTGCTGAACCTGACCCGGAACGGCTACGGCAGCACCCAGTACATCCGGTTCAGCCCCGAC
TTCACCTTCGGCTTCGAGGAATCCCTGGAAGTGGACACCAACCCTCTGCTGGGAGCCGGCAAGT
TTGCCACCGACCCTGCCGTGACACTGGCCCACGAGCTGATCCACGCCGGCCACAGACTGTACG
GCATTGCCATCAACCCCAACCGGGTGTTCAAAGTGAACACCAACGCCTACTACGAGATGAGCGG
CCTGGAAGTGTCCTTCGAGGAACTGCGGACCTTTGGCGGCCACGACGCCAAGTTCATCGACAGC
CTGCAGGAAAACGAGTTCCGGCTGTACTACTACAACAAGTTCAAGGATATCGCCAGCACCCTGAA
CAAGGCCAAGAGCATCGTGGGCACCACCGCCAGCCTGCAGTACATGAAGAACGTGTTCAAAGAG
AAGTACCTGCTGTCCGAGGACACCAGCGGCAAGTTCAGCGTGGACAAGCTGAAGTTCGACAAGC
TGTACAAGATGCTGACCGAGATCTACACCGAGGACAACTTCGTGAAGTTCTTCAAGGTGCTGAAT
GCCAAGACCTTCCTGAACTTCGATAAGGCCGTGTTCAAGATCAACATCGTGCCCAAAGTGAACTA
CACCATCTACGACGGCTTCAACCTGCGGAACACCAACCTGGCCGCCAACTTCAACGGCCAGAAC
ACCGAGATCAACAACATGAACTTCACCAAGCTGAAGAACTTCACCGGCCTGTTCGAGTTCTACAA
GCTGCTGTGCGTGAGAGGCATCATCACCAGCAAGACCAAGAGCCTGGACAAGGGCTACAACAAG
GCCCTGAACGACCTGTGCATCAAAGTGAATAACTGGGACCTGTTCTTCAGCCCCAGCGAGGACA
ATTTCACCAACGACCTGAATAAGGGCGAGGAAATCACCAGCGACACCAACATCGAGGCCGCCGA
GGAAAACATCAGCCTGGACCTGATCCAGCAGTACTACCTGACCTTCAACTTCGACAACGAGCCC
GAGAACATCAGCATCGAGAACCTGTCCAGCGACATCATCGGCCAGCTGGAACTGATGCCCAATA
TCGAGCGGTTCCCCAACGGCAAGAAGTACGAGCTGGACAAGTACACCATGTTCCACTACCTGCG
GGCCCAGGAATTCGAGCACGGCAAGAGCCGGATCGCCCTGACCAACAGCGTGAACGAGGCCCT
GCTGAACCCCAGCAGAGTGTACACCTTCTTCAGCAGCGACTACGTGAAGAAAGTGAACAAAGCC
ACCGAGGCCGCCATGTTTCTGGGCTGGGTGGAGCAGCTGGTGTACGACTTCACCGACGAGACA
AGCGAGGTGTCCACCACCGACAAGATCGCCGATATCACCATCATCATCCCTTACATCGGCCCTG
CCCTGAACATCGGCAACATGCTGTACAAGGACGACTTCGTGGGCGCCCTGATCTTCAGCGGAGC
CGTGATCCTGCTGGAATTCATCCCCGAGATCGCCATCCCCGTGCTGGGCACCTTCGCCCTGGTG
TCCTACATTGCCAATAAGGTGCTGACCGTGCAGACCATCGATAACGCCCTGAGCAAGCGGAACG
AGAAGTGGGACGAGGTGTACAAGTACATCGTGACCAACTGGCTGGCTAAAGTGAATACCCAGAT
CGACCTGATCCGGAAGAAGATGAAAGAGGCCCTGGAAAACCAGGCCGAGGCCACCAAGGCCAT
CATCAACTACCAGTACAATCAGTACACAGAGGAAGAGAAGAACAACATCAACTTTAACATCGACG
ACCTGAGCAGCAAGCTGAATGAGAGCATCAACAAGGCCATGATTAACATCAACAAGTTTCTGAAC
CAGTGCAGCGTGTCCTACCTGATGAACAGCATGATCCCCTACGGCGTGAAGCGGCTGGAAGATT
TCGACGCCAGCCTGAAGGACGCTCTGCTGAAGTACATCTACGACAACCGGGGCACCCTGATCGG
ACAGGTGGACCGGCTGAAGGACAAAGTGAACAATACCCTGTCTACCGACATCCCCTTCCAGCTG
TCTAAGTACGTGGACAACCAGCGGCTGCTGTCCACCTTCACCGAGTACATCAAGAACATCATCAA
TACCTCCATCCTGAACCTGAGATACGAGAGCAACCACCTGATCGACCTGTCCAGATACGCCAGC
AAGATCAATATCGGCAGTAAAGTGAACTTCGACCCCATCGACAAGAACCAGATCCAGCTGTTCAA
CCTGGAAAGCAGCAAGATCGAAGTGATCCTGAAGAACGCCATCGTGTACAACAGCATGTACGAG
AACTTCAGCACCAGCTTTTGGATCAGAATCCCCAAGTACTTCAACAGCATCAGCCTGAACAACGA
GTACACAATCATCAACTGCATGGAAAACAACTCCGGCTGGAAGGTGTCCCTGAACTACGGCGAG
ATCATCTGGACCCTGCAGGACACCCAGGAAATCAAGCAGCGGGTCGTGTTCAAGTACAGCCAGA
TGATCAACATCAGCGACTACATCAACCGGTGGATCTTCGTGACCATCACCAACAACCGGCTGAAC
AACAGCAAGATCTACATCAACGGCCGGCTGATCGACCAGAAGCCCATCAGCAACCTGGGCAACA
TCCACGCCAGCAACAACATCATGTTCAAGCTGGACGGCTGCCGGGACACCCACCGGTACATCTG
GATCAAGTACTTTAACCTGTTCGACAAAGAGCTGAACGAGAAAGAGATCAAGGACCTGTACGACA
ACCAGAGCAACAGCGGCATCCTGAAGGACTTTTGGGGCGACTACCTGCAGTACGACAAGCCCTA
CTACATGCTGAATCTGTACGACCCCAACAAATACGTGGACGTGAACAACGTGGGCATCCGGGGC
TACATGTATCTGAAGGGCCCCAGAGGCAGCGTGATGACCACCAACATCTACCTGAACAGCAGCC
TGTACCGGGGCACAAAGTTCATCATCAAGAAGTATGCCAGCGGCAACAAGGACAATATCGTGCG
GAACAACGACCGGGTGTACATCAACGTGGTGGTGAAGAACAAAGAGTACCGGCTGGCCACCAAT
GCCTCTCAGGCCGGCGTGGAGAAGATCCTGAGCGCCCTGGAAATCCCCGACGTGGGCAACCTG
AGCCAGGTGGTGGTGATGAAGTCCAAGAACGACCAGGGCATCACCAATAAGTGCAAGATGAACC
TGCAGGATAACAACGGCAACGACATCGGCTTTATCGGCTTCCACCAGTTCAACAATATCGCCAAA
CTGGTGGCCAGCAACTGGTACAACCGGCAGATCGAGCGGAGCAGCAGAACCCTGGGCTGCAGC
TGGGAGTTCATCCCCGTGGACGACGGCTGGGGAGAAAGACCTCTGATGGATGACCTAGGATCC
GTACGTGAGCTC

