

Neutralisation des porzinen endogenen Retrovirus (PERV) durch Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein p15E

Induktion von NHR- und MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper und deren
Charakterisierung im Kontext HIV-1 neutralisierender Antikörper

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexander Wächter

aus

Pößneck/Thüringen

Berlin, 2013

Die Arbeit wurde am „Zentrum für HIV und Retroviren“ (FG18) innerhalb des Robert Koch-Instituts vom 1. September 2009 bis 31. Januar 2013 erstellt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 17.12.2013

Zusammenfassung/Abstract

Die Xenotransplantation von porcinem Gewebe stellt eine Möglichkeit der Organtransplantation dar, die es ermöglichen soll, Menschen mit Organschäden zu retten bzw. deren Lebensbedingungen dauerhaft zu verbessern.

Neben dem Risiko einer Infektion mit Bakterien, Pilzen oder anderen Parasiten stellt die Übertragung von porcinen endogenen Retroviren (PERV) ein weiteres potentiell Risiko dar. Trotz der Möglichkeit, dass PERV in der Lage ist, *in vitro* humane Zellen zu infizieren, konnte bis heute in keiner klinischen Xenotransplantation mit porcinem Gewebe eine Übertragung von PERV festgestellt werden.

Um dennoch die Möglichkeit einer Xenozoonose durch eine Übertragung mit PERV auszuschließen, wird in verschiedenen Richtungen geforscht. Darunter befindet sich auch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern, um einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen.

Erneut konnten in dieser Arbeit neutralisierende Antikörper gegen das Transmembran-(TM-)protein p15E von PERV induziert werden. Eine Affinitätschromatographische Aufreinigung zeigt erstmalig, dass nur die Antikörper neutralisieren, die gegen die membran-proximal region (MPER) gerichtet sind (Epitop: ₅₈₉GWFE₅₉₉GWFN₅₉₉RSP₅₉₉). Bindende Antikörper im N-terminalen Bereich (N-terminal heptad repeats, NHR) zeigten keine neutralisierende Wirkung gegenüber dem Virus.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass für die Induktion dieser MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper die komplette Ektodomäne von p15E notwendig ist. Immunisierungen mit der C-terminalen Domäne des p15E oder auch mit einem längeren MPER-Peptid konnten keine neutralisierenden Antikörper induzieren. Im Gegensatz dazu wurden erstmalig neutralisierende Antikörper gegen die NHR-Domäne nach der Immunisierung mit einem N-terminalen Fragment von p15E gezeigt.

Durch Einbeziehung der Epitop-Kartierungen aller Immunisierungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, binden diese erstmalig beschriebenen NHR-spezifischen Neutralisationsantikörper an das Epitop ₅₀₆IVTEDLQALEKS₅₁₇.

Im Vergleich zu anderen Gammaretroviren (z.B. FeLV) und auch dem Lentivirus HIV-1 zeigte sich, dass die hier beschriebenen MPER- und NHR-spezifischen Neutralisationsantikörper ebenfalls bei anderen Retroviren zu finden sind.

Da die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 bisher nur bedingt gezeigt und in dieser Arbeit gleich mehrere gegen PERV beschrieben werden konnten, wurde ein Vergleich zwischen den transmembranen Hüllproteinen von PERV und HIV-1 durchgeführt.

Darin wurden grundlegende Unterschiede in der Glykosylierung, der Länge der TM-Proteine sowie der Einfluss der Membranlipide auf die Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern festgestellt. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in wichtigen Strukturelementen wurden durch einen datenbasierenden Vergleich ergänzt.

Allerdings zeigte sich bei diesen Vergleichen, dass beide TM-Proteine trotz Ähnlichkeiten an bindenden und neutralisierenden Antikörpern strukturell unterschiedlich aufgebaut sind.

Neben der Induktion und Charakterisierung von Antikörpern, fand eine Charakterisierung von FPPR- und MPER-abgeleiteten Peptiden statt. Diese zeigte erstmalig, dass bestimmte Peptide durch Bindung am Virus eine PERV-Infektion von humanen Zellen beeinflussen.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit verschiedene PERV-neutralisierenden Antikörper induziert, aufgereinigt und charakterisiert werden. Der Vergleich zu HIV-1 neutralisierenden Antikörpern zeigt trotz ähnlicher Lokalisation derer Epitope auf ihren TM-Proteinen grundlegende strukturelle Unterschiede, so dass weitere Versuche zeigen müssen, ob die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse bei PERV auch für eine Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 dienlich sein können.

Abstract

Xenotransplantation could possibly help overcome the shortage of allografts needed for transplantation into patients suffering from organ failure. However, in addition to the risk of infection by bacteria, fungi or other pathogens, the transmission of porcine endogenous retroviruses (PERV) is of potential concern.

Despite infection of human cell lines *in vitro*, none of the clinical xenotransplantations using porcine tissue has so far resulted in demonstrable transmission of PERV. However, various strategies to avoid a possible PERV zoonoses have been developed, one of which is the generation of an effective vaccine able to induce neutralising antibodies.

Again neutralising antibodies against the p15E transmembrane (TM) protein of PERV could be induced. Here, for the first time, an affinity chromatography showed that only antibodies specific for the MPER (₅₈₉GWFE₅₉₉) were shown to have neutralising activity. Furthermore, the data generated in another section of this work suggest that the entire ectodomain is important for the generation of neutralising antibodies specific for the MPER of PERV p15E. Immunisation with a C-terminal region of p15E or a longer MPER peptide failed to elicit neutralising antibodies.

In contrary and for the first time, neutralising antibodies recognising the NHR of the PERV p15E TM protein were induced by immunising with the N-terminal subunit of p15E. Epitope mapping revealed a novel epitope in the NHR of PERV p15E (₅₀₆IVTEDLQALEKS₅₁₇).

Corresponding neutralising antibody epitopes located in the NHR and the MPER had been described for other gammaretroviruses such as FeLV or the lentivirus HIV-1. Since the successful induction of strong neutralising antibody responses against the NHR or MPER of HIV-1 gp41 have not been described but in this work the corresponding antibodies specific for PERV were very easily generated, a comparison between the TM proteins was carried out. Although neutralising antibodies targeting the same region of the TM proteins gp41 and p15E were found, differences in glycosylation, protein length and the influence of lipids were found. In addition, a database comparison of the structures of PERV p15E and HIV-1 gp41 revealed additional dissimilarities that suggest profound differences during infection and therefore presentation in possible epitopes for antibody induction.

In addition to the separation and characterisation of the purified antibodies for the first time peptides influencing a PERV infection were described.

Overall several antibodies neutralising PERV could be induced, purified and characterised. Further experiments are needed to determine whether the induction of antibodies against PERV, as described here, will help with the induction of neutralising antibodies against

HIV-1. The existence of neutralising antibodies binding to the NHR and MPER of the TM proteins of PERV and HIV-1 demonstrate that these regions may indeed be important targets for the neutralisation of various retroviruses.

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Abstract

I. Inhaltsverzeichnis	i
II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	v
III. Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Immunsystem	- 1 -
1.2 Impfstoffe.....	- 1 -
1.3 Induktion von Antikörper und deren Aufreinigung.....	- 3 -
1.4 Retroviren.....	- 5 -
1.4.1 Einführung.....	- 5 -
1.4.2 Aufbau der retroviralen Partikel.....	- 7 -
1.4.3 Genomorganisation	- 8 -
1.4.4 Replikationszyklus.....	- 9 -
1.5 Das porcine endogene Retrovirus (PERV)	- 12 -
1.5.1 Aufbau und Genetik von PERV	- 13 -
1.5.2 Vorkommen und Infektion mit dem Virus	- 14 -
1.5.3 Antikörper gegen PERV	- 16 -
1.6 Transplantation.....	- 18 -
1.6.1 Alternativen zur Allotransplantation	- 18 -
1.6.2 Xenotransplantation.....	- 19 -
1.7 Das humane Immundefizienz-Virus	- 23 -
1.7.1 Genetik und Morphologie von HIV	- 23 -
1.7.2 Übertragung und Krankheitsverlauf	- 23 -
1.7.3 Antikörper und Impfstoffe gegen HIV	- 24 -
1.8 Vergleich zwischen PERV und HIV-1.....	- 26 -
2. Zielsetzung	- 29 -
3. Material	- 30 -
3.1 Reagenzien und Chemikalien	- 30 -
3.2 Lösungen und Puffer	- 31 -
3.3 Enzyme.....	- 32 -
3.4 Zellkulturmedien	- 32 -

3.5	Sepharosen/gekoppelte Beads	- 33 -
3.6	Kits	- 33 -
3.7	Antikörper	- 33 -
3.8	Filter und Membranen.....	- 34 -
3.9	Vektoren, Bakterienstämme und Zelllinien.....	- 34 -
3.10	Primer und Sonden	- 35 -
3.11	Peptide und Peptid-Microarrays.....	- 36 -
3.12	Versuchstiere	- 36 -
3.13	Geräte und Software.....	- 37 -
3.14	Marker	- 37 -
4.	Methoden	- 38 -
4.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	- 38 -
4.1.1	Isolation von Nukleinsäuren.....	- 38 -
4.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	- 39 -
4.2	Protein-Techniken	- 44 -
4.2.1	Protein-Expression in E. coli und Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen	- 44 -
4.2.2	Isolierung von Immunglobulinen G	- 45 -
4.2.3	Aufreinigung von spezifischen Antikörpern	- 45 -
4.2.4	Aufkonzentration von Proteinlösungen.....	- 46 -
4.2.5	Dialyse.....	- 46 -
4.2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	- 47 -
4.2.7	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	- 47 -
4.2.8	Gelfiltration	- 48 -
4.3	Zellbiologische Arbeiten	- 49 -
4.3.1	Kultivieren von 293T-Zellen.....	- 49 -
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	- 49 -
4.3.3	Herstellung neuer Virus-Stocks.....	- 50 -
4.3.4	Immunpräzipitation	- 50 -
4.3.5	Erzeugung kompetenter Bakterien.....	- 50 -
4.4	Immunologische Techniken	- 51 -
4.4.1	ELISA.....	- 51 -
4.4.2	Western Blot.....	- 52 -
4.4.3	Epitop-Kartierung	- 53 -
4.4.4	Neutralisationsassay	- 53 -
4.4.5	Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse	- 54 -

4.5	Gewinnung von Immunsereen	- 55 -
5.	Ergebnisse.....	- 57 -
5.1	Induktion und Charakterisierung von p15E-spezifischen Antikörpern.....	- 57 -
5.1.1	Charakterisierung der rekombinanten Proteine.....	- 58 -
5.1.2	Charakterisierung von p15E-spezifischen Antikörpern	- 59 -
5.1.3	Interaktion zwischen PERV und p15E-spezifischen Antikörper	- 62 -
5.1.4	Isolation von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern	- 62 -
5.1.5	Hemmung von PERV durch MPER-spezifische Antikörper.....	- 64 -
5.1.6	Vergleich zwischen den Immunsereen nach der Immunisierung mit p15E(aa478-602) und p15E(aa488-596)	- 66 -
5.2	Induktion von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern.....	- 68 -
5.2.1	Charakterisierung der Antigene.....	- 68 -
5.2.2	Charakterisierung der Immunsereen.....	- 69 -
5.2.3	Isolierung von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern	- 71 -
5.2.4	Epitop-Kartierung von Kaninchen-Sereen.....	- 73 -
5.3	Immunisierung mit p15E(C549A).....	- 74 -
5.3.1	Hemmung der Neutralisation durch rekombinante Proteine.....	- 77 -
5.4	Einfluss von p15E-abgeleiteten Peptiden auf die PERV-Infektion.....	- 79 -
5.5	Induktion von FPPR- und MPER-spezifischen Antikörpern	- 82 -
5.6	Interaktion zwischen den PERV-Peptiden.....	- 83 -
6.	Diskussion	- 85 -
6.1	Neutralisierende Antikörpern gegen PERV	- 86 -
6.1.1	Neutralisation durch MPER-spezifische Antikörper	- 88 -
6.1.2	Beteiligung von NHR-spezifische Antikörper an der PERV-Neutralisation	- 89 -
6.2	Vergleich von neutralisierenden Antikörpern zwischen PERV und HIV-1	- 94 -
6.2.1	Homologie zwischen MPER-spezifischen Antikörpern bei PERV und HIV-1	- 94 -
6.2.2	NHR-spezifische Neutralisationsantikörper gegen HIV-1	- 97 -
6.3	Einfluss der NHR auf die Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern gegen PERV und HIV-1.....	- 99 -
6.4	Charakterisierung der p15E-abgeleiteten Peptide.....	- 101 -
6.4.1	Induktion von Peptid-Antikörpern.....	- 104 -
6.5	Fazit.....	- 106 -

7. Anhang	- 107 -
7.1 Neutralisation mit MPER-spezifischen Antikörpern von HIV-1 gegen PERV	- 107 -
7.2 Charakterisierung von PERV-infizierten Zellen und deren zellfreier Überstand	- 107 -
7.3 Zusammenhang zwischen ct-Wert und Kopienzahl.....	- 110 -
7.4 Datenbasierender Vergleich des TM-Proteins p15E und gp41 von PERV-A und HIV-1 ...	- 112 -
IV. Danksagung	x
V. Eigene Veröffentlichungen	xi
VI. Eidesstattliche Erklärung	xii
VII. Literaturverzeichnis	xiii

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.01. Immunmechanismen gegen virale Erreger	- 2 -
Abbildung 1.02. Schematische Darstellung eines einfachen retroviralen Partikels	- 7 -
Abbildung 1.03. Virales Genom eines einfachen und komplexen Retrovirus sowie deren Proteinexpression	- 8 -
Abbildung 1.04. Replikationszyklus eines Retrovirus.....	- 10 -
Abbildung 1.05. Ausbildung eines six-helix-bundle am Beispiel des transmembranen Hüllproteins gp41 während der HIV-Infektion von CD4+-Zellen.....	- 11 -
Abbildung 1.06. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV-Partikeln	- 14 -
Abbildung 1.07. Genomische Struktur von zwei PERV-Klonen.....	- 15 -
Abbildung 1.08. Übersicht der induzierten Antikörper nach Immunisierungen mit rekombinanten p15E	- 17 -
Abbildung 1.09. Proteinsequenzvergleich zwischen gp41 (HIV-1) und p15E (PERV-A/C)	- 27 -
Abbildung 3.01. Vektorkarte des verwendeten Vektors pGEX-KG	- 36 -
Abbildung 5.01. Übersicht der exprimierten rekombinanten Proteine.....	- 58 -
Abbildung 5.02. Darstellung von p15E(aa478-602)	- 59 -
Abbildung 5.03. Epitop-Kartierung nach Immunisierung mit p15E(aa478-602)	- 60 -
Abbildung 5.04. Western Blot-Analyse des Ziegenserums 350.....	- 61 -
Abbildung 5.05. Verlauf der Titer gegen das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid.....	- 61 -
Abbildung 5.06. Titerbestimmung der p15E-spezifischen Antikörper	- 62 -
Abbildung 5.07. Neutralisationsassay der p15E-spezifischen Antikörper	- 62 -
Abbildung 5.08. Versuchsabbau der Affinitätschromatographie sowie Darstellung der Ergebnisse der ELISA-Experimente.....	- 64 -
Abbildung 5.09. Epitop-Kartierung der Fraktionen nach Affinitätschromatographie	- 65 -
Abbildung 5.10. Neutralisierungsaktivität von isolierten Antikörpern bzw. Durchlaufaktionen	- 66 -
Abbildung 5.11. Gelfiltration der rekombinanten Proteine p15E(aa478-602) und CBP- p15E(aa488-596)	- 67 -
Abbildung 5.12. Vergleich der Epitop-Kartierungen der Ziegen-Seren 346, 355 und 350.....	- 67 -
Abbildung 5.13. Charakterisierung der Bindungs- und Neutralisierungsaktivität von verschiedenen Ziegenseren.....	- 68 -
Abbildung 5.14. Immunpräzipitation von PERV durch Protein G	- 63 -
Abbildung 5.15. Charakterisierung der rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR und GST- CHR/MPER4K.....	- 70 -
Abbildung 5.16. Gelfiltration der rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR, GST-CHR/MPER4K.....	

.....	- 70 -
Abbildung 5.17. Bindungseigenschaften der Immunsereen	- 71 -
Abbildung 5.18. Titration des Ziegenserums 369	- 71 -
Abbildung 5.19. Neutralisationsassay nach GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K- Immunisierung	- 72 -
Abbildung 5.20. Titration der aufgereinigten Antikörper nach Affinitätschromatographie des Immunserums der Ziege 369.....	- 73 -
Abbildung 5.21. Neutralisierungsaktivität von isolierten Antikörpern des Immunserums der Ziege 369	- 73 -
.....	- 73 -
Abbildung 5.22. Epitop-Kartierung der Kaninchen-Seren.....	- 74 -
Abbildung 5.23. Darstellung des rekombinanten Proteins p15E(C549A)	- 76 -
Abbildung 5.24. Bindungs- und Neutralisierungseigenschaften des Immunserums der Ziege 3429	- 76 -
Abbildung 5.25. Epitop-Kartierung des Ziegenserum 3429 nach p15E(C549A)-Immunisierung.....	- 77 -
Abbildung 5.26. Bindungs- und Neutralisierungseigenschaften der aufgereinigten Antikörper des Ziegenserums 3429.....	- 78 -
Abbildung 5.27. Hemmung der PERV-Infektion durch rekombinante Proteine	- 79 -
Abbildung 5.28. Einfluss von synthetischen Peptiden auf die PERV-Infektion	- 81 -
Abbildung 5.29. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Peptid-Inkubation	- 81 -
Abbildung 5.30. Titration der Immunsereen nach Peptid-Immunisierung.....	- 83 -
Abbildung 5.31. Neutralisationsassay mit isolierten Immunglobuline nach Peptidimmunisierung	- 84 -
Abbildung 5.32. Interaktionsstudien zwischen NHR- und CHR-Peptiden	- 85 -
Abbildung 6.01. Darstellung von möglichen hydrophoben Taschen	- 93 -
Abbildung 6.02. Interaktion zwischen NHR und CHR bei gp41 von HIV-1.....	- 101 -
Abbildung 7.01. Neutralisationsversuch von HIV-1-neutralisierenden Antikörpern gegen PERV	- 107 -
Abbildung 7.02. PCR-Analyse nach Primärinfektion von nicht-infizierten 293T-Zellen	- 108 -
Abbildung 7.03. (RT-)PCR-Analyse nach PERV-Infektion von nicht-infizierten 293T-Zellen	- 108 -
Abbildung 7.04. Western Blot-Analyse des Zell-Lysats	- 109 -
Abbildung 7.05. RT-PCR der isolierten RNA aus dem Zellüberstand.....	- 109 -
Abbildung 7.06. SDS-PAGE und Western Blot Analyse des aufkonzentrierten zellfreien Virusüberstands.....	- 109 -
Abbildung 7.06. Vergleich der Hydrophobizität der TM-Proteine gp41 und p15E	- 113 -

Abbildung 7.07. Vergleich der Flexibilität der TM-Proteine gp41 und p15E	- 114 -
Abbildung 7.08. Vergleich der Alpha-Helices der TM-Proteine gp41 und p15E.....	- 114 -
Abbildung 7.09. Darstellung von möglichen Antikörper-Epitopen	- 115 -
Tabelle 1.01. Klassifikation der Familie der Retroviren.....	- 6 -
Tabelle 1.02. Vorteile der Xenotransplantation.....	- 21 -
Tabelle 1.03. Vergleich zwischen dem Transmembranprotein p15E (PERV) und gp41 (HIV-1)	- 29 -
Tabelle 4.01. Übersicht der Kits für die RNA und DNA Isolierung.....	- 39 -
Tabelle 4.02. Pipettier- und Reaktionsschema für das gerichtete Klonieren.	- 40 -
Tabelle 4.03. Pipettier- und Reaktionsschema der durchgeführten Restriktionsanalyse.....	- 40 -
Tabelle 4.04. Pipettierschema für eine Ligation	- 41 -
Tabelle 4.05. PCR-Programm für die Kolonie-PCR.....	- 42 -
Tabelle 4.06. PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR.....	- 42 -
Tabelle 4.07. Pipettierschema und PCR-Programm für die real-time PCR.....	- 43 -
Tabelle 4.08. Pipettierschema und PCR-Programm für die RT-PCR	- 44 -
Tabelle 4.09. Pipettierschema und PCR-Programm für die Punktmutation	- 44 -
Tabelle 4.10. Übersicht der expremierten und aufgereinigten Proteine.....	- 45 -
Tabelle 4.11. Aufreinigungsschema der rekombinanten Proteine.....	- 46 -
Tabelle 4.12. Aufreinigungsschema mit gekoppelter CNBr-Sepharose	- 47 -
Tabelle 4.13. Extinktionskoeffizienten der vermessenen Proteine	- 48 -
Tabelle 4.14. Zusammensetzung des Trenngels	- 49 -
Tabelle 4.15. Zusammensetzung des Sammelgels	- 49 -
Tabelle 4.16. ELISA-Arbeitsschritte	- 53 -
Tabelle 4.17. Arbeitsschritte bei der Fluoreszenzfärbung	- 56 -
Tabelle 4.18. Immunisierte Spezies zwecks Antikörper-Induktion.....	- 56 -
Tabelle 4.19. Übersicht der Immunisierungen.....	- 57 -
Tabelle 5.01. Übersicht der rekombinanten Proteine	- 58 -
Tabelle 5.02. Induktionsbedingungen der rekombinanten Proteine.....	- 59 -
Tabelle 5.03. Zusammenfassung der Bindungs- und Neutralisationseigenschaften der einzelnen Fraktionen	- 69 -
Tabelle 5.04. Zusammenfassung der Ergebnisse nach den Immunisierungen mit N- und C- terminalen Proteinen.....	- 75 -
Tabelle 5.05. Zusammenfassung der Ergebnisse nach der Immunisierung mit der p15E-Mutante..	- 79 -

Tabelle 5.06. Übersicht der verwendenden PERV-Peptide	- 80 -
Tabelle 5.07. Histogramm-Statistiken der FACS-Analyse	- 82 -
Tabelle 5.08. Zusammenfassung der Ergebnisse nach Peptid-Immunsierung.....	- 84 -
Tabelle 6.01. Die Transmembran-Proteine einzelner Retroviren im Vergleich.....	- 96 -
Tabelle 6.02. Übersicht der induzierten Antikörper und deren neutralisierende Aktivität....	- 106 -
Tabelle 7.01. Ergebnis der Berechnung der Kopienanzahl	- 110 -
Tabelle 7.02. Verwendete Sequenzen für den datenbasierenden Vergleich.....	- 112 -
Tabelle 7.03. Vergleich der Sekundär-Strukturelemente bei p15E und gp41 und weiteren TM-Proteinen von Retroviren.....	- 113 -

III. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
6-HB	<i>six-helix-bundle</i>
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> ; Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCVI	<i>antibody-dependent cell-mediated viral inhibition</i> ; Antikörper-abhängige zelluläre Virus-Inhibition
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> ; erworbenes Immundefektsyndrom
APC	Antigen-presenting cell; Antigenpräsentierende Zelle
CBP	Calmodulin-bindendes Proteins
CHR	C-terminal heptad repeat
CNBr	Bromcyan
CTL	Cytotoxische T-Zelle
ct-Wert	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Env	<i>Envelope</i> ; Oberfläche
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FeLV	Feline Leukämievirus
FPPR	<i>fusion peptide proximal region</i>
Gag	<i>group-specific antigen</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HAR	hyperakute vaskuläre Abstoßungsreaktion
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HuPAR-1/2	humaner PERV-A Rezeptor
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoRV	Koala Retrovirus
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MPER	<i>membrane proximal region</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NHR	<i>N-terminal heptad repeat</i>
nm	Nanometer
NT-Assay	Neutralisationsassay
NTP	Nukleosidtriphosphat

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERV	Porzines endogene Retrovirus
PRR	prolinreiche Region
rand.	randomerisiert
RBD	Rezeptor-bindende Domäne
RBP	Rezeptor-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SPF	Spezifiziert pathogen frei
SU	<i>surface unit</i> ; externes Glykoprotein
TM	Transmembran
tRNA	transfer-RNA
ü. N.	über Nacht
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Immunsystem

Dem menschlichen Organismus stehen für die Bekämpfung von Infektionen mehrere Schutzmechanismen zur Verfügung. Die angeborene Immunität dient der primären Abwehr. Bestandteile der angeborenen Immunität sind u.a. Schleimhäute, die Haut sowie das Komplementsystem und bakterizide Proteine, welche jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und auch keinen gezielten Schutz gegen erneute Infektionen entwickeln. Die adaptive Immunantwort hingegen zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Bei dieser spezifischen Immunantwort werden Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen und regen B- Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern an oder aktivieren cytotoxische T-Zellen (CTL), die durch die Freisetzung bestimmter Proteine die Apoptose von infizierten oder krankhaft veränderten Zellen einleiten. Durch die Bildung von Gedächtniszellen schützt die adaptive Immunantwort auch vor Infektionen mit demselben Erreger zu einem späteren Zeitpunkt (zusammengefasst und gekürzt nach (Janeway, 2002)).

1.2 Impfstoffe

Die Entdeckung von Impfstoffen stellt eine der größten Erfolge in der Medizingeschichte dar (Koff *et al.*, 2013). Einige Krankheitserreger konnten seither ganz (z.B. die Pocken) oder fast (z.B. die Kinderlähmung) ausgerottet werden. Hinzu kommt der Schutz von Millionen von Menschen vor infektiösen Erkrankungen jedes Jahr. Damit stellt die (Schutz-)Impfung die erfolgreichste Manipulation des Immunsystems dar, bei der man sich die Eigenschaften des adaptiven Immunsystems zu Nutze macht.

Für eine erfolgreiche Immunisierung gegen z.B. virale Erreger können durch eine der vier Haupt-Impfstoffgruppen neutralisierende Antikörper induziert werden: i) attenuierte Viren, ii) inaktivierte Viren, iii) Protein- und Peptidstrukturen von Viren und iv) Vektoren, welche Virusgene kodieren.

Abgeschwächte Viren werden heute z.B. in der Kombinationsimpfung Maser-Mumps-Röteln eingesetzt, die einen 99%-igen Schutz vor diesen Krankheiten bietet (Atkinson, 2012).

Inaktivierte Viruspartikel werden gegen Influenza und Kinderlähmung geimpft. Bei der Hepatitis B-Schutzimpfung wird das rekombinante Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus eingesetzt, das die Produktion von neutralisierenden Antikörpern induziert. In Form einer Vektorenimpfung (DNA-Impfung) wurden bislang Impfstoffe gegen das Hühnerpockenvirus (*Fowlpox virus*, FPV) sowie die Viren der infektiösen Laryngotracheitis und der atypischen Geflügelpest (*Newcastle disease*) in Tierversuchen erprobt (Fuchs *et al.*, 2006). Am Menschen muss diese Methode allerdings noch getestet werden.

Auch wenn die Möglichkeit einer Immunisierung recht einfach ist, gibt es zahlreiche Erkrankungen gegen die es keinen Impfstoff gibt. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um Viren, Bakterien und Parasiten, die sich durch eine komplexe Pathogenese, umfassende Variabilität oder auch Abwehrmechanismen gegen das humane Immunsystem auszeichnen.

Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern stellt aber nur eine Möglichkeit der Immunantwort dar, um virale Erreger zu erkennen und zu eliminieren (humorale Immunantwort). Ist allerdings eine Zelle bereits infiziert, schaffen es neutralisierende Antikörper nicht, gegen den Erreger vorzugehen. Aus diesem Grund gibt es die zelluläre Immunantwort, die es durch Natürliche Killerzellen und aktivierte CD8-T-Zellen schafft, infizierte Zellen zu erkennen und zu töten. In Abbildung 1.01. sind zur Übersicht die unterschiedlichen Immunantworten gegen virale Erreger dargestellt.

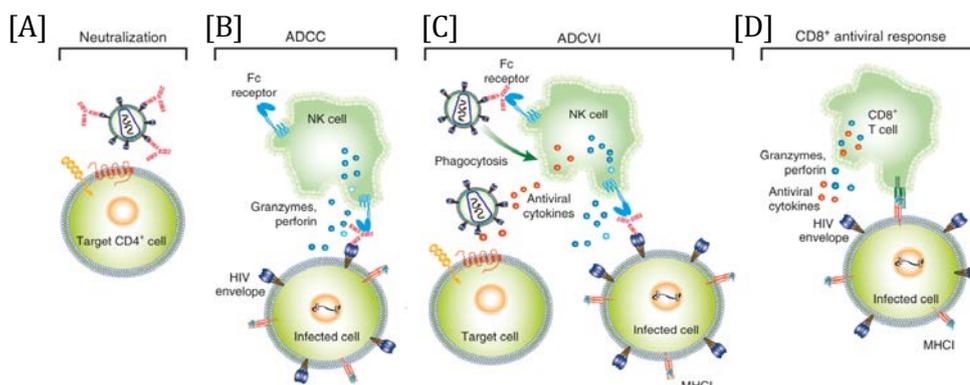


Abbildung 1.01. Immunmechanismen gegen virale Erreger. [A] Neutralisierende Antikörper binden direkt an der Oberfläche des Virus und verhindern eine Infektion. [B] Antikörper erkennen infizierte Zellen und aktivieren Natürliche Killerzellen, die mithilfe von Perforin und Granzymen die infizierte Zellen zerstören (Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität, ADCC). [C] Die Antikörper-abhängige zelluläre Virus-Inhibition (*Antibody-dependent cellular virus inhibition*, ADCVI) besteht aus ADCC und der direkten Bindung von Antikörpern an der Virusoberfläche. [D] Die CD8-Zellantwort erfolgt über die Präsentation von viralen Peptiden im Histokompatibilitätskomplex I (*histocompatibility complex class I*, MHC-1) auf der Oberfläche von infizierten Zellen. Die aktivierten CD8-T-Zellen produzieren ebenfalls Perforine und Granzyme. (Overbaugh & Morris, 2012; Saunders *et al.*, 2012)

1.3 Induktion von Antikörper und deren Aufreinigung

Immunisierungen mit größeren Peptiden oder auch Proteinen führen in der Regel zu der Induktion von Antikörper. Durch die Präsentation immunogener Regionen werden naive B-Zellen in der humoralen Immunantwort angeregt, Antikörper und Gedächtniszellen zu bilden.

Bei Immunisierungen gegen Krankheitserreger wie Bakterien und Viren stellt sich die Frage, wie ein Immunisierungsantigen beschaffen sein muss, um gezielt neutralisierende Antikörper gegen diesen Erreger zu induzieren. Zur Beantwortung dieser Frage werden Richtlinien über Eigenschaften der Antigene ausgewiesen, die sich als wichtig herausgestellt haben. Die Firma Millipore macht z.B. auf ihrer Internetseite Angaben zur Größe des Antigens (mind. 8 – 10 kDa), der Struktur des Antigens (*signifikante stretches* mit keinen wiederholenden Domänen) und der Wichtigkeit von immunogenen Regionen, um erfolgreich Antikörper zu induzieren (Millipore, 2013). Immunogene Regionen können u.a. hoch-konservierte Regionen, aktive Zentren, extra- oder intrazelluläre Domänen oder Regionen mit posttranslationalen Modifikationen sein (Backstrom & Sanders-Bush, 1997). An anderer Stelle werden bestimmte Aminosäuren für die Antigenizität eines Proteins verantwortlich gemacht (Ibrahimi *et al.*, 1980).

Für eine Immunisierung mit Peptiden werden auf wiederum andere, zum Teil zu einer Protein-Immunisierung entgegengesetzte, Richtlinien verwiesen (Abcam, 2013).

Da die Transmembran- und Oberflächenhüllproteine bei vielen (Retro-)viren die einzigen Proteine sind, die auf der Oberfläche präsentiert werden, stellen diese eine geeignete Zielstruktur für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern dar.

Um diese Proteine dem Immunsystem korrekt präsentieren zu können, sollte die Sekundär- und Tertiärstruktur nach rekombinanter Herstellung annähernd die des nativen Proteins entsprechen (Pellequer & Westhof, 1993; Rubinstein *et al.*, 2008), um Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte sowie hydrophobe Interaktionen zwischen der naiven B-Zelle und dem Antigen zu ermöglichen.

Neben der Induktion von neutralisierenden Antikörpern sollen durch Immunisierungen Gedächtniszellen gebildet werden, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen rasch neue Antikörper bilden. Die Aktivierung zu solchen Gedächtniszellen und auch antikörperproduzierenden Zellen erfordert neben der Erkennung von viralen oder bakteriellen Strukturen durch antigenspezifische B- und T-Zell-Rezeptoren einen bestimmten inflammatorischen Kontext. Dieser zeichnet sich durch die anatomische Umgebung (Lymphknoten, Keimzentrum), zusätzliche Cytokinsignale und/oder im Rahmen

von Zell-Zell- Kontakten vermittelte Ligand-Rezeptor-Interaktionen aus (Ehl, 2006). Um bei Totimpfstoffen wie Virus-/Bakterienproteinen eine Immunreaktion hervorzurufen, müssen Adjuvanzen im Impfstoff enthalten sein, um eine lokale Entzündungsreaktion hervorzurufen (Alving *et al.*, 2012). Ein Adjuvanz-Molekül sollte entsprechend stabil sein und den größtmöglichen immunologischen Effekt ausüben. Die Wirkung einer Adjuvanz ist aber auch abhängig von der Art des Antigens, der gewünschten Immunantwort und der Wahl des Immunisierungsweges. Ein Problem kann entstehen, wenn ein optimiertes Adjuvanz-System aus dem Tiermodell für einen humanen Impfstoff verwendet werden soll, da dieses im Hinblick der Sicherheit, des Effektes und der Effizienz unterschiedlich sein kann (Alving, 2002).

Für die Aufreinigung von induzierten Antikörpern aus Seren bedient man sich verschiedener Methoden. Durch die Verwendung von Protein A/G oder durch Ammoniumsulfat-Fällung werden alle Immunglobuline isoliert. Nach Immobilisation eines Antigens z.B. an CNBr-aktivierter Sepharose können in einer Affinitätschromatographischen Aufreinigung spezifische Antikörper isoliert werden. Die Bindung des Antikörpers an das immobilisierte Protein hängt ebenfalls von vielen Faktoren ab: Struktur, Ladung oder der hydrophobe Charakter, um nur einige zu nennen (Jaroslava, 2002). Während einer solchen Aufreinigung nehmen weiterhin folgende Bedingungen Einfluss auf die Bindung zwischen den Antikörpern und dem immobilisierten Antigen und sollten entsprechend bei einer Aufreinigung optimiert werden: Temperatur (Muronetz *et al.*, 2001), Konzentration der Antikörper-Lösung (Urh *et al.*, 2009) und die Flussrate (GE-Healthcare, 2007).

1.4 Retroviren

1.4.1 Einführung

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Retroviren zum ersten Mal durch V. Ellermann und O. Bang beschrieben. In einem Experiment übertrugen diese 1908 erstmals Leukämie durch zellfreie Filtrate von erkrankten auf gesunde Hühner (Ellermann & Bang, 1908). Wenige Jahre später entdeckte P. Rous, dass es bei der Übertragung von verschiedenen angefertigten filtrierten Extrakten aus Geflügelsarkomen auf gesunde Hennen zu Tumorerkrankungen kommt (Rous, 1911). Das hierfür verantwortliche Retrovirus wurde später nach seinem Entdecker Rous-Sarkom-Virus benannt.

Heute weiß man, dass die Retroviren die komplexesten Vertreter von Retroelementen (transponierbare mobile Elemente der genomischen DNA) sind und die Eigenschaft besitzen, infektiöse Partikel zu bilden (Temin, 1980). Durch die Beschreibung der Reversen Transkriptase durch H. Temin, D. Baltimore und R. Dulbecco konnte erklärt werden, wieso der Fluss der genetischen Informationen bei Retroviren in umgekehrter Richtung RNA -> DNA Provirus stattfinden kann (Mizutani *et al.*, 1970).

1980 wurde mit dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) erstmals ein Retrovirus beschrieben, das bei erwachsenen Menschen Krebserkrankungen verursachen kann (Broder & Gallo, 1985). Zu den heute wohl bekanntesten humanen Retroviren zählt das humane Immundefizienzvirus (HIV), das von F. Barré-Sinoussi und L. Montagnier 1983 als Auslöser der erworbenen immunschwäche Krankheit AIDS identifiziert wurde (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983).

Im Rahmen der Forschung zu HIV konnte aufgezeigt werden, dass Retroviren von einer Spezies auf eine andere übertragen werden können (Gao *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Übertragung des Koala-Retrovirus (KoRV), ein Vertreter der Gammaretroviren, der mit dem porzinen endogenen Retrovirus (PERV) verwandt ist (Tarlinton *et al.*, 2008; Tarlinton *et al.*, 2006).

Die Familie der Retroviren wird nach dem *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) in zwei Subfamilien mit insgesamt sieben Genera unterteilt (Tabelle 1.01.). Die Zuordnung basiert auf den Besonderheiten während einer möglichen Infektion sowie nach morphologischen und genetischen Unterschieden.

Tabelle 1.01. Klassifikation der Familie der Retroviren

Subfamilie	Genera	Vertreter	
<i>Orthoretrovirinae</i> (I)	Alpharetroviren	Aviäres Leukosevirus	
	Betaretroviren	Murines Mammary Tumor Virus	
	Gammaretroviren		Porzines Endogenes Retrovirus (PERV)
			Murines Leukemie-Virus (MLV)
			Felines Leukemie-Virus (FeLV)
	Deltaretroviren	Humanes T-Zell Leukämie-Virus (HTLV)	
		Humanes endogenes Retrovirus (HERV)	
Epsilonretroviren	Walauge Demal Sarcoma-Virus (WDSV)		
<i>Spumaretrovirinae</i> (II)	Spumaviren	Humanes/ Primaten Foamyvirus (HFV, PFV)	

Weiterhin können Retroviren exogen oder endogen sein. Die exogenen Retroviren besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Im Unterschied zu den endogenen Retroviren erfolgt die Übertragung der exogenen Retroviren von Organismus zu Organismus (horizontale Verbreitung).