Glykoprotein GP4 Ebov Zaire (NC_002549.1)

GATGAAGATTAAGCCGACAGTGAGCGTAATCTTCATCTCTCTTAGATTATTTGTTTTCCAGAGTAG
GGGTCGTCAGGTCCTTTTCAATCGTGTAACCAAAATAAACTCCACTAGAAGGATATTGTGGGGCA
ACAACACAATGGGCGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTC
TTTCTTTGGGTAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCA

CATTACAGGTTAGTGATGTCGACAAACTAGTTTGTCGTGACAAACTGTCATCCACAAATCAATTGA
GATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAAG
ATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCACCAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAA
AACTGCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACG
GGATTCGGGGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCG
GAGACTTTGCCTTCCATAAAGAGGGTGCTTTCTTCCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCT
ACCGAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGTCGTTGCATTTCTGATACTGCCCCAAGCTAAGAAGGAC
TTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGGTCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACT
ATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTTGGAACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAG
GTTGACAATTTGACCTACGTCCAACTTGAATCAAGATTCACACCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAAT
GAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAACTAATTTGGAAGGTCAACCC
CGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAAACCTCACTAGAAAAAT
TCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAGTTGTATCAAACGGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAGAGTC
CGGCGCGAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACTGAAGACCACAAAATCATGGCTTC
AGAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTCGCATCTAA
CAACCCTTGCCACAATCTCCACGAGTCCCCAATCCCTCACAACCAAACCAGGTCCGGACAACAG
CACCCATAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACATCACC
GCAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGACACTCCCTCTGCCACGACCGCAGCCGGACCCC
CAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGAGCACTGACTTCCTGGACCCCGCCACCACAACAAG
TCCCCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATCACCAAGATACCGGAGAAGAG
AGTGCCAGCAGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTCGCAGGACTGATCA
CAGGCGGGAGAAGAACTCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTA
CATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATTTCGGGCA
GCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTAATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTGAG
ACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTGTTCCTGAGAGCCACAACTGAGCTACGC
ACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCA
CATTCTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAACAGACAAAATTG
ATCAGATTATTCATGATTTTGTTGATAAAACCCTTCCGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGG
ACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATCGC
TTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAGTTTTTCTTCAGATTGCTTCATGGAAAAGCTCAGCCT
CAAATCAATGAAACCAGGATTTAATTATATGGATTACTTGAATCTAAGATTACTTGACAAATGATAA
TATAATACACTGGAGCTTTAAACATAGCCAATGTGATTCTAACTCCTTTAAACTCACAGTTAATCAT
AAACAAGGTTTGACATCAATCTAGTTATCTCTTTGAGAATGATAAACTTGATGAAGATTAAGAAAAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGGGCGTGACCGGCATCCTGCAGCTGCCCCGGGACCGGTTCAAGCGGACCAGCTTCTTCCTG
TGGGTGATCATCCTGTTCCAGCGGACCTTCAGCATCCCCCTGGGCGTGATCCACAACAGCACCC
TGCAGGTGTCCGACGTGGACAAGCTGGTGTGCCGGGACAAGCTGTCCAGCACCAACCAGCTGC
GGAGCGTGGGCCTGAACCTGGAAGGCAACGGCGTGGCCACCGACGTGCCCAGCGCCACCAAG
AGATGGGGCTTCCGCAGCGGCGTGCCCCCCAAGGTGGTGAACTACGAGGCCGGCGAGTGGGC
CGAGAACTGCTACAACCTGGAAATCAAGAAGCCCGACGGCAGCGAGTGTCTGCCTGCCGCCCCT
GACGGCATCAGAGGCTTCCCCCGGTGCAGATACGTGCACAAGGTGTCCGGCACCGGCCCCTGT
GCCGGCGACTTCGCCTTCCACAAAGAGGGCGCCTTTTTCCTGTACGACCGGCTGGCCAGCACC
GTGATCTACCGGGGCACCACCTTCGCCGAGGGCGTGGTGGCCTTCCTGATCCTGCCCCAGGCC
AAGAAGGACTTCTTCAGCAGCCACCCCCTGCGGGAGCCCGTGAACGCCACCGAGGACCCCAGC
AGCGGCTACTACAGCACCACCATCAGATACCAGGCCACCGGCTTCGGCACCAACGAGACAGAGT
ACCTGTTCGAGGTGGACAACCTGACCTACGTGCAGCTGGAAAGCCGGTTCACCCCCCAGTTTCT
GCTGCAGCTGAACGAGACAATCTACACCAGCGGCAAGCGGAGCAACACCACAGGCAAGCTGAT
CTGGAAAGTGAACCCCGAGATCGACACCACCATCGGCGAATGGGCCTTTTGGGAGACAAAGAAG
AACCTGACCCGGAAGATCAGAAGCGAGGAACTGAGCTTCACCGTGGTGTCCAACGGCGCCAAG
AACATCAGCGGCCAGAGCCCCGCCAGAACCAGCAGCGACCCCGGCACCAACACCACCACCGAG
GATCACAAGATCATGGCCAGCGAGAACAGCAGCGCCATGGTGCAGGTGCACAGCCAGGGCCGG
GAGGCCGCCGTGAGCCACCTGACCACCCTGGCCACCATCAGCACCAGCCCCCAGAGCCTGACC
ACCAAGCCTGGCCCCGACAACTCCACCCACAACACCCCCGTGTACAAGCTGGACATCAGCGAGG
CCACCCAGGTGGAGCAGCACCACCGGCGGACCGACAACGACAGCACCGCCAGCGACACCCCCT
CTGCCACCACAGCCGCCGGACCCCCCAAGGCCGAGAACACCAACACCTCCAAGAGCACCGACT
TTCTGGACCCCGCCACCACCACCTCCCCCCAGAACCACTCCGAGACAGCCGGCAACAACAACAC
CCACCACCAGGACACCGGCGAGGAAAGCGCCAGCTCCGGCAAGCTGGGCCTGATCACCAACAC
AATCGCCGGCGTGGCCGGCCTGATTACCGGCGGCAGACGGACCAGACGGGAGGCCATCGTGA
ACGCCCAGCCCAAGTGCAACCCCAACCTGCACTACTGGACCACCCAGGACGAGGGAGCCGCCA

TCGGCCTGGCCTGGATTCCCTACTTCGGCCCTGCCGCCGAGGGCATCTACATCGAGGGCCTGAT
GCACAACCAGGACGGCCTGATCTGCGGCCTGCGGCAGCTGGCCAACGAAACCACCCAGGCCCT
GCAGCTGTTCCTGCGGGCCACCACAGAGCTGCGGACCTTCTCCATCCTGAACAGAAAGGCCATC
GACTTTCTGCTGCAGAGATGGGGCGGCACCTGCCACATCCTGGGCCCCGACTGCTGCATCGAG
CCCCACGACTGGACCAAGAATATCACCGACAAGATCGACCAGATCATCCACGACTTCGTGGACA
AGACCCTGCCCGACCAGGGCGACAACGATAACTGGTGGACAGGCTGGCGGCAGTGGATTCCTG
CCGGCATCGGCGTGACAGGCGTGATCATTGCCGTGATCGCCCTGTTCTGCATCTGCAAGTTCGT
GTTCATGGACGACCTGGGATCCATTCCAAACCCTTTGCTGGGATTGGAC

Leserahmen ZEboV-GP-Fc delta tm

ATGGGCGTGACCGGCATCCTGCAGCTGCCCCGGGACCGGTTCAAGCGGACCAGCTTCTTCCTG
TGGGTGATCATCCTGTTCCAGCGGACCTTCAGCATCCCCCTGGGCGTGATCCACAACAGCACCC
TGCAGGTGTCCGACGTGGACAAGCTGGTGTGCCGGGACAAGCTGTCCAGCACCAACCAGCTGC
GGAGCGTGGGCCTGAACCTGGAAGGCAACGGCGTGGCCACCGACGTGCCCAGCGCCACCAAG
AGATGGGGCTTCCGCAGCGGCGTGCCCCCCAAGGTGGTGAACTACGAGGCCGGCGAGTGGGC
CGAGAACTGCTACAACCTGGAAATCAAGAAGCCCGACGGCAGCGAGTGTCTGCCTGCCGCCCCT
GACGGCATCAGAGGCTTCCCCCGGTGCAGATACGTGCACAAGGTGTCCGGCACCGGCCCCTGT
GCCGGCGACTTCGCCTTCCACAAAGAGGGCGCCTTTTTCCTGTACGACCGGCTGGCCAGCACC
GTGATCTACCGGGGCACCACCTTCGCCGAGGGCGTGGTGGCCTTCCTGATCCTGCCCCAGGCC
AAGAAGGACTTCTTCAGCAGCCACCCCCTGCGGGAGCCCGTGAACGCCACCGAGGACCCCAGC
AGCGGCTACTACAGCACCACCATCAGATACCAGGCCACCGGCTTCGGCACCAACGAGACAGAGT
ACCTGTTCGAGGTGGACAACCTGACCTACGTGCAGCTGGAAAGCCGGTTCACCCCCCAGTTTCT
GCTGCAGCTGAACGAGACAATCTACACCAGCGGCAAGCGGAGCAACACCACAGGCAAGCTGAT
CTGGAAAGTGAACCCCGAGATCGACACCACCATCGGCGAATGGGCCTTTTGGGAGACAAAGAAG
AACCTGACCCGGAAGATCAGAAGCGAGGAACTGAGCTTCACCGTGGTGTCCAACGGCGCCAAG
AACATCAGCGGCCAGAGCCCCGCCAGAACCAGCAGCGACCCCGGCACCAACACCACCACCGAG
GATCACAAGATCATGGCCAGCGAGAACAGCAGCGCCATGGTGCAGGTGCACAGCCAGGGCCGG
GAGGCCGCCGTGAGCCACCTGACCACCCTGGCCACCATCAGCACCAGCCCCCAGAGCCTGACC
ACCAAGCCTGGCCCCGACAACTCCACCCACAACACCCCCGTGTACAAGCTGGACATCAGCGAGG
CCACCCAGGTGGAGCAGCACCACCGGCGGACCGACAACGACAGCACCGCCAGCGACACCCCCT
CTGCCACCACAGCCGCCGGACCCCCCAAGGCCGAGAACACCAACACCTCCAAGAGCACCGACT
TTCTGGACCCCGCCACCACCACCTCCCCCCAGAACCACTCCGAGACAGCCGGCAACAACAACAC
CCACCACCAGGACACCGGCGAGGAAAGCGCCAGCTCCGGCAAGCTGGGCCTGATCACCAACAC
AATCGCCGGCGTGGCCGGCCTGATTACCGGCGGCAGACGGACCAGACGGGAGGCCATCGTGA
ACGCCCAGCCCAAGTGCAACCCCAACCTGCACTACTGGACCACCCAGGACGAGGGAGCCGCCA
TCGGCCTGGCCTGGATTCCCTACTTCGGCCCTGCCGCCGAGGGCATCTACATCGAGGGCCTGAT
GCACAACCAGGACGGCCTGATCTGCGGCCTGCGGCAGCTGGCCAACGAAACCACCCAGGCCCT
GCAGCTGTTCCTGCGGGCCACCACAGAGCTGCGGACCTTCTCCATCCTGAACAGAAAGGCCATC
GACTTTCTGCTGCAGAGATGGGGCGGCACCTGCCACATCCTGGGCCCCGACTGCTGCATCGAG
CCCCACGACTGGACCAAGAATATCACCGACAAGATCGACCAGATCATCCACGACTTCGTGGACA
AGACCCTGCCCGACCAGGGCGACAACGATAACTGGTGGACAGGCTGGCGGCAGTGCAAGTTCG
TGTTCATGGACGACCTGGGATCCAGGGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA
ACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAATGA

Glykoprotein GP4 MarV Musoke (NC_001608.3)