Die endogenen Retroviren sind hingegen in das Genom nahezu aller Vertebraten integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Ursache hierfür ist die stabile Integration eines exogenen Retrovirus in die Keimbahn des Wirtes während der gemeinsamen Koevolution (Coffin, 1996). Unter bestimmten Umständen kann eine Aktivierung zu exogenen, infektiösen Partikeln erfolgen. Zudem kann die Rekombination zwischen endogenen und exogenen Retroviren eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Krankheiten spielen (Gifford & Tristem, 2003). Jedoch weisen die meisten endogenen Retroviren so umfassende Deletionen auf, dass auch Helferviren nicht mehr zu einer Aktivierung beitragen können (Modrow *et al.*, 2003). Zusammenfassend hat Coffin vier charakteristische Eigenschaften für endogene Retroviren zusammengestellt (Coffin, 1996):

- im Allgemeinen sind endogene Proviren (Virus-DNA innerhalb der Wirtszelle) transkriptionell inaktiv
- endogene Proviren sind durch Deletionen oder Punktmutationen oft defekt und unterscheiden sich vom eigentlichen Wild-Typ-Virus
- auch wenn endogene Retroviren replikationskompetent sind, sind einige nicht in der Lage, sich in dem Organismus zu replizieren, in welchen sie natürlich vorkommen, da der entsprechende Rezeptor dafür fehlt (*xenotropism*)

- Viren von endogenen Proviren sind meist für den Wirtsorganismus apathogen; die Replikationsrate ist zudem durch Unterschiede in den *long terminal repeats* (LTR) erhöht

1.4.2 Aufbau der retroviralen Partikel

Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von 80-100 nm. Das Kapsid (CA, *capsid*), welches das Virusgenom enthält, ist von einer Hüllmembran (*envelope*) umgeben, das von der Zytoplasmamembran der infizierten Zelle abgeleitet ist. In dieser Membran ist das transmembrane Hüllprotein (TM, *transmembrane envelope protein*) verankert, an das externe Glykoprotein (SU, *surface unit*) gebunden ist. Diese *envelope*-Proteine sind in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als „Spikes“ mit 5 nm bis 10 nm Länge zu erkennen und formen trimere Komplexe (Wilson *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2003).

Im Inneren der mit Matrixproteinen (MA) ausgekleideten Hüllmembran liegt das Kapsid, das in zylindrischer, konischer oder ikosaedrischer Form vorliegen kann (Nermut & Hockley, 1996).

In dem Kapsid befindet sich das Genom des Virus als zwei einzelsträngige RNA-Kopien, welche mit Nukleokapsidproteinen komplexiert vorliegen.

Neben dem Genom befinden sich zudem die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) im Kapsid. Die Kapsid-, Matrix- und Nukleokapsidproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine).

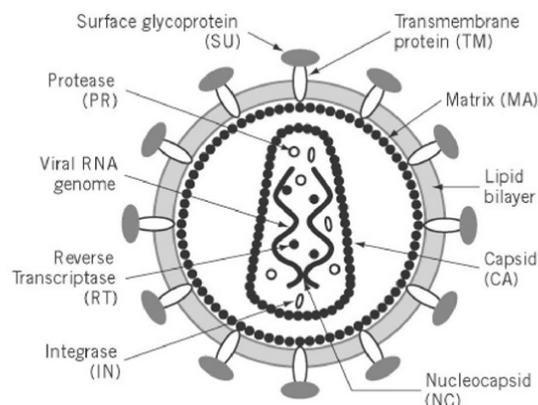


Abbildung 1.02. Schematische Darstellung eines einfachen retroviralen Partikels. Innerhalb des Kapsids (CA) sind die enzymatischen Proteine (PR, RT, IN) und die einzelsträngige RNA, welche mit Nucleokapsidproteinen (NC) komplexiert ist, dargestellt. (what-when-how.com, 2013).

1.4.3 Genomorganisation

Das Genom der Retroviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die mit ihrer 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Merkmale einer eukaryotischen mRNA aufweist (Furuichi *et al.*, 1975). Je nach Virustyp umfasst das Genom 7 bis 12 kb. Grundsätzlich kann man hinsichtlich des Genoms zwischen einfachen und komplexeren Retroviren unterscheiden. Prinzipiell besteht das Genom aller Retroviren aus dem Gen *env* (*envelope*), sowie dem überlappenden Leserahmen *gag/pol* (*group specific antigen/polymerase*) (Abb. 1.03. [A]). Der *gag*-Leserahmen enthält die Information für alle strukturellen Proteine (MA, CA und NC), während das *pol*-Gen die Information für die Bildung der viralen Enzyme (RT und IN) kodiert. Zwischen der *gag*- und der *pol*-Region liegt der Leserahmen für die Protease (PR). Je nach Retrovirus wird dieses Protein als Teil des *gag*- oder *pol*-Leserahmens oder in einem separaten offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) exprimiert. Die durch Spaltung eines Vorläuferproteins resultierenden Hüllproteine (TM und SU) werden durch *env* kodiert. Das Genom wird von zwei nicht kodierenden regulatorischen Kontrollsequenzen, den sogenannten LTR-Sequenzen (*long terminal repeats*) flankiert. Diese Sequenzen, die sich in ihrer Größe innerhalb der Familie der Retroviren stark unterscheiden, sind in drei Teile strukturiert: die U3-, R- und U5-Region.

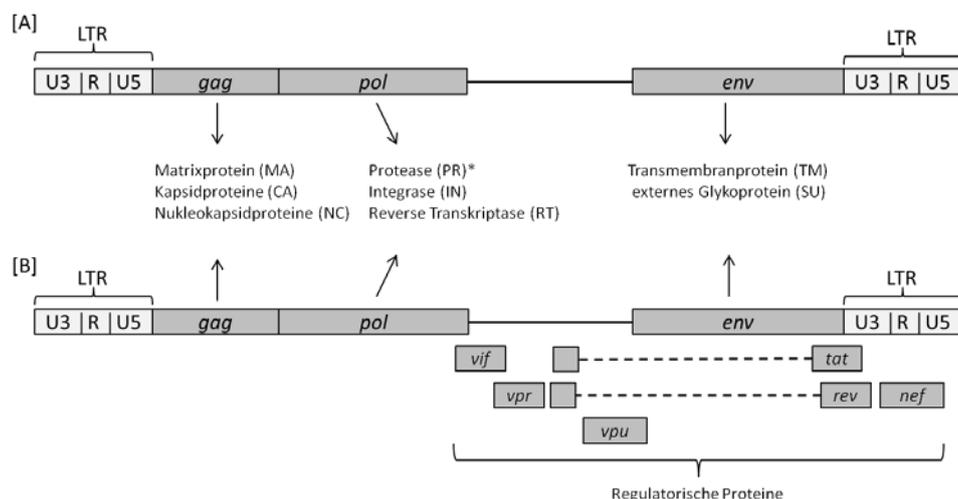


Abbildung 1.03. Virales Genom eines einfachen und komplexen Retrovirus sowie deren Proteinexpression. Darstellung des Genoms eines [A] einfachen Retrovirus und [B] komplexeren Retrovirus (hier: HIV-1) mit den offenen Leserahmen, welche von den LTR-Sequenzen flankiert sind. Die retrovirale Protease kann als Bestandteil des *gag* oder auch *pol*-Leserahmens als auch im eigenständigen Leserahmen vorkommen. Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. Abbildung modifiziert nach (Singh, 2006).

Die U3-Region beinhaltet einen Großteil der Kontrollelemente für Transkription und Replikation wie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, Promotor- und Enhancersequenzen. Von der Enhancersequenz hängt das Ausmaß der Virusreplikation in der Wirtszelle und somit der Einfluss des Virus auf den Wirtsorganismus ab (Holland *et al.*, 1987). Kleine Veränderungen in der Basenfolge dieser Region können daher zu Veränderungen der Pathogenität eines Virus führen. Die R-Region enthält ein Polyadenylierungssignal und spielt eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription (Trubetskoy *et al.*, 1999). Auch die U5-Region kann Einfluss auf die Replikationsaktivität eines Provirus nehmen (Murphy & Goff, 1989).

Komplexere Retroviren (z.B. HIV) besitzen zusätzliche Gene, die weitere regulatorische und akzessorische Proteine kodieren (Abb. 1.03. [B]).

Gegenüber anderen Viren (z.B. Herpes- und Inflenzaviren) besitzen Retroviren vier allgemeingültige genetische Eigenschaften (Coffin, 1996):

- sie besitzen zwei gleiche Moleküle einzelsträngiger RNA (diploides Genom);
- die Synthese und Prozessierung wird durch einen eigenen kodierten Transkriptionsapparat unterstützt;
- durch eine eigene tRNA erfolgt die Bindung des Genoms an der Primer Bindungsstelle;
- sie besitzen (+)RNA-Stränge.

1.4.4 Replikationszyklus

Die Virusreplikation erfolgt in mehreren Schritten: Infektion der Zelle, Reverse Transkription der Virus-RNA, Integration ins Genom der Wirtszelle mit anschließender Expression der viralen Proteine und des RNA-Genoms sowie die Bildung neuer Viruspartikel (Abb. 1.04.).

Die Infektion der Zelle beginnt mit einer hochspezifischen Interaktion zwischen den Oberflächen-Glykoproteinen des Virus und den Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Nach Verschmelzen mit der Zellplasmamembran wird das Viruskapsid ins Zellplasma freigegeben. Im Kapsid wird mit Hilfe der RT die RNA-Matrize (inklusive LTR-Sequenzen) vom 5'-Ende zum 3'-Ende in doppelsträngige DNA umgeschrieben, wobei die provirale Sequenz mit Proteinkomponenten gebunden bleibt. Bei Lentiviren (z.B. HIV) wird der Komplex aktiv durch die Kernporen in den Zellkern transportiert. Bei Retroviren, die keine Möglichkeit des aktiven Transports besitzen, kann die Integration der Provirus-DNA in das Genom der Wirtszelle erst im Zuge der Zellteilung nach Auflösen der Kernmembran

erfolgen. Die Integration erfolgt durch die Integrase an eine beliebige Stelle des Genoms. Damit ist das Provirus permanenter Bestandteil der infizierten Zelle und wird bei jeder Zellteilung mitrepliziert. Die Wirtszelle besitzt keinen Mechanismus das Provirus zu entfernen. Die Transkription des Provirus wird durch die LTR gesteuert, so dass das Virus Einfluss auf den Wirtstropismus hat. Nach erfolgter Transkription des Provirus dient ein Teil der RNA als Matrize für die Translation der viralen Proteine und der andere Teil als Genom für die neu reifenden Viruspartikel. Dazu lagern sich die viralen Bestandteile an die Zellmembran, wo Vorläufer-Viren, die Virionen, durch Knospung freigesetzt werden. Weitere Prozesse außerhalb der Zelle führen zur vollständigen Reifung der neuen Viren (zusammengefasst nach (Modrow *et al.*, 2003)).

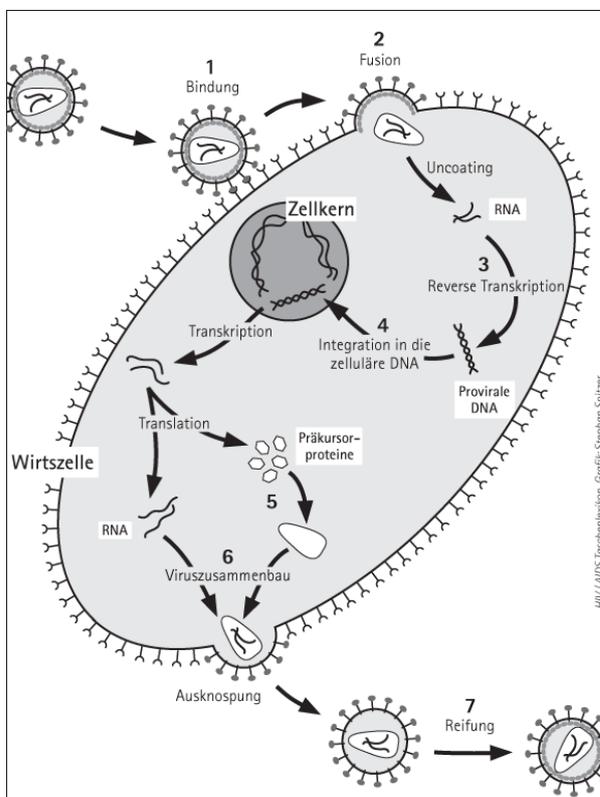


Abbildung 1.04. Replikationszyklus eines Retrovirus. Die Replikation des Virus verläuft in mehreren Schritten, wobei die Bindung an und die Fusion mit einer Wirtszelle, Voraussetzung ist. Nach der erfolgten Fusion, wird die Virus-RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und in das Wirtszellengenom integriert. Durch Transkription und Translation der integrierten viralen Gene werden alle benötigten Virus-Bestandteile von der Wirtszelle hergestellt. Nach deren Synthese erfolgt der Viruszusammenbau und die Abknospung von Vorläuferviren, den Virionen, welche außerhalb der Zelle zu den fertigen Viren heranreifen (Dressler & Wienold, 2001).

Eine maßgebliche Rolle bei der Rezeptorerkennung und der Verschmelzung von Zell- und Virusmembran spielen die retroviralen Hüllproteine. Dabei unterscheidet man *Class I* und *Class II* Fusionsproteine (Kielian & Rey, 2006). Retrovirale TMs sind Class I Fusionsproteine, die aus einem N-terminalen Fusionspeptid, einem *coiled coil* Trimer und einem C-terminalen Segment, das mit einer Transmembrandomäne und einem cytoplasmatischen Schwanz verknüpft ist (Wilson *et al.*, 2007).

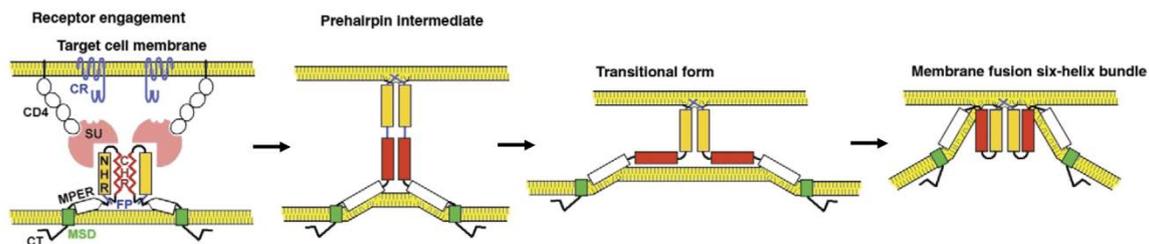


Abbildung 1.05. Ausbildung eines *six-helix-bundle* am Beispiel des transmembranen Hüllproteins gp41 während der HIV-Infektion von CD4⁺-Zellen. Das Oberflächenhüllprotein (SU) gp120 interagiert zuerst mit CD4 und anschließend mit dem Chemokinrezeptor (CR). Die NHR (gelb) und die CHR (rot) bilden nach einer ersten Konformationsänderung einen *three-helix rod* aus, der als *prehairpin*-Intermediat bezeichnet wird. Dadurch kann das Fusionspeptid (FP) am N-terminalen Ende des Moleküls in die Zellmembran eindringen. In dem jetzt gängigen Modell kommt es dann zur Interaktion beider Helices, was zu einem *six-helix-bundle* und der Annäherung der beiden Membranen führt (Roux & Taylor, 2007).

Da diese Arbeit auf der Induktion von neutralisierenden Antikörper gegen TM-Proteine beruht, soll an dieser Stelle kurz das gängige Modell der Umlagerung des TM-Proteins während des ersten Schrittes der Infektion beschrieben werden: Nach der Rezeptorbindung durch das SU-Protein und Ablösen des SU-Proteins vom restlichen TM-Protein (*shedding*) kann das N-terminale hydrophobe Fusionspeptid des TM-Proteins in den cis-Monolayer der Zellmembran eindringen. Die N- und C-terminalen Segmente bilden daraufhin ein helikales Trimer, welches auch als *Prähairpin*-Intermediat bezeichnet wird. Durch die freiliegenden hydrophoben Furchen des N-terminalen Trimers wird das C-terminale Segment antiparallel an dieses herangezogen (Hairpin-Struktur) (Chan & Kim, 1998). Während dieser Umlagerung wird die Zellmembran aufgerissen, so dass Virus- und Zellmembran verschmelzen können (*six-helix bundle*, 6HB) (Abb. 1.05.).

Allerdings gibt es für die beschriebenen Umlagerungen im Allgemeinen und für die strukturellen Veränderungen im Cystein-Loop im Speziellen während der HIV-Infektion keine direkten Beweise (Caffrey, 2001). Wie Mutationsstudien bei gp41 von SIV zeigten, wird durch den Verlust des Cystein-Loops die Struktur des gp41 vor und nach Fusion nicht verändert (Caffrey *et al.*, 1997; Sen *et al.*, 2007).

Caffrey und seine Kollegen schlagen daher vor, die kritische Rolle von gp41 während der Infektion weiter zu untersuchen, um gesicherte Aussagen über die intermolekulare Interaktionen und Umlagerungen treffen zu können.

1.5 Das porcine endogene Retrovirus (PERV)

PERVs gehören zu den Gammaretroviren und wurden erstmals Anfang der 1970-iger Jahre in Nierenzellkulturen von Schweinen beschrieben (Armstrong *et al.*, 1971; Breese, 1970; Kaaden & Dietzschold, 1971).

Es wird vermutet, dass dieses endogene Retrovirus sich vor 7,6 Millionen Jahren ins Schweinegenom integriert und seinen Ursprung in Afrika hat (Tonjes & Niebert, 2003). Hintergrund für diese Annahme ist, dass in den heute lebenden Pekaeris in Amerika, die die nächsten Verwandten zu den heutigen Schweinen darstellen und sich evolutionär vor 7,6 Millionen Jahren von diesen getrennt haben, keine PERVs gefunden werden konnten.

1997 konnte gezeigt werden, dass PERVs in der Lage sind, menschliche Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience *et al.*, 1997). Martin und andere haben 1998 beschrieben, dass es ohne mitogene Stimuli zu einer Expression von PERV RNA sowie Freisetzung von viralen Partikel kommen kann (Martin *et al.*, 1998). Allerdings konnte bis heute in keinem klinischen Versuch, bei denen porcine Zellen wie z.B. Inselzellen der Bauchspeicheldrüse in Diabetes-Patienten transplantiert worden sind, eine PERV-Infektion nachgewiesen werden (Di Nicuolo *et al.*, 2010; Irgang *et al.*, 2003; Paradis *et al.*, 1999; Patience *et al.*, 1998). Doch weisen einige Studien darauf hin, dass die Anzahl der Probanden zu klein ist, um eine Infektion zu 100 % auszuschließen, und fordern daher weitere Forschungen (Herring *et al.*, 2001; Valdes-Gonzalez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011b).

Dass es noch zu keiner Infektion gekommen ist, liegt vielleicht auch daran, dass PERVs allgemein niedrigtitrig vorliegen (Munoz *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1998), jedoch durch das Passagieren von infizierten humanen Zellen einen höheren infektiösen Titer erreichen können (Denner *et al.*, 2003).

Im Tiermodell hingegen gibt es widersprüchliche Aussagen zu *in vivo* Infektionen. Bei der Transplantation von porcinem Gewebe auf nicht-menschliche Primaten wurde einerseits keine Übertragung von PERV festgestellt (Denner *et al.*, 2009). Bei der Xenotransplantation bei Lämmern jedoch konnte eine *in vivo* Transmission von PERV ermittelt werden (Popp *et al.*, 2007).

Insgesamt werden PERVs anhand ihrer *env*-Gene in drei replikationskompetente Subtypen unterschieden, PERV-A, -B und -C. Die Unterschiede im *env*-Gen beschränken sich allerdings nur auf das Oberflächenprotein (SU) gp70, woraus unterschiedliche Wirtsspezifitäten resultieren (Patience *et al.*, 2001). Die Gene *pol* und *gag* weisen hingegen untereinander eine sehr große Homologie auf (Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997). PERV-A und -B können verschiedene Zelllinien infizieren und werden daher als polytrop bezeichnet; PERV-

C dagegen kann nur Schweinezellen infizieren und wird daher als ecotrop bezeichnet (Akiyoshi *et al.*, 1998; Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000). Neben diesen drei Subtypen konnte eine exogene Variante, eine PERV-A/C-Rekombinante, nachgewiesen werden. Dieses Virus, das sich nicht in der Keimbahn befindet, besitzt die Rezeptorbindungsstelle von PERV-A und kann somit auch nicht-porzine Zellen infizieren (Denner, 2008; Harrison *et al.*, 2004).

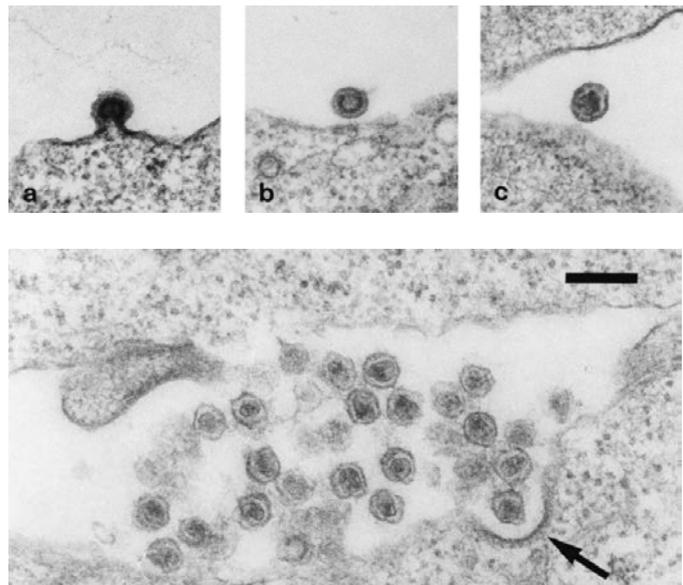


Abbildung 1.06. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV-Partikeln. In den oberen Aufnahmen ist das *budding* von infizierten 293-Zellen dargestellt (a-c). Der Durchmesser der Partikel beträgt ungefähr 110 nm. Der Pfeil in der unteren Aufnahme zeigt ein Viruspartikel bei dem Zelleintritt. Für diese Aufnahmen wurden 293-Zellen mit PK15-abgeleiteten PERV-Partikeln infiziert (Czauderna *et al.*, 2000).

1.5.1 Aufbau und Genetik von PERV

Der Aufbau von PERV-Proviren entspricht dem eines einfachen Retrovirus (siehe Abschnitt 1.4.1) (Abb. 1.07.). Die Oberflächen-Proteine p15E (TM-Protein) und gp70 (SU-Protein), welche auf der Virusmembran zu finden sind, entstehen enzymatisch aus einem Vorläuferprotein (Chiang *et al.*, 2007; Pinter *et al.*, 1997). Gp70 ist wie alle Oberflächenproteine von Retroviren glykosyliert. In der Literatur werden sieben bzw. fünf N-Glykosylierungsstellen für PERV-A bzw. PERV-B beschrieben (Hazama *et al.*, 2003; Le Tissier *et al.*, 1997). Durch Versuche mit Endoglycosidase H (EndoH), welches Mannose entfernt, konnte indirekt nachgewiesen werden, dass auch O-Glykosylierungsstellen vorliegen (Watanabe *et al.*, 2005). Sie sind strukturell für die Oberflächenstruktur des

Virus und analog zu HIV notwendig für die Rezeptorbindung und daher für eine erfolgreiche Infektion (Freed & Risser, 1987). Der Einsatz von α - und β -Mannosidase führte zu einer Reduzierung der PERV-Infektion (Hazama *et al.*, 2003; Miyagawa *et al.*, 2006).

Die SU-Einheit der meisten Retroviren besitzt einen N-terminalen Bereich, der als Rezeptorbindungsstelle (*receptor binding protein*, RBP oder *receptor binding domain*, RBD) dient (Albritton *et al.*, 1993; Heard & Danos, 1991) und einen C-terminalen Bereich, der für die Stabilität des viralen Oberflächenproteins sorgt (Ragheb & Anderson, 1994). Eine dazwischenliegende prolinreiche Region (PRR) verbindet beide Domänen und sorgt für deren Aktivität (Gray & Roth, 1993). Jüngste Ergebnisse zeigen jedoch, dass für eine PERV-Infektion die PRR kritisch für die Infektion ist und nicht wie sonst für Retroviren üblich die N-terminale Region der RBP (Argaw & Wilson, 2012). Bereits früher publizierte Interaktionsstudien mit SU-Klonen zeigten ebenfalls, dass nur die komplette SU-Einheit (inkl. PRR) und nicht nur die RBP notwendig für die Bindung mit humanen Zellen ist (Watanabe *et al.*, 2005).

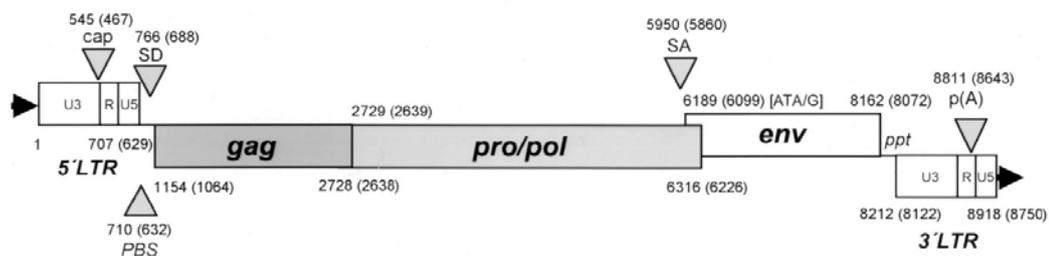


Abbildung 1.07. Genomische Struktur von zwei PERV-Klonen. Die Gesamtlänge der proviralen Sequenz von PERV-B(33) und PERV-B(43) beträgt 8.918 und 8.750 Basenpaare. Cap=Transkriptionsstartpunkt; PBS=Primer-Bindungsstelle; SD= Splice-Donor; SA=Splice-Akzeptor; p(A)=Poly-A-Schwanz (Czauderna *et al.*, 2000).

1.5.2 Vorkommen und Infektion mit dem Virus

Insgesamt lassen sich bis zu 50 PERV-Proviren im porcinen Genom finden, wobei diese je nach Schweinerasse variieren (Bosch *et al.*, 2000; Herring *et al.*, 2001). Durch Deletionen sind die Proviren meist nicht mehr dazu fähig, intakte infektiöse Viruspartikel zu bilden (Lee *et al.*, 2002; Patience *et al.*, 2001). In den unterschiedlichen Geweben variiert die Expression von PERV-mRNA sehr stark, wobei im Pankreas die geringste und in den Nieren die höchste Expression zu detektieren ist (Akiyoshi *et al.*, 1998; Clemenceau *et al.*, 1999). Bezüglich der

Freisetzung von intakten Viruspartikeln bestehen ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Schweinerassen (Dieckhoff *et al.*, 2009; Tacke *et al.*, 2000).

Für die Nutzung von porzinen Geweben in Xenotransplantationen wurden genetische Analysen mit verschiedenen Schweinerassen durchgeführt. Allerdings kommen dabei Mang und Kollegen zu dem Ergebnis, dass die Kopienzahl abhängig von der Zucht ist (Mang *et al.*, 2001) und eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen Zucht und Anzahl der Proviren aufzeigen (Quereda *et al.*, 2012).

2003 konnten die für eine PERV-A Infektion benötigten Oberflächenrezeptoren einer humanen Wirtszelle beschrieben werden: HuPAR-1 und HuPAR-2 (humaner PERV-A Rezeptor) (Ericsson *et al.*, 2003). Die entsprechenden Gene (GPR172A und GPR172B) befinden sich auf den Chromosomen 8 und 17 und sind zu 86,5% homolog. Die Rezeptorfunktion von HuPAR-2 ist zehnmal höher als die von HuPAR-1 (Marcucci *et al.*, 2009). HuPAR-1 übernimmt zudem die Funktion als Gamma-Hydroxybutyrat-Rezeptor im menschlichen Gehirn (Andriamampandry *et al.*, 2007); HuPAR-2 dient als Riboflavin-Transporter (Yonezawa *et al.*, 2008).

Erste Experimente und Berechnungen zeigten, dass die Rezeptoren aus elf Transmembrandomänen mit einem intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus bestehen (Marcucci *et al.*, 2009; Mattiuzzo *et al.*, 2007). Für HuPAR-2 konnte gezeigt werden, dass zwei Regionen kritisch für die PERV-A Infektion sind (Marcucci *et al.*, 2009) und dieser durch epigenetische Faktoren hochreguliert wird (Moalic *et al.*, 2009; Nakaya *et al.*, 2011b). Für PERV-B ist noch kein Rezeptor identifiziert worden.

Viele Gammaretroviren besitzen in ihrem SU-Protein ein PHQ-Motiv (Prolin-Histidin-Glutamin), das bei einer Mutation oder einer Deletion des Histidins die Membranfusion und somit die Infektion blockiert wird (Bae *et al.*, 1997; Lavillette *et al.*, 2000). Hingegen besitzt PERV kein vollständiges PHQ-Motiv mehr, sondern nur noch an der zehnten Stelle des Glycoproteins gp70 ein Histidin. Durch Deletion dieses Histidins konnte gezeigt werden, dass dieses unerlässlich für die Infektion ist. Durch Zugabe der Rezeptor-Bindungsdomäne eines anderen Gammaretrovirus bei *in vitro*-Experimenten konnten Zellen, die keinen PERV-Rezeptor exprimieren, mit PERV infiziert werden (Lavillette & Kabat, 2004). Daraus abgeleitet wird eine rezeptorunabhängige Infektion vermutet.

Zudem konnte gezeigt werden, dass ein mutierter PERV-C Klon über einen unbekanntem Rezeptor humane Zellen infiziert (Argaw & Wilson, 2012).

Ähnlich bindende und neutralisierende Antikörper konnten nach der Immunisierung mit der Ektodomäne von p15E von dem feline Leukämie-Virus (FeLV) (Langhammer *et al.*, 2011; Langhammer *et al.*, 2006) und dem Koala-Retrovirus (KoRV) (Kaulitz, 2012; Mahdi, 2009) nachgewiesen werden, so dass von homologen immunogenen Strukturen bei der Ektodomäne des Transmembranproteins p15E bei Gammaretroviren ausgegangen werden kann.

Für PERV konnte bis heute keine eindeutige Aussage getroffen werden, an welchem Epitop die neutralisierenden Antikörper nach einer p15E-Immunisierung binden und wie diese genauer induziert werden. Bei Inhibierungsversuchen mit Peptiden, um die Neutralisation durch p15E-spezifische Antikörper zu reduzieren, wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht, welche Antikörper-Population für die Neutralisation verantwortlich ist (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011).

Neben den beschriebenen neutralisierenden Antikörpern gegen das TM-Protein wurden neutralisierende Antikörper gegen Regionen in der PRR von gp70 beschrieben (Nakaya *et al.*, 2011a).

Eine Immunisierung mit einem Env-Protein, das sowohl gp70 als auch p15E umfasste, konnte ebenfalls neutralisierende Antikörper induzieren (Chiang *et al.*, 2007). Zwei der Epitope befanden sich auf dem gp70, eines im Cystein-Loops des p15Es.

1.6 Transplantation

Die Organtransplantation stellt heute ein etabliertes Behandlungsverfahren in der Medizin dar, bei der Menschen mit Organschäden gerettet bzw. deren Lebensbedingungen dauerhaft verbessert werden können. Seit der ersten Transplantation 1954 zwischen eineiigen Zwillingen wurden in Deutschland zwischen 1963 und 2012 112.604 Transplantationen durchgeführt (DSO, 2012; 2013). Überwiegend werden Nieren, aber auch Organe wie Leber, Herz, Pankreas und Lunge transplantiert (DSO, 2012). Heute sind durchschnittlich etwa 70 % der transplantierten Organe noch nach fünf Jahren funktionstüchtig.

Grundlage für diese erfolgreichen Transplantationen sind pharmakologische und biologische Erkenntnisse der Immunsuppression, um ein Abstoßen der transplantierten Organe zu verhindern.

Trotz Deutschland- und Europaweiter Koordination zwischen Spendern und Empfängern warteten allein in Deutschland im Jahr 2012 rund 11.300 Patientinnen und Patienten auf ein Spenderorgan (Eurotransplant, 2013). Ca. 30 % der Betroffenen auf der Warteliste versterben, weil das benötigte Organ nicht verfügbar ist. Die Bereitschaft zur Organspende hat in der Eurozone leicht zugenommen; in Deutschland hingegen wurden 2011 7,5 % weniger Organe gespendet als 2010 (Eurotransplant, 2012). Da die Zahl der Empfänger immer noch höher als die der Spender, kann nicht allen Menschen mit Organdefekten/-versagen geholfen werden. Aus diesem Grund müssen Alternativen zur gängigen Organtransplantation erforscht und etabliert werden.

1.6.1 Alternativen zur Allotransplantation

Die unter Abschnitt 1.6 beschriebene Form der Transplantation wird auch als Allotransplantation bezeichnet, da hier Spender und Empfänger einer Spezies angehören. Daneben gibt es die Xenotransplantation, welche die Übertragung von Zellen und/oder Organen zwischen genetisch verschiedenen Spezies umfasst (siehe Abschnitt 1.6.2). Als weitere Alternative der kurzfristigen Organüberbrückung gibt es die Möglichkeit mit maschinellen Organen, z.B. einer Herzpumpe (Lederman *et al.*, 2002; Moazami *et al.*, 2013). Für Organe mit einer komplexen Stoffwechselfunktion, wie beispielsweise Leber oder Niere, ist ein solcher Einsatz derzeit nicht möglich.

Als vierte Möglichkeit des Organersatzes kann das *tissue engineering* angeführt werden. Darunter wird die Möglichkeit verstanden, aus humanen Stammzellen Zellen der

verschiedenen Organe zu züchten. Schon heute werden durch dieses Verfahren Hautzellen bei großflächigen Brandwunden gewonnen und transplantiert (Bannasch *et al.*, 2000).

1.6.2 Xenotransplantation

Bei der Xenotransplantation handelt es sich um die Übertragung von Zellen, Geweben und Organen zwischen zwei verschiedenen Spezies. Diese Verfahren kann zum einen eine zeitliche Überbrückung darstellen, bis ein geeignetes humanes Spenderorgan vorliegt. Es wird allerdings auch angestrebt, die Verpflanzung dahingehend zu optimieren, dass ein Xenotransplantat als ein permanenter Organersatz dienen kann (Buhler *et al.*, 2002a; Buhler *et al.*, 2002b; Fuchimoto *et al.*, 2001; Sachs, 2000).

Zeitgleich mit dem Beginn der Transplantation von humanen Organen befasste man sich mit der Möglichkeit, nicht-humane Organe zu transplantieren. 1963/64 wurden in zwei Studien erfolgreich Paviannieren auf mehrere Patienten übertragen, wobei die Organe in den meisten Fällen nach 2-3 Monaten wieder abgestoßen wurden und die Patienten verstarben (Starzl *et al.*, 1964). Mitte der 80-iger Jahre wurde versucht, ein Pavianherz einem neugeborenem Mädchen zu transplantieren. Nach 20 Tagen wurde das Xenograft abgestoßen (Bailey *et al.*, 1985). Letztmalig wurden 1992 durch Prof. Starzl erneut eine Pavianleber in einen 35-jährigen Patienten transplantiert, welcher allerdings nach 71 Tagen verstarb (Starzl *et al.*, 1993).

Seit längerer Zeit zählen aus physiologischen, anatomischen und ethischen Gründen Schweine zu den favorisiertesten Spendeorganismen für Xenotransplantationen (Boneva *et al.*, 2001; Dorling *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2009; Sachs, 1994). Aus diesem Grund wurde in den 1990-iger Jahren begonnen, porcines Gewebe und Organe zu transplantieren. Nach vielen erfolglosen Xenotransplantationen der 90-iger Jahre infolge Abstoßungsreaktionen wird nun versucht, eingekapseltes Gewebe bzw. zellfreie Gewebestrukturen zu transplantieren (Ekser *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). Beispielsweise konnten so erfolgreich eingekapselte Inselzellen in Diabetes-Patienten (Elliott *et al.*, 2000) und auch porcinen Hepatozyten in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen (Bengtsson *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2000) transplantiert werden. Hinzu kommen Transplantationen mit porcinem „Material“ im orthopädischen Bereich, um den Stütz- und Bewegungsapparat wiederherzustellen (Laurencin & El-Amin, 2008). Bei neuronalen Defekten wie Parkinson und Huntington konnte bereits fötales neuronales Gewebe transplantiert werden (Deacon *et al.*, 1997; Schumacher *et al.*, 2000).

Tabelle 1.02. Vorteile der Xenotransplantation (Magre *et al.*, 2003)

-
- unlimitierter Organvorrat
 - bessere Planungen bei den Operationen, da Organe planbarer vorliegen
 - Möglichkeit der vorsorglichen Immunbehandlung des Empfängers
 - Organe können zum Zeitpunkt des Bedarfs bereitgestellt werden
 - Züchtung von pathogenfreien Tieren, um Pathogenesen zu verhindern
 - leichtere Überprüfung der zu transplantierenden Organe bevor diese einem Spendetier entnommen wird
-

Nach dem Sekretariat der Deutschen Bischofskonferenz würden voraussichtlich 4.000 bis 6.000 Tiere erforderlich sein, um den geschätzten jährlichen Bedarf an Organtransplantaten in der Bundesrepublik Deutschland zu decken (DBK, 1998). Im Vergleich dazu werden jährlich 48 Millionen Schweine für Nahrungszwecke erzeugt. Es bestünde damit die Möglichkeit, bei allen Erkrankten, bei denen eine Transplantation medizinisch indiziert wäre, diese auch durchzuführen.

1.6.2.1 Hindernisse und Risiken der Xenotransplantation

Grundlegend müssen bei einer Xenotransplantation drei Hindernisse diskutiert werden: physiologische, anatomische und immunologische. Da nicht-humane Primaten aufgrund verschiedenster Aspekte für eine Xenotransplantation nicht infrage kommen, muss auf Spender einer anderen zoologischen Ordnung zurückgegriffen werden (Denner & Tonjes, 2012). Dadurch ergeben sich zwangsläufig physiologische und anatomische Barrieren zwischen Spender- und Empfängerorganismus. Zum einen muss die Größe sowie die Orientierung des Organs betrachtet werden, da es durch die Änderung der Orientierung zu einer Beeinträchtigung der Funktion kommen kann (West *et al.*, 1987).

Zum anderen muss auf die Alterungsdynamik zwischen Spender und Empfänger geachtet werden. Um die Hormon- und Enzymkompatibilität zwischen Spender und Empfänger zu gewährleisten, müssen Stoffwechselkreisläufe gleich ablaufen. Auch wenn Größe, Hormon- und Enzymkompatibilität beachtet werden, kann es zu immunologischen Abstoßungen eines Transplantates kommen. Insgesamt lassen sich die auftretenden immunologischen Reaktionen in drei bis vier verschiedene Phasen einteilen (Auchincloss & Sachs, 1998; Dorling *et al.*, 1997): hyperakute vaskuläre Abstoßungsreaktion (HAR) (Cooper *et al.*, 1994), die verzögerte Xenotransplantatabstoßung, die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion (Bach *et al.*, 1995) und die chronische Transplantationsabstoßung. Die Entwicklung neuer

Medikamente oder anderer Technologien haben in den letzten Jahren viel zur Überwindung einer Abstoßungsreaktion beigetragen (Dai *et al.*, 2002; Pierson *et al.*, 2009; Schmoeckel *et al.*, 1998). Um eine Abstoßungsreaktion bei porzinem Gewebe unter Kontrolle zu bekommen, wurden z.B. transgene Schweine generiert, welche menschliche Proteine auf ihren Zellen exprimieren (Klymiuk *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2009). Neben den beschriebenen Hindernissen darf man die Risiken durch Infektionen mit Bakterien, Pilzen oder anderen Parasiten nicht unterschätzen (Fishman, 2001; Onions *et al.*, 2000). Die meisten Erreger sind allerdings bei Schweinen bekannt und können mittels SPF-Haltung (*specified pathogen free*) (Munoz *et al.*, 1999), Antibiotikabehandlung und präventiver Vakzinierung als Infektionsrisiko ausgeschlossen werden. Es sei allerdings noch darauf hingewiesen, dass viele Organismen, welche Zoonosen hervorrufen, im natürlichen Organismus meist harmlos sind und erst nach Übertragung auf eine fremde Spezies ihre pathogenen Eigenschaften offenbaren (George, 2006).

Auch wenn eine Infektion mit PERV nach durchgeführten Xenotransplantationen noch nicht nachgewiesen wurde, ist eine Infektion weiterhin nicht ausschließbar. Unter dem Stichwort „Xenotourismus“ wurde darauf aufmerksam gemacht, dass internationale Regularien erstellt werden müssen, um zu verhindern, dass Patienten in Ländern behandelt werden, in denen „gelockerte“ Bedingungen zur Xenotransplantation gelten und somit Zoonosen wie z.B. bei HIV-1 entstehen könnten (Sykes *et al.*, 2004). Emanuel und Kollegen fordern in ihren Überlegungen, dass der wissenschaftliche Nutzen einer Xenotransplantation einer Risiken-Nutzen-Rechnung unterzogen wird (Emanuel *et al.*, 2000).

1.6.2.2 Ethische Aspekte bei der Xenotransplantation

Neben den medizinischen und weiteren naturwissenschaftlichen Aspekten der Xenotransplantation sollen hier kurz ethische Bedenken bei der Verwendung von tierischen Organen für die Heilung von Krankheiten erwähnt werden. Nach den weltweit gültigen Deklarationen von Helsinki (1964) und Tokio (1975) ist der Tierversuch legitim und stellt eine notwendige Voraussetzung zum Versuch am gesunden wie kranken Menschen dar. Auch wenn in diesen Deklarationen keine expliziten Aussagen zu Xenotransplantationen gemacht werden, sollte behutsam mit Versuchstieren umgegangen werden. Zukünftig muss weiterhin darauf geachtet werden, dass Menschen wie Tiere nicht zum Zwecke des Forschungsfortschritts instrumentalisiert werden (DBK, 1998).

Weiterhin könnten durch die Xenotransplantation Tierschutzstandards reduziert und zurückgeschraubt werden, weil die Behandlung schwerkranker Menschen Priorität hat.

In die öffentliche Debatte über den Nutzen von Xenotransplantationen sollten auch wirtschaftliche Aspekte einbezogen werden. Daneben muss überprüft werden, ob bei den momentanen klinischen Studien der lebensrettende Gedanke für eine Gesellschaft oder konkret für einen Partizipierenden im Vordergrund steht (National Academy of Sciences (US), 1996). In Kanada fand aus diesem Grund 2001 eine öffentliche Anhörung mit Wissenschaftlern, Experten mit sozialen und ethischen Hintergründen sowie sonstigen Interessierten und Betroffenen statt (Einsiedel & Ross, 2002; Jones & Einsiedel, 2011). In dieser wurde beschlossen, dass keine weiteren klinischen Studien durchgeführt werden, bis mögliche Risiken bei der Xenotransplantation ausgeschlossen sind (Einsiedel, 2004). Bach *et al.* forderte ebenfalls im Zusammenhang mit der Xenotransplantation in verschiedenen öffentlichen Gremien darüber zu debattieren und Regularien zum Nutzen festzuhalten (Anderson, 2006; Bach & Ivinson, 2002). Insgesamt hat die britische *Xenotransplantation Interim Regulatory Authority* schon 2003 ein Dokument mit über 200 *Abstracts* zum Thema herausgegeben (DoH, 2003).

James F. George, Professor der Alabama Universität in Birmingham (USA), fasste seine Überlegungen zum ethischen Diskurs wie folgt zusammen: „Aufgrund der Komplexität der medizinischen, ethischen und rechtlichen Fragen wird es immer eine kontroverse Auseinandersetzung geben. Sollten die wissenschaftlichen Probleme geklärt sein, so wird die Entscheidung von klinischen Versuchen abhängig von kollektiven Diskussionen sein, die durch ethische, regulatorische und rechtliche Rahmenbedingungen mittels Konsens getroffen werden.“ (George, 2006).

1.7 Das humane Immundefizienz-Virus

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein Lentivirus, welches in seiner Pathogenese zur Immunschwäche AIDS (*acquired immune deficiency syndrom*) führt. Seit Beschreibung dieser Krankheit 1981 sind über 37 Millionen Menschen daran gestorben. AIDS ist mit jährlich knapp 1,7 Millionen Toten weltweit die vierthäufigste Todesursache auf der Welt (UNAIDS, 2012). Da das Virus zu einer Immunschwäche führt, konnten zwar Anfang der 1980-iger Jahre die Auswirkungen wie verschiedene Pilzinfektionen und die möglichen Übertragungswege beschrieben werden (Gottlieb *et al.*, 1981), aber erst 1984 wurde der Erreger entdeckt und als LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983) bzw. HTLV-III (humanes T-Zell Leukämie Virus) (Gallo *et al.*, 1983) bezeichnet. Viele weitere Arbeitsgruppen bestätigten den Befund einer Viruserkrankung. 1986 erhielt das Virus seinen heutigen Namen (Coffin *et al.*, 1986).

1.7.1 Genetik und Morphologie von HIV

Das Virus gehört zum Genus der Lentiviren und somit zur Familie der *Retroviridae*. Das Genom besteht aus zwei Kopien einer einzelsträngigen RNA, welche die typischen Proteine eines Retrovirus kodiert: *Gag*, *Pol* und *Env*. Zusätzlich werden die regulatorischen Proteine Tat und Rev sowie Nef, Vif, Vpr und Vpu kodiert, die z.B. an der Replikation und Proteinexpression sowie dem Unterdrücken der Immunantwort gegen infizierte Zellen beteiligt sind. Als Oberflächenproteine, welche durch *env* kodiert sind, liegen gp120 und gp41 vor, die beide sehr stark glykosyliert sind (Thomas *et al.*, 1991).

1.7.2 Übertragung und Krankheitsverlauf

Die Übertragung des Virus erfolgt u.a. über ungeschützten sexuellen Kontakt, Kontakt mit infiziertem Blut bzw. Blutprodukten sowie beim Stillen von Neugeborenen.

Die Pathogenese einer HIV-Infektion ist durch drei Phasen gekennzeichnet: frühe, chronische und späte Phase. Die Infektion erfolgt über die Schleimhäute. Alternativ kann die Infektion über membranständige C-Typ Lektine von mukosalen Langerhans Zellen, welche durch eine Shuttle-Funktion das Virus in die Zelle schleusen, erfolgen. Bis zu sechs Wochen verweilen die infizierten Lymphozyten in den Lymphknoten, bis es zum ersten Ausbruch kommt: die Viruslast im Blut steigt auf bis zu 5×10^6 RNA-Kopien/ml an und ist

gekennzeichnet durch Fieber, starken Nachtschweiß, Abgeschlagenheit, Hautausschläge, orale Ulzerationen oder Arthralgie. Das Virus breitet sich nun im gesamten Organismus aus, währenddessen die CD4+ Zellzahl abnimmt. Durch die primäre Immunantwort wird das Virus zunächst wieder zugedrängt bis es in der chronischen Phase nicht mehr unterdrückt werden kann. Die CD4+-Zellzahl fällt zur späten Phase hin kontinuierlich ab, bis nur noch 200 CD4+-Zellen/ μl gezählt werden. Die letzte Phase ist durch den Wechsel des Korezeptors CCR5 (R5-tropes Virus) zum CXCR4-Korezeptor gekennzeichnet. Ursache dafür ist eine Mutation in der variablen Region V3 des Oberflächenproteins gp120 von HIV-1. Durch diese Mutation ändert sich das Glykosylierungsmuster von gp120, wodurch der andere Korezeptor verwendet wird (Polzer *et al.*, 2002).

Durch die geringe Anzahl an CD4+-Zellen kommt es in der Regel zu AIDS-definierenden Erkrankungen: zu diesen zählen opportunistische Infektionen, die durch Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten bedingt sind, sowie andere Erkrankungen, wie die Ausbildung von Kaposi-Sarkomen oder malignen Lymphomen. Unbehandelt führen diese Erkrankungen zum Tod.

1.7.3 Antikörper und Impfstoffe gegen HIV

Die Entwicklung eines sicheren und effektiven HIV-Impfstoffs wäre unzweifelhaft die beste Lösung, die AIDS-Pandemie in den Griff zu bekommen, wobei bis heute kein wirklicher Durchbruch zu einem Impfstoff gelungen ist (Fauci, 2008). Ein HIV-Impfstoff sollte eine Infektion verhindern bzw. die Viruslast auf Dauer reduzieren, um eine Infektion von anderen Menschen auszuschließen (Barouch, 2008). Ein Forschungsschwerpunkt stellt dabei die Induktion von breitneutralisierenden Antikörpern dar, welche in einigen Patientenseren gefunden worden sind. Diese Antikörper sind größtenteils gegen das Oberflächenprotein gp120 oder gp41 gerichtet (Lin & Nara, 2007).

Nach Charakterisierung der Bindungs epitope und der Eigenschaften der Antikörper wurde versucht, diese im Tiermodell zu induzieren. Bei der Wahl des Antigens wurden alle Möglichkeiten einer möglichen Induktion von Antikörpern (siehe Abschnitt 1.2.) ausgenutzt (Girard *et al.*, 2011; Wijesundara *et al.*, 2011). Darunter befanden sich Impfstoff-Strategien mit inaktivierten Viruspartikeln (Kim *et al.*, 2007; Phogat *et al.*, 2008), nativen Env-Strukturen (Belshe *et al.*, 1993; Dolin *et al.*, 1991), modifizierten Env-Molekülen (Ho *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2002), DNA-Partikeln (Lori *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2011) sowie Vektorenimpfungen (Currier *et al.*, 2010; McElrath *et al.*, 2008). Neben unzähligen Tierimmunisierungen wurden mehr als 40 verschiedene Impfstoff-Kandidaten in über 80

klinischen Studien der Phase I und II mit mehr als 10.000 Personen erprobt (Mascola & Montefiori, 2010; Ross *et al.*, 2010). Bis heute konnte in keiner der durchgeführten Studien eine Möglichkeit des ausreichenden Schutzes vor einer HIV-Infektion gefunden werden (Munier *et al.*, 2011).

Neben der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gibt es die Möglichkeit durch die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen oder aber von CD8-T-Zellen virale Erreger zu eliminieren (Forthal & Moog, 2009; Overbaugh & Morris, 2012). In einigen *Reviews* werden daher zelluläre und humorale Immunantworten zu gleichen Anteilen erwähnt und ergänzend darauf hingewiesen, dass das Zusammenspiel beider Immunantworten Aussicht auf den Erfolg eines Impfstoffes hat (Saunders *et al.*, 2012; Walker & Burton, 2008).

Für diese vorliegende Arbeit sind die breitneutralisierenden Antikörper 2F5, 4E10 und 10E8, welche an der *membrane proximal region* (MPER) von gp41 binden (Huang *et al.*, 2012; Montero *et al.*, 2008; Muster *et al.*, 1993; Zwick *et al.*, 2001) von besonderer Bedeutung. Wie diese das Virus neutralisieren ist noch nicht eindeutig geklärt, wobei davon auszugehen ist, dass die Bindung der Antikörper die Fusion mit der Zielzelle verhindert (Lin & Nara, 2007).

Die lange Kette der Antikörperbindungsstelle 3 (CDR3) ist bei 2F5 und 4E10 recht lang, so dass eine Interaktion mit der Virusmembran in Betracht kommen könnte (Cardoso *et al.*, 2005; Ofek *et al.*, 2004). Ob diese allerdings für die Neutralisation bzw. Induktion der entsprechenden Antikörper notwendig ist, konnte noch nicht eindeutig beschrieben werden. Neben den breitneutralisierenden Antikörpern, welche in der MPER von gp41 binden, wurden neutralisierende Antikörper beschrieben, die Epitope in der NHR erkennen (Gustchina *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2005; Sabin *et al.*, 2010).

Einer davon, HK20, wurde aus immortalisierten Gedächtniszellen von HIV-1 Infizierten isoliert (Corti *et al.*, 2010), ein anderer, D5, wurde durch einen Phagendisplay aus einer Antikörper-Bibliothek isoliert (Miller *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur von D5 zeigt, dass dieser in einer hydrophoben Tasche in der NHR von gp41 bindet (Luftig *et al.*, 2006). Die gleiche Region wurde zuvor als Zielregion verschiedener Inhibitionspeptide beschrieben (Eckert & Kim, 2001a). Obwohl das D5-Epitope unter den HIV-1 Isolaten hochkonserviert ist, neutralisiert der D5-Antikörper schwach und ist zielzell-abhängig (Miller *et al.*, 2005). Verschiedene Immunisierungsstudien haben versucht, D5-ähnliche Antikörper zu induzieren, wobei nur einige dieser Studien erfolgreich waren (Bianchi *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2008).

1.8 Vergleich zwischen PERV und HIV-1

Auch wenn PERV und HIV-1 evolutionär nicht sehr nah verwandt sind, lassen sich dennoch einige Gemeinsamkeiten, aber auch grundlegende Unterschiede aufzeigen (Denner, 2011). Diese Gemeinsamkeiten stellen die Grundlage für die vorliegende Arbeit dar.

Nach Immunisierungen mit der Ektodomäne des rekombinanten TM-Proteins p15E wurden Antikörper in der FPPR und MPER induziert, wobei die Antikörper der MPER eine Sequenzhomologie zu dem breitneutralisierenden Antikörper 4E10 gegen HIV-1 aufweisen: PERV EGWFN und HIV-1 NWFN/DIT (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011).

In Tabelle 1.03. sind die wichtigsten Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich bindender und neutralisierender Antikörper gegen die TM-Proteine gp41 (HIV-1) und p15E (PERV) zusammengefasst. Im Zusammenhang mit der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1, welche an der MPER binden, wurden der Einfluss von Lipiden und die Glykosylierung diskutiert. Allerdings kann für diese Einflüsse keine abschließende Beurteilung gemacht werden, da experimentelle Versuche noch zu keiner hinreichenden Induktion von MPER-neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 gekommen sind.

Da das TM-Protein von PERV nicht glykosyliert und der Einfluss von Lipiden noch nicht gezeigt worden ist, sollen diese Aspekte nicht außer Acht gelassen werden und fließen in die abschließende Diskussion mit ein. Zusammenfassend zeigt sich, dass die TM-Proteine gp41 und p15E einige Gemeinsamkeiten, aber auch grundlegende strukturelle Unterschiede aufweisen (Tab. 1.03).

Als einzige Übereinstimmung eines Proteinsequenzvergleichs beider TM-Proteine konnte nur der Bereich der MPER identifiziert werden, an welchem bei HIV-1 der breitneutralisierende Antikörper 4E10 bindet (Abb. 1.09.).

```
>lcl|1217 unnamed protein product
Length=260

Score = 15.0 bits (27), Expect = 1.6, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 3/8 (38%), Positives = 6/8 (75%), Gaps = 0/8 (0%)

Query 132 WFDITKWL 139
      WF+ + W+
Sbjct 194 WFNRSFWM 201
```

Abbildung 1.09. Proteinsequenzvergleich zwischen gp41 (HIV-1) und p15E (PERV-A). Der Vergleich der Proteinsequenzen zwischen den kompletten TM-Proteinen gp41 (HIV-1; Acc. CAB96240) und p15E (PERV-A; Acc. CAA72927) zeigt nur im Bereich der MPER eine Übereinstimmung. Von den erkannten acht Aminosäuren sind drei identisch (alle bindungsrelevant für der HIV-1 neutralisierenden Antikörper 4E10) und drei weitere in ihrer Ladung (BLAST / National Library of Medicine, US).

Gemeinsamkeiten zeigen beide Viren auch bei der Wirkung von antiretroviralen Medikamenten. So entfalten Medikamente, die die Replikation von HIV-1 hemmen, ihre Wirkung auch gegen PERV. Darunter befanden sich die unspezifischen nukleosidischen RT-Inhibitoren Zidovudine (AZT) und Dideoxyinosine, die beide die Replikation hemmen (Powell *et al.*, 2000; Qari *et al.*, 2001; Stephan *et al.*, 2001). Von vier getesteten HIV-1 Genexpressions-Inhibitoren waren zudem zwei in der Lage, auch die PERV-Expression zu mindern (Shi *et al.*, 2009).

Da die getesteten Inhibitoren allerdings unspezifisch antiretroviral wirken, ist es nicht verwunderlich, dass diese sowohl bei HIV-1 als auch PERV wirken.

Tabelle 1.03. Vergleich zwischen den Transmembranproteinen p15E (PERV) und gp41 (HIV-1).

	PERV	HIV-1	Quelle
Ausbildung <i>six-helix-bundle</i> bei der Infektion	Ja (Annahme)	Ja	(Gallo <i>et al.</i> , 2003; Hazama <i>et al.</i> , 2003; Pan <i>et al.</i> , 2010; Watanabe <i>et al.</i> , 2005)
Glykosyliertes SU-Protein	Ja	Ja	(Kumar <i>et al.</i> , 2011; Leonard <i>et al.</i> , 1990; Ma <i>et al.</i> , 2011)
Glykosyliertes TM-Protein	Nein	Ja	(Denner, 2012; Lee <i>et al.</i> , 1992)
Bindende Antikörper nach p15E-Immunsierung/HIV-1-Infektion	NHR, Cys-Cys-Loop, CHR/MPER	NHR, Cys-Cys-Loop, CHR/MPER	(Bellamy-McIntyre <i>et al.</i> , 2007; Fiebig <i>et al.</i> , 2003; Finnegan <i>et al.</i> , 2002; Kaulitz <i>et al.</i> , 2011; Sattentau <i>et al.</i> , 1995; Xu <i>et al.</i> , 1991; Xu <i>et al.</i> , 2004)
Neutralisierende Antikörper	Ja, binden in der NHR und CHR/MPER*; ein weiterer bindet am Cystein-Loop	Ja, binden in der NHR und der MPER	(Chiang <i>et al.</i> , 2007; Fiebig <i>et al.</i> , 2003; Gustchina <i>et al.</i> , 2010; Kaulitz <i>et al.</i> , 2011; Miller <i>et al.</i> , 2005; Muster <i>et al.</i> , 1993; Sabin <i>et al.</i> , 2010; Zwick <i>et al.</i> , 2001)
MPER-spezifische Antikörper	Ja, ev. neutralisierend*	Ja, neutralisierend	(Kaulitz <i>et al.</i> , 2011; Muster <i>et al.</i> , 1993; Zwick <i>et al.</i> , 2001)
Einfluss von Membranlipiden auf MPER bzw. MPER-bindende Antikörper (z.B. 4E10)	-	Ja	(Haynes <i>et al.</i> , 2005; Huarte <i>et al.</i> , 2008; Huarte <i>et al.</i> , 2011; Matyas <i>et al.</i> , 2009a; Matyas <i>et al.</i> , 2009b; Sun <i>et al.</i> , 2008)
Interaktion zwischen FPPR/NHR und MPER/CHR	-	Ja	(Bellamy-McIntyre <i>et al.</i> , 2007; de la Arada <i>et al.</i> , 2009)

*keine detaillierte Betrachtung möglich, da NHR- und CHR/MPER-spezifische Antikörper gegen das TM-Protein bisher nicht einzeln untersucht worden sind

2. Zielsetzung

Grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die zuvor beschriebenen p15E-spezifischen Antikörper gegen das porcine endogene Retrovirus (PERV) genauer zu untersuchen und deren Induzierbarkeit zu erklären.

Frühere Immunisierungen mit der Ektodomäne des Transmembranproteins p15E induzierten Antikörper, die eine PERV-Infektion hemmen und die somit eine Übertragung von PERV bei einer Xenotransplantation verhindern könnten. Epitop-Kartierungen der Immunseren zeigten, dass diese Antikörper in der FPPR/NHR und CHR/MPER von p15E binden und es zwischen dem Epitop in der MPER und dem Epitop des breitneutralisierenden Antikörper 4E10 gegen HIV-1 eine Homologie in der Lokalisation sowie Aminosäuresequenz gibt.

Aus diesem Grund sollen durch verschiedene Immunisierungen und affinitätschromatographischen Aufreinigungen die FPPR/NHR- und CHR/MPER-spezifischen Antikörper hinsichtlich ihrer Bindung und Neutralisation untersucht werden.

Durch die Einbeziehung von Immunisierungsversuchen, die der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1 oder anderen (Gamma-)Retroviren dienen, sollen zudem mögliche Zusammenhänge zwischen PERV und HIV-1 beschrieben werden, um einen Beitrag zu einem effektiveren Antigen-Design bei Retroviren zu liefern.

Folgende Fragestellungen sollen in diesem Zusammenhang beantwortet werden:

- An welche Epitope binden die neutralisierenden p15E-spezifischen Antikörper gegen PERV?
- Wie können diese Antikörper induziert werden?
- Welche Zusammenhänge bestehen zwischen PERV und HIV-1 in Bezug auf die Induktion von TM-spezifischen Antikörpern?
- Welche strukturellen Eigenschaften sind maßgebend für ein erfolgreiches Antigen-Design?

3. Material

3.1 Reagenzien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Roth
Acrylamid (30%) Bisacrylamid (0.8%)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Roth
Rinderserum Albumin (BSA)	Roth
<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	Serva
<i>Protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche/Thermo Scientific
Ethanol, 99%	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fetales Kalbsserum	Biochrom
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Biochrom
L-Glutamin (200mM, steril)	PAA
ECL- Western Blot Reagenz	Thermo Scientific
Isopropanol	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol, 99%	Roth
Milchpulver	Sucofin
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumlaurylsulphat (SDS)	Roth
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris (hidroxymethyl) aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth

3.2 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
APS Lösung	10 % APS in H ₂ O
<i>Blocking</i> Lösung (Western-Blot)	5 % Milchpulver in PBS-T
<i>Blocking</i> Lösung (CNBr-Sepharose)	0,1 M Tris-HCl Puffer, pH 8,0
<i>Blocking</i> Lösung (ELISA)	PBS-T; 5 % BSA
CNBr-Puffer (pH 4,0)	0,1 M Na-Acetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0
CNBr-Puffer (pH 8,0)	0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8,0
<i>Coomassie Blue</i> -Färbelösung	0,5 % Coomassie G; 10 % Essigsäure; 40 % Methanol
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC in 1 l H ₂ O durch Schütteln lösen, über Nacht inkubieren; autoklavieren
DNA-Ladepuffer	40 % Glycerin; 2g SDS; 0,01 g Bromphenolblau; 0,3 M Tris/HCl pH 6,8
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin, pH 8,3; 0,1 % SDS
Elutionspuffer Antikörper-Aufreinigung	0,2 M Glycin pH 2,3
Elutionspuffer GST-Aufreinigung	10 mM red. L-Glutathion
Entfärber für SDS-Gele	40 % Methanol, 10 % Essigsäure
IPTG	200 mg/ml; steril filtrieren; aliquotieren; bei -20 °C aufbewahren
Kopplungspuffer für CNBr- Sepharose	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,3, 0,5 M NaCl
Natriumphosphat-Puffer	0,5 M NaH ₂ PO ₄ , 0,5 M Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 12 mM Phosphat
PBS-T	PBS, 0,05 % Tween-20
SDS-PAGE Probenpuffer (3x)	0,15 M Tris-HCl, pH 6,8; 30 % Glycerol; 6 % SDS; 0,003 % Bromphenol Blau; 75 mM DTT
Sammelgel Puffer (SDS-PAGE) (4x)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
Transferpuffer (Western Blot)	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; 0,04 % SDS
Trenngel Puffer (SDS-PAGE) (4x)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
TAE-Puffer (50x), pH 8,0	2 M Tris; 57% Essigsäure; 100 mM EDTA
TBS (Tris buffered saline) (10x)	0,5 M Tris/HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl
TBS-T	TBS, 0,05 % Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA

3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
AmpliTaq™ Gold DNA Polymerase	Invitrogen
HotStart Taq Polymerase	Segentic
BioTherm™ DNA Polymerase	Genecraft
BioThermStar™ DNA Polymerase	Genecraft
Lysozym (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
T ₄ -DNA-Ligase	Fermentas
Proteinase K	Fermentas
Penicillin/Streptavidin	PAA
Trypsin/EDTA (1x)	PAA
Thrombin	Qiagen
Restriktionsenzyme	Fermentas
Lysosym	Roth
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies

3.4 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller	
eukaryontischen Zellen	293T-Medium	500 ml DMEM; 10% FCS; 0,2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, 7,5 ml HEPES
	Einfriermedium	20 % DMSO; 80 % DMEM
	OptiPRO™ SFM (serumfreies Medium)	Fa. GIPCO
Bakterien- kultur	LB-Agar	35 g LB-Agar (Roth) für 1l
	LB-Medium	20 g LB-Medium (Roth) für 1l; 5 g NaCl

Die Medien für die Bakterienkultur wurden für 20 min bei 121°C sterilisiert. Nach Autoklavieren wurde dem Agar und den flüssigen Medien kurz vor der Verwendung Ampicillin hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 100 µg Ampicillin pro ml zu erhalten.

3.5 Sepharosen/gekoppelte Beads

Name	Hersteller
AminoLink Immobilization Kit	Thermo Scientific
CNBr-activated Sepharose™ 4B	GE Healthcare
Cross-linked Agarose mit Dextran (Gelfiltration)	GE Healthcare
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare
Protein G HP SpinTrap	GE Healthcare

3.6 Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step Kit	Bioline

3.7 Antikörper

primäre Antikörper

Für die Charakterisierung der Antigene im Vorfeld der Immunisierungen wurde das Ziegenserum 346 verwendet, das p15E-spezifische Antikörper enthielt. Für die Darstellung der Virusbestandteile wurde zudem das Ziegenserum 14 (anti-p27) und 62 (anti-gp70) verwendet. Alle drei Immunsereen wurden durch die AG Denner bereitgestellt.

sekundäre Antikörper

Die verwendeten sekundären Antikörper (α -Ratte, α -Kaninchen und α -Ziege) waren für die Western Blot- und ELISA-Analysen mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurden von DAKO (Dänemark) bezogen. Des Weiteren wurde für die Fluoreszenz- als auch FACS-Analyse ein Streptavidin-Konjugat verwendet, welcher mit AlexaFluor™ 488 (Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen) gekoppelt war, verwendet.

Für die Epitop-Mappings wurde ein DyLight™ 649-AffiniPure konjugierter Sekundärantikörper (α -Kaninchen bzw. α -Ziege-Antikörper) der Firma Jackson ImmunoResearch verwendet.

3.8 Filter und Membranen

Name	Hersteller
Amicon Ultra 15	Millipore
Blot-Papier	Bio-Rad
Dialyse-Schläuche	Serva
Western Blot-Membran	Millipore
Roti-Spin Mini	Roth

3.9 Vektoren, Bakterienstämme und Zelllinien

Bezeichnung	Genotyp	
Bakterienstämme [#]	BL21-CodonPlus™ (DE3)-RP	E. coli B F- ompT hsdS(rB, mB-) dcm ⁺ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam ^r]
	DH5 α	E. coli F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ - leu mtl1
	Top10 F'	E. coli F' lacIq, Tn10(TetR)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
	HEK-293T	

[#]als Expressionsstamm wurden hauptsächlich BL21-Zellen verwendet; DH5 α - als auch Top10-Zellen dienten als Klonierungsstamm

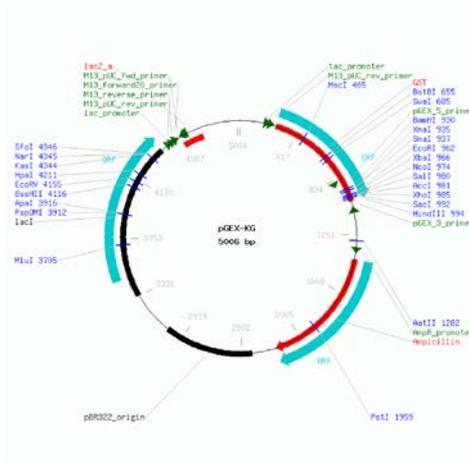


Abbildung 3.01. Vektorkarte des verwendeten Vektors pGEX-KG.

3.10 Primer und Sonden

	Primer/Sonden		Lokalisation	Genbank Acc.
Real-time PCR	hGAPDH-for	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	+365..385	AF261085
	hGAPDH-rev	TGGTCCACACCCATGACGA	-495..513	
	hGAPDH-probe	HEX-TTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG-BHQI	+407..430	
	PERV-gag for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	+1213..1232	AJ293656
	PERV-gag rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	-1289..1308	
	PERV-gag-probe	FAM-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT-BHQ1	+1244..1267	
Protein-Expression*	p15E-for	TTGAATTCTAGCTGCAGGCGTGGGA	+7579..7595	AJ133817
	p15E-rev	TTCTCGAGCTAGGTGGTCATCCAAGG	-7944..7958	
	NHR-for	TTGAATTCTAGCTGCAGGCGTGGGA	+7579..7595	
	NHR-rev	TTCTCGAGCTAAACCACTTCAGATAA	-7728..7742	
	CHR4K-for	TTGAATTCTACACTCAGGAGCCATC	+7833..7847	
	CHR4K-rev	TTCTCGAGCTATTTCTTTTCTTGGTGGT CATCCAAGG	-7944..7958	
	pGEX_5_primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	+869..891	pGEX-KG
	pGEX_3_primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	-1078..1056	(5006bp)
	C549A-for	CTAAAAGAAGGAGGGTTAGCTGTAGCCTTAAAAGAGG		
	C549A-rev	CCTCTTTTAAGGCTACAGCTAACCCCTCCTTTTCTTTAG		

* die for-Primers enthalten eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle; die rev-Primers eine XhoI-Restriktionsschnittstelle

3.11 Peptide und Peptid-Microarrays

Die Synthese der Peptide für die ELISA-Untersuchungen als auch Inhibierungsversuche erfolgte durch die Firmen Genaxxon BioScience GmbH sowie GeneCust Europe. Die aliquotierten Mengen wurden in PBS gelöst (1mg/ml). Die Peptid-Microarrays für die Epitop-Kartierungen wurden über die Firma JPT Peptide Technologies GmbH bezogen. Die Aminosäure-Sequenz entspricht den Positionen 463 bis 660 des Env-Proteins mit der GenBank Nummer: CAA72927.

Bezeichnung	Sequenz (Nummerierung CAA72927)
FPPR-abgeleitetes Peptid (kurz: FPPR)	⁴⁷⁸ AAGVGTGTAALITGPQQLEKGLS ₅₀₀
MPPR-abgeleitetes Peptid (kurz: MPPR)	⁵⁸⁵ EREADQGWFEFGWFNRSPWMTTL ₆₀₄
Randomisiertes FPPR	ALRLGQELISGHNAPIKTQTLG
Randomisiertes MPER	TWPGEFWRSTNMLDWEQARFGE
M1	⁴⁹⁶ EKGLSNLHRIVTEDLQALEKSV ₅₁₇
M2	⁵⁰⁸ EDLQALEKSVSNLEESLTSLS ₅₂₉
Aminosäure-Sequenz des Peptid-Microarrays	⁴⁶³ EPISLTLAVMLGLGVAAGVGTGTAALITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSSEVVLQNRRLDLDLLFLKEGGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLERRRREREADQGWFEFGWFNRSPWMTTLLSALTGPLVLLLLLLTVGPCLINRFVAFVRERVSQIMVLRQQYQGLLSQGETDL ₆₆₀

3.12 Versuchstiere

Tier	Anzahl	Bezieher	Versuchsort
Wismar-Ratte	16	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Kaninchen (Chinchilla Hybride)	7	BfR	BfR-Tierstall
Ziege	1	BfR	BfR-Tierstall

3.13 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Elektrophoresekammer	BioRad
Äkta-Explorer 10S	GE Healthcare
Analysewaage	Sartorius
Curix 60	Agfa
Detektionsgerät für Agarose- & Western Blot-Gele	Chemocam Imager, INTAS
ELISA-Reader Spectra Classic	TECAN
FACS-Gerät	FACS Calibur E3476
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss LSM 780 (inverses)
Heizblöcke	Eppendorf
PCR Maschinen	Eppendorf
pH-Meter	Mettler-Toledo
Schüttler für SDS-Gele/Blots	CFL, Heidolph
SDS-Gelgießapparatur	BioRad
SDS-Elektrophoresekammer	BioRad
Spektrophotometer	Nandrop Technologies
Sterilbänke	Thermo Scientific
Stromversorgungsgeräte	BioRad
Trans-Blot™ SD Semi-dry Blotter	BioRad
Ultraschall-Homogenisator	Branson
Zentrifugen	Eppendorf, Beckman

3.14 Marker

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Ready-to-Use	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

Die Isolation von RNA und DNA aus den in der Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen und Bakterien erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits. Nach Isolation der RNA wurde diese gleich eingefroren, um einen Abbau zu minimieren. Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden die Plasmide räumlich getrennt von der DNA isoliert.

Tabelle 4.01. Übersicht der Kits für die RNA und DNA Isolierung.

	Kit	Protokoll, Änderungen
DNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	QIAmp DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen)	nach Anleitung des Herstellers, Elution mit 200 µl AE-Puffer
RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	RNeasy Mini Kit (Qiagen)	nach Anleitung des Herstellers, Elution mit 50 µl DEPC-Wasser
DNA-Elution aus Agarosegelen	QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)	nach Anleitung des Herstellers
Plasmid-Isolation aus Bakterienkulturen	QIAprep Spin Miniprep Kit/ QIAGEN Plasmid Midi Kit	nach Anleitung des Herstellers, Elution mit 200 µl (Midi-Prep) bzw. 100 µl (Mini-Prep) TE-Puffer

Nach durchgeführter Plasmid-Isolation und DNA-Elution aus Agarosegelen/Zellen wurden die Nukleinsäurekonzentrationen am ND-1000 NanaDrop® (peqlab, Deutschland) vermessen. Über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm konnte auch gleichzeitig die Reinheit der Probe ermittelt werden.

4.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.1.2.1 Klonierung von PCR-Fragmenten/Transformation von *E.coli*

Für das Klonieren der PERV-Konstrukte wurden verschiedene Primer konstruiert, welche die Zielsequenz flankieren und zusätzlich Restriktionsschnittstellen enthalten. Diese Restriktionsschnittstellen dienen der gerichteten Klonierung in den verwendeten pGEX-KG Vektor. Um eine höhere Effizienz des Produkts zu erhalten, wurden zuvor die PERV-Konstrukte über ihren Adenin-Überhang in einen pSSTA-Vektor kloniert (TA-cloning), in *E. coli* transformiert und anschließend durch einen Restriktionsverdau wieder herausgeschnitten. Die nach Auftrennung aus einem Agarose-Gel ausgeschnittenen Amplifikate sind zu 100 % mit den Restriktionsschnittstellen versehen und können in einen ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten pGEX-KG-Vektor kloniert werden.