GAAGAACATTAATTGCTGGGTAAAAGTGATTAATTTCTTTAAATTTGACCAGAATAATATTTTGTCA
GTGAATATATTCTCATATCACTTGATTAAAAACAGAAAATTACCCTAACATGAAGACCACATGTTTC
CTTATCAGTCTTATCTTAATTCAAGGGACAAAAAATCTCCCCATTTTAGAGATAGCTAGTAATAATC
AACCCCAAAATGTGGATTCGGTATGCTCCGGAACTCTCCAGAAGACAGAAGACGTCCATCTGATG
GGATTCACACTGAGTGGGCAAAAAGTTGCTGATTCCCCTTTGGAGGCATCCAAGCGATGGGCTTT
CAGGACAGGTGTACCTCCCAAGAATGTTGAGTACACAGAGGGGGAGGAAGCCAAAACATGCTAC
AATATAAGTGTAACGGATCCCTCTGGAAAATCCTTGCTGTTAGATCCTCCTACCAACATCCGTGAC
TATCCTAAATGCAAAACTATCCATCATATTCAAGGTCAAAACCCTCATGCACAGGGGATCGCCCTT
CATTTATGGGGAGCATTTTTTCTGTATGATCGCATTGCCTCCACAACAATGTACCGAGGCAAAGTC
TTCACTGAAGGGAACATAGCAGCTATGATTGTCAATAAGACAGTGCACAAAATGATTTTCTCGCG
GCAAGGACAAGGGTACCGTCATATGAATCTGACTTCTACTAATAAATATTGGACAAGTAGTAACG
GAACGCAAACGAATGACACTGGATGTTTCGGCGCTCTTCAAGAATACAATTCTACAAAGAACCAA
ACATGTGCTCCGTCCAAAATACCTCCACCACTGCCCACAGCCCGTCCGGAGATCAAACTCACAA
GCACCCCAACTGATGCCACCAAACTCAATACCACGGACCCAAGCAGTGATGATGAGGACCTCGC
AACATCCGGCTCAGGGTCCGGAGAACGAGAACCCCACACAACTTCTGATGCGGTCACCAAGCAA
GGGCTTTCATCAACAATGCCACCCACTCCCTCACCACAACCAAGCACGCCACAGCAAGGAGGAA
ACAACACAAACCATTCCCAAGATGCTGTGACTGAACTAGACAAAAATAACACAACTGCACAACCG
TCCATGCCCCCTCATAACACTACCACAATCTCTACTAACAACACCTCCAAACACAACTTCAGCACT
CTCTCTGCACCATTACAAAACACCACCAATGACAACACACAGAGCACAATCACTGAAAATGAGCA
AACCAGTGCCCCCTCGATAACAACCCTGCCTCCAACGGGAAATCCCACCACAGCAAAGAGCACC
AGCAGCAAAAAAGGCCCCGCCACAACGGCACCAAACACGACAAATGAGCATTTCACCAGTCCTC
CCCCCACCCCCAGCTCGACTGCACAACATCTTGTATATTTCAGAAGAAAGCGAAGTATCCTCTGG
AGGGAAGGCGACATGTTCCCTTTTCTGGATGGGTTAATAAATGCTCCAATTGATTTTGACCCAGTT
CCAAATACAAAAACAATCTTTGATGAATCCTCTAGTTCTGGTGCCTCGGCTGAGGAAGATCAACAT
GCCTCCCCCAATATTAGTTTAACTTTATCTTATTTTCCTAATATAAATGAGAACACTGCCTACTCTG
GAGAAAATGAGAATGATTGTGATGCAGAGTTAAGAATTTGGAGCGTTCAGGAGGATGACCTGGC
CGCAGGGCTCAGTTGGATACCGTTTTTTGGCCCTGGAATTGAAGGACTTTACACTGCTGTTTTAA
TTAAAAATCAAAACAATTTGGTCTGCAGGTTGAGGCGTCTAGCCAATCAAACTGCCAAATCCTTGG
AACTCTTATTGAGAGTCACAACTGAGGAAAGAACATTCTCCTTAATCAATAGACATGCTATTGACT
TTCTACTCACAAGATGGGGAGGAACATGCAAAGTGCTTGGACCTGATTGTTGCATCGGGATAGAA
GACTTGTCCAAAAATATTTCAGAGCAAATTGACCAAATTAAAAAGGACGAACAAAAAGAGGGGAC
TGGTTGGGGTCTGGGTGGTAAATGGTGGACATCCGACTGGGGTGTTCTTACTAACTTGGGCATTT
TGCTACTATTATCCATAGCTGTCTTGATTGCTCTATCCTGTATTTGTCGTATCTTTACTAAATATATC
GGATAACGTTAAATGTGTAATGATTAGGACTTTAGGACAATTGCTACTGAGCCCTTTTTCTAATCT
ACTGAAATCAACTTGGGAGATTTTTAAGAAGCTGATAACTTAATGTGAATCAATAGTTTATGTATTA
TCGATTATTATGGTTTGATATTCAATTGTTATTATTGTCAGGAGTGACCTTTTCTATTTGATGCATTA
ATGTTTTAAACTACCTCTTAAGCCTTTGAGGGCGGTCCCAATATGTGCGTAGGGGTTAATTTAAAG
GGATTTCTTATTGTACAGTTTTCTGTATTACTTATTTGGGCTTGAAGACATAGTTAAGATTTGCCGA
AAATGCTCTCCAGTCAATTCCATCCCCTCTCAGAAAAGACGTGCTGTTCAAAGAGTCTTAATTTAT
AACCAACTATTGCAAGAATTAATTTACTTTTTCCGTTATACTTAGTTACATTAATCTTTTGACTGTTC
AGCATTATTAACGACTTGTCTTAATTCAATCGTTCGGATGAAATTCATAAGGAAAAATGAGCCTCC
TTCCCCCTATTCTGGGCTGAGAAAATTTCTCTTATCCGCCTAAAATCTGATCTGTTAGGTCATGGG
TCCTTCATAATCTGTTTGAGCATGAATATTGATCAAATGACCAAATGATAGTGCATTTGTATAGACT
CAATTATCCTTTATTAAGAAAAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGAAAACCACCTGCTTTCTGATCAGCCTGATCCTGATCCAGGGCACCAAGAACCTGCCCATCCT
GGAAATCGCCAGCAACAACCAGCCCCAGAACGTGGACAGCGTGTGCAGCGGCACCCTGCAGAA
AACCGAGGACGTGCACCTGATGGGCTTCACACTGAGCGGCCAGAAGGTGGCCGACAGCCCCCT
GGAAGCCAGCAAGAGATGGGCCTTCCGGACCGGCGTGCCCCCCAAGAATGTGGAGTACACCGA
GGGCGAGGAAGCCAAGACCTGCTACAACATCAGCGTGACCGACCCCAGCGGCAAGAGCCTGCT
GCTGGACCCCCCCACCAACATCAGAGACTACCCCAAGTGCAAGACCATCCACCACATCCAGGGC
CAGAACCCCCACGCCCAGGGCATTGCTCTGCACCTGTGGGGCGCCTTTTTCCTGTACGACCGGA
TCGCCAGCACCACCATGTACCGGGGCAAGGTGTTCACCGAGGGCAATATCGCCGCCATGATCGT
GAACAAGACCGTGCACAAGATGATCTTCAGCAGACAGGGCCAGGGCTACCGGCACATGAACCTG
ACCAGCACCAACAAGTACTGGACCAGCAGCAACGGCACCCAGACCAACGACACCGGCTGCTTC
GGCGCCCTGCAGGAATACAACAGCACCAAGAATCAGACCTGTGCTCCCAGCAAGATCCCTCCTC