Tabelle 4.02. Pipettier- und Reaktionsschema für das gerichtete Klonieren.

Reagenz	Stocklsg.	Finale Konz./Ansatz
PCR-Puffer	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	1,7 mM
dNTPs	Je 10 mM	Je 0,5 mM
Primer (je)	10 pmol/μl	5 pmol
Taq-Polymerase	5 U/μl	1,25 U
DNA-Template		
Programm: 10 min 94°C – 34x [1 min 94°C – 1 min 65°C – 2 min 72°C] – 5 min 72°C – ∞ 4°C		

Tabelle 4.03. Pipettier- und Reaktionsschema der durchgeführten Restriktionsanalyse

Reagenz	pSSTA/PERV bzw. pGEX-KG
DNA/Vektor (>1 μg)	26 μl
10x NEB-Puffer 4	3 μl
EcoRI	0,5 μl
XhoI	0,5 μl
H ₂ O	-
Inkubation für 1,5 Stunden bei 37°C	

Für das Zusammenfügen entsprechend geschnittener Inserts und Vektoren wurde folgender Ligationsansatz verwendet.

Tabelle 4.04. Pipettierschema für eine Ligation

Reagenz	Menge
Insert-DNA	6 µl
dephosphorylierte Vektor-DNA	3 µl
10x Ligase-Puffer	3 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O	17 µl
Inkubation für 3 Stunden bei 16°C	

Für die Transformation von kompetenten *E. coli* (Stamm: XL1-Blue, Stratagene) wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock. Zu den auf Eis auftauenden Zellen wurde die Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C an. Anschließend wurden die Zellen für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf der Agarplatte wurden die Zellen für eine Stunde in 100 µl LB-Medium bei 37°C inkubiert.

4.1.2.2 Kolonie-PCR

Um nach erfolgter Transformation eines Ligationsansatzes einen positiven Klon zu identifizieren, kann eine einzelne *E. coli*-Kolonie direkt einer PCR unterzogen werden. Die Kolonie wird dabei direkt in den PCR-Ansatz (1x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM NTP (je); 5 pM je Primer; 1,25 U Polymerase) gegeben und anschließend ein Replikat auf eine neue LB-Agarplatte ausgestrichen, um den Klon nach erfolgreicher PCR weiter verwenden zu können. Durch spezifische Primer des pGEX-Vektors – welche vor und nach dem Insert binden – kann anhand der Größe des Amplifikates ein positiver Klon identifiziert werden.

Tabelle 4.05. PCR-Programm für die Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Initialisierung	94°C	10 Minuten	1
Denaturierung	94°C	1 Minute	} 35x
Annealing	65°C	1 Minute	
Elongation	72°C	2 Minuten	
Abschlusselongation	72°C	5 Minuten	1
Kühlung	4°C	∞	1

4.1.2.3 Sequenzierungs-PCR

Bei der Sequenzierungsmethode nach Sanger werden zu einem PCR-Ansatz dNTPs mit fehlender 3'-Hydroxylgruppe und gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen gegeben, die bei der Elongation zu Kettenabbrüchen führen. Nach Größenauftrennung der Amplifikate ist die Sequenz anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzen detektierbar. Folgender Ansatz wurde durch das RKI-interne Sequenzierlabor empfohlen: 2 µl BigDye-Mix 3.1; 1 µl 5x ABI-Puffer; 0,5 µl Primer (entweder forward oder reverse, 10 pmol/µl); 2 µl DNA. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Lasergene 8 (DNASTAR).

Tabelle 4.06. PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
Initialisierung	1	96°C	2 Minuten
Denaturierung	25	96°C	10 Sekunden
Annealing	25	55°C	5 Sekunden
Elongation	25	60°C	4 Minuten
Kühlung	1	4°C	∞

4.1.2.4 Real-time PCR

Für die quantitative Bestimmung der PERV-Expression von infizierten Zellen (z.B. in einem Neutralisationsassay) wurde sich einer bereits etablierten *real-time* PCR bedient (Kaulitz *et al.*, 2011). Dabei wird die gesamte PERV-DNA einer Zelle (bestehend aus integriertem Provirus im Genom der infizierten Zelle und neu transkribierter Virus-DNA) quantitativ

gemessen. Diese Messung beruht auf Anlagerung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden (hier: PERV gag- und humane GAPDH-Sonden), die sich bei den PCR-Zyklen an die PCR-Produkte lagern und es dadurch zu einer Erhöhung der Fluoreszenz kommt. Zur Auswertung werden die *ct*-Werte (*cycle threshold*, Schwellenwert) der unterschiedlichen Ansätze verglichen. Der *ct*-Wert gibt an, bei welcher Zyklusanzahl die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und im Vergleich zu Kontrollen Auskunft gibt, ob viel oder wenig Kopien des zu untersuchenden Genes vorliegen.

Tabelle 4.07. Pipettierschema und PCR-Programm für die *real-time* PCR

Reagenz	Stocklsg.	Finale Konz./Ansatz
PCR-Puffer	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	1,7 mM
dNTPs	Je 10 mM	Je 0,5 mM
GAPDH/PERV gag-Primer (je)	10 pmol/μl	5 pmol
GAPDH/PERV Sonde (je)	10 pmol/μl	5 pmol
HotStart Polymerase	5 U/μl	1,25 U
Programm: 12min 95°C – 45x [1min 95°C – 1min 55°C – 0,5min 72°C]		

Für die Bestimmung der Kopienzahl des *gag*-Gens (AJ133817) in einem pipettierten Ansatz wurde eine Eichgerade durch das vorhandene Plasmid erstellt. Dazu wurde das Plasmid in bekannten Konzentrationen ausverdünnt und anschließend über die Anzahl der Nukleotide und des *ct*-Wertes der einzelnen Konzentrationen die Kopienzahl berechnet (Ergebnis siehe Anhang 8.3).

4.1.2.5 Reverse Transkription (RT)-PCR

Zwecks Überprüfung, ob integrierte Provirus-DNA auch abgelesen und in Virionen verpackt wird, kann isolierte RNA (siehe Abschnitt 4.1.1) aus den infizierten Zellen mit Hilfe der reversen Transkription komplementär in DNA-Stränge umgeschrieben und anschließend einer PCR unterzogen werden. Für diese Arbeit wurde ein RT-Kit (SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step Kit) der Firma Bioline verwendet, bei dem die reverse Transkriptase und eine Taq Polymerase in einem Ansatz vorliegen. Somit musste auch nur ein Programm mit dem Zykler ausgeführt werden.

Tabelle 4.08. Pipettierschema und PCR-Programm für die RT-PCR

Reagenz	Stocklsg.	Finale Konz./Ansatz
Reaktions-Mix	2x	1x
Primer rev.	10 pmol/μl	400 nM
Primer for.	10 pmol/μl	400 nM
Reverse Transkriptase		0,2 μl
RiboSafe RNase Inhibitor		0,4 μl
RNA-Template		4 μl
H ₂ O		ad 16 μl
Programm: 20 min 45°C – 2 min 95°C - 40x [5 sec 95°C – 20 sec 60°C] - ∞ 4°C		

4.1.2.6 Punktmutation (site-directed mutagenese)

Zwecks Deletion eines Cysteins, das an der Ausbildung des Cystein-Loops bei dem TM-Protein p15E beteiligt ist, wurde eine Punktmutation direkt am pGEX-KG-p15E Vektor vorgenommen. Dabei wird durch Austausch eines Basenpaares eine gezielte Mutation in ein Basentriplett eingeführt, das schlussendlich eine andere Aminosäure in das Protein einbaut. Ein Primerpaar, das direkt an den Bereich der gewünschten Mutation bindet, enthält mittig ein neues Basentriplett, um bei einer PCR das gewünschte Amplifikat zu erhalten. Die methylierten Parental-Stränge werden durch DpnI verdaut, um den Hintergrund zu minimieren. Durch eine anschließende Transformation, Kolonie-PCR, Mini-Prep und Sequenzierung wurden mutationspositive Klone ausgewählt.

Tabelle 4.09. Pipettierschema und PCR-Programm für die Punktmutation

Reagenz	Stocklsg.	Finale Konz./Ansatz
PCR-Puffer	10x	1x
dNTPs	Je 10 mM	Je 0,5 mM
Primer (je)	25 mM	10 pmol
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	5 U/μl	1,25 U
Template (pGEX-KG/p15E)		10 ng
Programm: 1 min 94°C – 18x [0,5 min 94°C – 1 min 55°C – 2,5 min 72°C] - ∞ 4°C		

4.2 Protein-Techniken

4.2.1 Protein-Expression in *E. coli* und Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen

Nach erfolgreicher Transformation (siehe Abschnitt 4.1.2.1) konnte eine Kolonie der Agar-Platte in einer Übernachtskultur für die Protein-Expression vorbereitet werden. Die Übernachtskultur wurde für die Expression in der Verdünnung 1/100 mit neuem LB-Medium gemischt und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 500 µl einer 1 M IPTG-Lösung dem 500 ml Kulturmedium zugesetzt und der Ansatz für weitere 4-5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach ist die Bakterienkultur bei 6.000 x g für 10 min zentrifugiert worden. Nach einem weiteren Waschschrift der Bakterienpellets mit PBS konnte der Aufschluss der Bakterien durch Lysozym und anschließender Ultraschall-Behandlung erfolgen. Die unlösliche Proteinfraction wurde nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 min abgetrennt, um die löslichen Glutathione S-transferase (GST-) gekoppelte Proteine im Überstand für die affinitätschromatographische Aufreinigung verwenden zu können.

Tabelle 4.10. Übersicht der exprimierten und aufgereinigten Proteine

Name	Proteingröße	Aufreinigungsmethode*
GST-p15E	(aa478-602)	Manuelle Pumpe, Äkta
GST-FPPR/NHR	(aa478-532)	Manuelle Pumpe, Äkta
GST-CHR/MPER4K	(aa562-602)	<i>Batch</i> -Verfahren
GST-p15E(C549A)	(aa478-602)	Äkta

* für eine optimale Aufreinigung in Reinheit und Menge wurden verschiedene Methoden ausprobiert

Für die Aufreinigung wurde Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) als Matrix, an welche GST-gekoppelte Proteine binden, verwendet. Die Aufreinigung erfolgte entweder im *Batch*-Verfahren, in einer Säule mit manueller Pumpe sowie an einem Äkta-Automat (GE Healthcare) (Tab. 4.10.) und bestand im Wesentlichen aus drei Schritten: Beladung – Waschen – Elution. Als Waschpuffer wurde PBS verwendet. Die Elution von p15E und p15E(C549A) erfolgte durch den direkten Verdau mit Thrombin auf der Säule, so dass nach Verdau bei 4°C über Nacht ungetaggte rekombinanten Protein eluiert werden konnten. Da die Proteine FPPR/NHR und CHR/MPER4K zu klein waren, um ohne tag aufgereinigt zu

werden, wurden die rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K durch reduzierte Glutathion-Lösung eluiert.

Um sowohl das Thrombin als auch das reduzierte Glutathion aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde alle Lösungen einer Dialyse gegen PBS (für die Immunisierungen) bzw. dem Kopplungspuffer (für die Immobilisierung) unterzogen.

Tabelle 4.11. Aufreinigungsschema der rekombinanten Proteine

Verfahren	Beladung	Waschen	Elution
Manuelle Pumpe	ü. N. 4°C	20 Volumenteile	Thrombin (ü. N. 4°C) bzw. red. Glutathion (10 Volumenteile)
Batch-Verfahren	ü. N. 4°C	3x10 Volumenteile	
Äkta Explorer 10S	2h RT	60 Volumenteile	

4.2.2 Isolierung von Immunglobulinen G

Da Serumbestandteile nach erfolgter Immunisierung Einfluss auf einen Neutralisationsversuch nehmen können, wurden in der Regel die Immunglobuline G (IgG) aus den Kaninchen-, Ratten- und Ziegensereren isoliert. Für größere Mengen – wie bei den Kaninchen- und Ziegensereren – wurden die IgGs mit Hilfe von 4M eiskalten Ammoniumsulfat gefällt. Dabei sind gleiche Anteile an Serum und Ammoniumsulfat-Lösung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert worden. Nach Zentrifugation der gefällten Antikörper bei 10.000 x g für 10 min wurde das Pellet in 2/3 des Originalvolumens in PBS resuspendiert und erneut im Verhältnis 1:1 mit der Ammoniumsulfat-Lösung gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1/5 des Original-Volumen in PBS resuspendiert und um das Ammoniumsulfat vollständig zu entfernen gegen PBS dialysiert.

Die Isolierung von Ratten-IgGs erfolgte nach Anleitung mit Hilfe von Protein G HP SpinTrap-Säulen (GE Healthcare).

4.2.3 Aufreinigung von spezifischen Antikörpern

Für die Isolierung von Antikörpern, die spezifisch an NHR/FPPR- und CHR/MPER bzw. p15E binden, wurden die rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR, GST-CHR/MPER4K und GST-p15E kovalent an Cyanbrom-(CNBr) aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt. Diese Matrix stellt eine der meist studiertesten und zum Einsatz gebrachte Matrix dar (Trier

et al., 2012). Dazu wurden 1 g CNBr-Sepharose 4B in 200 ml 1 mM HCl gewaschen und aufgequellt. Die Proteine wurden vor Kopplung gegen den Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃) dialysiert. Über Nacht wurde dann das Protein bei leichter Rotation im Kühlraum an die CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Nicht gekoppelte Proteine wurden durch 10 ml Kopplungspuffer entfernt; freie Bindungsstellen wurden durch 100 mM Tris-HCl abgeblockt. Vor Inkubation mit dem Serum wurde die gekoppelte Sepharose in zwei Puffer (pH 4,0 und pH 8,0) abwechselnd gewaschen. Die anschließende Isolation der spezifischen Antikörper (Bindung-Waschen-Elution) wurde entweder manuell mit einer Pumpe (bei 4°C) als auch automatisch an einem Äkta-System (bei Raumtemperatur) durchgeführt. Als Waschpuffer wurde PBS, als Elutionspuffer 0,2 M Glycin pH 2,35 verwendet. Pro 1 ml (250 µl) Elution wurden 50 µl (12,5 µl) 1 M Tris pH 8,6 zwecks auspuffern vorgelegt. Anschließend wurden die eluierten Antikörper gegen PBS dialysiert, ggfls. aufkonzentriert und deren Menge bestimmt.

Tabelle 4.12. Aufreinigungsschema mit gekoppelter CNBr-Sepharose

Verfahren	Beladung	Waschen	Elution
Manuelle Pumpe	ü. N. 4°C	20 Volumenteile	10 x 1 ml
Äkta Explorer 10S	2h RT	60 Volumenteile	20 x 250 µl

4.2.4 Aufkonzentration von Proteinlösungen

Eine Aufkonzentration von Protein- und Antikörperlösungen erfolgte durch die Verwendung von Amicon Ultra-15- (Millipore) bzw. Roti-Spin Mini (Roth) Säulen. Dabei wurden die Lösungen in die dafür vorgesehene Filtereinheit gefüllt und anschließend für 20 bis 30 Minuten (Amicon Ultra) bzw. 4-5 Minuten (Roti-Spin Mini) bei 25°C und 4.000 x g zentrifugiert. Das Konzentrat konnte anschließend aus der Filtereinheit entnommen werden.

4.2.5 Dialyse

Da eine Proteinlösung für die durchgeführten Immunisierungen und Kopplungen an CNBr-Sepharose frei von Detergenzien und anderen denaturierenden Reagenzien sein sollte, erfolgte eine Dialyse gegen PBS. Dazu sind entsprechend der Anleitung für Dialyseschläuche

von der Firma Serva geeignete Längen an Schläuchen vorbereitet und anschließend mit der Proteinlösung gefüllt worden. Die Dialyse fand in zwei Stufen statt: zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS (Verhältnis Proteinlösung:PBS 1/200) und ein weiteres Mal in frischem PBS über Nacht bei 4°C.

4.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine und der eluierten Antikörper nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung erfolgte zum einen am NanoDrop® ND-1000 (peqlab, Deutschland) und zum anderen im gefärbten SDS-Gel mit Hilfe einer BSA-Vergleichsreihe. Bei der Absorptionsmessung bei 280 nm am NanoDrop® ist diese hauptsächlich durch Tyrosin und Tryptophan, zu einer sehr geringen Menge auch durch Phenylalanin und Disulfid-Brücken bedingt. Da in Proteinen unterschiedliche Anteile der oben genannten Aminosäuren vorhanden sind, unterscheidet sich der Extinktionskoeffizient einer 1mg/ml Proteinlösung je nach Zusammensetzung des Proteins und muss bei der Konzentrationsbestimmung mit einbezogen werden.

Tabelle 4.13. Extinktionskoeffizienten der vermessenen Proteine

Probe	Extinktionskoeffizient ϵ (Wilkins <i>et al.</i> , 1999)
p15E(aa478-602)	1,284 l/(mol*cm)
GST-FPPR/NHR	1,052 l/(mol*cm)
GST-MPER/CHR4K	1,653 l/(mol*cm)
Immunglobuline G	1,350 l/(mol*cm)

4.2.7 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung und Darstellung von Proteinen erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer Apparatur von BioRad, die nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese arbeitet. Dabei besteht das Gel aus einem Trenn- und Sammelgel mit verschiedenen pH-Werten. Entsprechend der zu untersuchenden Proteingröße kamen verschiedene Acrylamidkonzentrationen des Trenngels zum Einsatz. Das Trenngel wurde in die Gelapparatur von BioRad gegossen und mit Isopronanol

überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen.

Tabelle 4.14. Zusammensetzung des Trenngels (Angaben in ml)

Lösung	finale Acrylamidkonzentration			
	5 %	10 %	15 %	20 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	2,50	5,00	7,50	10,00
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75
H ₂ O	8,75	6,25	3,75	1,25
10 % (w/v) APS	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01

Tabelle 4.15. Zusammensetzung des Sammelgels

Lösung	Volumen (in ml)
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	0,65
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25
H ₂ O	3,05
10 % (w/v) APS	0,036
TEMED	0,006

Vor Beladen des Gels mit den Proben wurden diese mit 4x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel mit *Coomassie Blue* gefärbt bzw. für eine Western Blot-Analyse geblottet.

4.2.8 Gelfiltration

Zur Darstellung von Interaktionen und die Bestimmung der Polymerisierung der rekombinanten Proteine sind diese einer Gelfiltration unterzogen worden. Dazu wurde eine Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) an den Äkta Explorer 10S geschlossen. Bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde die Proteine im PBS-Laufpuffer über die Säule gegeben. Als Referenzen für das Elutionsverhalten wurde ein Mix aus BSA (69 kDa) und DNase I (37 kDa) auf die Säule gegeben.

4.3 Zellbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten zur Zellkultur erfolgten unter einer Sterilwerkbank. Dabei sind ausschließlich autoklavierte bzw. steril gekaufte Materialien / Medien verwendet worden. Alle Gefäße wurden vor Verwendung in der Sterilwerkbank desinfiziert; nichtautoklavierbare Flüssigkeiten wurden vor Gebrauch steril filtriert.

4.3.1 Kultivieren von 293T-Zellen

Die Kultivierung der adhärennten 293T-Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Um ein konfluentes Wachstum zu vermeiden, wurden die Zellen alle 3-4 Tage in einem Verhältnis 1:4 bzw. 1:5 gesplittet und in frisches DMEM-Medium überführt. Es wurde sichergestellt, dass die Zellen keine höhere Konfluenz als 80 % besaßen. Ein Ablösen der Zellen erfolgte durch Trypsin-EDTA.

Die Zellzahlbestimmung für z.B. Neutralisationsassays erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurden zu gleichen Anteilen Zellsuspension und eine 0,4 %-ige Trypanblau-Lösung vermischt, in die Zählkammer eingebracht und mithilfe eines Mikroskops gezählt.

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für den Erhalt/Fortbestand von Zelllinien ist es zwingend notwendig, dass jederzeit neue Zellen zur Verfügung stehen – vor allem wenn es zu Kontaminationen kommt. Dazu ist es unumgänglich, dass Zellen eingefroren und aufgetaut werden. Dabei ist zu beachten, dass das Einfrieren langsam und das Auftauen ganz schnell erfolgen müssen.

Das Einfrieren erfolgt in einem Isopropanol-Bad, das die Temperatur um 1°C pro Stunde senkt. Dazu werden gleiche Volumenteile Einfriermedium (enthält DMSO) und resuspendierte Zellen in ein gefriertaugliches Gefäß (Kryoröhrchen) gegeben und im Isopropanol-Bad bei -80°C aufbewahrt. Nach 24h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zusammen mit frischem Zellmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erfolgter Zentrifugation konnten die Zellen vom toxischen DMSO getrennt und in entsprechend vorbereitete Kulturschalen überführt werden.

4.3.3 Herstellung neuer Virus-Stocks

Für die Herstellung von neuen Virus-Stocks zur Durchführung von Neutralisationsassays wurden Überstände von konfluent-gewachsenen und schon vorher durch einen PERV A/C-Klon infizierte 293T-Zellen auf uninfizierte 293T-Zellen gegeben. Nach dreimaligen Splitten der Zellen und Überführen in große Kulturflaschen konnten erneut Überstände entnommen werden. Nach Zentrifugation der Überstände bei 4000 x g für 10 min und Filtration (0,45 µm) konnten die Virus-Stocks zu 1 ml Portionen direkt in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden. Die Titration der Überstände erfolgte nach gleichen Bedingungen wie der Neutralisationsversuch, allerdings ohne Verwendung eines Antikörpers. Angestrebt wurde, ein hochtitriges Virus zu erhalten, das bei einer hohen Verdünnung in einer *real-time* PCR immer noch eine Infektion zeigt (siehe Abschnitt 4.4.4.).

4.3.4 Immunpräzipitation

Für einen Nachweis, dass p15E-spezifische Antikörper direkt mit dem Virus interagieren wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden p15E-spezifische Antikörper aus dem Ziegenserum 350 an Protein G-gekoppelter Sepharose immobilisiert. Nach mehrmaligem Waschen der Sepharose, um ungebundene Antikörper zu entfernen, fand eine Inkubation mit zellfreiem Virus-Überstand statt. Weitere Waschschritte mit PBS entfernten nicht gebundene Viren. Anschließend wurde die Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgekocht und für eine SDS-PAGE verwendet. Nach Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Membran, fand die Detektion möglicher p15E-Proteine durch ein Kaninchen-Serum statt, das ebenfalls p15E-spezifische Antikörper enthielt. Durch die Detektion mit einem Antikörper einer anderen Tierspezies wurde verhindert, dass durch den Sekundärantikörper (α -Kaninchen) die immobilisierten p15E-Antikörper des Ziegenserums detektiert worden sind.

4.3.5 Erzeugung kompetenter Bakterien

Für die Erzeugung kompetenter Zellen ist zunächst eine Vorkultur mit 5 ml LB-Medium angesetzt worden. Nach Inkubation über Nacht im Schüttler bei 37°C wurde die Kultur am nächsten Tag in 500 ml neues LB-Medium überführt. Erreichte die Bakterienkultur eine OD600 von 0,4 bis 0,6, wurde die Bakterienkultur auf Eis (versetzt mit NaCl)

heruntergekühlt. Anschließend erfolgte bei 3.500 x g, 4°C und für 8 min das Abzentrifugieren der Bakterien. Das Bakterienpellet wurde in 200 ml vorgekühlter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und einer weiteren Zentrifugation unterzogen. Nach Verwerfen des Überstands ist das Pellet in 200 ml vorgekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert worden. Anschließend wurde die Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation und dem Resuspendieren der Zellen in 15 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung und 2,5 ml 87%-igem Glycerol konnten neue kompetente Zellen erzeugt werden.

Die Zellen wurden anschließend aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.4 Immunologische Techniken

4.4.1 ELISA

Mit dem *Enzyme Linked Immunsorbent Assay* (ELISA) wurde der Antikörpertiter der Seren sowie der aufgereinigten Antikörper-Lösungen bestimmt. Zudem konnte durch die Verwendung unterschiedlicher Peptide überprüft werden, welche Antikörperpopulationen nach den Aufreinigungen (siehe 4.2.3.) vorlagen.

Für einen ELISA wurden 100 ng FPPR- bzw. MPER-Peptid pro well einer 96-well Mikroplatte (Microlon, Greiner) durch Eintrocknen über Nacht bei 37°C immobilisiert. Die Inkubationen der Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) erfolgten bei 37°C, die Waschschrte mit PBS-T mithilfe des 96 Plate Washer™ (TECAN). Für die Seren wurden in der Regel folgende Verdünnungen gewählt: 1/40-1/5.120; für die Antikörper: 0,3 - 80 µg/ml. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde 1/2.000 eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte mit 80 µl einer o-Phenylenediamin- Dihydrochlorid-Lösung (1 mg/ml). Die einsetzende Farbentwicklung wurde nach acht Minuten durch die Zugabe von weiteren 80 µl 5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Farbreaktion wurde photometrisch bei 490/620 nm im ELISA Reader (TECAN) gemessen.

Tabelle 4.16. ELISA-Arbeitsschritte

Schritt	Puffer/Lösung	Zeit/Wiederholungen
1. Blockieren	5% BSA/PBS-T	mind. 1h
2. Waschen	PBS-T	1x
3. Inkubation mit Seren/isolierten Antikörpern	in 2,5 % BSA/PBS-T	1,5h
4. Waschen	PBS-T	3x
5. Inkubation mit Sekundärantikörper/HRP	In 2,5 % BSA/PBS-T	1h
6. Waschen	PBS-T	7x
7. Entwicklung	OPD/5M H ₂ SO ₄	<10min

Neben der Titerbestimmung wurde mithilfe des ELISA die Interaktion zwischen verschiedenen PERV-Peptiden überprüft (Kumada *et al.*, 2007). Dazu wurden verschiedene NHR-Peptide über Nacht auf der ELISA-Platte immobilisiert. Nach Blockieren mit BSA wurde ein Biotin-gekoppeltes CHR-Peptid hinzugegeben. Nach Waschen mit PBS-T wurde ein Streptavidin-Konjugat/HRP verwendet, welcher an Biotin bindet. Dadurch war es möglich Interaktionen zwischen den NHR-Peptiden und dem CHR-Peptid detektieren zu können.

4.4.2 Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry-Blotters (BioRad) aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Gel wurde zusammen mit der Membran zwischen je zwei Lagen aus Whatman-Papier eingebettet. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran bei einer Spannung von 18-20 V für 30 min. Nach Blockieren der Membran konnte die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen. Dies erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen und der Inkubation mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper in einer 1/2000 Verdünnung in PBS-T unterzogen. Nach dreimaligem Waschen konnten die Proteine durch Chemilumineszenz unter Verwendung einer *enhanced chemiluminescent* (ECL)-Lösung und anschließendem Belichten und Entwickeln eines Röntgenfilms bzw. Detektion durch ein ECL-Imager (Chemocam Imager, Firma Intas) sichtbar gemacht werden.

4.4.3 Epitop-Kartierung

Für die Identifikation der Bindungsstellen der induzierten Antikörper gegen p15E sind PepStar Microarray-Chips (JPT Peptide Technologies) zum Einsatz gekommen. Diese bestehen aus einem Objektträger, der mit Peptiden mit einer Länge von 15 Aminosäuren und einer Überlappung von jeweils zwölf Aminosäuren gespottet ist. Die Epitop-Kartierungen wurden nach beigelegter Anleitung durchgeführt. Zuerst fand eine Inkubation der Chips mit den Immunseren über Nacht bei 4°C statt. Nach drei Waschschrritten mit TBS erfolgte die Inkubation mit einem DyLight™ 649-AffiniPure konjugierten Sekundärantikörper (α -Kaninchen, α -Ziege; Jackson ImmunoResearch). Abermals wurde der Objektträger mit TBS (fünfmal) gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Zur Trocknung wurde der Objektträger bei 500 x g für eine Minute in einem speziellen Träger (Eppendorf) zentrifugiert. Ein GenePix 4000B Scanner (Molecular Devices) diente der Fluoreszenz-Detektion.

4.4.4 Neutralisationsassay

Der Neutralisationsassay beruht auf der Hemmung der Infektion von 293T-Zellen mit zellfreien Überstand mit einem PERV A/C-Klon (Karlus *et al.*, 2010). Dafür sind 100 μ l nicht-infizierte 293T-Zellen (30.000 Zellen/ml) pro well einer 96-well Mikrotiter Platte (Greiner) ausgesät worden und für 24 h bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ anwachsen lassen. Verschiedene Mengen an Serum bzw. aufgereinigten Antikörpern (in 50 μ l Medium) sind mit infektiösen PERV (auch in 50 μ l Medium) für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben worden. Nach 72 h der Inkubation wurde das Medium entfernt, und die Zellen sind durch dreimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (+100°C) im Wechsel je 10 min lysiert worden. Für 4 h folgte bei 56°C ein Proteinase K-Verdau (0,2 mg/ml Proteinase K; 1x PCR-Puffer; 100 μ l/well). Die Proteinase K wurde vor dem Ansetzen der *real-time* PCR für 30 min bei 100°C hitzeinaktiviert.

Jeweils 3 μ l des Lysates wurden in einer duplex *real-time* PCR (siehe Abschnitt 4.1.2.4) nach PERV *gag* als auch humanem *GAPDH* analysiert. Grundlage für die Auswertung der Neutralisationsversuche ist die Differenz zwischen dem *ct*-Wert von *GAPDH* und dem *ct*-Wert von PERV [Δ ct=ct(PERV-A/C)-ct(*GAPDH*)] (für die Erklärung des *ct*-Wertes siehe Abschnitt 3.4.). Die Einbeziehung des Kontroll-Gens *GAPDH* ist für eine korrekte Darstellung der genetischen PERV-Expression notwendig.

Für eine optimale Infektion der 293T-Zellen (Durchinfektion) wurde bei diesem Assay unter den oben beschriebenen Bedingungen definiert, dass der *ct*-Wert von PERV bei etwa 25/26 und der von *GAPDH* bei ungefähr 24/25 liegt sollte. Somit ergibt sich für die Durchinfektion $\Delta ct=1/2$. Ferner wurde der *cut-off* auf 1 *ct*-Wert über den Δct des Präimmunserums bzw. isolierte IgGs des Präimmunserums festgelegt, um erst bei einer Reduzierung von mehr als 50% von PERV *gag* von einer Neutralisation/Hemmung zu sprechen. Diese Angabe entspricht in etwa der Darstellung des IC50-Wertes für neutralisierende Antikörper, die eine Infektion zu 50 % inhibieren. Analog dazu könnte IC75 bzw. IC90 bestimmt werden, indem der *cut-off* auf 2,0 bzw. 2,5 *ct*-Werte über den Δct des Präimmunserums bzw. isolierte IgGs des Präimmunserums festgelegt wird.

Da der NT-Assay mit anschließender *real-time* PCR sehr sensitiv ist, wurden für alle Seren und isolierte Antikörper Triplet-Messungen durchgeführt. Zudem sind immer mehrere Verdünnungen hergestellt worden, um die neutralisierenden Effekte auch in Abhängigkeit der Antikörper-Konzentration darzustellen.

Für eine vergleichbare und Reproduzierbarkeit der durchgeführten Neutralisations-(NT-) Assays sind in einem Ansatz einheitliche Virusstocks bzw. Virusstockmengen eingesetzt worden, die annähernd den gleichen Infektionstiter besaßen. Zudem kamen Seren bzw. Antikörper, die miteinander in ihrer neutralisierenden Wirkung verglichen werden sollten, auf einer 96-well-Platte zum Einsatz, um Bedingungen, wie Zellzahl, Zellpassage, Virusstock, Proteinase K-Verdau sowie die anschließende *real-time* PCR gleich zu halten.

Zur Überprüfung des Einflusses von Proteinen oder Peptiden auf die PERV-Infektion wurden diese in verschiedenen Konzentrationen vor Zugabe auf die nicht-infizierten Zellen zusammen mit dem zellfreien Virusüberstand für 30 min inkubiert.

4.4.5 Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse

Für die Fluoreszenzfärbung wurden 6000 Zellen/well auf eine μ -Slide 18-well (Ibidi) gegeben und für 24 Stunden anwachsen lassen. Um den Einfluss der PERV-Peptide auf eine PERV-Infektion zu überprüfen, sind diese allein bzw. mit dem zellfreien Virusüberstand zusammen auf die Zellen gegeben worden. 2 μ g Peptid bzw. 4 μ l Virusüberstand kamen zum Einsatz. Nach 24h Inkubation ist das Medium mit den Peptiden und dem Virusüberstand abgenommen und nach den Arbeitsschritten in Tabelle 4.17. weitergearbeitet worden.

Tabelle 4.17. Arbeitsschritte bei der Fluoreszenzfärbung

Arbeitsschritte	Zeit
1. 3x mit PBS waschen	-
2. Zellen in 2% PFA/PBS fixieren	30 min
3. 3x mit PBS waschen	-
4. Inkubation mit Streptavidin-ALEXA 488 (1/500 in 3% BSA/PBS)	45 min
5. 3x mit PBS waschen	-
6. Zellen trocknen und mit Mounting Medium überschichten	-

Die FACS-Analyse lief nach ähnlichen Arbeitsschritten ab: Inkubation der Zellen mit Peptiden mit/ohne Virusüberstand → Zellen waschen → mit CellFix (BD Biosciences) fixieren → mit PBS waschen → Inkubation mit Streptavidin-ALEXA 488 → mit PBS waschen → FACS-Analyse. Pro Ansatz wurden 20.000 Ereignisse (hier: 293T-Zellen) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo 9.4.11.

4.5 Gewinnung von Immunsereen

Für die Induktion von p15E-, FPPR/NHR- und CHR/MPER-spezifischen Antikörpern wurden verschiedene Spezies immunisiert. Die Aufreinigung der Antigene erfolgte wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben, bis die rekombinanten Proteine einen Reinheitsgrad von mind. 90 % aufwiesen.

Tabelle 4.18. Immunisierte Spezies zwecks Antikörper-Induktion

Spezies	Menge Antigen	Volumen	Injektion
Ratte	250 µg / 500 µg*	Max. 1 ml	1x intramuskulär
Kaninchen	500 µg/1mg*	Max. 1 ml	2x subkutan, 1x intramuskulär
Ziege	500 µg/1 mg*	Max. 2 ml	2x subkutan

Zeitplan: die Tiere wurden alle 3 bzw. 4 Wochen immunisiert
 * bei der Immunisierung mit zwei Antigenen kam jeweils die doppelte Menge zum Einsatz

Die aufgereinigten Proteine sind bei der ersten Immunisierung mit Freund'schem Adjuvants *complete* und bei den Folgeimmunisierungen mit Freund'schem Adjuvants *incomplete* im Verhältnis 1:1 vermischt worden. Diese Adjuvanz, das aus Mineralöl (Depotwirkung) und hitzeinaktivierten Mykobakterien (Aktivierung des Immunsystems) besteht, zeigt im Tiermodell als auch beim Menschen trotz möglicher toxischer Wirkung gute Immunantworten (Edelman, 1980; Gupta *et al.*, 1993).

Die Blutabnahmen erfolgten beim Kaninchen per Herzpunktion nach Narkotisierung mit 10% Ketamin und 2% Xylazin, bei den Ziegen erfolgte die Blutabnahme aus der Vena jugularis ohne Narkose. Die Immunisierungen der Kaninchen und Ziegen erfolgten durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin-Marienfelde. Die Immunisierungen der Ratten erfolgten im RKI-eigenen Tierstall.

Tabelle 4.19. Übersicht der Immunisierungen

Spezies	Bezeichnung	Antigen
Ratte	315-1...315-4	FPPR-Peptid
	316-1...315-4	MPER-Peptid
	317-1...317-4	FPPR/MPER-Peptid
	318-1...318-4	PBS
Kaninchen*	1	p15E(478-602)
	11; 100*	GST-FPPR/NHR
	22; 000*	GST-CHR/MPER4K
	44; 008*	GST-FPPR/NHR+ GST-CHR/MPER4K
Ziege	350	p15E(478-602)
	3429	p15E(C539A)
	369	GST-FPPR/NHR+ GST-CHR/MPER4K

* die Immunisierung der Kaninchen erfolgte in zwei getrennten Versuchen

Zur Gewinnung der Seren aus dem Vollblut wurde zunächst durch Rühren mit einem Glasstab die Blutgerinnung aktiviert. Nach 24-stündiger Kühlung wurde das Serum durch Zentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Anschließend wurde das Serum bei 56°C für 30 min erhitzt, um das Komplementsystem zu deaktivieren. Vor der Aufbewahrung der Seren bei -20°C wurden diese aliquotiert.

5. Ergebnisse

5.1 Induktion und Charakterisierung von p15E-spezifischen Antikörpern

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, neutralisierende Antikörper, die gegen die Ektodomäne des Transmembranproteins p15E von PERV gerichtet sind, näher zu untersuchen. Um das schon beschriebene FPPR- und vor allem MPER-Epitop, an denen die in Vergangenheit induzierten p15-spezifischen Antikörper bindeten, besser präsentieren zu können, wurde in dieser Arbeit erneut eine Ziege mit einer verlängerten rekombinanten Ektodomäne von p15E von PERV immunisiert (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011) (Abb. 5.01.).