CCCTGCCAACAGCCAGACCCGAGATCAAGCTGACCTCCACCCCCACCGACGCCACCAAGCTGAA
CACCACCGACCCCTCCAGCGACGACGAGGACCTGGCCACCTCCGGCAGCGGCAGCGGCGAGA
GAGAGCCCCACACCACCTCCGACGCCGTCACCAAGCAGGGCCTGAGCAGCACTATGCCTCCTA
CCCCCTCCCCTCAGCCCAGCACCCCTCAGCAGGGCGGCAACAACACCAACCACAGCCAGGATG
CCGTGACCGAGCTGGACAAGAACAATACCACCGCCCAGCCCAGCATGCCCCCCCACAATACCAC
CACCATCTCCACCAACAACACCTCCAAGCACAACTTCAGCACCCTGAGCGCCCCTCTGCAGAAC
ACCACCAACGACAACACCCAGAGCACCATCACCGAGAACGAGCAGACCAGCGCCCCTTCCATCA
CCACCCTGCCCCCTACCGGCAACCCCACAACCGCCAAGAGCACCAGCTCCAAGAAGGGCCCTG
CCACCACAGCCCCCAACACCACAAACGAGCACTTCACCAGCCCCCCTCCCACCCCTAGCAGCAC
CGCCCAGCATCTGGTGTACTTCCGGCGGAAGCGGAGCATCCTGTGGCGGGAGGGCGACATGTT
CCCCTTTCTGGACGGCCTGATCAACGCCCCCATCGACTTCGACCCCGTGCCCAACACCAAGACC
ATCTTCGACGAGAGCAGCAGCTCCGGCGCCAGCGCCGAAGAGGACCAGCACGCCAGCCCCAAC
ATCTCCCTGACCCTGAGCTACTTCCCCAACATCAACGAGAACACCGCCTACTCCGGCGAGAACG
AGAACGACTGCGACGCCGAGCTGCGGATTTGGAGCGTGCAGGAAGATGACCTGGCCGCCGGCC
TGAGCTGGATTCCCTTCTTCGGCCCTGGCATCGAGGGCCTGTACACCGCCGTGCTGATCAAGAA
CCAGAACAACCTGGTGTGCCGGCTGCGGCGGCTGGCCAACCAGACCGCCAAGTCCCTGGAACT
GCTGCTGAGAGTGACCACCGAGGAACGGACCTTCTCCCTGATCAACCGGCACGCCATCGATTTT
CTGCTGACCAGATGGGGCGGCACCTGCAAGGTGCTGGGCCCCGACTGCTGCATCGGCATCGAG
GATCTGAGCAAGAACATCAGCGAGCAGATCGACCAGATCAAGAAGGACGAGCAGAAAGAGGGC
ACCGGCTGGGGCCTGGGCGGCAAGTGGTGGACCAGCGACTGGGGCGTGCTGACCAACCTGGG
CATCCTGCTGCTGCTGTCTATTGCCGTGCTGATTGCCCTGAGCTGCATCTGCCGGATCTTCACCA
AGTACATCGGCATGGACGACCTGGGATCCATTCCAAACCCTTTGCTGGGATTGGACTGA

Leserahmen LVMarV-GP-FC

ATGAAAACCACCTGCTTTCTGATCAGCCTGATCCTGATCCAGGGCACCAAGAACCTGCCCATCCT
GGAAATCGCCAGCAACAACCAGCCCCAGAACGTGGACAGCGTGTGCAGCGGCACCCTGCAGAA
AACCGAGGACGTGCACCTGATGGGCTTCACACTGAGCGGCCAGAAGGTGGCCGACAGCCCCCT
GGAAGCCAGCAAGAGATGGGCCTTCCGGACCGGCGTGCCCCCCAAGAATGTGGAGTACACCGA
GGGCGAGGAAGCCAAGACCTGCTACAACATCAGCGTGACCGACCCCAGCGGCAAGAGCCTGCT
GCTGGACCCCCCCACCAACATCAGAGACTACCCCAAGTGCAAGACCATCCACCACATCCAGGGC
CAGAACCCCCACGCCCAGGGCATTGCTCTGCACCTGTGGGGCGCCTTTTTCCTGTACGACCGGA
TCGCCAGCACCACCATGTACCGGGGCAAGGTGTTCACCGAGGGCAATATCGCCGCCATGATCGT
GAACAAGACCGTGCACAAGATGATCTTCAGCAGACAGGGCCAGGGCTACCGGCACATGAACCTG
ACCAGCACCAACAAGTACTGGACCAGCAGCAACGGCACCCAGACCAACGACACCGGCTGCTTC
GGCGCCCTGCAGGAATACAACAGCACCAAGAATCAGACCTGTGCTCCCAGCAAGATCCCTCCTC
CCCTGCCAACAGCCAGACCCGAGATCAAGCTGACCTCCACCCCCACCGACGCCACCAAGCTGAA
CACCACCGACCCCTCCAGCGACGACGAGGACCTGGCCACCTCCGGCAGCGGCAGCGGCGAGA
GAGAGCCCCACACCACCTCCGACGCCGTCACCAAGCAGGGCCTGAGCAGCACTATGCCTCCTA
CCCCCTCCCCTCAGCCCAGCACCCCTCAGCAGGGCGGCAACAACACCAACCACAGCCAGGATG
CCGTGACCGAGCTGGACAAGAACAATACCACCGCCCAGCCCAGCATGCCCCCCCACAATACCAC
CACCATCTCCACCAACAACACCTCCAAGCACAACTTCAGCACCCTGAGCGCCCCTCTGCAGAAC
ACCACCAACGACAACACCCAGAGCACCATCACCGAGAACGAGCAGACCAGCGCCCCTTCCATCA
CCACCCTGCCCCCTACCGGCAACCCCACAACCGCCAAGAGCACCAGCTCCAAGAAGGGCCCTG
CCACCACAGCCCCCAACACCACAAACGAGCACTTCACCAGCCCCCCTCCCACCCCTAGCAGCAC
CGCCCAGCATCTGGTGTACTTCCGGCGGAAGCGGAGCATCCTGTGGCGGGAGGGCGACATGTT
CCCCTTTCTGGACGGCCTGATCAACGCCCCCATCGACTTCGACCCCGTGCCCAACACCAAGACC
ATCTTCGACGAGAGCAGCAGCTCCGGCGCCAGCGCCGAAGAGGACCAGCACGCCAGCCCCAAC
ATCTCCCTGACCCTGAGCTACTTCCCCAACATCAACGAGAACACCGCCTACTCCGGCGAGAACG
AGAACGACTGCGACGCCGAGCTGCGGATTTGGAGCGTGCAGGAAGATGACCTGGCCGCCGGCC
TGAGCTGGATTCCCTTCTTCGGCCCTGGCATCGAGGGCCTGTACACCGCCGTGCTGATCAAGAA
CCAGAACAACCTGGTGTGCCGGCTGCGGCGGCTGGCCAACCAGACCGCCAAGTCCCTGGAACT
GCTGCTGAGAGTGACCACCGAGGAACGGACCTTCTCCCTGATCAACCGGCACGCCATCGATTTT
CTGCTGACCAGATGGGGCGGCACCTGCAAGGTGCTGGGCCCCGACTGCTGCATCGGCATCGAG
GATCTGAGCAAGAACATCAGCGAGCAGATCGACCAGATCAAGAAGGACGAGCAGAAAGAGGGC
ACCGGCTGGGGCCTGGGCGGCAAGTGGTGGACCAGCGACTGGGGCGTGCTGACCAACCTGGG
CATCCTGCTGCTGCTGTCTATTGCCGTGCTGATTGCCCTGAGCTGCATCTGCCGGATCTTCACCA
AGTACATCGGCATGGACGACCTGGGATCCAGGGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC
ACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG

CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGA

Matrixprotein VP40 MARV Musoke (NC_001608.3)

GAAGAACATTAAGAAGATCTTTCTTTCGTAGTGTTCTTTTACTGGAAGGAGTATTCCAATTTCAGCT
TGTTGGATTAATTGTTACTTAAATTGTCCTTTTTGAAATTAATTCACACAAGGTAGTTTAAATTTATA
TCCAAAATAAATTTTGATATGGCCAGTTCCAGCAATTACAACACATACATGCAATACTTGAACCCC
CCTCCTTATGCTGATCACGGTGCAAACCAGTTGATCCCGGCGGATCAGCTATCAAATCAGCAGG
GTATAACTCCAAATTACGTGGGTGATTTAAACCTAGATGATCAGTTCAAAGGGAATGTCTGCCATG
CTTTCACTTTAGAGGCAATAATTGACATATCTGCATATAACGAGCGAACAGTCAAAGGCGTTCCG
GCATGGCTGCCTCTTGGGATTATGAGCAATTTTGAATATCCTTTAGCTCATACTGTGGCCGCGTT
GCTCACAGGCAGCTATACAATCACCCAATTTACTCACAACGGGCAAAAATTCGTCCGTGTTAATC
GACTTGGTACAGGAATCCCAGCACACCCACTCAGAATGTTGCGTGAAGGAAATCAAGCTTTTATT
CAGAATATGGTGATCCCCAGGAATTTTTCAACTAATCAATTCACCTACAATCTCACTAATTTAGTAT
TGAGTGTGCAAAAACTTCCTGATGATGCCTGGCGCCCATCCAAGGACAAATTAATTGGGAACACT
ATGCATCCCGCAGTCTCCATCCACCCGAATCTGCCGCCTATTGTTCTACCAACAGTCAAGAAGCA
GGCTTATCGTCAGCACAAAAATCCCAACAATGGACCATTGCTGGCCATATCTGGCATCCTCCATC
AACTGAGGGTCGAAAAAGTCCCAGAGAAGACGAGCCTGTTTAGGATCTCGCTTCCTGCCGACAT
GTTCTCAGTAAAAGAGGGTATGATGAAGAAAAGGGGAGAAAATTCCCCCGTGGTTTATTTTCAAG
CACCTGAGAACTTCCCTTTGAATGGCTTCAATAACAGACAAGTTGTGCTAGCGTATGCGAATCCA
ACGCTCAGTGCCGTTTGAAATGATGCTCAAATGAGACAGGAGTCCATCTGTATAAGAAGTATGGC
TTAAATGGATATTTGTCAAATTCTTACAAGATTAGTTTGTATTGATTTCAACAATGCTTTAACCTTAC
ATTGCTGCTTTAAATAGTTGATTAAGCTGATCAGCTTGTAATATGTAATCTCTTCTGGGCCATCAG
ATCCATAATGGGTTTACTAGACTATATAAGAGAAATAGTAATATTTTATAAACAATTCTTGCTCAGT
TTTACTGTGATTTAATAACATATGTCATTGTGCCCTCCATTGCTAAGTCAACTCAACTGACGATAAT
ACTCCTTCTGAAATAGTAAG
AAAAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGGCCAGCAGCAGCAACTACAACACCTACATGCAGTACCTGAACCCTCCCCCATACGCCGACC
ACGGCGCCAACCAGCTGATCCCCGCCGACCAGCTGAGCAACCAGCAGGGCATCACCCCCAACT
ACGTGGGCGACCTGAACCTGGACGACCAGTTCAAGGGCAACGTGTGCCACGCCTTCACCCTGG
AGGCCATCATTGACATCAGCGCCTACAATGAGAGAACAGTGAAGGGAGTGCCTGCATGGCTGCC
ACTGGGCATCATGAGCAACTTCGAGTACCCCCTGGCCCACACCGTGGCCGCCCTGCTGACCGG
CAGCTACACCATCACCCAGTTCACCCACAACGGCCAGAAGTTCGTGCGGGTGAACAGACTGGGA
ACAGGCATCCCCGCACACCCACTGAGAATGCTGAGAGAGGGCAACCAGGCCTTCATCCAGAACA
TGGTGATCCCCCGGAACTTCAGCACCAACCAGTTCACCTACAACCTGACCAACCTGGTGCTGAG
CGTGCAGAAGCTGCCCGACGACGCCTGGCGGCCCAGCAAGGACAAGCTGATCGGCAACACCAT
GCACCCCGCCGTGAGCATCCACCCCAACCTGCCTCCAATCGTGCTGCCCACCGTGAAGAAGCA
GGCCTACCGGCAGCACAAGAACCCCAACAATGGACCACTGCTGGCAATCTCTGGCATCCTGCAC
CAGCTGAGAGTGGAGAAGGTGCCAGAGAAGACCAGCCTGTTCCGGATCAGCCTGCCCGCCGAC
ATGTTCAGCGTGAAGGAGGGCATGATGAAGAAGCGGGGCGAGAACAGCCCCGTGGTGTACTTC
CAGGCCCCCGAGAACTTCCCCCTGAACGGCTTCAACAACCGGCAGGTGGTGCTGGCCTACGCC
AACCCCACCCTGAGCGCCGTG