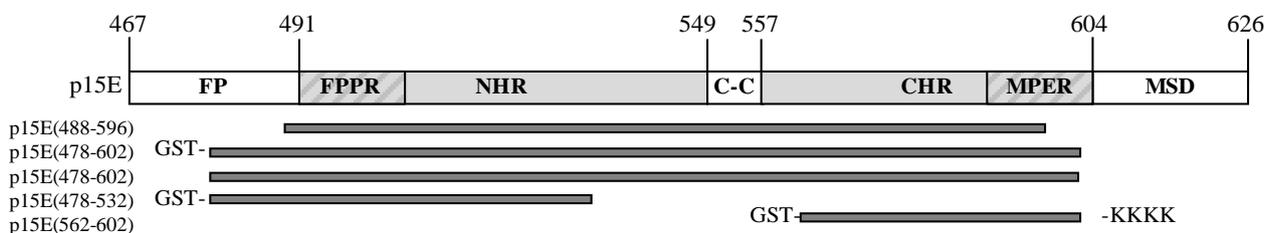


Abbildung 5.01. Übersicht der exprimierten rekombinanter Proteine. Die dargestellten Proteine sind sowohl für die Immunisierungen zwecks Induktion möglicher neutralisierender Antikörper, als auch für die Affinitätschromatographische Aufreinigungen verwendet worden. Als Vergleich wurde das kurze p15E(488-596) ebenfalls eingetragen. FP= Fusionspeptid, FPPR= *fusion peptide proximal region*; NHR= *N-terminal heptad repeat*; C-C= Disulfidbrücke; CHR= *C-terminal heptad repeat*; MPER= *membrane proximal external region*; MSD= Transmembrandomäne. Die Information über mögliche Transmembrandomänen (FP, MSD) wurde nach HMMTOP bestimmt (Tusnady & Simon, 2001). (Waechter *et al.*, 2012).

Tabelle 5.01. Übersicht der rekombinanten Proteine, die für die Immunisierungen als auch für die Affinitätschromatographie verwendet worden sind

Name*	Position	Verwendung
p15E(aa478-602)	p15E(aa478-602)	Immunisierung
GST-p15E(aa478-602)	p15E(aa478-602)	Affinitätschromatographie
GST-FPPR/NHR	p15E(aa478-532)	Immunisierung, Affinitätschromatographie
GST-CHR/MPER4K	p15E(aa562-602)	Immunisierung, Affinitätschromatographie

* der Name stellt die Bezeichnung der Konstrukte in dieser Arbeit dar

5.1.1 Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Die Expression von p15E(aa478-602) sowie GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K erfolgte bakteriell im *E. coli*-Stamm BL21. Für eine effiziente Induktion der Proteine wurden zunächst in einem kleinen Maßstab die IPTG-Endkonzentrationen, die Expressionstemperaturen und das mögliche Anhängen von vier Lysinen am C-terminalen Ende des jeweiligen Proteins zwecks besserer Löslichkeit bestimmt.

Tabelle 5.02. Induktionsbedingungen der rekombinanten Proteine

Protein	Endkonz. IPTG	Expressionstemp.
p15E(aa478-602)	0,1 mM	37°C
GST-FPPR/NHR	0,5 mM	37°C
GST-CHR/MPER4K	0,5 mM	37°C

Die löslichen Proteine wurde durch Gluthation-beladene Sepharose affinitätschromatographisch aufgereinigt. Das GST-p15E(aa478-602) wurde nach Beladen und Waschen direkt mittels Thrombin-Verdau von der Matrix geschnitten, so dass freies und lösliches p15E(aa478-602) für die Immunisierung verwendet werden konnte (Abb. 5.02.). Die kleineren Proteine FPPR/NHR und CHR/MPER4K waren ohne GST zu instabil, so dass diese durch reduziertes L-Glutathion von der Matrix eluiert wurden (Charakterisierung dieser Proteine unter Abschnitt 5.2.1).

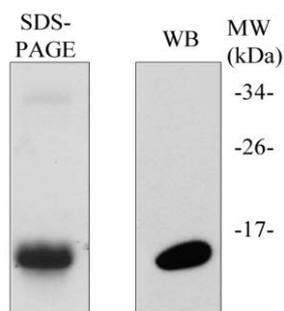


Abbildung 5.02. Darstellung von p15E(aa478-602). Der Nachweis des rekombinanten Proteins erfolgte zum einem in der SDS-PAGE als auch in einer Western Blot (WB)-Analyse, in der gezeigt wurde, dass induzierte p15E-Antikörper aus vorherigen Versuchen das verlängerte p15E erkennen. (Waechter *et al.*, 2012).

5.1.2 Charakterisierung von p15E-spezifischen Antikörpern

Nach erfolgter Immunisierung der Ziege 350 mit p15E(aa478-602) wurde zunächst durch Erhitzen der Antisera bei 56°C für 30 min das Komplementsystem inaktiviert. Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der induzierten p15E-spezifischen Antikörper erfolgte durch Epitop-Kartierung, ELISA- und Western Blot-Analysen.

Durch die Epitop-Kartierung konnten erneut die schon beschriebenen Epitope in der FPPR/NHR und der CHR/MPER bestätigt werden (Abb. 5.03.) (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011). Allerdings wird in der FPPR/NHR kein eindeutiges Epitop detektiert, sondern eine Vielzahl an Epitopen. Ein drittes Epitop ist zudem im Bereich der Disulfidbrücke zu erkennen.

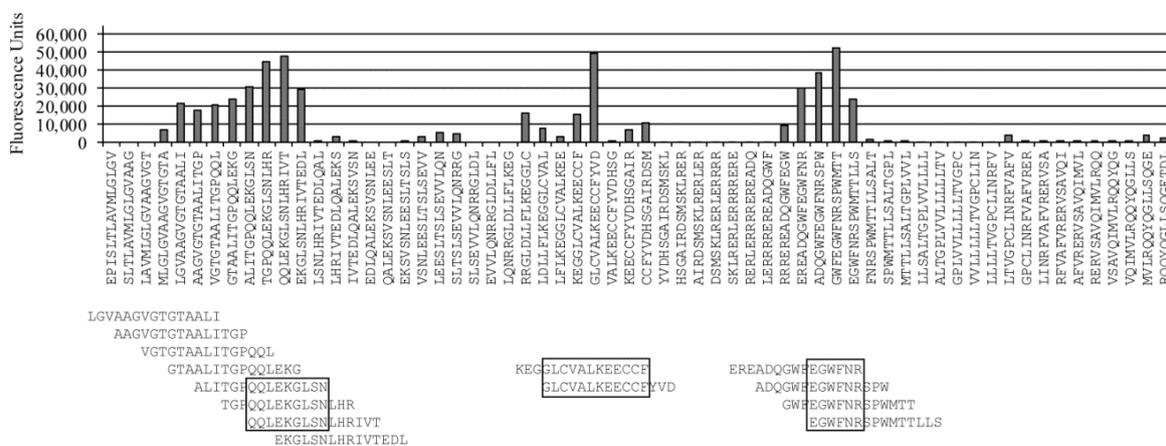


Abbildung 5.03. Epitop-Kartierung nach Immunisierung mit p15E(aa478-602). Die Epitop-Kartierung zur Feststellung, welche Antikörper nach Immunisierung mit p15E induziert worden sind, erfolgte durch das Verwenden eines PepStar Microarray-Chips. Eingerahmt sind die Epitope, welche über 30.000 Fluoreszenzeinheiten aufwiesen. (Wächter *et al.*, 2012).

Durch eine Western Blot-Analyse konnte ebenfalls die Induktion von p15E-, NHR und CHR-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 5.04.).

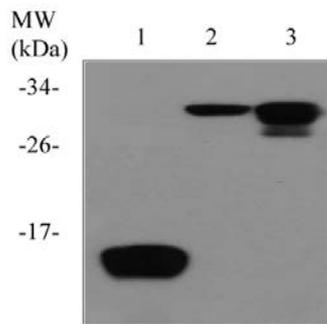


Abbildung 5.04. Western Blot-Analyse des Ziegenserums 350. Das Immuneserum der Ziege 350, welche mit rekombinanten p15E(478-602) immunisiert worden ist, erkennt sowohl das verwendete Antigen (Spur 1), als auch die rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR (Spur 2) und GST-CHR/MPER4K (Spur 3). (Waechter *et al.*, 2012).

Für eine Übersicht, wie hoch der Titer an FPPR- und MPER-bindenden Antikörpern liegt, sind in Abbildung 5.05. die Titer gegen das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid zu bestimmten Zeitpunkten aufgetragen. Zunächst wurde die Ziege 350 zweimal immunisiert. Der Antikörper-Titer des Immuneserums stieg darauf sehr stark an, bis dieser ungefähr 10^{-5} betrug. In den Folgewochen fiel der Titer jedoch sehr schnell ab, bis dieser nach drei Monaten nur noch 10^{-4} betrug. Eine erneute Immunisierung mit rekombinanten p15E(aa478-602) führte allerdings wieder zum raschen Anstieg der bindenden Antikörper.

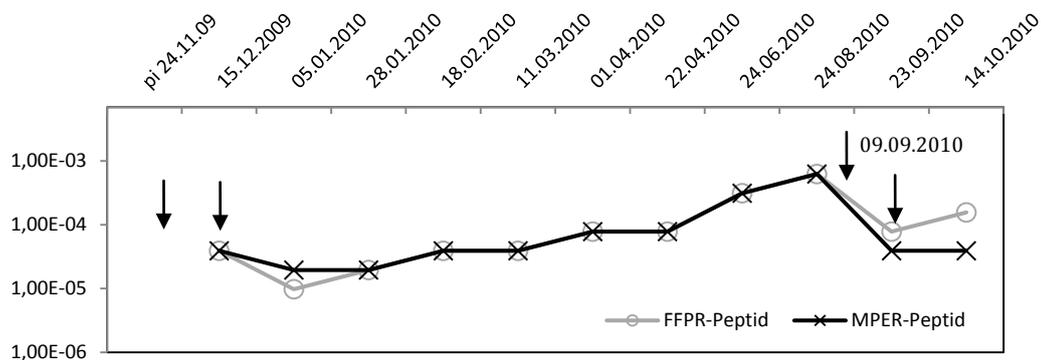


Abbildung 5.05. Verlauf der Titer gegen das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid. Die Graphik zeigt die Titration der bindenden Antikörper des Ziegenserums 350 nach der Immunisierung mit p15E(aa478-602) gegen das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid in einem ELISA-Experiment. Die Immunisierungszeitpunkte sind mit Pfeilen markiert.

Da die Absorptionswerte der Immuneseren vom 5.1.2010 bzw. 28.1.2010 besonders hoch waren, wurde in der folgenden Arbeit mit diesen beiden Seren gearbeitet.

Für weitere Untersuchungen des Immuneserums und der induzierten Antikörper wurden die p15E-spezifischen Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus dem Immuneserum isoliert. Eine Titerbestimmung der isolierten p15E-spezifischen Antikörper zeigt in dem

ELISA noch bis zu einer Konzentration von 1,25 µg/ml eine Bindung an das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid.

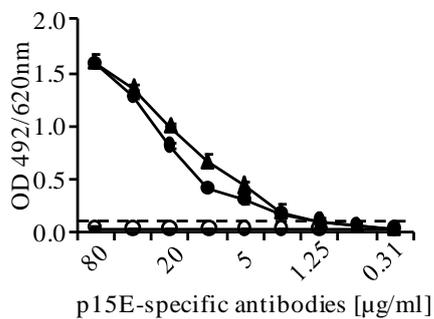


Abbildung 5.06. Titerbestimmung der p15E-spezifischen Antikörper. Der ELISA zeigt, dass die isolierten Immunglobuline aus dem Prämunsrum (Strich) nicht an den FPPR- und MPER-abgeleiteten Peptiden binden. Die isolierten p15E-spezifischen Antikörper des Immunsersums hingegen binden an das FPPR (Dreiecke)- und MPER (Kreise)-Peptid. (Waechter *et al.*, 2012).

Das Immunsrum der Ziege 350, als auch die isolierten p15E-spezifischen Antikörper wurden auf ihre neutralisierende Wirkung gegen PERV überprüft. In diesem Assay wurde mittels *real-time* PCR die Menge an Virus-DNA (hier: PERV A *gag*) in den Zelllysaten bestimmt. Sowohl das Immunsrum, als auch die isolierten p15E-spezifischen Antikörper zeigen, dass sie in der Lage sind, die PERV-Infektion zu hemmen.

Der Neutralisierungstiter entsprach der Verdünnung, bei der die Differenz zwischen PERV *gag* und GAPDH einen Δ ct-Wert höher liegt als die Negativkontrolle (Prämunsrum/isolierte Immunglobuline aus Prämunsrum). Der Neutralisationstiter des Immunsersums liegt zwischen 1/100 und 1/120 (Abb. 5.10.); bei den p15E-spezifischen Antikörper bei 80 µg/ml (Abb. 5.07.). Einen *ct*-Wert über diesen Titer entspricht 50 % weniger DNA und damit auch in etwa einer 50 %-igen Hemmung der Infektion (analog zu IC_{50}). Diese Hemmung wird mit dem Immunsrum bei einer Verdünnung von 1/80 und mit den p15E-spezifischen Antikörpern bei einer Konzentration von 100 µg/ml erreicht.

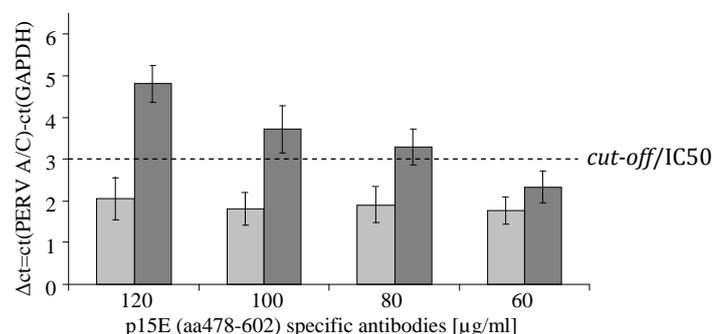


Abbildung 5.07. Neutralisationsassay der p15E-spezifischen Antikörper. Die Überprüfung der neutralisierenden Wirkung der p15E-spezifischen Antikörper (dunkelgraue Balken) erfolgte durch quantitative Messung der Virus-DNA in den infizierten Zellen. Als Negativkontrolle (hellgraue Balken) wurde die gleiche Menge an isolierten Immunglobulinen aus dem Prämunsrum verwendet. Der *cut-off/IC₅₀*-Wert wurde mit einem Δ ct über der Negativkontrolle definiert. (Waechter *et al.*, 2012)

5.1.3 Interaktion zwischen PERV und p15E-spezifischen Antikörpern

Um eine direkte Interaktion zwischen dem Virus und den p15E-spezifischen Antikörpern nachzuweisen, wurden isolierte p15E-Antikörper des Antiserum der Ziege 350 an Protein G kovalent gekoppelt und anschließend mit zellfreiem Virusüberstand inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen und Aufkochen der Protein G-Beads wurden die freigesetzten Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Durch die Verwendung eines p15E-spezifischen Antiserums konnte virales p15E, das über die p15E-spezifischen Antikörper an den Beads gebunden hat, nachgewiesen werden (Abb. 5.14.). Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle keine Bande in Höhe des viralen p15Es.

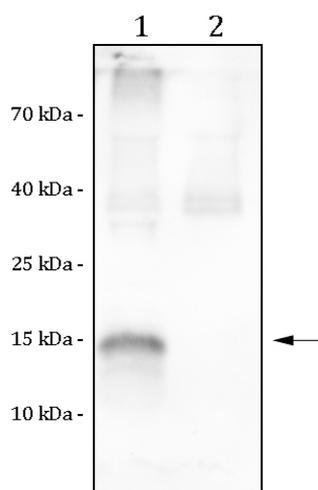


Abbildung 5.14. Immunpräzipitation von PERV durch Protein G. Für die Interaktion zwischen PERV und p15-spezifischen Antikörpern wurden ein p15E-spezifischer Antikörper (Spur 1) und ein unspezifischer Antikörper (Spur 2) an Protein G-Beads geladen. Nach Inkubation mit zellfreiem Überstand wurden die Beads in Probenpuffer aufgekocht und nach Auftrennung der Proteine einer Western Blot-Analyse unterzogen.

5.1.4 Isolation von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern

Um herauszufinden, welche der verschiedenen p15E-spezifischen Antikörper am Neutralisationsprozess beteiligt sind, wurden die NHR- und CHR-spezifischen Antikörper mittels Affinitätschromatographie isoliert. Dazu wurden die rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K an CNBr-aktivierte Sepharose immobilisiert. Bei den Aufreinigungen wurden nur geringe Mengen an Immuns serum der Ziege 350 verwendet, um alle NHR- bzw. CHR-spezifischen Antikörper dem Serum zu „entziehen“ und dementsprechend auch Durchläufe auf ihre Bindung und Neutralisationskapazität analysieren zu können.

Dadurch war es möglich, zwei Fraktionen pro Aufreinigung zu erhalten, die nur eine Antikörper-Population enthalten.

Die ELISA-Experimente zeigten, dass sowohl die gesammelten Eluate als auch Durchläufe nur Antikörper enthielten, die entweder an das immobilisierte FPPR- oder das MPER-Peptid gebunden haben (Abb. 5.08.). Nach Immobilisation von GST-FPPR/NHR sind im Eluat Antikörper gegen das FPPR-abgeleitete Peptid zu finden; im Durchlauf nur hingegen Antikörper gegen das MPER-abgeleitete Peptid. Im Eluat nach der Aufreinigung mit immobilisierten GST-CHR/MPER4K werden Antikörper gegen das MPER-abgeleitete Peptid, im Durchlauf gegen das FPPR-abgeleitete Peptid detektiert (siehe Übersicht Tabelle 5.03.).

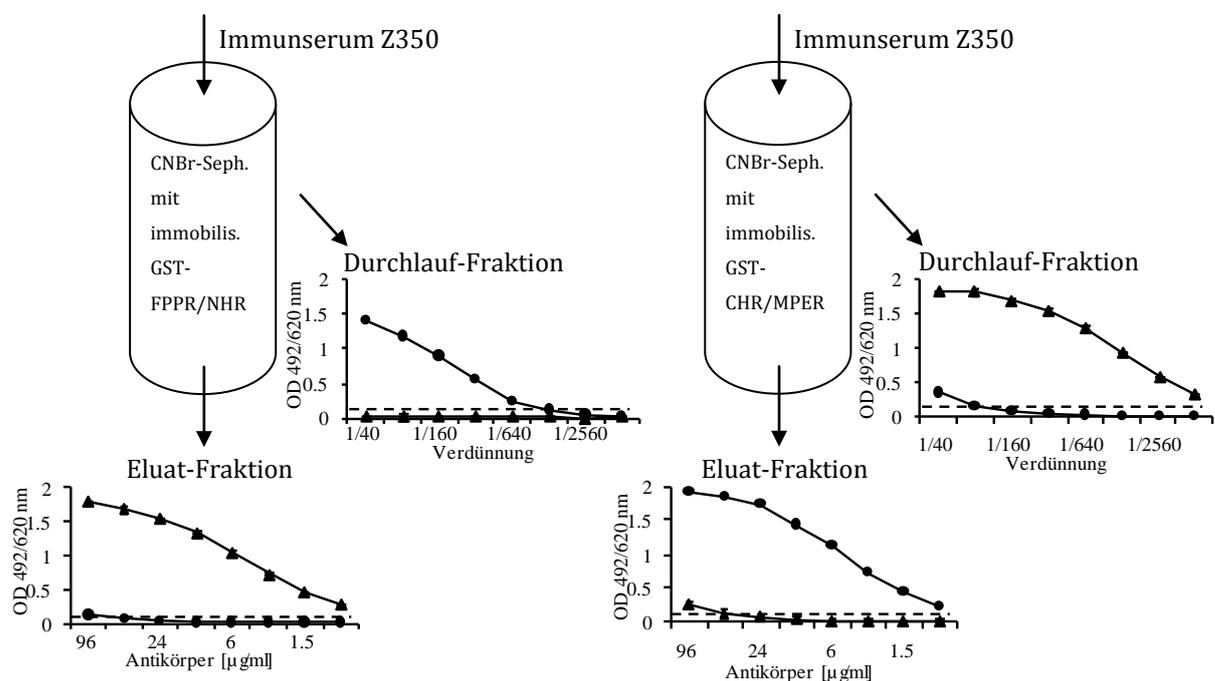


Abbildung 5.08. Versuchsabbau der Affinitätschromatographie sowie Darstellung der Ergebnisse der ELISA-Experimente. Die nach Affinitätschromatographie gewonnenen Durchläufe und Eluate sind in einem ELISA-Experiment auf ihre Bindung an das abgeleitete FPPR-(Dreiecke) bzw. MPER- (Kreise) Peptid untersucht worden. (Waechter *et al.*, 2012)

Die ebenfalls durchgeführten Epitop-Kartierungen der einzelnen Fraktionen bestätigen die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen: entsprechend des immobilisierten Proteins befinden sich nur N- bzw. C-Terminus erkennende Antikörper in den einzelnen Fraktionen (Abb. 5.09.). Da die ELISA-Untersuchungen nur die Bindung an einem bestimmten N- bzw. C-terminalen Peptid zeigten, konnten in einer Epitop-Kartierung alle bindenden Antikörper der Fraktionen sichtbar gemacht werden.

Der zweite NT-Assay zeigte ebenfalls, dass nur die Fraktionen neutralisieren, die CHR/MPER-bindende Antikörper erhalten: entweder die p15E-spezifischen Antikörper oder das Eluat nach Affinitätschromatographie mit immobilisierten GST-CHR/MPER4K (Abb. 5.10. [B]).

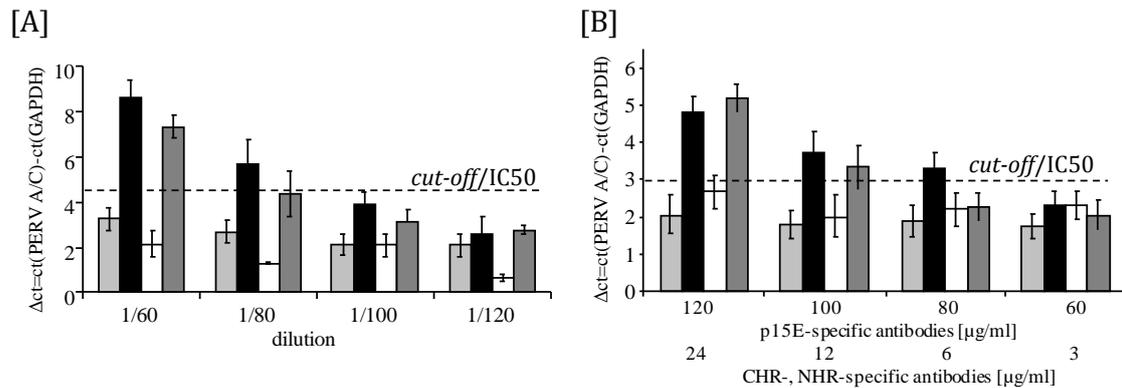


Abbildung 5.10. Neutralisierungsaktivität von isolierten Antikörpern bzw. Durchlaufaktionen nach Affinitätschromatographie mit immobilisierten GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K. [A] Dargestellt sind alle "serumhaltigen" Fraktionen: Antiserum mit p15E-spezifischen Antikörpern (schwarz), Prämiserum (hellgrau), Durchlaufaktion mit FPPR/NHR-spezifischen Antikörper (weiß) und die Durchlaufaktion mit CHR/MPER-spezifischen Antikörpern (dunkelgrau). [B] Im zweiten Diagramm sind alle isolierten Antikörper aufgetragen: p15E-spezifische Antikörper (schwarz), Ig isoliert aus dem Prämiserum (hellgrau), Eluat mit FPPR/NHR-spezifischen Antikörpern (weiß) und das Eluat mit CHR/MPER-spezifischen Antikörpern (dunkelgrau). (Waechter *et al.*, 2012).

5.1.6 Vergleich zwischen den Immunsereen nach der Immunisierung mit p15E(aa478-602) und p15E(aa488-596)

Da in dieser Arbeit die Immunisierung mit einem verlängerten p15E erfolgte, wurde das erhaltende Immunsereum mittels einer Epitop-Kartierung, einem ELISA und einem Neutralisationsassay mit den Immunsereen nach Immunisierungen mit dem kürzeren p15E aus früheren Immunisierungen verglichen. Daneben wurden die Antigene einer Gelfiltration unterzogen, um eine mögliche Oligomerisierung der Proteine sichtbar zu machen. Im Elutionsbild läuft das p15E(aa478-602) bei 15 ml, das ungefähr eine Größe von 28-30 kDa darstellt. Das CBP-gekoppelte p15E(aa488-596) eluiert erst nach 20 ml, welches somit eine Größe von ca. 15 kDa entspricht. Demzufolge findet beim p15E(aa478-602) eine Dimerisierung statt; das CBP-p15E(aa488-596) liegt als Monomer vor (Abb. 5.11.).

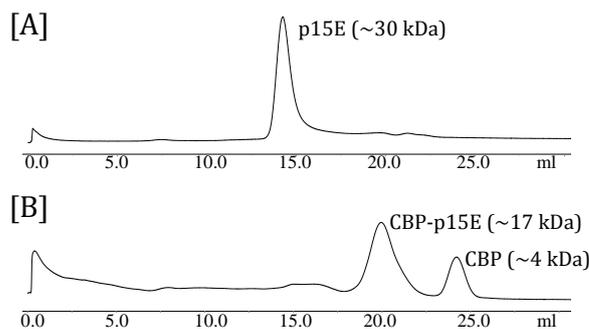


Abbildung 5.11. Gelfiltration der rekombinanten Proteine [A] p15E(aa478-602) und [B] CBP-p15E(aa488-596). (Waechter *et al.*, 2012).

Die Epitop-Kartierung (Abb. 5.03.) des Antiserums nach der Immunisierung mit dem längeren p15E zeigte ähnlich bindende Antikörper wie nach den Immunisierungen mit dem kürzeren p15E, die in der NHR als auch in der CHR binden. Allerdings sind die Epitope entsprechend der Verlängerung auch stärker ausgeprägt (Abb. 5.12.). Ein zusätzliches Epitop im Cystein-Loop ist nur nach der Immunisierung mit dem längeren p15E zu sehen.



Abbildung 5.12. Vergleich der Epitop-Kartierungen der Ziegen-Seren 346, 355 und 350. In grau sind die Antigene dargestellt, welche für die Immunisierung verwendet worden sind. Ziege 346 und 355 wurden mit CBP-p15E(488-596) (Kaulitz *et al.*, 2011) und Ziege 350 mit p15E(478-602) immunisiert. Die Hauptepitope sind in schwarz dargestellt; zusätzlich erkannte Epitope im N-terminalen Bereich durch das Ziegenserum 350 in hellgrau (Waechter *et al.*, 2012).

Für einen vergleichenden ELISA als auch NT-Assay wurden zuvor die Immunglobuline der Antiseren durch Ammoniumsulfat gefällt, um gleiche Mengen von Antikörpern für die Versuche verwenden zu können. Der ELISA zeigt, dass die Immunglobuline des Immunserums der Ziege 350 den höchsten Titer an FPPR- und MPER-bindenden Antikörpern besitzen (Abb. 5.13. [A]). Einen bis zu 20-fach höheren Titer wurde im Ziegenserum 350 gegenüber anderen Ziegenseren detektiert, welche aus den Ziegen gewonnen wurden, die mit dem kürzeren p15E immunisiert worden sind.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich, als die isolierten Immunglobuline der Ziegenseren in einem NT-Assay untersucht wurden: die höchste neutralisierende Wirkung gegen PERV zeigen die Immunglobuline des Ziegenserums 350. Eine bis zu vierfach höhere Neutralisation ist im Vergleich zu erkennen (Abb. 5.13. [B]).

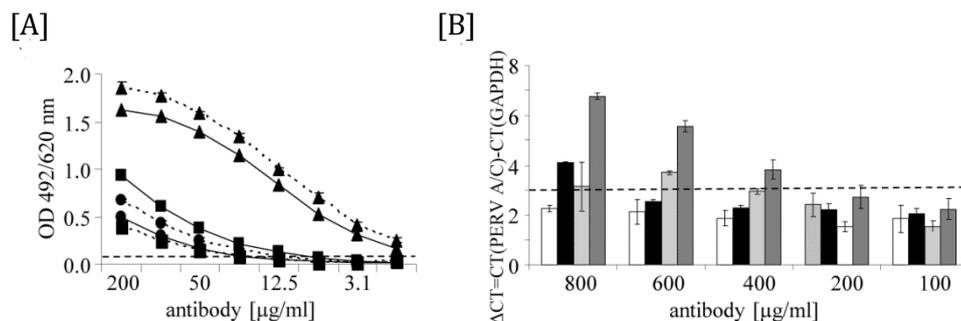


Abbildung 5.13. Charakterisierung der Bindungs- und Neutralisierungsaktivität von Ziegenseren, die mit verschiedenen p15Es immunisiert worden sind. [A] Titration von aufgereinigten Immunglobulinen der Ziegenseren 346 (Rechtecke), 355 (Kreise) und 350 (Dreiecke) gegen das FPPR- (gestrichelte Linie) und das MPER- (durchgezogene Linie) abgeleitete Peptid. [B] Neutralisierungsaktivität der Igs der Ziegenseren 355 (schwarze Balken), 346 (hellgrau) und 350 (dunkelgrau). Als Negativkontrolle sind die isolierten Immunglobuline des Ziegenserums 350 verwendet worden (weiße Balken) (Wächter *et al.*, 2012).

Durch die Immunisierung mit einem verlängerten rekombinanten p15E konnten erneut neutralisierende Antikörper induziert werden. Nach Charakterisierung der Bindungseigenschaften und neutralisierender Aktivität der FPPR/NHR- und CHR/MPER-spezifischen Antikörpern, konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass nur die MPER-spezifischen Antikörper am Neutralisationsprozess beteiligt sind. Im Vergleich zu anderen p15E-Immunseren zeigte sich auch, dass durch die Verlängerung höhere Titer an FPPR/NHR- und CHR/MPER-spezifischen Antikörpern induziert werden konnten.

In Tabelle 5.03. sind zu einer besseren Übersicht die Ergebnisse der Bindungs- als auch Neutralisationsstudien des Immunerums der Ziege 350 dargestellt.

Tabelle 5.03. Zusammenfassung der Bindungs- und Neutralisationseigenschaften der einzelnen Fraktionen.

Fraktion	Bindende Antikörper gegen		Neutralisation
	FPPR/NHR	CHR/MPER	
p15E-Immuneserum	+	+	+
p15E-spezifische Antikörper	+	+	+
Präimmuneserum	-	-	-
Ig aus Präimmuneserum	-	-	-
GST-CHR/MPER4K-Eluat	-	+	+
GST-CHR/MPER4K-Durchlauf	+	-	-
GST-FPPR/NHR-Eluat	+	-	-
GST-FPPR/NHR-Durchlauf	-	+	+

5.2 Induktion von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die MPER-spezifischen Antikörper nach einer p15E-Immunisierung für die Neutralisation verantwortlich sind (Waechter *et al.*, 2012), soll in diesem Teil untersucht werden, durch welche Antigene diese induziert werden können.

5.2.1 Charakterisierung der Antigene

Für die Immunisierung wurden drei Gruppen von jeweils zwei Kaninchen mit den oben beschriebenen rekombinanten Proteinen GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K (siehe Tab. 4.19.) und zusätzlich ein Kaninchen mit dem rekombinanten p15E(aa478-602) immunisiert.

Für die Auftrennung von FPPR/NHR- und CHR/MPER-spezifischen Antikörper bei der Kombi-Immunisierung mit der N- und C-terminalen Domäne wurde neben der Kaninchen-Gruppe eine Ziege mit GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K zusammen immunisiert. Der Reinheitsgrad der Antigene wurde erneut durch eine SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie Blue*-Färbung überprüft (Abb. 5.15.).

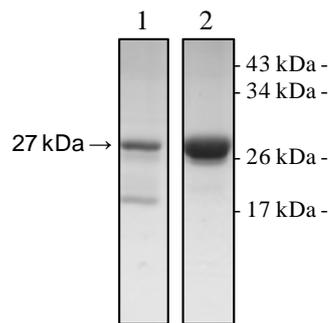


Abbildung 5.15. Charakterisierung der rekombinanten Proteine GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung durch SDS-PAGE und anschließender *Coomassie Blue*-Färbung. GST-CHR/MPER4K (Spur 1), GST-FPPR/NHR (Spur 2) (Waechter & Denner, 2013).

Desweiteren sind die rekombinanten Proteine getrennt als auch zusammen auf eine Gelfiltrationssäule gegeben worden, um eine mögliche Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Domänen aber auch untereinander feststellen zu können (Abb. 5.16.). Das Elutionsverhalten der Proteine zeigt, dass es zwischen dem GST-FPPR/NHR und dem GST-CHR/MPER4K zu keiner Interaktion kommt und die Proteine als Monomere vorliegen.

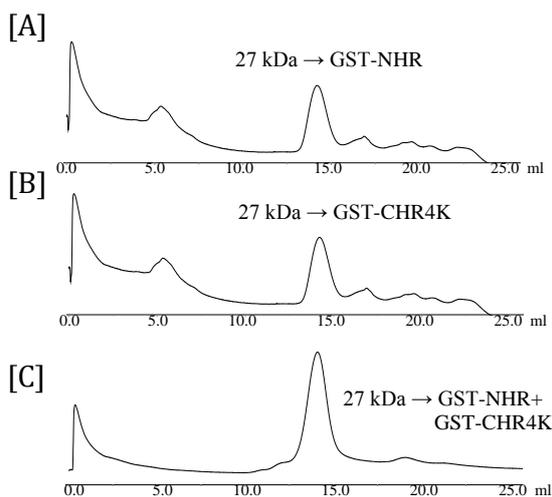


Abbildung 5.16. Gelfiltration der rekombinanten Proteine [A] GST-FPPR/NHR, [B] GST-CHR/MPER4K und [C] GST-FPPR/NHR+GST-CHR/MPER4K (Waechter & Denner, 2013).

5.2.2 Charakterisierung der Immunsereen

Um die Bindungseigenschaften der induzierten Antikörper in den Immunsereen zu analysieren, wurden Western Blot-Analysen, ELISA-Untersuchungen und Epitop-Kartierungen durchgeführt. Anschließend wurden die Antiseren auf ihre neutralisierende Wirkung hin überprüft.

Die Western Blot-Analyse zeigte, dass alle Tiere nach den Immunisierungen bindende Antikörper gegen p15E ausbildeten (Abb. 5.17. [A]). In den ELISA-Untersuchungen konnten entsprechend der verwendeten Antigene N- bzw. C-terminale Antikörper detektiert werden,

die an den immobilisierten FPPR- bzw. MPER-abgeleiteten Peptiden bindeten (Abb. 5.17. [B]).

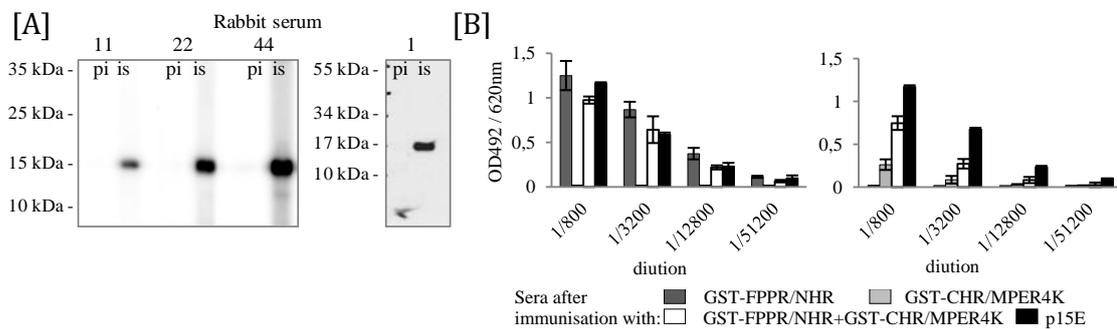


Abbildung 5.17. Bindungseigenschaften der Immunsereen. [A] Western Blot-Analyse mit rekombinanten p15E(aa497-602). Alle Immunsereen (is) detektieren rekombinantes p15E. Die Präimmunsereen (pi) zeigen keine bindenden Antikörper. [B] Titration der Kaninchensereen nach Immunisierung mit rekombinanten GST-FPPR/NHR, GST-CHR/MPER4K, GST-FPPR/NHR+GST-CHR/MPER4K und p15E(478-602). Der linke Graph zeigt die Titer gegen das FPPR- und der rechte gegen das MPER-abgeleitete Peptid (Waechter & Denner, 2013).

Das erhaltene Immunsereum der Ziege 369, die mit beiden Proteinen GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K immunisiert wurde, bestätigte im ELISA die Produktion von Antikörpern gegen das FPPR- und MPER-abgeleitete Peptid. (Abb. 5.18.).

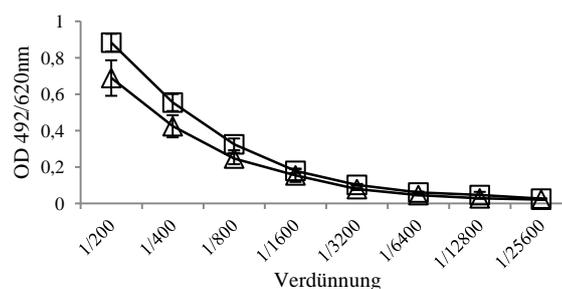


Abbildung 5.18. Titration des Ziegensereums 369 nach Immunisierung mit GST-FPPR/NHR+GST-CHR/MPER4K in einer ELISA-Analyse mit immobilisierten FPPR- (Rechtecke) und MPER- (Dreiecke) abgeleiteten Peptiden.

In den Neutralisationsassays wurde nur mit den Kaninchensereen eine Hemmung der PERV-Infektion erzielt, die Antikörper gegen GST-FPPR/NHR enthielten (Abb. 5.19. [A]). Keine Neutralisation hingegen konnte mit dem Immunsereum gezeigt werden, das nach der Immunisierung mit GST-CHR/MPER4K erhalten wurde. Das Immunsereum des mit p15E(aa478-602) immunisierten Kaninchens neutralisierte ebenfalls im durchgeführten

NT-Assay. Der Neutralisierungstiter lag dabei mit einer Verdünnung vom 1/200 höher als die Titer der Immunsereen nach Immunisierung mit dem GST-FPPR/NHR von bis zu 1/40 (Abb. 5.19. [A]). Auch die isolierten p15E-spezifischen Antikörper des Immuserums der Ziege 369, die mit GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K zusammen immunisiert worden ist, zeigen eine gute neutralisierende Wirkung (Abb. 5.19. [B]). Der Neutralisierungstiter betrug dabei 5,0 µg/ml.

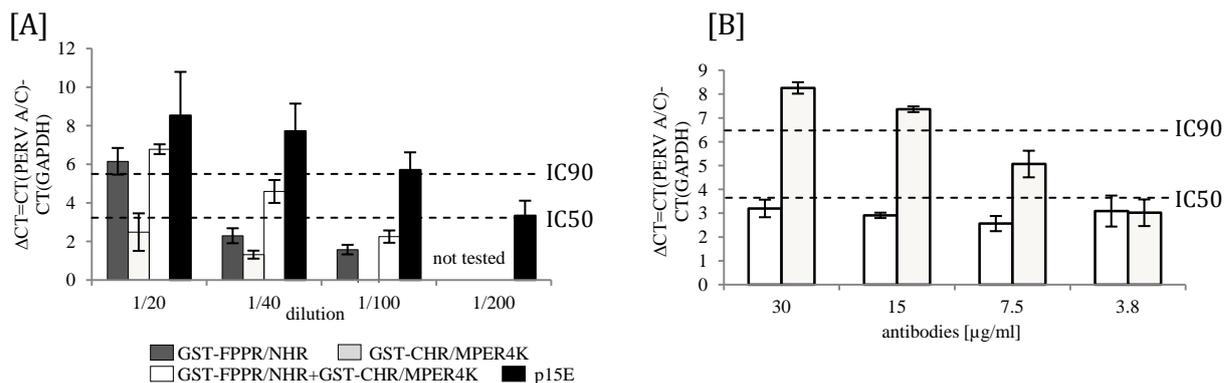


Abbildung 5.19. Neutralisationsassay nach GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K-Immunsierung. [A] Darstellung der Immunsereen der immunisierten Kaninchen bis zu einer Verdünnung von 1/100 bzw. 1/200. [B] Darstellung der p15E-spezifischen Antikörper nach affinitätschromatographischer Aufreinigung des Immuserums der Ziege 369 (hellgrau), die mit GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K immunisiert worden ist. Als Negativkontrolle sind die isolierten Immunglobuline des Präimmuserums (weiß) verwendet worden (Waechter & Denner, 2013).

Die Neutralisationsassays nach den Immunisierungen mit den rekombinanten Proteinen GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K zeigten, dass eine neutralisierende Wirkung nur nach den Immunisierungen mit GST-FPPR/NHR (ob Einzel- oder Kombi-Immunsierung) zu erkennen war. Die Einzel-Immunsierung mit GST-CHR/MPER4K führte zur keiner Induktion an neutralisierenden Antikörpern.

5.2.3 Isolierung von NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern

Um die Frage zu beantworten, welche/r Antikörper bei den Kombi-Immunsierungen eine neutralisierende Wirkung zeigen/zeigt, wurden durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K die beiden Antikörperpopulationen des Immuserums der Ziege 369 voneinander getrennt. Der ELISA der

Eluatfraktionen bestätigte erneut, dass die beiden Antikörper-Populationen zu trennen sind (Abb. 5.20.): Das Eluat aus der Aufreinigung mit immobilisierten GST-FPPR/NHR enthielt nur bindende Antikörper gegen das FPPR-abgeleitete Peptid; das Eluat aus der Aufreinigung mit immobilisierten GST-CHR/MPER4K nur gegen das MPER-abgeleitete Peptid.

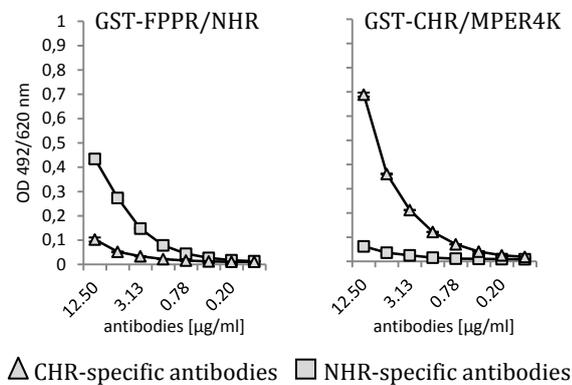


Abbildung 5.20. Titration der aufgereinigten Antikörper nach Affinitätschromatographie des Immunerums der Ziege 369. Im linken Graphen sind nach Immobilisation von GST-FPPR/NHR Antikörper gegen das FPPR-abgeleitete Peptid (Quadrat) zu erkennen; nach Immobilisation von GST-CHR/MPER4K (rechter Graph) werden bindenden Antikörper gegen das MPER-abgeleitete Peptid erkannt (Waechter & Denner, 2013).

Im NT-Assay zeigte nur das Eluat eine neutralisierende Wirkung gegen PERV, das bindende Antikörper gegen GST-FPPR/NHR enthielt. Die isolierten CHR/MPER-spezifischen Antikörper nach der Kombi-Immunisierung mit GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K konnten hingegen die PERV-Infektion nicht hemmen (Abb. 5.21.). Eine Ausverdünnung zeigt, dass die FPPR/NHR-spezifischen Antikörper bis zu einer Konzentration von 6,5 µg/ml neutralisieren.

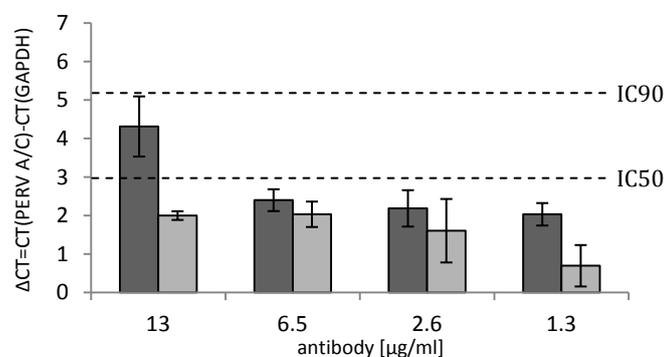


Abbildung 5.21. Neutralisierungsaktivität von isolierten Antikörpern des Immunerums der Ziege 369. Nach Affinitätschromatographie mit immobilisierten GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K wurden die NHR- (dunkelgrau) und CHR-spezifischen (hellgrau) Antikörper auf ihre neutralisierende Aktivität getestet.

5.2.4 Epitop-Kartierung von Kaninchen-Seren

Zur Darstellung der Epitope, an welche die induzierten Antikörper binden, wurden die Immunsereen der Kaninchen für eine Epitop-Kartierung verwendet. Die Epitop-Kartierung des Serums des Kaninchens 1, welches mit der Ektodomäne von p15E immunisiert worden ist, zeigt ausgeprägte Epitope in der CHR; darunter auch das MPER-Epitop $_{589}\text{GWFEGWFNRSP}_{599}$, an welches die im Abschnitt 5.1.4 nachgewiesenen neutralisierenden Antikörper binden.

Im Gegensatz dazu werden durch die Seren der Tiere, die mit den GST-gekoppelten Proteinen (GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K) immunisiert worden sind, sehr stark überlappenden Epitope – entsprechend der verwendeten Antigene – detektiert.

Nach den Immunisierungen mit dem N-terminalen Fragment des p15Es wird im Vergleich mit den Epitopen des Kaninchenserums 1 im C-terminalen Bereich der NHR ein zusätzliches Epitop erkannt: $_{506}\text{IVTEDLQALEKS}_{517}$. Der Vergleich zwischen den Immunsereen nach der Immunisierung mit GST-CHR/MPER4K und der Ektodomäne von p15E zeigt, dass Antikörper gegen das zuvor beschriebene Epitop in der MPER ($_{589}\text{GWFEGWFNRSP}_{599}$) nicht durch das Antigen GST-CHR/MPER4K induziert wurden (Abb. 5.22.).

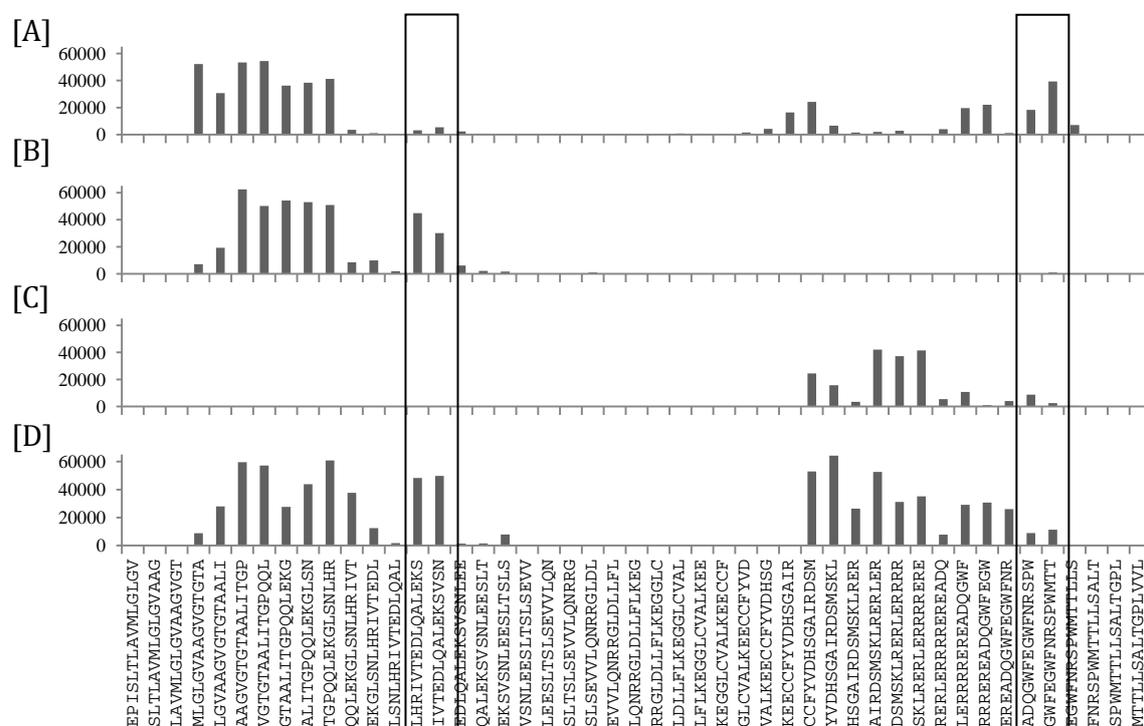


Abbildung 5.22. Epitop-Kartierung der Kaninchen-Seren. Signifikante Unterschiede zwischen den Immunsereen nach p15E(aa478-602)- [A], GST-FPPR/NHR- [B], GST-CHR/MPER4K- [C] und GST-CHR/MPER4K+GST-FPPR/NHR –Immunisierung [D] sind eingerahmt (Waechter & Denner, 2013).

Zusammengefasst zeigte diese Immunisierungsstudie, dass im Gegensatz zu der Immunisierung mit dem rekombinanten p15E(aa478-602) keine neutralisierenden MPER-spezifischen Antikörper induziert werden konnten (Tab. 5.04.). Weder die Einzel- noch die Kombi-Immunisierung mit GST-CHR/MPER4K konnten MPER-spezifische Neutralisationsantikörper induzieren. Hingegen wurden nach den Immunisierungen mit GST-FPPR/NHR neutralisierende Antikörper festgestellt. Epitop-Kartierungen zeigten neben den schon beschriebenen Epitopen ein weiteres Epitop in der NHR (₅₀₆IVTEDLQALEKS₅₁₇), welches mit der neutralisierenden Wirkung der NHR-spezifischen Antikörper korreliert.

Tabelle 5.04. Zusammenfassung der Ergebnisse nach den Immunisierungen mit N- und C-terminalen Proteinen.

Immunisierungsantigen/ Aufreinigungsfraction	Bindende Antikörper gegen		Neutralisation
	FPPR/NHR	CHR/MPER	
GST-FPPR/NHR	+	-	+
GST-CHR/MPER4K	-	+	-
GST-FPPR/NHR+ GST-CHR/MPER4K	+	+	+
GST-FPPR/NHR-Eluat nach KI#	+	-	+
GST-CHR/MPER4K-Eluat nach KI#	-	+	-

Eluate aus den affinitätschromatographischen Aufreinigungen nach der Kombi-Immunisierung mit GST-FPPR/NHR+ GST-CHR/MPER4K

5.3 Immunisierung mit p15E(C549A)

Da weder eine Immunisierung mit GST-CHR/MPER4K noch durch die Zugabe der N-terminalen Domäne zu der Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationantikörpern geführt hat, wurde vermutet, dass nur das native p15E zu der Induktion von diesen Antikörpern führt. Aus diesem Grund wurde eine weitere Immunisierung mit einer mutierten p15E-Variante durchgeführt.

Diese Mutante zeichnete sich durch eine Deletion eines Cysteins aus, von welchem angenommen wird, dass dieses bei der Ausbildung des Cysteins-Loops des TM-Proteins während der Infektion beteiligt ist (Ashkenazi *et al.*, 2011; Fenouillet *et al.*, 2007). Allerdings wird in einigen wenigen Veröffentlichung aufgeführt, dass es für die Ausbildung dieser Disulfidbrücke in gp41 bei HIV-1 zwecks struktureller Änderungen des TM-Proteins während der Infektion keine direkten Beweise gibt (Caffrey, 2001; Sen *et al.*, 2007).

Nach Punktmutation und Sequenzierung wurde der Vektor transformiert und das rekombinante Protein exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 5.23.).

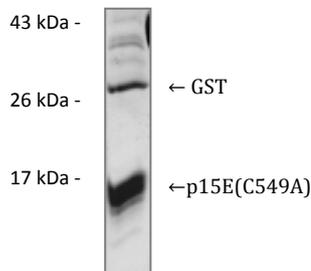


Abbildung 5.23. Darstellung des rekombinanten Proteins p15E(C549A). Auftrennung des eluierten Proteins in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blue-Färbung.

Für die Charakterisierung der bindenden als auch neutralisierenden Eigenschaften des Serums bzw. der induzierten Antikörper nach erfolgter Immunisierung wurde ein ELISA, eine Epitop-Kartierung als auch ein NT-Assay durchgeführt. Der ELISA zeigt, dass Antikörper gegen das FPPR- als auch MPER-abgeleitete Peptid im Serum enthalten sind. Der Vergleich mit dem Immuserum der Ziege 350, die mit dem nativen p15E(aa478-602) immunisiert wurde, zeigt, dass der Titer um eine Zehnerpotenz geringer ist (Abb. 5.24. [A]). In dem NT-Assay zeigten die p15E-spezifischen Antikörper bis zu einer Konzentration von 10,75 µg/ml eine neutralisierende Wirkung (Abb. 5.24. [B]).

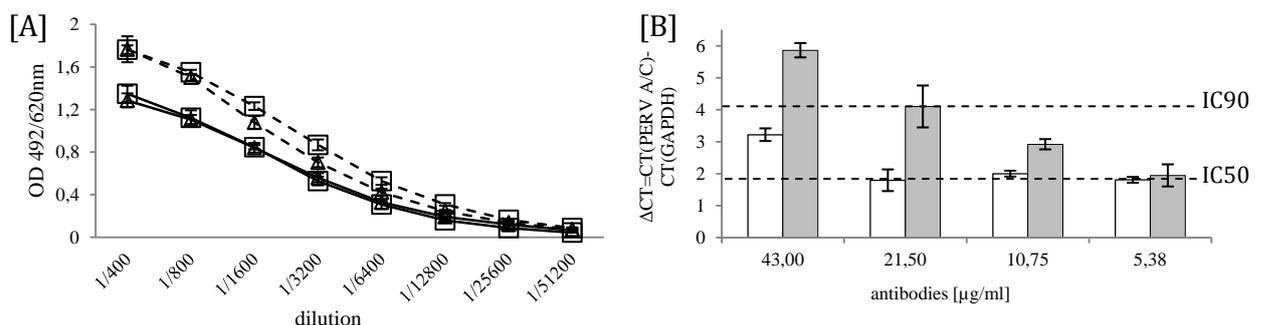


Abbildung 5.24. Bindungs- und Neutralisierungseigenschaften des Immuserums der Ziege 3429. [A] Titration des Ziegenserums 3429 nach Immunisierung mit dem rekombinanten p15E(C549A) in einem ELISA (durchgezogene Linie). Dargestellt sind die bindenden Antikörper gegen das FPPR (Rechtecke)- und das MPER (Dreiecke)-abgeleitete Peptid. Zum Vergleich wurde das Ziegenserum 350 nach Immunisierung mit dem p15E (gestrichelte Linie) eingetragen. [B] Neutralisierungsaktivität der p15E-isolierten Antikörper des Ziegenserums 3429 (grau). Als Negativkontrolle wurden die isolierten Immunglobuline des Präimmuserums (weiß) verwendet (Waechter & Denner, 2013).

Eine Epitop-Kartierung zeigt im Vergleich zur Immunisierung mit dem nativen p15E(aa478-602), dass viele verschiedene Antikörper gegen das gesamte p15E(C549A) induziert wurden; signifikante Epitope können nur schwer definiert werden (Abb. 5.25.). In Bezug auf die schon beschriebenen Epitope nach den Immunisierungen mit den Einzeldomänen NHR und CHR des p15Es wird das Epitop $_{506}$ IVTEDLQALEKS $_{517}$, das nach den Immunisierungen mit dem GST-FPPR/NHR detektiert worden ist, ebenfalls durch die induzierten Antikörper nach der p15E(C549A)-Immunisierung erkannt. An das Epitop in der MPER ($_{589}$ GWFEWGFNRSP $_{599}$), an welchem die neutralisierenden Antikörper nach der p15E-Immunisierung binden, lässt sich eine nur schwache Bindung feststellen (Abb. 5.22. und 5.25.).

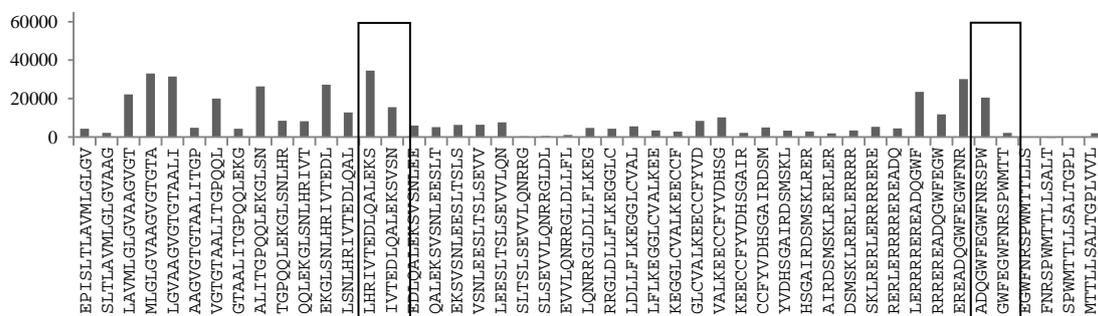


Abbildung 5.25. Epitop-Kartierung des Ziegenserums 3429 nach p15E(C549A)-Immunisierung. Im Vergleich zu der Immunisierung mit dem nativen p15E sind keine abgrenzbaren Epitope zu erkennen. Die schon beschriebenen Epitope $_{506}$ IVTEDLQALEKS $_{517}$ und $_{589}$ GWFEWGFNRSP $_{599}$ in der NHR und CHR sind eingerahmt (Waechter & Denner, 2013).

Um eine Aussage treffen zu können, welche Antikörper für die Hemmung der PERV-Infektion verantwortlich sind, wurde erneut eine Trennung nach NHR- und CHR-bindenden Antikörpern vorgenommen. Ein ELISA bestätigte, dass die Eluate nur eine Antikörper-Population enthielten: entweder zeigten die eluierten Antikörper eine Bindung an das FPPR- oder das MPER-abgeleitete Peptid (Abb.5.26. [A]). Das Eluat nach FPPR/NHR-Aufreinigung enthält nur bindende Antikörper gegen das FPPR-abgeleitete Peptid; das Eluat nach CHR/MPER-Aufreinigung nur Antikörper gegen das MPER-abgeleitete Peptid.

Im anschließenden Neutralisierungsassay konnte gezeigt werden, dass nur die FPPR/NHR-spezifischen Antikörper die PERV-Infektion hemmen. Der Titer lag hierbei bei knapp 2,0 μ g/ml (Abb. 5.26. [B]).

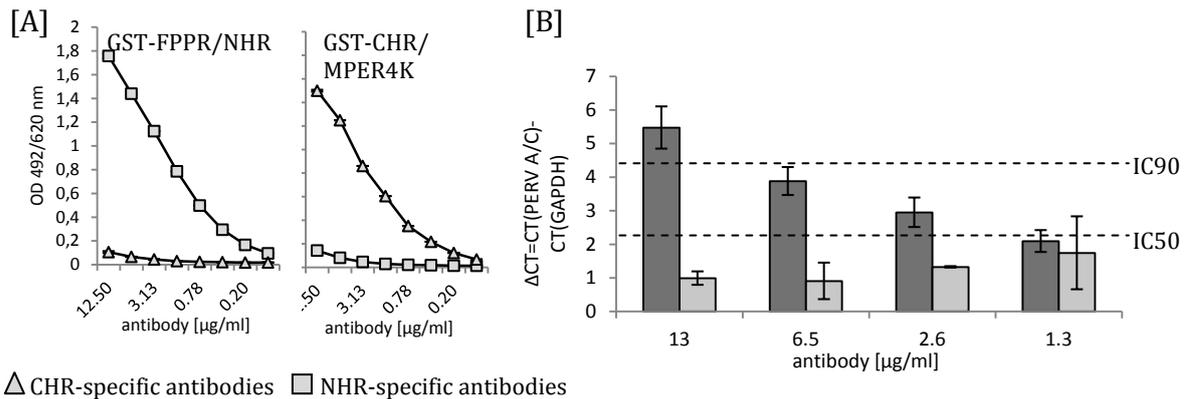


Abbildung 5.26. Bindungs- und Neutralisierungseigenschaften der aufgereinigten Antikörper des Ziegenserums 3429. [A] Titration der aufgereinigten Antikörper nach Affinitätschromatographie mit immobilisierten GST-FPPR/NHR (linker Graph) bzw. GST-CHR/MPER4K (rechter Graph). Dargestellt sind die Bindungen gegen die FPPR (Rechtecke)- und das MPER (Dreiecke)-abgeleitete Peptide in einem ELISA. [B] Neutralisierungsassay der FPPR/NHR (dunkelgrau)- und CHR/MPER (hellgrau)-Eluate (Waechter & Denner, 2013).

5.3.1 Hemmung der Neutralisation durch rekombinante Proteine

Um die Spezifität der neutralisierenden Aktivität nicht nur durch die Isolation der Antikörper-Populationen zu zeigen, wurden Inhibierungsexperimente mit den rekombinanten Proteinen GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K durchgeführt. Zur Kontrolle, ob die Proteine selbst einen Einfluss auf die Infektion haben, wurden diese ohne Zugabe von neutralisierenden Antikörpern mit dem Virus inkubiert und später zu den nicht-infizierten Zellen gegeben.

Für den Ausschluss von mögliche Nebeneffekten und/oder Interaktionen zwischen den Serumsbestandteilen und den rekombinanten Proteinen, sind affinitätschromatographisch aufgereinigte p15E-Antikörper verwendet worden.

Die Inkubation der Antikörper mit dem rekombinanten GST-CHR/MPER4K zeigte keinen Einfluss auf die Hemmung der PERV-Infektion durch die p15E(C549A)-spezifischen Antikörper (Abb. 5.27.). Hingegen wurde die neutralisierende Wirkung der p15E(C549A)-spezifischen Antikörper durch die Inkubation mit dem rekombinanten Protein GST-FPPR/NHR gemindert. Die Betrachtung der gemessenen *ct*-Werte zeigt, dass die Neutralisation um bis zu 100 % gemindert wurde. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass die neutralisierenden Antikörper nach einer p15E(C549A)-Immunisierung gegen die FPPR/NHR gerichtet sind. Die Inkubation des zellfreien Virusüberstands mit den

rekombinanten Proteinen zeigte, dass die Proteine keinen Einfluss auf die Infektion haben ($\Delta\text{ct} \leq 0,1$) (Abb. 5.27.).

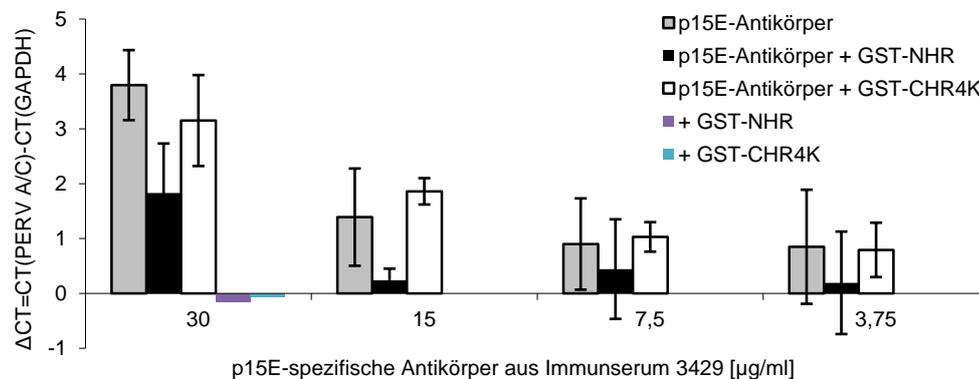


Abbildung 5.27. Hemmung der PERV-Infektion durch rekombinante Proteine. Zur Überprüfung des Einflusses der N- und C-terminalen Proteinen GST-FPPR/NHR und GST-CHR/MPER4K auf die Neutralisation sind diese zusammen mit den p15E(C549A)-spezifischen Antikörpern vorinkubiert und anschließend einem NT-Assay unterzogen. Als Kontrolle wurden die Proteine zusammen mit dem Virus inkubiert und zu den Zellen gegeben.

Auch durch die Immunisierung mit der p15E-Mutante, bei der die Ausbildung der Disulfidbrücke nicht möglich ist, konnten keine MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper induziert werden. Hingegen zeigte erneut eine affinitätschromatographische Aufreinigung, dass auch hier NHR-spezifische Neutralisationsantikörper gegen PERV induziert worden sind. Eine Epitop-Kartierung zeigte ebenfalls wie bei der Immunisierung mit dem GST-FPPR/NHR ein neues Epitop ($_{506}\text{IVTEDLQALEKS}_{517}$), welches nach der Immunisierung mit dem nativen p15E(aa478-602) nicht erkannt wurde.

Tabelle 5.05. Zusammenfassung der Ergebnisse nach der Immunisierung mit der p15E-Mutante.

Immunisierungsantigen/ Aufreinigungsfraction	Bindende Antikörper gegen		Neutralisation
	FPPR/NHR	CHR/MPER	
p15E(C549A)	+	+	+*
GST-FPPR/NHR-Eluat#	+	-	+
GST-CHR/MPER4K-Eluat#	-	+	-

* Hemmung dieser Neutralisation durch Zugabe von GST-FPPR/NHR

Eluate aus den affinitätschromatographischen Aufreinigungen

5.4 Einfluss von p15E-abgeleiteten Peptiden auf die PERV-Infektion

In Vergangenheit wurde durch Inhibierungsversuche mit FPPR- und MPER-abgeleiteten Peptiden untersucht, welche Antikörper-Population nach p15E-Immunsierung für die Neutralisation verantwortlich ist.

Ein erster Versuch mit kürzeren Peptiden bewies, dass nur durch die Zugabe der FPPR- und MPER-abgeleiteten Peptide zusammen die Neutralisation durch p15E-spezifische Antikörper gehemmt wurde (Fiebig *et al.*, 2003). Daher konnte man vermuten, dass es sich um einen Antikörper mit einem diskontinuierlichen Epitop handelt, welcher PERV neutralisiert. In einem zweiten Versuch mit längeren Peptiden hemmte hingegen nur das MPER-abgeleitete Peptid die Neutralisation (Kaulitz *et al.*, 2011).

Aufgrund dieser konträren Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, welchen Einfluss die in dieser Arbeit verwendeten Peptide auf die PERV-Infektion haben. Diese Peptide unterschieden sich allerdings aus verschiedenen Gründen erneut von den o.g. eingesetzten Peptiden (Tab. 5.06.).

Tabelle 5.06. Übersicht der verwendeten PERV-Peptide

Versuch	FPPR-Peptid	MPER-Peptid
#1	ALITGPQLEKGLSC*	CREADQGWFEFEGWFNR*
#2	AALITGPQLEKGLSNLHRICKKK*	KKKCCREREADQGWFEFEGWFNRSPWM*
#3	AAGVGTGTAALITGPQLEKGLS	EREADQGWFEFEGWFNRSPWMTTL

* durch das Lösen dieser Peptide in DMEM entstehen Dipeptide (Tam *et al.*, 1991)
 # 1 (Fiebig *et al.*, 2003) #2 (Kaulitz *et al.*, 2011) #3 diese Arbeit

Insgesamt wurden abgeleitete p15E- als auch randomisierte Peptide (siehe Abschnitt 3.11) in verschiedenen Konzentrationen zu einem Infektionsansatz gegeben und die PERV-DNA anschließend mittels *real-time* PCR quantifiziert.

Die eingesetzten Peptide, welche in PBS gelöst waren, haben sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Infektion mit PERV: die Peptide FPPR, M1, M2 und randomisierte FPPR zeigten keinen bis nur minimalen Einfluss auf die Infektion. Hingegen ist bei dem MPER-Peptid eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Infektion und beim randomisierten MPER-Peptid eine starke Hemmung zu erkennen (Abb. 5.28).

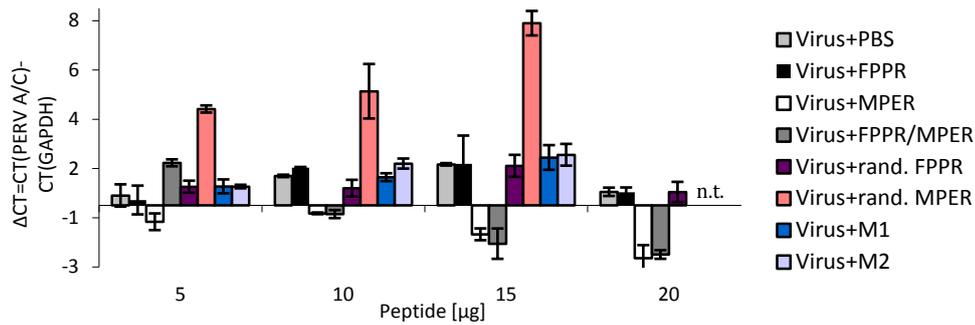


Abbildung 5.28. Einfluss von synthetischen Peptiden auf die PERV-Infektion. Einfluss der Peptide FPPR, M1, M2, MPER und randomisierte FPPR/MPER auf die Infektion von zellfreien PERV-haltigen Überstand auf nicht-infizierte 293T-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Peptid-Konzentrationen. Als Kontrolle wurde PBS verwendet, in welchem die Peptide gelöst sind.

Um in einem ersten Versuch eine Erklärung für die Einflussnahme bestimmter Peptide auf die Infektion zu finden, wurden biotinylierte Peptide (FPPR, MPER, rand. FPPR und MPER) mit und ohne Virusüberstand zu nicht-infizierten 293T-Zellen gegeben und nach 24 Stunden durch ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin-Konjugat (Streptavidin-ALEXA) in ihrer Lokalisation sichtbar gemacht. Dabei stand die Lokalisation an den Zellmembranen im Vordergrund. Die Auswertung erfolgte sowohl qualitativ über Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.29.) als auch quantitativ durch eine FACS-Analyse (Tab. 5.07.).

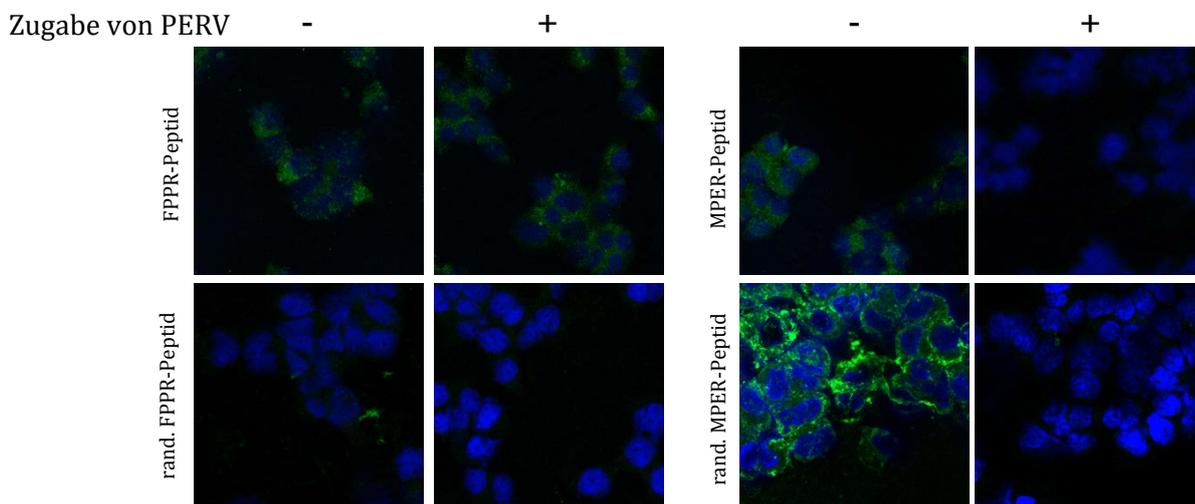


Abbildung 5.29. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Peptid-Inkubation. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellen, die zum einen nur mit dem biotinylierten Peptid (-) als auch zusammen mit virushaltigen Überstand (+) für 24 Stunden inkubiert worden sind. Für eine optimalere Darstellung und Drucklegung in dieser Arbeit ist der grüne Farbton (Streptavidin, Alexa Fluor® 488-Konjugat, welcher an die biotinylierten Peptide bindet) bei allen Bildern im gleichen Umfang intensiviert worden. Die Zellkerne (blaue Färbung) wurde mithilfe von DAPI eingefärbt.

Die Fluoreszenzbilder zeigen sehr deutlich, dass sowohl das FPPR-, MPER- als auch das rand. MPER-Peptid stark an den Zellen bindet. Das rand. FPPR-Peptid bindet dagegen kaum an den Zellen (Abb. 5.29.). Die Bindung des MPER- und rand. MPER-Peptids verringert sich allerdings, wenn die Peptide vor Zugabe auf die Zellen mit zellfreien Virusüberstand inkubiert worden sind. Ein Unterschied der Bindung des FPPR- und rand. FPPR-Peptids mit und ohne Vorinkubation mit PERV wurde nicht erkannt.

Auch die FACS-Analyse konnte die Interaktion zwischen den 293T-Zellen und den MPER- und rand. MPER-Peptiden bestätigen (Tab. 5.07.). Durch Zugabe des Virusüberstands reduzierte sich ebenfalls der Anteil der durch Streptavidin-ALEXA markierten Zellen. Das rand. FPPR-Peptid zeigte kaum eine Bindung an die 293T-Zellen, das FPPR-Peptid nur eine geringe. Der prozentuale Anteil der Zellen mit Signal änderte sich durch Zugabe des Virusüberstands aber auch hier kaum.

Tabelle 5.07. Histogramm-Statistiken der FACS-Analyse.

Peptid	Nur Peptid	Peptid/Virus
FPPR	5,01 %	5,43 %
Randomisiertes FPPR	0,23 %	1,44 %
MPER	5,42 %	0,59 %
Randomisiertes MPER	7,34 %	1,56 %
Zellen ohne Signal: 1,72 %		
Zellen ohne Signal und ohne Zugabe eines biotinylierten Peptids: 1,67 %		

Werden die Ergebnisse dieses Kapitels zusammengeführt, zeigt sich, dass die Peptide MPER- und rand. MPER-Peptid, die die Infektion beeinflussen ebenfalls sehr stark an die nicht infizierten Zellen binden und diese Bindung allerdings nach Zugabe des Virus abgeschwächt wird. Das Peptid FPPR bindet ebenfalls sehr stark an nicht-infizierte Zellen; das rand. FPPR nicht. Die Lokalisation des FPPR-Peptids verändert sich allerdings nicht nach Zugabe des Virus.

5.5 Induktion von FPPR- und MPER-spezifischen Antikörpern

Neben den Immunisierungen mit rekombinanten Proteinen wurden vier Gruppen von jeweils vier von Ratten mit synthetisch hergestellten Peptiden und PBS immunisiert. Diese Peptide sind von der Ektodomäne des Transmembranproteins p15E abgeleitet. Im Unterschied zu einer vorherigen Arbeit mit kürzeren Peptiden, welche nur nach Kopplung mit BSA eine Immunantwort gezeigt haben (Fiebig, 2008), wurden in der vorliegenden Arbeit längere ungekoppelte Peptide verwendet.

Ein Nachweis über die Induktion von Antikörpern erfolgte in einem ELISA. Entsprechend der Antigene, mit denen die Tiere immunisiert worden sind, konnten bindende Antikörper gegen die immobilisierte Peptide nachgewiesen werden (Abb. 5.30.).