Matrixprotein VP40-cherry MarV Musoke

ATGGCCAGCAGCAGCAACTACAACACCTACATGCAGTACCTGAACCCTCCCCCATACGCCGACC
ACGGCGCCAACCAGCTGATCCCCGCCGACCAGCTGAGCAACCAGCAGGGCATCACCCCCAACT
ACGTGGGCGACCTGAACCTGGACGACCAGTTCAAGGGCAACGTGTGCCACGCCTTCACCCTGG
AGGCCATCATTGACATCAGCGCCTACAATGAGAGAACAGTGAAGGGAGTGCCTGCATGGCTGCC

ACTGGGCATCATGAGCAACTTCGAGTACCCCCTGGCCCACACCGTGGCCGCCCTGCTGACCGG
CAGCTACACCATCACCCAGTTCACCCACAACGGCCAGAAGTTCGTGCGGGTGAACAGACTGGGA
ACAGGCATCCCCGCACACCCACTGAGAATGCTGAGAGAGGGCAACCAGGCCTTCATCCAGAACA
TGGTGATCCCCCGGAACTTCAGCACCAACCAGTTCACCTACAACCTGACCAACCTGGTGCTGAG
CGTGCAGAAGCTGCCCGACGACGCCTGGCGGCCCAGCAAGGACAAGCTGATCGGCAACACCAT
GCACCCCGCCGTGAGCATCCACCCCAACCTGCCTCCAATCGTGCTGCCCACCGTGAAGAAGCA
GGCCTACCGGCAGCACAAGAACCCCAACAATGGACCACTGCTGGCAATCTCTGGCATCCTGCAC
CAGCTGAGAGTGGAGAAGGTGCCAGAGAAGACCAGCCTGTTCCGGATCAGCCTGCCCGCCGAC
ATGTTCAGCGTGAAGGAGGGCATGATGAAGAAGCGGGGCGAGAACAGCCCCGTGGTGTACTTC
CAGGCCCCCGAGAACTTCCCCCTGAACGGCTTCAACAACCGGCAGGTGGTGCTGGCCTACGCC
AACCCCACCCTGAGCGCCGTGATGGATGACCTAGGATCCACCGGGTTCGCCACCATGGTGAGC
AAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGG
GCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGC
ACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTG
TCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACT
TGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCG
TGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCG
CGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTC
CTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCT
GAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCA
GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACC
ATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTAC
AAGTAG

Matrixprotein VP40 EboV (NC_002549.1)

GATGAAGATTAAGAAAAACCTACCTCGGCTGAGAGAGTGTTTTTTCATTAACCTTCATCTTGTAAA
CGTTGAGCAAAATTGTTAAAAATATGAGGCGGGTTATATTGCCTACTGCTCCTCCTGAATATATGG
AGGCCATATACCCTGTCAGGTCAAATTCAACAATTGCTAGAGGTGGCAACAGCAATACAGGCTTC
CTGACACCGGAGTCAGTCAATGGGGACACTCCATCGAATCCACTCAGGCCAATTGCCGATGACA
CCATCGACCATGCCAGCCACACACCAGGCAGTGTGTCATCAGCATTCATCCTTGAAGCTATGGTG
AATGTCATATCGGGCCCCAAAGTGCTAATGAAGCAAATTCCAATTTGGCTTCCTCTAGGTGTCGC
TGATCAAAAGACCTACAGCTTTGACTCAACTACGGCCGCCATCATGCTTGCTTCATACACTATCAC
CCATTTCGGCAAGGCAACCAATCCACTTGTCAGAGTCAATCGGCTGGGTCCTGGAATCCCGGAT
CATCCCCTCAGGCTCCTGCGAATTGGAAACCAGGCTTTCCTCCAGGAGTTCGTTCTTCCGCCAGT
CCAACTACCCCAGTATTTCACCTTTGATTTGACAGCACTCAAACTGATCACCCAACCACTGCCTGC
TGCAACATGGACCGATGACACTCCAACAGGATCAAATGGAGCGTTGCGTCCAGGAATTTCATTTC
ATCCAAAACTTCGCCCCATTCTTTTACCCAACAAAAGTGGGAAGAAGGGGAACAGTGCCGATCTA
ACATCTCCGGAGAAAATCCAAGCAATAATGACTTCACTCCAGGACTTTAAGATCGTTCCAATTGAT
CCAACCAAAAATATCATGGGAATCGAAGTGCCAGAAACTCTGGTCCACAAGCTGACCGGTAAGAA
GGTGACTTCTAAAAATGGACAACCAATCATCCCTGTTCTTTTGCCAAAGTACATTGGGTTGGACCC
GGTGGCTCCAGGAGACCTCACCATGGTAATCACACAGGATTGTGACACGTGTCATTCTCCTGCAA
GTCTTCCAGCTGTGATTGAGAAGTAATTGCAATAATTGACTCAGATCCAGTTTTATAGAATCTTCT
CAGGGATAGTGATAACATCTATTTAGTAATCCGTCCATTAGAGGAGACACTTTTAATTGATCAATA
TACTAAAGGTGCTTTACACCATTGTCTTTTTTCTCTCCTAAATGTAGAACTTAACAAAAGACTCATA
ATATACTTGTTTTTAAAGGATTGATTGATGAAAGATCATAACTAATAACATTACAAATAATCCTACTA
TAATCAATACGGTGATTCAAATGTTAATCTTTCTCATTGCACATACTTTTTGCCCTTATCCTCAAATT
GCCTGCATGCTTACATCTGAGGATAGCCAGTGTGACTTGGATTGGAAATGTGGAGAAAAAATCGG
GACCCATTTCTAGGTTGTTCACAATCCAAGTACAGACATTGCCCTTCTAATTAAGAAAAAA

Kodonoptimierung (CDS)