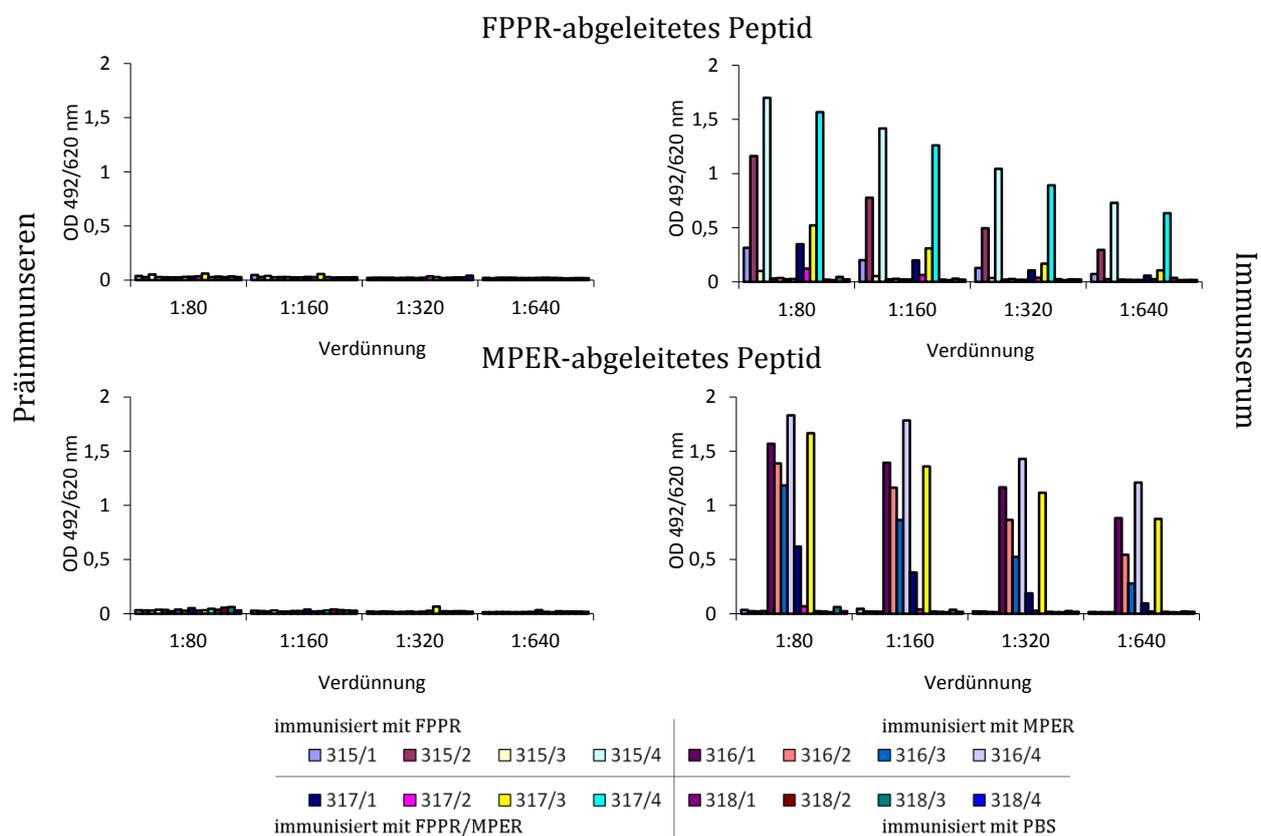


Abbildung 5.30. Titration der Immunsere nach Peptid-Immunisierung. Titration der Präimmunsere als auch Immunsere nach der Immunisierung mit den FPPR und MPER-abgeleiteten Peptiden. In einem ELISA-Experiment zeigen die Immunsere der Tiere, welche mit dem FPPR-Peptid immunisiert worden sind, bindende Antikörper gegen das immobilisierte FPPR-abgeleitete Peptid. Tiere, die mit dem MPER-Peptid immunisiert worden sind, induzierten Antikörper, welche gegen das MPER-abgeleitete Peptid gerichtet sind.

Für einen NT-Assay wurden die Immunglobuline aus den Immunseren isoliert und anschließend gegen PBS dialysiert. Die Immunglobuline zeigten im durchgeführten Assay keine neutralisierende Wirkung. Nur die Positivkontrolle (p15E-spezifische Antikörper des Immunserums der Ziege 350) konnte die Virus-Infektion hemmen (Abb. 5.31.).

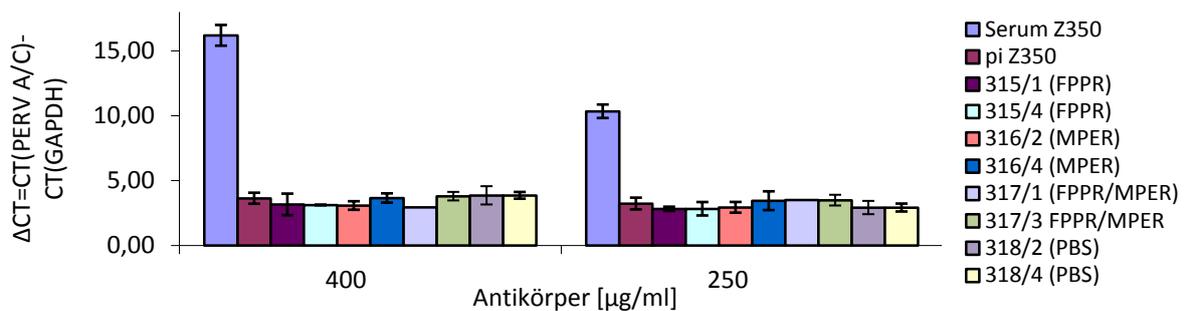


Abbildung 5.31. Neutralisationsassay mit isolierten Immunglobuline nach Peptidimmunisierung. Im dargestellten NT-Assay wurden die Seren verwendet, welche einen hohen Titer an FPPR- und MPER-bindenden Antikörpern besaßen.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Peptide grundsätzlich in der Lage sind, eine Immunantwort zu aktivieren. Allerdings konnten die induzierten Antikörper eine PERV-Infektion nicht hemmen.

Tabelle 5.08. Zusammenfassung der Ergebnisse nach Peptid-Immunsierung.

Antigen	Bindende Antikörper gegen		Neutralisation
	FPPR	MPER	
FPPR	+	-	-
MPER	-	+	-
FPPR/MPER	+	+	-
PBS	-	-	-

5.6 Interaktion zwischen den PERV-Peptiden

Die Primär-, Sekundär- und folglich die Tertiärstruktur von Proteinen führt zu wichtigen innermolekularen Interaktionen des Proteins. Auch bei der Infektion von Retroviren spielen diese innermolekularen Interaktionen eine entscheidende Rolle, da bei dem Kontakt mit den

Rezeptoren an der Zielzelle Umstrukturierungen an den Oberflächenproteinen der Viren stattfinden, die dazu führen, dass das Virus in die Zelle eindringen kann. Für HIV-1 gezeigt und für weitere Retroviren angenommen, legen sich jeweils drei NHR- und CHR-Domänen aneinanderlegen und bilden die sog. *six-helix-bundle* aus. Diese ist Voraussetzung für die Annäherung zwischen Virus- und Wirtszellmembran (Colman & Lawrence, 2003; Eckert & Kim, 2001b; Gallaher *et al.*, 1989; Skehel & Wiley, 1998).

Wie Versuche mit NHR- und CHR-Peptiden von HIV-1 zeigen, interagieren diese Peptide miteinander und bilden teilweise eine *six-helix-bundle* aus (Liu *et al.*, 2007).

Da die in dieser Arbeit verwendeten PERV-Peptide durch eine Coomassie Blue-Färbung nicht sichtbar gemacht werden konnten, wurde deren mögliche Interaktion in einem ELISA-Experiment überprüft (Kumada *et al.*, 2007).

Bei zwei der drei getesteten NHR-Peptide (FPPR und M1) konnte keine Interaktion durch diese Methoden festgestellt werden. Bei dem dritten Peptid (M2) hingegen konnte eine leichte konzentrationsabhängige Interaktion gezeigt werden (Abb. 5.32.).

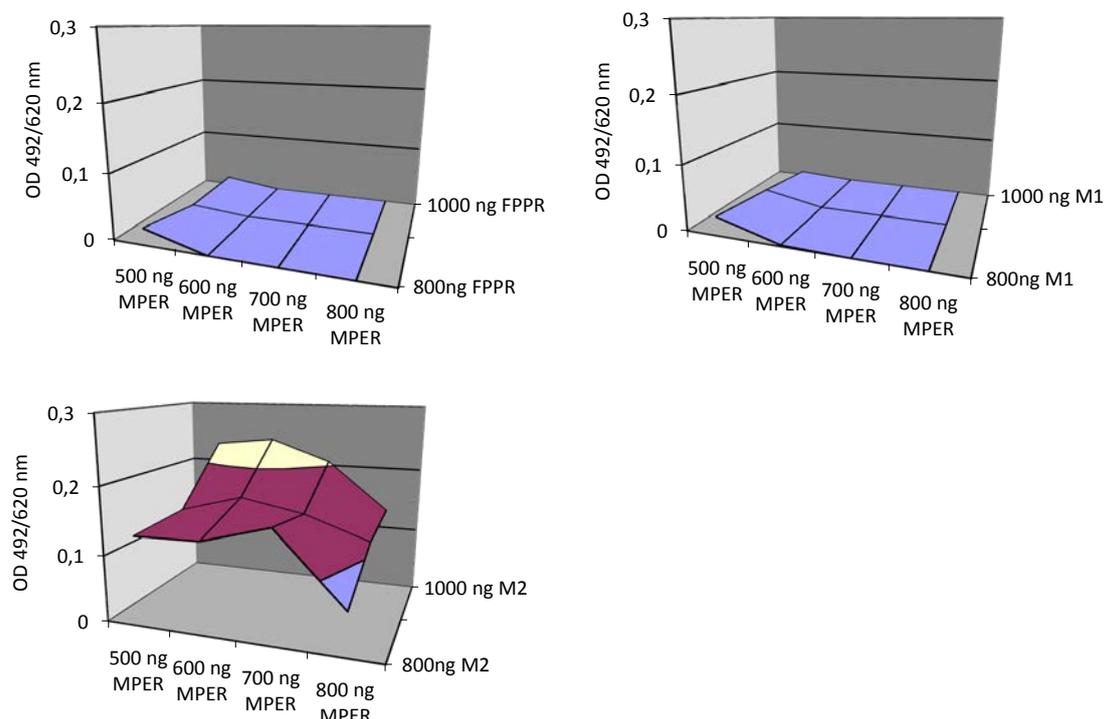


Abbildung 5.32. Interaktionsstudien zwischen NHR- und CHR-Peptiden. Mithilfe eines Sandwich-ELISA wurde die Interaktion zwischen den NHR-Peptiden FPPR, M1 und M2 mit dem CHR-Peptid MPER festgestellt.

6. Diskussion

Vorrangig sollten in dieser Arbeit die in früheren Arbeiten induzierten p15E-spezifischen Antikörper, die für einen potentiellen Impfstoff gegen PERV genutzt werden könnten, charakterisiert werden. Darüber hinaus soll ein Vergleich mit ähnlich lokalisierten neutralisierenden Antikörpern gegen andere (Gamma-)Retroviren generelle Aussagen über die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen TM-Proteine von Retroviren liefern und so auch zur Antikörperforschung gegen HIV-1 beitragen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher zu zeigen, an welche Epitope die nach einer Immunisierung mit dem rekombinanten TM-Protein p15E induzierten Neutralisationsantikörper gegen das porcine endogene Retrovirus (PERV) binden und wie diese im Detail induziert werden. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen PERV stellt u.a. eine Möglichkeit dar, die Übertragung dieser endogenen Retroviren bei einer Xenotransplantation von prozinem Gewebe auf den menschlichen Organismus zu verhindern (Fiebig *et al.*, 2003).

Da PERV in fast allen porcinen Genomen detektierbar ist (Denner & Tonjes, 2012; Labrecque *et al.*, 2011; Le Tissier *et al.*, 1997; Popp *et al.*, 2007) und menschliche Zellen *in vitro* infizieren kann (Patience *et al.*, 1997), müssen alle nötigen Vorkehrungen getroffen werden, um eine speziesübergreifende Infektion bei einer Xenotransplantation mit porzinem Gewebe zu verhindern. Bis heute wurde allerdings in keiner klinischen Xenotransplantation mit porzinem Gewebe beim Menschen eine PERV-Übertragung festgestellt (Di Nicuolo *et al.*, 2010; Irgang *et al.*, 2003; Paradis *et al.*, 1999; Patience *et al.*, 1998).

Andere Retroviren, darunter das Gammaretrovirus KoRV als auch HIV, zeigen allerdings, dass es zu Xenozoonosen kommen kann und diese schwerwiegende Folgen für den Empfängerorganismus hat (Gao *et al.*, 1999; Tarlinton *et al.*, 2008; Tarlinton *et al.*, 2006).

In den ersten beiden Kapiteln wird zunächst die Induktion von MPER- und NHR-spezifischen Neutralisationsantikörpern gegen PERV diskutiert. Im Anschluss dessen werden jeweils zu diesen Antikörpern Parallelen zu HIV-1 gezogen, da gegen dieses Virus ebenfalls neutralisierende Antikörper gegen die MPER und NHR beschrieben worden sind. Dieser Abschnitt wird durch Ergebnisse des Anhangs 7.4 ergänzt, die aus einem datenbasierenden Vergleich zwischen gp41 von HIV-1 und p15E von PERV resultieren.

Daraus abgeleitet soll der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die NHR und CHR bei der Induktion von Antikörpern haben und welchen Einfluss sie dabei aufeinander haben.

6.1 Neutralisierende Antikörpern gegen PERV

Nachdem in mehreren Arbeiten p15E-spezifische Antikörper, die die Infektion von humanen Zellen mit PERV verhindern bzw. reduzieren, induziert werden konnten, stellte sich die Frage, an welche Bereiche von p15E die neutralisierenden Antikörper binden (Denner *et al.*, 2012; Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011).

Um die beschriebenen Epitope in der FPPR/NHR und CHR/MPER, an welche die induzierten Antikörper binden, dem Immunsystem besser präsentieren zu können, wurde für diese Arbeit das bisherige rekombinante p15E für eine erneute Immunisierung einer Ziege N- und C-terminal verlängert und entsprach nahezu der kompletten Ektodomäne (Abb. 5.01.).

Eine Epitop-Kartierung des Immunserums zeigte, dass ebenfalls wie in den vergangenen Immunisierungen Antikörper induziert wurden, die in der FPPR/NHR und CHR/MPER binden (Abb. 5.03.). Allerdings konnte in der FPPR/NHR kein konkretes Epitop definiert werden, so dass davon auszugehen ist, dass viele verschiedene FPPR/NHR-spezifische Antikörper mit überlappenden Epitopen induziert worden sind.

Das Epitop in der CHR/MPER, das durch das Ziegenserum 350 erkannt worden ist, wurde mit $_{589}\text{GWFE}\text{GWFN}\text{RSP}_{599}$ definiert und ist identisch mit dem Epitop des Ziegenserums 355 als auch die Epitope, welche nach Immunisierungen mit p15E von Ratten, Mäusen und Meerschweinchen erkannt wurden (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011). Wie schon beschrieben, besteht mit diesem Epitop eine Sequenzhomologie zu dem Epitop des breitneutralisierenden Antikörper 4E10 gegen HIV-1, welcher bis zu 95 % aller HIV-1 Stämme neutralisiert (Binley *et al.*, 2004; Zwick *et al.*, 2001).

Neben den Epitopen in der FPPR/NHR und der CHR/MPER wird ein Epitop im Bereich der Disulfidbrücke erkannt. Nach der Immunisierung mit einem rekombinanten Protein, das aus gp70 und p15E bestand, konnte in einer anderen Studie ebenfalls ein Antikörper (Name: 7C4) gezeigt werden, der an der Disulfidbrücke bindet und das Virus neutralisiert (Chiang *et al.*, 2007).

Da die Charakterisierung der FPPR/NHR und CHR/MPER-bindenden Antikörper im Vordergrund dieser Arbeit stand, wurden die bindenden Antikörper im Bereich der Disulfidbrücke nicht weiter untersucht. Für einen Vergleich der in dieser Arbeit induzierten

Antikörper gegen die Disulfidbrücke und 7C4 kann man den hier gezeigten Antikörper durch Affinitätschromatographie aufreinigen und in einem Neutralisationsassay testen.

Durch die erneut gezeigte Induktion von Antikörpern in den Bereichen der NHR/FFPR, der Disulfidbrücke sowie der MPER können diese als immunogene Regionen beschrieben werden. Auch bei anderen Retroviren werden gegen diese Regionen Antikörper induziert, so z.B. sind nach einer HIV-1 Infektion ebenfalls Antikörper gegen diese Regionen des TM-Proteins gp41 zu finden (Bellamy-McIntyre *et al.*, 2007; Finnegan *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2008; Sattentau *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2004), oder nach der Infektion mit dem Gammaretrovirus FeLV (Langhammer *et al.*, 2006). Aber auch nach Immunisierungen mit den TM-Proteinen der Gammaretroviren FeLV und KoRV konnten Antikörper in diesem Bereichen induziert werden (Kaulitz, 2012; Langhammer *et al.*, 2005; Mahdi, 2009).

Im Vergleich zu den Immunisierungen mit dem kürzeren p15E zeigte das Immuneserum nach der Immunisierung mit dem längeren p15E höhere Titer an FFPR- und MPER-bindenden Antikörper, aus denen eine stärkere Neutralisation des Virus resultierte (Abb. 5.13.).

Dieser Neutralisationsassay basiert auf der Messung der viralen DNA mittels *real-time* PCR, um zu zeigen, dass die Zellen durch den zellfreien Virusüberstand infiziert wurden und die Reverse Transkriptase aktiv ist (Behrendt *et al.*, 2012; Kaulitz *et al.*, 2011). Eine Hemmung der Infektion ist somit direkt durch die Abnahme von viraler DNA erkennbar. Diese Methode hat die Vorteile, dass i) diese durch Basieren einer *real-time* PCR sehr sensitiv ist, ii) die Infektion zu einem frühen Stadium durch die Messung viraler DNA gemessen wird und iii) durch die Verwendung einer 96-well-Platte nur geringe Mengen an Serum/Antikörper benötigt werden und somit viele Verdünnungen der Seren/Antikörper möglich sind.

Die Unterschiede in den Titern und der Neutralisation können am Nicht-Vorhandensein eines Tags, an der Fähigkeit Dimere statt Monomere unter physiologischen Bedingungen auszubilden (Abb. 5.11.) und/oder durch die Länge des rekombinanten Proteins liegen (Abb. 5.12.) – wobei diese Unterschiede keine Relevanz auf die Isolierung und weiteren Untersuchungen der Antikörper hatte.

Um zu zeigen, dass die Neutralisation durch p15E-spezifische Antikörper erfolgt, sind diese nach Immobilisation von GST-p15E aus dem Immuneserum der Ziege 350 isoliert und ebenfalls einem Neutralisationsassay unterzogen worden (Abb. 5.07.).

Für die Darstellung der Interaktion zwischen p15E-spezifischen Antikörpern und Virus, sind diese durch Protein G immobilisiert worden und konnten in einer Immunpräzipitation das Virus binden (Abb. 5.14.). Dieser Versuch zeigt auch, dass die induzierten p15E-spezifischen Antikörper direkt an das Virus binden, ohne dass der Fusionsprozess mit den beschriebenen

Umlagerungen im TM-Protein eingeleitet wurde. Allerdings zeigt dieser Versuch nicht, welcher Antikörper (FPPR/NHR, Disulfidbrücke oder CHR/MPER) an das Virus bindet. Ebenfalls kann durch diese Immunpräzipitation nicht gezeigt werden, ob die bindenden Antikörper auch verantwortlich für die gezeigte Neutralisation sind. Daher ist zu empfehlen weitere Immunpräzipitationen mit weiteren induzierten (Neutralisations-)Antikörpern gegen PERV und deren Aufreinigungen durchzuführen. Durch solche Immunpräzipitationen könnte auch der Frage nachgegangen werden, bei welcher Struktur die neutralisierenden Antikörper binden, um mögliche Antigene daraus abzuleiten.

6.1.1 Neutralisation durch MPER-spezifische Antikörper

Nachdem erneut gezeigt werden konnte, dass p15E-spezifische Antikörper eine PERV-Infektion hemmen, soll die Frage diskutiert werden, an welches Epitop die neutralisierenden Antikörper gegen PERV binden. Für eine Affinitätschromatographie der FPPR/NHR- und CHR/MPER-bindenden Antikörper wurden rekombinante Proteine, die zum einen den N-terminalen Bereich (NHR) und zum anderen den C-terminalen Bereich (CHR) von p15E umfassen, hergestellt.

Die Entscheidung, rekombinante Proteine und nicht synthetische Peptide zu verwenden wurde hauptsächlich getroffen, um relativ große Mengen kostengünstig aufzureinigen und einen größeren Abschnitt des TM-Proteins zwecks Stabilisierung und Struktur der Epitope verwenden zu können.

In einem früheren Versuch mit immobilisierten Peptiden hat eine ähnliche Aufreinigung kein Ergebnis geliefert (Fiebig, 2008). Eine Möglichkeit des Fehlschlagens könnte sein, dass die verwendeten Peptide zu kurz waren. So zeigt die Bindung des neutralisierenden Antikörpers 2F5 gegen HIV-1, dass dieser besser an einem längeren Peptid bindet (Ho *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass längere Peptide/Proteine mehr der nativen Struktur ähneln als kürzere und somit Antikörper mit einer höheren Affinität an längere binden und isoliert werden können (Arnold *et al.*, 2009; Barbato *et al.*, 2003).

Da eine solche affinitätschromatographische Aufreinigung von vielen Faktoren abhängig ist (GE-Healthcare; Muronetz *et al.*, 2001; Urh *et al.*, 2009), wurden nicht nur die gebundenen und eluierten Antikörper auf ihre Bindungs- und Neutralisationseigenschaften getestet, sondern auch die Antikörper, die nicht gebunden haben. Aus diesem Grund wurden für die Aufreinigungen relativ wenig Serum verwendet, um möglichst eine Antikörper-Population dem Serum komplett zu „entziehen“ und somit auch die Durchläufe testen zu können.

Die ELISA-Untersuchungen und auch Epitop-Kartierungen der Eluate als auch Durchläufe zeigten, dass es möglich war, beide Antikörper-Populationen (FPPR/NHR und CHR/MPER) zu trennen (Abb. 5.08. und 5.09.), so dass jeweils zwei Fraktionen mit nur FPPR/NHR- oder CHR/MPER-spezifischen Antikörpern für den NT-Assay verwendet werden konnten.

Aus unbekanntem Grund zeigten dennoch die Epitop-Kartierungen noch 1-3 % unspezifische Bindung von Antikörpern, welche entweder unspezifisch an das immobilisierte Protein oder an Iso-Harnstoff-Derivate binden, die sich während der Aktivierung der CNBr-Sephrose formen (Robin, 1993).

Der Neutralisationsassay zeigte, dass nur die Fraktionen die PERV-Infektion hemmten, die CHR/MPER-spezifische Antikörper enthielten (Abb. 5.10.). Durch die durchgeführte Epitop-Kartierung konnte zuvor bestätigt werden, dass diese Antikörper nur an dem Epitop₅₈₉GWFE₅₉₉ binden, so dass im Folgenden von MPER-spezifischen Antikörpern geredet wird. Dass die MPER-spezifischen Antikörper für die Neutralisation verantwortlich sind, konnte zuvor schon durch einen der oben erwähnten Inhibitionsversuche gezeigt werden, in welchem das MPER-abgeleitete Peptid die Neutralisation durch p15E-spezifische Antikörper reduziert (Kaulitz *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu hatte das FPPR-abgeleitete Peptid keinen Einfluss auf die Neutralisation.

Allerdings bewies ein ähnlicher Versuchsaufbau mit anderen synthetisch hergestellten Peptiden, dass die FPPR- und MPER-abgeleiteten Peptiden nur zusammen und nicht einzeln die Neutralisation hemmen (Fiebig *et al.*, 2003). Aufgrund dieser entgegengesetzten Ergebnisse wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Peptide auf die Infektion und somit auch auf diese Inhibitionsversuche überprüft. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 6.4 diskutiert.

Das Ergebnis, dass MPER-spezifische Antikörper nach einer Immunisierung mit dem TM-Protein p15E von PERV eine neutralisierende Wirkung besitzen, zeigt erneut, dass die MPER eine wichtige Domäne für die Neutralisation von PERV darstellt.

6.1.2 Beteiligung von NHR-spezifische Antikörper an der PERV-Neutralisation

Nachdem im ersten Teil der Arbeit eine Trennung der FPPR/NHR- und CHR/MPER-bindenden Antikörper vorgenommen und festgestellt wurde, dass nur die MPER-spezifischen Antikörper neutralisieren, stellte sich nun die Frage, wie solche MPER-neutralisierenden Antikörper induziert werden können. Aus diesem Grund wurden in

dieser Arbeit weitere Immunisierungsstudien mit neuen Antigenen und entsprechenden Affinitätschromatographischen Aufreinigungen durchgeführt.

Nach der Immunisierung mit der C-terminalen Domäne GST-CHR/MPER4K konnten keine MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper detektiert werden (Abb. 5.19.). Auch die Annahme, dass die N-terminale Domäne vorhanden sein muss, konnte nicht bestätigt werden, da durch eine Immunisierung mit dem GST-CHR/MPER4K und dem GST-FPPR/NHR ebenfalls keine MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper induziert werden konnten (Abb. 5.26.). Hingegen konnte erstmals nach der Immunisierung mit der N-terminalen Domäne neutralisierende Antikörper induziert werden. Diese konnten ebenfalls nach der Immunisierung mit GST-CHR/MPER4K und dem GST-FPPR/NHR nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung detektiert werden (Abb. 5.26.).

Bei einer Immunisierung mit einer p15E-Mutante, bei welcher der Cystein-Loop mutiert wurde, konnten ebenfalls keine gegen die MPER gerichteten Neutralisationsantikörper gezeigt werden (Abb. 5.21.). Hingegen zeigten die isolierten FPPR/NHR-spezifischen Antikörper eine neutralisierende Wirkung.

In einem weiteren Versuch hemmte die Zugabe des rekombinanten Proteins GST-FPPR/NHR die neutralisierende Wirkung der p15E-spezifischen Antikörper nach der Immunisierung mit der p15E-Mutante. Das rekombinante Protein GST-CHR4K zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Neutralisation (Abb. 5.27.). Als Kontrolle zeigten beide Proteine keinen Einfluss auf die PERV-Infektion.

Somit konnte sowohl direkt durch Isolation der Antikörper als auch indirekt durch Inhibition mit rekombinanten Proteinen nachgewiesen werden, dass nach der Immunisierung mit der p15E-Mutante NHR-spezifische Neutralisationsantikörper induziert werden konnten.

Die Epitop-Kartierungen der Seren, die NHR-spezifische Neutralisationsantikörper enthielten, zeigten ein neues Epitop, das nach der Immunisierung mit dem nativen p15E(aa478-602) nicht detektiert wurde: $_{506}\text{IVTEDLQALEKS}_{517}$ (Abb. 5.22. und 5.25.). Im Gegenzug dazu wird das MPER-Epitop $_{589}\text{GWFEGWFNRSP}_{599}$, an welches die neutralisierenden Antikörper nach einer Immunisierung mit p15E(aa478-602) binden, nach den Immunisierungen mit der C-terminalen Domäne nicht erkannt.

Aus diesen Epitop-Kartierungen und den durchgeführten Neutralisationsassays lässt sich schlussfolgern, dass die neutralisierende Aktivität mit dem Vorhandensein von Antikörpern gegen das MPER-Epitop $_{589}\text{GWFEGWFNRSP}_{599}$ und gegen das NHR-Epitop $_{506}\text{IVTEDLQALEKS}_{517}$ korreliert.

Um das Epitop der neutralisierenden FPPR/NHR-spezifischen Antikörper gegen PERV allerdings näher zu bestimmen, sollten weitere Studien wie Inhibitionsversuche oder Affinitätschromatographien mit kleineren Peptiden erfolgen.

Hierbei sollte allerdings bedacht werden, dass die zu untersuchenden/verwendeten Peptide keinen Einfluss auf die Infektion mit PERV haben, indem sie z.B. mit den Oberflächenproteinen oder mit der Virusmembran des Virus interagieren (siehe Abschnitt 6.4) (Pang *et al.*, 2009; Stanfield & Wilson, 1995). Bei der Verwendung von kleinen Peptiden in einer affinitätschromatographischen Aufreinigung muss darauf geachtet werden, dass diese die Strukturen des nativen Proteins einnehmen (Ayyar *et al.*, 2012). Sollte nämlich durch die Veränderung der Ligandenform oder die Ladung des Antigens die eigentliche Epitopstruktur verändert werden (Jaroslava, 2002), kann es sein, dass die entsprechenden Antikörper nicht mehr isoliert werden können.

Zwischen einem Teil der Sequenz des hier erstmalig beschriebenen Epitops $_{506}$ IVTEDLQALEKS $_{517}$ und der Sequenz eines FeLV-Peptids (TDIQALEESISALEKSLTSLSE), das nach einer Immunisierung von Kaninchen neutralisierende Antikörper gegen das Gammaretrovirus FeLV induzierte (Elder *et al.*, 1987), besteht eine Sequenzhomologie. Das Peptid ist ähnlich wie das erkannte Epitop auf der NHR des TM-Proteins von FeLV lokalisiert und zeigt somit, dass auch auf dem N-terminalen Bereich der Hüllproteine von Gammaretroviren Ähnlichkeiten in Bezug auf antigen-induzierenden Strukturen bestehen. Neben der Immunisierung mit Peptiden konnten Langhammer und Kollegen durch die Immunisierung mit rekombinanten p15E von FeLV ebenfalls neutralisierende Antikörper induzieren (Langhammer *et al.*, 2005). Eine Epitop-Kartierung zeigte auch hier, dass ein Teil der induzierten p15E-Antikörper am Epitop ALEESISALEKS (E1b) binden. Natürlich mit FeLV infizierte Katzen zeigten ebenfalls, dass sie Antikörper gegen das E1b-Epitop induziert haben (Langhammer *et al.*, 2006).

Nur kurz angesprochen werden, soll hier die Möglichkeit der Ausbildung von hydrophoben Taschen durch α -Helices der NHR von PERV. Für den HIV-1 neutralisierenden Antikörper D5, der ebenfalls in der NHR sein Epitop hat, konnte gezeigt werden, dass dieser in einer solchen Tasche bindet (Luftig *et al.*, 2006).

In Abbildung 6.01. wird daher eine Möglichkeit der Ausbildung von hydrophoben Taschen bei p15E von PERV dargestellt. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sich in der Aminosäuresequenz im Wechsel alle vier bzw. drei Aminosäuren eine hydrophobe

Aminosäure befindet (Chan *et al.*, 1997). Auch das beschriebene Epitop ₅₀₆IVTEDLQALEKS₅₁₇ befindet sich in solchen Taschen (Abb. 6.01.).

GST-AAGVGTGTAALITGPQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSEV

Abbildung 6.01. Darstellung von möglichen hydrophoben Taschen. Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz des verwendeten Antigens NHR (gekoppelt mit GST). Rot eingezeichnet sind die hydrophoben Aminosäuren, welche im 3-2er Abstand die hydrophoben Taschen ausbilden. Das Epitop ₅₀₆IVTEDLQALEKS₅₁₇ ist unterstrichen.

Da allerdings keine dreidimensionale Struktur von p15E von PERV vorliegt, beruht diese Darstellung auf rein theoretischen Grundlagen. Für weitere Untersuchungen mit dem TM-Protein p15E von PERV wäre es sehr hilfreich durch eine NMR- oder eine Röntgenstrukturanalyse eine Darstellung der räumlichen Struktur vorliegen zu haben.

Die Existenz von neutralisierenden Antikörpern, die an der NHR der TM-Proteine von PERV und FeLV binden, zeigt, dass diese Region neben der MPER ein wichtiges Ziel für die Neutralisation von verschiedenen Gammaretroviren darstellt. Für einen effektiven Impfstoff gegen PERV wäre es daher ratsam MPER- und NHR-spezifische Antikörper, durch eine Immunisierung mit der kompletten Ektodomäne sowie der FPPR/NHR-Untereinheit, zu induzieren, damit diese synergistisch wirken können.

Wie bei den meisten Immunisierungsversuchen müssen die Ergebnisse auch auf ihre Signifikanz diskutiert werden. Dieser Abschnitt der Arbeit umfasste drei Immunisierungen, bei welchen in einem Ansatz jeweils zwei Tiere und in den anderen beiden jeweils nur ein Tier immunisiert worden sind. Da nach den Immunisierungen mit mehreren Antigenen als auch mit der p15E-Mutante die affinitätschromatographischen Aufreinigungen geplant waren, wurde sich wieder für die Ziegenspezies entschieden, bei welcher in der Regel immer nur ein Tier immunisiert wird.

Für eine Wiederholung mit einer höheren Anzahl an Tieren, konnte sich in dieser Arbeit nicht durchgerungen werden. Eine Immunisierung von Ratten brachte das Ergebnis, dass diese präformierte Antikörper im Präimmunserum besitzen und daher diese Spezies nicht geeignet ist (Kaulitz, 2012). Widersprüchliche Aussagen liegen bei der Immunisierung von Meerschweinchen vor, ob die induzierten Antikörper in dem hier angewendeten

Neutralisationsassay überhaupt getestet werden können (Denner *et al.*, 2012; Kaulitz, 2012), so dass ebenfalls von dieser Spezies Abstand genommen werden sollte.

Ebenso ist zu bedenken, dass die Resultate bei Inzucht-Tieren wie Mäusen, die für lange Zeit ein „Basis-Tool“ für Immunologen dargestellt haben, nicht unbedingt übertragbar auf das menschliche Immunsystem sind (Davis, 2008; Mestas & Hughes, 2004). Aus diesem Grund steht der Verfasser dieser Arbeit groß angelegten Immunisierungen skeptisch gegenüber.

6.2 Vergleich von neutralisierenden Antikörpern zwischen PERV und HIV-1

6.2.1 Homologie zwischen MPER-spezifischen Antikörpern bei PERV und HIV-1

Zahlreiche Versuche, MPER-spezifische Antikörper zu induzieren, die HIV-1 effektiv neutralisieren, schlugen bisher fehl (Montero *et al.*, 2008; Munier *et al.*, 2011). Im Vergleich dazu konnten in dieser Arbeit MPER-spezifische Neutralisationsantikörper gegen PERV durch Immunisierungen mit dem TM-Hüllprotein p15E induziert werden (Waechter *et al.*, 2012). Auch bei verwandten Gammaretroviren wie FeLV (Langhammer *et al.*, 2006) oder KoRV (Fiebig *et al.*, 2006) ließen sich durch einfache Immunisierungen mit den entsprechenden TM-Hüllproteinen neutralisierende Antikörper induzieren, wobei nach diesen Immunisierungen keine Auftrennung nach NHR- und CHR-spezifischen Antikörpern erfolgte.

Anhand drei grundlegender Unterschiede zwischen den TM-Proteinen von PERV und HIV-1 soll die Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern gegen HIV-1 und PERV diskutiert werden:

- I. Glykosylierung des TM-Proteins
- II. Interaktion zwischen der MPER und der Virusmembran
- III. Konformation/Struktur des Proteins

Im Gegensatz zu p15E von PERV, FeLV und KoRV sind die TM-Proteine von HIV-1 (gp41) und HIV-2 (gp36) glykosyliert (Denner, 2012; Lee *et al.*, 1992).

In einer Vielzahl an Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Kohlenhydrate Einfluss auf die Bindung und Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern haben. So zeigte eine Immunisierung mit deglykosylierten gp140 (bestehend aus der Ektodomäne von gp120 und gp41 zusammen; ohne Signalpeptid), dass das deglykosylierte gp140 höhere Level von Antikörpern induzierte als das native gp140, die das 2F5-Epitop erkennen (Ma *et al.*, 2011). Als Ergebnis dieses Versuchs wurde postuliert, dass die Reaktivität der breitneutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 mit der Deglykosylierung von gp140 zunimmt.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Immunisierungsstudie mit einer SIVmac239-Mutante, die ein deglykosyliertes gp41 besaß (Yuste *et al.*, 2008). Eine spätere Analyse der induzierten neutralisierenden Antikörper zeigt, dass diese im Bereich der ursprünglichen

Deglykosylierungsstelle binden und nur die deglykosylierte Mutante neutralisieren (Martinez-Navio & Desrosiers, 2012).

Erst jüngst konnte erstmalig gezeigt werden, dass es auch bei HIV-1 zu einer erhöhten Immunizität von gp41 kommt, sobald dieses deglykosyliert ist (Quinnan *et al.*, 2013). Bei einer Untersuchung verschiedener gp41-Mutanten konnte allerdings nur für eine Mutante gezeigt werden, dass diese schwach neutralisierende Antikörper induziert.

In einer kritischen Diskussion wurde allerdings angemerkt, dass die erhöhte Immunizität auch mutationsbedingt sein könnte und nicht unbedingt mit der Deglykosylierung zusammenhängen muss. Trotz dieses kritischen Beitrags wurde in dieser Arbeit zusammenfassend geschlussfolgert, dass die Glykosylierung von gp41 bzw. anderer TM-Proteine wichtig für Struktur und Funktion und somit auch mit der Verdeckung von Epitopen von möglichen neutralisierenden Antikörpern assoziiert ist.