ATGCGGCGGGTGATCCTGCCCACCGCTCCTCCAGAGTACATGGAGGCCATCTACCCCGTGCGG
AGCAACAGCACCATCGCCAGAGGTGGAAACAGCAATACAGGCTTCCTGACCCCTGAGTCTGTGA
ATGGAGACACCCCAAGCAATCCTCTGAGACCAATTGCAGATGACACCATTGACCACGCAAGCCA
CACCCCTGGCAGCGTGAGCAGCGCCTTCATCCTGGAGGCCATGGTGAACGTGATCAGCGGCCC
CAAGGTGCTGATGAAGCAGATCCCCATCTGGCTGCCCCTGGGCGTGGCCGACCAGAAGACCTA
CAGCTTCGACAGCACCACCGCCGCCATCATGCTGGCCAGCTACACCATCACCCACTTCGGCAAG
GCCACAAATCCACTGGTGCGGGTGAACAGACTGGGACCTGGCATCCCCGACCACCCACTGAGA
CTGCTGCGGATCGGCAACCAGGCCTTCCTGCAGGAGTTCGTGCTGCCTCCAGTGCAGCTGCCC

CAGTACTTCACCTTCGACCTGACCGCCCTGAAGCTGATCACCCAGCCACTGCCTGCAGCAACCT
GGACAGATGACACCCCAACAGGCAGCAATGGCGCCCTGAGACCAGGCATCAGCTTCCACCCCA
AGCTGCGGCCCATCCTGCTGCCCAACAAGAGCGGCAAGAAGGGCAACAGCGCCGACCTGACCA
GCCCCGAGAAGATCCAGGCCATCATGACCAGCCTGCAGGACTTCAAGATCGTGCCCATCGACCC
CACCAAGAACATCATGGGCATCGAGGTGCCCGAGACCCTGGTGCACAAGCTGACCGGCAAGAA
GGTGACCAGCAAGAATGGACAGCCAATTATTCCCGTGCTGCTGCCAAAGTACATTGGACTGGAC
CCCGTGGCACCTGGAGACCTGACCATGGTGATCACCCAGGACTGTGACACCTGCCACAGCCCA
GCCAGCCTGCCCGCCGTGATCGAGAAG

Matrixprotein VP40-cherry EboV

ATGCGGCGGGTGATCCTGCCCACCGCTCCTCCAGAGTACATGGAGGCCATCTACCCCGTGCGG
AGCAACAGCACCATCGCCAGAGGTGGAAACAGCAATACAGGCTTCCTGACCCCTGAGTCTGTGA
ATGGAGACACCCCAAGCAATCCTCTGAGACCAATTGCAGATGACACCATTGACCACGCAAGCCA
CACCCCTGGCAGCGTGAGCAGCGCCTTCATCCTGGAGGCCATGGTGAACGTGATCAGCGGCCC
CAAGGTGCTGATGAAGCAGATCCCCATCTGGCTGCCCCTGGGCGTGGCCGACCAGAAGACCTA
CAGCTTCGACAGCACCACCGCCGCCATCATGCTGGCCAGCTACACCATCACCCACTTCGGCAAG
GCCACAAATCCACTGGTGCGGGTGAACAGACTGGGACCTGGCATCCCCGACCACCCACTGAGA
CTGCTGCGGATCGGCAACCAGGCCTTCCTGCAGGAGTTCGTGCTGCCTCCAGTGCAGCTGCCC
CAGTACTTCACCTTCGACCTGACCGCCCTGAAGCTGATCACCCAGCCACTGCCTGCAGCAACCT
GGACAGATGACACCCCAACAGGCAGCAATGGCGCCCTGAGACCAGGCATCAGCTTCCACCCCA
AGCTGCGGCCCATCCTGCTGCCCAACAAGAGCGGCAAGAAGGGCAACAGCGCCGACCTGACCA
GCCCCGAGAAGATCCAGGCCATCATGACCAGCCTGCAGGACTTCAAGATCGTGCCCATCGACCC
CACCAAGAACATCATGGGCATCGAGGTGCCCGAGACCCTGGTGCACAAGCTGACCGGCAAGAA
GGTGACCAGCAAGAATGGACAGCCAATTATTCCCGTGCTGCTGCCAAAGTACATTGGACTGGAC
CCCGTGGCACCTGGAGACCTGACCATGGTGATCACCCAGGACTGTGACACCTGCCACAGCCCA
GCCAGCCTGCCCGCCGTGATCGAGAAGATGGATGACCTAGGATCCcACCgGGTCGCCACCATGG
TGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACAT
GGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACG
AGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACA
TCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGA
CTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGC
GGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAG
CTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAG
GCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTG
AAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCC
GTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACT
ACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGC
TGTACAAGTAG

B. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle den Menschen meinen Dank aussprechen, die durch wohlwollende Unterstützung eine Anfertigung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben. Von den vielen Menschen, die mir in der Zeit meiner Promotion Mut zugesprochen und mich inspiriert haben, kann ich an dieser Stelle leider nur wenige nennen.

Zu Beginn gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. R. Kurth für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion am Robert Koch-Institut und Prof. Dr. R. Mutzel für die Betreuung der Arbeit als Gutachter der Freien Universität Berlin.

Mein Dank gilt auch Dr. O. Hohn für die Betreuung im Fachgebiet 18, der mir allzeit durch seine fachliche Unterstützung bei der Laborarbeit zur Seite stand und mir eine schnelle Eingewöhnung in die Abteilung ermöglichte. Darüber hinaus danke ich PD. Dr. N. Bannert für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit im FG18, unter seiner Leitung, und die Akquise der finanziellen Mittel, durch die Beteiligung am BiGRUDI- Projekt. Vielen Dank Dr. T. Schreiber, Dr. B. Dorner und den Mitarbeitern aus ZBS3, die durch den Wissenstransfer und die Bereitstellung von Mitteln und Infrastruktur eine schnelle und unkomplizierte Einarbeitung in das Themengebiet der Antikörpergenerierung ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. R. Schade für die herausragende Unterstützung im Zuge der durchgeführten Kooperation und die stets freundliche und wohlwollenden Hilfe bei den Tierstudien an der Charité Berlin.

Zusätzlich gilt mein Dank den ehemaligen Kollegen aus ZBS4 und Dr. K. Madela für die Einweisung in die fortschrittlichen bildgebenden Verfahren und die Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Kollegen aus dem Fachgebiet 18, die mir durch das freundliche Arbeitsklima und den regen Austausch im Labor die Zeit meiner Promotion besonders angenehm gestaltet haben und mir stets zur Seite standen.

Vielen Dank an meine Familie, die mir das Studium ermöglicht, mich in meinem Streben nach einer wissenschaftlichen Karriere maßgeblich unterstützt haben und meine Partnerin A. Müller, die mir in dieser Zeit eine große fachliche und auch emotionale Stütze war.

C. Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am
Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 15. April 2008 bis zum 31. Dezember 2011 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 07.03.2012 .....

Lars Niederstadt