In einer weiteren jüngst veröffentlichten Untersuchung von 25 Glykosylierungsstellen von gp120 und gp41 von HIV-1 konnte zudem gezeigt werden, dass die Antikörper 2F5 und 4E10 besser an deglykosylierten HIV-1 Mutanten binden und somit Glykane in unbekannter Weise die Bindung der Antikörper beeinflussen (Wang *et al.*, 2013). Als erste wage Erklärung wird die Zunahme der Flexibilität zwischen gp120 und gp41 nach der Deglykosylierung und somit mit einer Erhöhung der Präsentation der MPER von gp41 in Verbindung gebracht.

Zusammengefasst zeigt sich, dass für HIV-1 verschiedene Versuche einen Einfluss der Glykosylierung auf die Bindung und Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper aufzeigen konnten.

Neben dem Einfluss der Glykosylierung wird in vielen wissenschaftlichen Arbeiten die Wirkung der Virusmembran auf die Induktion von MPER-spezifischen Antikörper untersucht. Durch Kernspinresonanz- Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das 4E10-Epitop teilweise in der Lipiddoppelschicht verankert (Sun *et al.*, 2008) und aus diesem Grund für eine Antikörper-Bindung nicht zugänglich ist (Huarte *et al.*, 2008). Ob die Nähe zwischen dem Epitop und der Lipiddoppelschicht für eine Antikörper-Induktion notwendig ist, konnte noch nicht gezeigt werden, da bisher Immunisierungen mit Lipid-Protein-Komplexen fehlgeschlagen sind (Kim *et al.*, 2007; Lenz *et al.*, 2005).

Law und seine Kollegen gehen davon aus, dass durch den hydrophoben Charakter des Epitops von 4E10 dieses mit anderen hydrophoben Molekülen (z. B. Membranen) reagiert und somit vor einer möglichen Interaktion mit einem B-Zell-Rezeptor geschützt wird (Law *et al.*, 2007). Für den Antikörper 2F5 konnte zudem gezeigt werden, dass die Affinität an gp41 höher ist, wenn dieses zusammen mit einem Lipid vorliegt (Grundner *et al.*, 2002).

Leider fehlen für PERV und andere Gammaretroviren Analysen, inwieweit die MPER mit Lipiden und im speziellen mit der Virusmembran interagiert. Um einen direkten Vergleich zu HIV-1 durchzuführen, wie z.B. mit dem Ebola- und Sudan-Virus (Virusfamilie: *Filoviridae*) geschehen, könnten *Circular Dichroismus* (CD)-Spektroskopie-Analysen mit MPER-Peptiden und Dodecylphosphocholin (DPC) durchgeführt werden (Regula *et al.*, 2013).

Grundsätzlich ist die Länge der Ektodomäne der TM-Proteine p15E der Gammaretroviren gegenüber denen von HIV-1/2 sehr viel kleiner (HIV-1: 137aa; HIV-2: 141aa; PERV: 115aa; FeLV: 114aa), woraus sich wiederum strukturelle Unterschiede bei der Umlagerung der NHR- und CHR-Helices während der Infektion ergeben können (Tab. 6.02.). Dies wiederum hat einen starken Einfluss auf die Präsentation bestimmter Epitope.

Tabelle 6.01. Die Transmembran-Proteine einzelner Retroviren im Vergleich. (Denner, 2012)

Virus	kDa	Amino acids, total	Amino acids, ectodomain	Amino acids, cystein loop	Number of cysteins	Number of possible glycosylation sites	Amino acids, cytoplasmic tail	Accession number
HIV-1	41	345	137	5	2	7	151	CAB96240
HIV-2	36	258	141	5	2	7	154	ACT85844
FeLV	15	196	130 #	7	3	0	34	AAA93093
PERV	15	180	115	7	3	0	34	CAA72927
FFV	48	419	353	not defined	9	5	8	056861
PFV	47	417	354	not defined	7	3	7	Q87041

die Angabe über die Länge der Ektodomäne bei FeLV ist fehlerhaft; sie beträgt nur 114 Aminosäuren

Im Vergleich zwischen der tryptonphanreichen MPER von HIV-1 und PERV/FeLV zeigt sich, dass diese Region bei HIV-1 aus fünf Tryptophanen gebildet wird und bei PERV nur aus drei (Tab. 7.02).

Eins der fehlenden Tryptophane stellt das Tryptophan (Trp^{P680}) fernab des WFN-Motivs des Epitops des breitneutralisierenden Antikörpers 4E10 gegen HIV-1 dar, welches Einfluss auf die Bindungseigenschaft des Antikörpers nimmt (Zwick *et al.*, 2005). Auch der unterschiedliche Aufbau der MPER kann Ursache für die unterschiedliche Induktion und Neutralisation von MPER-spezifischen Antikörpern sein.

Neben den hier beschriebenen Unterschieden sind verschiedene Eigenschaften wie Hydrophobizität, Flexibilität und Antigenität der TM-Proteine p15E und gp41 im Anhang 7.4 dargestellt. Mit dem Ziel gemeinsame Strukturelemente in den NHR- und CHR-Helices beschreiben zu können, zeigten sich allerdings verstärkt große Unterschiede zwischen beiden Proteinen. So besteht z.B. das TM-Protein von HIV-1 aus über 80 % α -Helices und das von PERV nur aus 65 % (Tab. 7.03.). Bei der Betrachtung der Hydrophobizität und

Flexibilität der beiden Proteine zeigt sich, dass nur im Bereich der MPER Übereinstimmungen gefunden werden konnten (Abb. 7.06. und Abb. 7.07.).

Diese gezeigten Unterschiede können zu einem unterschiedlichen Aufbau der NHR- und CHR-Helices führen als auch vermuten, dass es während der Infektion zu einer unterschiedlichen Umlagerung kommt und somit bestimmte Regionen dem Immunsystem anders präsentiert werden. Da die hier induzierten MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper ohne Probleme PERV neutralisieren, scheint hingegen bei HIV-1 die Möglichkeit der Neutralisation von induzierten MPER-spezifischen Antikörpern gegen HIV-1 begrenzt. So konnten schließlich viele Arbeiten 2F5 bzw. 4E10-ähnliche Antikörper induzieren, die zwar binden aber das Virus aus unterschiedlichen Gründen nicht neutralisieren (McCoy & Weiss, 2013).

Basierend auf die Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern gegen PERV, wurden PERV-HIV-1Hybride hergestellt, die aus einem p15E-Gerüst mit der MPER-Sequenz von HIV-1 bestanden (Luo *et al.*, 2006). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden neben der MPER auch die FPPR von HIV-1 in das PERV p15E kloniert (Denner, 2012). Beide Arbeiten zeigten jedoch nicht den erhofften Durchbruch bei der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1.

6.2.2 NHR-spezifische Neutralisationsantikörper gegen HIV-1

Neben der Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern gegen PERV, die das Virus neutralisieren, konnten in dieser Arbeit NHR-spezifische Neutralisationsantikörper induziert werden (siehe Abschnitt 6.1.2). Auch gegen HIV-1 konnten verschiedene neutralisierende Antikörper beschrieben werden, die Bereiche der NHR als Epitop besitzen. Einer der am besten charakterisiert worden ist, stellt der Antikörper D5 dar (Miller *et al.*, 2005). Eine Proteinkristallographie zeigt, dass der Antikörper an einer hydrophoben Tasche in der NHR bindet (Luftig *et al.*, 2006). Die gleiche Region, an die D5 bindet, wurde zuvor schon als Ziel von verschiedenen Fusionsinhibitoren, wie z.B. T20 beschrieben (Eckert & Kim, 2001a). Obwohl das D5-Epitop in den meisten HIV-1 Isolaten sehr stark konserviert ist, ist die Neutralisationspotenz sehr gering und zielzell-abhängig (Miller *et al.*, 2005).

Ein weiterer neutralisierender Antikörper, HK20, wurde aus Gedächtniszellen eines HIV-Infizierten isoliert (Corti *et al.*, 2010). HK20 verhindert die Ausbildung der sog.

six-helix-bundles zwischen der NHR und der CHR. Bei Immunisierungen unter der Verwendung eines N-terminalen gp41 *prehairpin* Intermediats konnten schwach neutralisierende NHR-spezifische Antikörper gegen wenige *Tier-1* Isolate induziert werden (Bianchi *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2010).

Im Zusammenhang mit der Induktion von NHR-spezifischen Antikörpern wurde auch über den begrenzten Zugang der Antikörper diskutiert, da während der Fusion die NHR- und CHR-Domäne sich einander lagern und somit die NHR nur zeitlich begrenzt zugänglich ist (Nelson *et al.*, 2008). Neben diesem Aspekt wurde die Frage diskutiert, welche Konformation die NHR-Domäne bzw. das gesamte gp41 einnehmen muss, um diese NHR-neutralisierenden Antikörper induzieren zu können. Ähnlich wie bei der Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern wurde geschlossen, dass das TM-Protein in der Konformation des Intermediats- oder aber der Post-Fusion-Form vorliegen sollte, um NHR-spezifische Neutralisationsantikörper (Tran *et al.*, 2012).

Ein Vergleich zwischen der Induktion von NHR-spezifischen Neutralisationsantikörpern zwischen PERV und HIV-1 zeigt, dass deren Induktion bei PERV leicht möglich ist: anstelle der Verwendung von aufwendigen NHR- und gp41-Konstrukten wie bei HIV-1 reicht es aus, wenn ein NHR-Monomer (GST-FPPR/NHR) für die Immunisierung verwendet wird. Hintergrund für diesen Unterschied können die unter Abschnitt 6.2.1 und im Anhang 7.4 diskutierten strukturellen Unterschiede zwischen gp41 und p15E sein, wobei diese ohne gesicherte Erkenntnisse einer dreidimensionalen Struktur und Verhalten von p15E während der Infektion nur Vermutungen darstellen.

Für einen zukünftigen und gesicherten Vergleich zwischen den Strukturen der TM-Proteine von HIV-1 und PERV sollte von dem p15E sowohl eine dreidimensionale Struktur als auch Belege für ähnliche Umlagerungsprozesse während der Infektion wie es bei HIV-1 der Fall ist, Vorhandensein. Nur darüber könnte in Zukunft ein Vergleich zwischen beiden TM-Proteinen zu der Erstellung von Hybridkonstrukten führen.

6.3 Einfluss der NHR auf die Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern gegen PERV und HIV-1

In den durchgeführten Versuchen konnten MPER-spezifische Neutralisationsantikörper gegen PERV durch die Immunisierung mit der kompletten Ektodomäne induziert werden (Abschnitt 6.1.1). Immunisierungen mit dem rekombinanten Protein GST-CHR/MPER4K konnten diese Antikörper nicht induzieren (Abschnitt 6.1.2). Auch die Annahme, dass durch die Zugabe der NHR-Domäne MPER-spezifische Neutralisationsantikörper induziert werden könnten, konnte nicht bestätigt werden.

Eine Punktmutation im Cystein-Loop von p15E führte zum Verlust der Induktion an MPER-bindenden und neutralisierenden Antikörpern, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die Verknüpfung über den Cystein-Loop wichtig ist und die Struktur der kompletten Ektodomäne entscheidend für die Induktion von neutralisierenden MPER-spezifischen Antikörper ist.

Folgende Hypothesen sind daher in Bezug auf die Induktion der neutralisierenden MPER-spezifischen Antikörper denkbar:

- das Monomer GST-CHR/MPER4K besitzt nicht die korrekte Konformation für die Induktion neutralisierender Antikörper
- durch das Fehlen der NHR-Domäne kann die CHR-Domäne nicht die korrekte Konformation einnehmen; folglich nimmt die Mutation im Cystein-Loop innerhalb von p15E der NHR-Domäne die Möglichkeit, Einfluss auf die CHR-Domäne zu nehmen
- die NHR-Domäne nimmt direkten Einfluss (auf unbekannter Weise) auf die Induktion der neutralisierenden MPER-spezifischen Antikörper
- oder aber die Konformation spielt keine Rolle, sondern die Helices interagieren miteinander und verdecken somit bestimmte Epitope bzw. „legen“ sie für die Präsentation gegenüber dem Immunsystem frei

Diese Hypothesen bauen u.a. auf den Beschreibungen auf, die zeigen, dass die beiden α -Helices (NHR und CHR) der Ektodomäne von Transmembranproteinen von verschiedenen Retroviren miteinander reagieren und während des Fusionsprozesses mit der Wirtszellmembran sich zu einer sog. *six-helix-bundle* zusammenlagern (Bellamy-McIntyre *et al.*, 2007; Colman & Lawrence, 2003) und sich somit direkt gegenseitig beeinflussen können.

Die Induktion der NHR-spezifischen Neutralisationsantikörper zeigt ebenfalls, dass die CHR-Domäne Einfluss auf die Induktion von NHR-spezifischen Neutralisationsantikörper nimmt, da diese Antikörper bei einer p15E-Immunsierung nicht induziert werden konnten, sondern nur bei der einfachen Immunsierung mit der NHR-Domäne.

Werden die in dieser Arbeit beschriebenen Epitope der induzierten Neutralisationsantikörper mit denen einer Env₃₃₂₋₆₁₅-Immunsierung (Konstrukt aus gp70 und p15E von PERV) verglichen (Chiang *et al.*, 2007), zeigt sich, dass wiederum ganz andere Epitope innerhalb des p15Es durch die induzierten Neutralisationsantikörper erkannt werden. Auch hierbei lässt sich begründend anführen, dass das gp70 Einfluss auf die p15E-Domäne nimmt und somit Bereiche in der NHR und MPER verdeckt werden und somit in diese Bereiche keine neutralisierenden Antikörper induziert werden konnten.

Auch bei der Induktion von MPER-spezifischen Antikörpern gegen HIV-1 wurde der Einfluss der NHR-Domäne diskutiert.

Wang und seine Kollegen induzierten neutralisierende Antikörper gegen die MPER, indem sie ein NHR-CHR-Komplex mit einer Punktmutation in der NHR als Antigen verwendeten (Wang *et al.*, 2011a). Die gleiche Punktmutation und eine weitere in der *pocket-forming* Sequenz von NHR zeigten zuvor, dass die Antigenizität und Immunogenizität des 4E10-Epitop erhöht worden ist (Blish *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der NHR-Domäne und einem MPER-Antikörper experimentell gezeigt werden. Ebenfalls konnte durch die Interaktion zwischen Peptiden der FPPR/NHR und der CHR/MPER die Bindung des Antikörpers 2F5 an seinem Epitop erhöht werden (Huarte *et al.*, 2011; Lorizate *et al.*, 2006).

Dass die NHR Einfluss nimmt, könnte daran liegen, dass Mutationen in der NHR bei HIV-1 zu partiellen bzw. kompletten Defekten bei der Membranfusion zwischen Virus und Wirtszelle führen (Bar & Alizon, 2004; Cao *et al.*, 1993). Da während dieses Prozesses angenommen wird, dass die breitneutralisierenden Antikörper 4E10 und 2F5 (Hinz *et al.*, 2009) sowie die NHR-neutralisierenden Antikörper (Tran *et al.*, 2012) induziert werden, machten einige Arbeitsgruppen darauf aufmerksam, dass somit nur durch die korrekte Konformation des gp41 neutralisierende MPER-spezifische Antikörper induziert werden können (Frey *et al.*, 2010; Hinz *et al.*, 2009). Sollte diese nicht vorliegen, können sogar nicht-neutralisierende Antikörper induziert werden, die zu einer ineffektiven humoralen Antwort führen und somit einer Neutralisation im Wege stehen (Frey *et al.*, 2010).

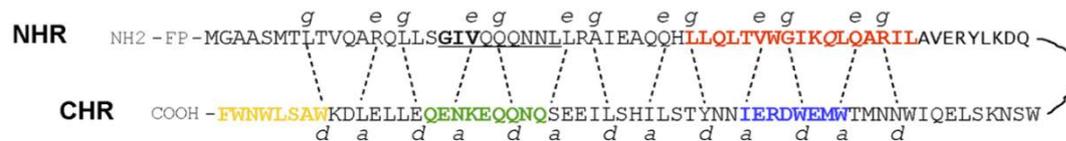


Abbildung 6.02. Interaktion zwischen NHR und CHR bei gp41 von HIV-1. Die Zusammenlagerung der beiden Domänen während der Infektion wird durch die Interaktion zwischen den Aminosäuren, die durch gestrichelte Linien verbunden sind, ermöglicht. Durch die räumliche Nähe der NHR und CHR ist es möglich, dass bestimmte Bereiche verdeckt werden bzw. Abschnitte der einen Domäne notwendig sind, um Antikörper auf der anderen Domäne zu induzieren. (Yu *et al.*, 2012).

Zusammenfassend für dieses Kapitel scheint es, dass neben den in Abschnitt 6.3 erwähnten Bedingungen auch die NHR-Domäne Einfluss auf die Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern gegen PERV und HIV-1 hat. Aus diesem Grund sollte die Einflussnahme der NHR auf die Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern weiter erforscht werden. Weitere Arbeiten an dem Gammaretrovirus PERV könnten dabei helfen, Antigene zu designen, die neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 induzieren.

Allerdings zeigen bisherige Immunisierungsstrategien bei HIV-1 mit NHR/CHR-Konstrukten, dass diese nur bedingt neutralisierende Antikörper induzierten. Vielmehr scheint es, dass aufgrund der Komplexität des TM-Proteins von HIV-1 mehrere der beschriebenen Aspekte in zukünftige Strategien einfließen sollten.

6.4 Charakterisierung der p15E-abgeleiteten Peptide

Für die Charakterisierung der in dieser Arbeit für die ELISA- Untersuchungen als auch Immunisierungen verwendeten PERV-Peptide wurden zwei Versuche durchgeführt: zum einen wurde überprüft, inwieweit die NHR- und CHR-Peptide (siehe 3.11) miteinander interagieren und zum anderen, welchen Einfluss diese Peptide auf die PERV- Infektion nehmen.

Da während der Infektion von Retroviren die NHR- und CHR-Domäne in näheren Kontakt kommen und über die Ausbildung einer *six-helix-bundle* die Fusion zwischen Virus- und

Wirtszellenmembran initiieren (Bellamy-McIntyre *et al.*, 2007; Colman & Lawrence, 2003), sollte hier die Interaktion zwischen den NHR- und CHR-Peptiden überprüft werden.

Da die verwendeten PERV-Peptide dieser Arbeit in einer SDS-PAGE durch *Coomassie Blue* und auch in der Gelfiltration nicht sichtbar gemacht werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde sich für einen Interaktionsversuch mittels ELISA entschieden (Kumada *et al.*, 2007). Dieser Versuch zeigte, dass es zwischen dem NHR-Peptid M2 und dem CHR-Peptid MPER zu einer Interaktion kommt (Abb. 5.32.).

Da bis heute keine dreidimensionale Struktur von p15E vorliegt, kann auch keine Schlussfolgerung auf die unmittelbare Nähe der Peptide der beiden Helices getroffen werden. Wie bereits erwähnt, verbleibt als wichtige Aufgabe, eine NMR- oder Röntgenstrukturanalyse von p15E durchzuführen.

Auch bei HIV-1 konnte bei der Verwendung von NHR- und CHR-Peptiden eine Interaktion bis hin zur Ausbildung der sog. *six-helix-bundle* gezeigt werden (Liu *et al.*, 2007; Lu & Kim, 1997).

Bei der Verwendung der beschriebenen PERV-Peptide der NHR und CHR bei einer PERV-Infektion, zeigten diese unterschiedliche Einflüsse auf die Infektion: das Peptid MPER begünstigte die Infektion, das randomisierte MPER-Peptid hemmte hingegen eine Infektion. Die getesteten NHR-Peptide (FPPR, M1 und M2) zeigten hingegen wenig bis gar keinen Einfluss auf die Infektion (Abb. 5.28.).

Das Ergebnis, dass die Peptide alleine einen Einfluss auf die Infektion nehmen, muss bei den Schlussfolgerungen der Arbeiten von Fiebig und Kaulitz berücksichtigt werden, die nach Zugabe ähnlicher Peptide eine Hemmung der neutralisierenden Wirkung durch p15E-spezifische Antikörper gezeigt haben (Fiebig *et al.*, 2003; Kaulitz *et al.*, 2011). In keinem der beiden Ansätze wurde der Einfluss der Peptide alleine auf die Infektion getestet.

Leider lassen sich die hier gezeigten Ergebnisse nicht auf diese Hemmungsversuche übertragen, da zur besseren Präsentation der beschriebenen Epitope der FPPR und MPER die hier verwendeten Peptide verlängert worden sind. Somit müssten die in den Arbeiten von Fiebig und Kaulitz verwendeten Peptide noch einmal alleine in einem Infektionsversuch eingesetzt werden.

Für PERV wurden bisher keine Peptide beschrieben, die eine Infektion inhibieren oder befördern können. Die hier getesteten Peptide stellen somit einen Anfang dar, um systematisch verschiedene Peptide auf ihren Einfluss auf die Infektion zu überprüfen.

Um einen ersten Anhaltspunkt für den Wirkungsmechanismus der Peptide auf die Infektion zu erhalten, wurden Fluoreszenzanalysen durchgeführt. Diese Analysen zeigten indirekt eine Interaktion zwischen den beiden MPER-Peptiden mit dem Virus, indem durch die Zugabe des Virus die unspezifische Bindung der Peptide mit den 293T- Zellen reduziert wurde (Abb. 5.29.). Eine FACS-Analyse konnte dieses Ergebnis ebenfalls bestätigen, wobei der Anteil an Zellen, an denen die Peptide gebunden haben, mit knapp über 5-7 % relativ gering ausgefallen ist. Dennoch ist zu erkennen, dass durch die Zugabe des Virusstocks deutlich der Anteil an „peptidmarkierten“ Zellen durch das MPER- und rand. MPER-Peptid auf 0,5-1,5 % gesunken ist (Tab. 5.05.). Bei der Verwendung der FPPR-Peptide konnte kein Unterschied zwischen der Inkubation mit und ohne Virusstock beobachtet werden.

Eine Wiederholung und Modifizierung der FACS-Analyse ist ratsam, um höhere Prozentzahlen hinsichtlich der Bindung der Peptide an den Zellen zu bekommen.

Dass der Prozentsatz bei der FACS-Analyse so gering war, liegt hauptsächlich daran, dass bei den Färbe- und Waschschritten der Zellen mittels Zell-Scharber, bei den Zentrifugationsschritten und der Resuspension der Zellen in PBS wahrscheinlich die Peptide von den Zellen dissoziiert sind. Zudem wurden die Zentrifugationsschritte nicht wie geplant bei 4°C durchgeführt (Vacchino & McConnell, 2001), da die Kühl-Zentrifuge nicht zur Verfügung stand. Desweiteren wird empfohlen, die Peptide nach den ersten Waschschritten auf den Zellen zu fixieren, damit diesen die Möglichkeit genommen wird, sich bei jedem Inkubations- und Waschschriff von der Zelle lösen.

Das Phänomen, das Peptide spezifisch oder auch unspezifisch an Proteinstrukturen binden, ist für die Zellbiologie von großer Bedeutung. Viele zelluläre Antworten und Aktivierungsmechanismen beruhen auf der Bindung eines Peptids mit einem Rezeptor, der die nachgesteuerten Prozesse aktiviert (Yanover & Hertz, 2005).

In den letzten Jahren hat die Forschung über Peptide als Hemmstoff gegen virale Erreger (Rajik & Yusoff, 2011; Schmidt *et al.*, 2010) oder sogar gegen Tumorwachstum (Vicari *et al.*, 2011) an Bedeutung gewonnen.

Zahlreiche Publikationen beschreiben Peptide, die als HIV-Inhibitoren infrage kommen (Chong *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2009). Meist sind diese Peptide von ihrer Sequenz her vom TM-Protein gp41 abgeleitet worden. Zwei Mechanismen sind im Rahmen des Hemmprozesses wahrscheinlich: i) die N- bzw. C-terminalen Peptide haben die entsprechend andere Domäne als Ziel oder ii) das Peptid bindet an die eigene Helix (Eckert & Kim, 2001a). In beiden Fällen wird jedoch die Formation der *six-helix-bundle* unterbunden, so dass die Infektion verhindert wird.

Um die Wirkung der PERV-Peptide im Detail herauszufinden, sollten Versuche zur Feststellung der Peptid-Protein-Interaktion durch weitere Immunpräzipitation oder anderen *Pull-Down*-Experimente mit virushaltigen Überstand sowie rekombinanten Proteinen durchgeführt werden.

6.4.1 Induktion von Peptid-Antikörpern

In einem letzten Immunisierungsversuch wurden Ratten in vier Gruppen mit ungekoppelten Peptiden immunisiert. Im Vergleich zu früheren Immunisierungen, die nur nach Kopplung mit einem Trägermolekül eine Immunantwort ausgelöst haben (Fiebig, 2008), zeigten diese Immunisierungen schon nach der ersten Injektion, dass Antikörper gegen die entsprechenden Peptide induziert worden sind (Abb. 5.30.). In dem durchgeführten NT-Assay konnte in keinem der Immunisierungsansätze neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 5.31.).

Vorteile einer Immunisierung mit Peptiden anstelle von rekombinanten Proteinen sind zum einen, dass Peptide im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen einen höheren Reinheitsgrad besitzen und dass sie mit keinen bakteriellen Proteinen/Bestandteile kontaminiert sind. Zum anderen können konkrete Epitope dem Immunsystem präsentiert werden, um bestimmte Antikörper zu induzieren.

Im Abschnitt 6.1 wurden schon einige Bedingungen für die Induktion von Antikörpern diskutiert und sollen hier bei der Induktion von Peptid-Antikörpern kritisch besprochen werden.

Allgemein wird beschrieben, dass Peptide zwar als Immunogen verwendet werden können, allerdings auch zu klein sind, um B- und T-Zellen entsprechende Epitope liefern zu können (Trier *et al.*, 2012). Daneben ist aufgrund der Größe mit keinen hochtitrischen Antikörpern zu rechnen (Hermanson, 1996). Um die Effizienz der Antikörper-Induktion zu erhöhen, ist es wichtig, Peptide an Trägerproteine zu koppeln (Houen *et al.*, 2003; Schaaper *et al.*, 1989; Strynadka *et al.*, 1988). Nach der Empfehlung von Millipore sollten 30 % der Aminosäuren sehr stark immunogen sein (Millipore, 2013). Dazu zählen folgende Aminosäuren: Lysin (K), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) und Asparagin (N). In den vorliegenden Peptiden beträgt der Anteil zum einen rund 20 % (FPPR-abgeleitetes Peptid, AAGVGTGTAALITGPQQLEKGLS) und über 30 % (MPER-abgeleitetes Peptid, EREADQGWFEQWFNRSPWMTTL). Die durchgeführten Immunisierungen zeigten aber auch, dass die Peptide nicht immer an einem Trägerprotein gekoppelt werden oder aber die 30 %

an immunogenen Aminosäuren enthalten müssen, da beide Peptide ungekoppelt und teilweise mit weniger „immunogenen Aminosäuren“ eine Immunantwort geliefert haben.

Dass die induzierten Antikörper nach der Peptid-Immunisierung nicht neutralisieren, kann unterschiedliche Ursachen haben. Wie schon weiter oben ausgeführt, ist die komplette Ektodomäne von p15E notwendig, um neutralisierende MPER-spezifische Antikörper zu induzieren. Zudem ist anzunehmen, dass die Konformation der Peptide nicht mit der übereinstimmen, die für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern benötigt wird (Ho *et al.*, 2005).

Auch vorstellbar ist, dass ein angenommenes/kartiertes Epitop nicht immer dem vollständigen immunogenen Epitop entspricht, das die Antikörper für eine Neutralisation benötigen und somit eine Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch kleinere Peptide fehlschlagen kann (Van Regenmortel, 2011). Aus diesem Grund sollten größere Strukturen bzw. Domänen für Immunisierungen verwendet werden.

Die Antigenität und Immunogenität von einem Protein entspricht auch nicht der Summe der Antigenität und Immunogenität der einzelnen Peptide, so dass einzelne Peptide nicht immer ausreichen, um Antikörper gegen das komplexere Protein zu induzieren (Shinnick *et al.*, 1983). In einer Studie zu dem Influenza A-Virus X-47 zeigte sich, dass 24 bindende Antikörper bei der Immunisierung von 26 Peptiden induziert werden konnten (Green *et al.*, 1982; Shinnick *et al.*, 1983). Von diesen 24 Peptiden waren 13 in der Lage das Virus zu neutralisieren (Shinnick *et al.*, 1983). *In vivo* Experimente an Mäusen zeigten wiederum, dass nur zwei Peptide vor der letalen Dosis des X-47-Virus bei der Infektion schützen. Daran zeigt sich, wie schwierig es ist, funktionale Antigene für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern herzustellen.

Zusammenfassend für dieses Kapitel aber auch im Allgemeinen für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern lässt sich somit sagen, dass die Wahl von immunogenen Strukturen auf Antigenen entscheidend für eine Induktion von Antikörper ist, aber noch kein Indiz dafür, dass diese neutralisieren oder gar *in vivo* den erhofften Erfolg zeigen.

6.5 Fazit

Aufgrund der Komplexität der diskutierten Ergebnisse soll an dieser Stelle noch einmal kurz die wesentlichsten Diskussionspunkte und Ergebnisse zusammengefasst werden (Tab. 6.02.).

Tabelle 6.02. Übersicht der induzierten Antikörper und deren neutralisierende Aktivität.

Spezies / Antigen	Induzierte Antikörper gegen das		Neutralisation durch		
	FPPR-abgeleit. Peptid	MPER-abgeleit. Peptid	NHR-spezifische Antikörper	CHR-spezifische Antikörper	
Kaninchen	GST-NHR	+	-	+	-
	GST-CHR4K	-	+	-	-
	GST-NHR/GST-CHR4K	+	+	+	-
	p15E	+	+	-	+
Ziegen	GST-NHR/GST-CHR4K	+	+	+	-
	p15E(C549A)	+	+	+	-
	p15E	+	+	-	+

Die Immunisierungen und affinitätschromatographischen Aufreinigungen zeigten, dass für eine Induktion von MPER-spezifischen Neutralisationsantikörpern gegen PERV, wie sie auch bei HIV-1 vorkommen, die komplette Ektodomäne von p15E notwendig ist. Die Ergebnisse lassen ebenfalls den Schluss zu, dass während der Induktion von (neutralisierenden) Antikörpern sich die N- und C-terminale Domäne gegenseitig beeinflussen und somit bestimmte Epitope dem Immunsystem präsentiert werden.

Trotz Unterschiedlichkeiten in der Struktur und evolutionärer Distanz zeigen PERV und HIV-1, dass beide Viren durch MPER- und NHR-spezifische Antikörper neutralisiert werden können. Somit stellen diese Bereiche wichtige Strukturen für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern dar. Nach Lösen der räumlichen Struktur von p15E könnte weiterhin diskutiert werden, inwieweit Hybridkonstrukte sinnvoll sind, um neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 zu induzieren. Die in dieser Arbeit diskutierten Differenzen in der Struktur der TM-Proteine, speziell die Komplexität von gp41, erklären, wieso es bisher nicht gelungen ist, effektive MPER- bzw. NHR-spezifische Neutralisationsantikörper gegen HIV-1 zu induzieren.

7. Anhang

7.1 Neutralisation mit MPER-spezifischen Antikörpern von HIV-1 gegen PERV

Da die Epitope der breitneutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 gegen HIV-1 ebenso wie die der p15E-neutralisierenden Antikörper (nach einer p15E-Immunisierung; Abschnitt 5.1 bzw. 6.2.1) in der MPER binden und zusätzlich zwischen dem Epitop von 4E10 und den MPER-spezifischen Neutralisationsantikörper gegen PERV eine Sequenzhomologie besteht, wurde in einem Neutralisationsversuch die Antikörper 2F5 und 4E10 auf ihre Reaktivität gegen PERV getestet. Der Versuch zeigt, dass weder 2F5 noch 4E10 in einer eingesetzten 1/500 Verdünnung die PERV-Infektion hemmen (Abb.7.01).

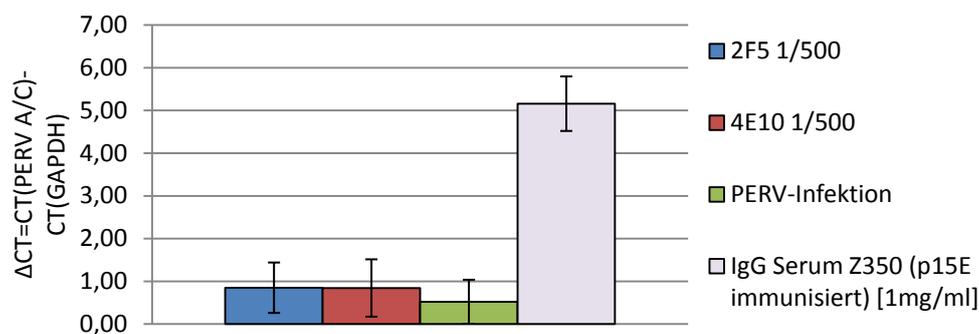


Abbildung 7.01. Neutralisationsversuch von HIV-1-neutralisierenden Antikörpern gegen PERV. Zur Überprüfung der neutralisierenden Aktivität der HIV-spezifischen Antikörper 2F5 und 4E10 gegen PERV wurden diese im Vergleich zu p15E-spezifischen Antikörper in einem NT-Assay überprüft.

7.2 Charakterisierung von PERV-infizierten Zellen und deren zellfreier Überstand

Für den beschriebenen Neutralisationsassay ist es notwendig, einen zellfreien Virusüberstand zu haben, der in einer geringen Konzentration nicht-infizierte Zellen infizieren kann. Für die Präparation von neuem Virusüberstand werden nicht-infizierte Zellen durch zellfreien Virusüberstand infiziert und nach mehrmaligen Splitten und Kultivierung der infizierten Zellen über 2-3 Wochen gefiltert und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Um zu überprüfen, dass eine Infektion der nicht-infizierten Zellen durch den Virusüberstand stattgefunden hat, kann man sich verschiedener Methoden bedienen. In diesem Kapitel soll daher der Nachweis einer PERV-Infektion mittels DNA- und RNA-Analyse sowie durch die Betrachtung auf Proteinebene erfolgen.

Bei Betrachtung auf DNA-Ebene bei den infizierten Zellen, kann überprüft werden, ob die Primärinfektion des Retrovirus stattgefunden hat. Für die durchgeführten PCR-Analysen kamen spezifische envA-Primer zum Einsatz. Das gebildete Amplikon dieser spezifischen Primer beträgt knapp 380 Basenpaare (Abb. 7.02.).

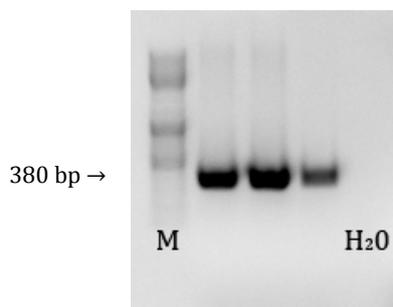


Abbildung 7.02. PCR-Analyse nach Primärinfektion von nicht-infizierten 293T-Zellen. Nicht-infizierte 293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an zellfreien Überstand infiziert.

Neben der einfachen PCR-Analyse kann die Replizierbarkeit der Retroviren auf RNA- und Proteinebene betrachtet werden. Bei der Betrachtung von isolierter RNA aus den Zellen, wird erkannt, ob die integrierte DNA auch abgelesen wird und schlussendlich neue Virus-Partikel produziert werden (Abb. 7.03.). Wichtig ist dabei, eine einfache PCR-Kontrolle auf DNA-Spuren durchzuführen und gegebenenfalls einen zusätzlichen DNase Q-Verdau zu machen. Die Virus-Proteine lassen sich direkt im Zell-Lysat durch eine Western Blot-Analyse nachweisen (Abb. 7.04.).

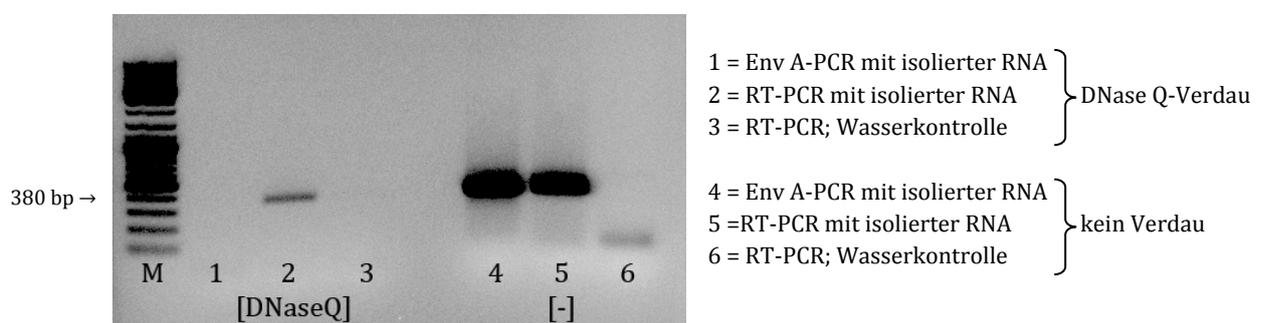


Abbildung 7.03. (RT-)PCR-Analyse nach PERV-Infektion von nicht-infizierten 293T-Zellen. Eine einfache PCR-Analyse diente der Kontrolle, ob das RNA-Eluat DNA-frei ist. Da dies nicht der Fall war (Spur 4) musste die isolierte RNA einem weiteren DNase Q-Verdau unterzogen werden (Spuren 1-3). Die nun überprüfte RNA war DNA-frei (Spur 1). Eine RT-PCR mit der zusätzlich verdauten DNA zeigt in Spur 2 die gewünschte Größe des env A-Amplikons.

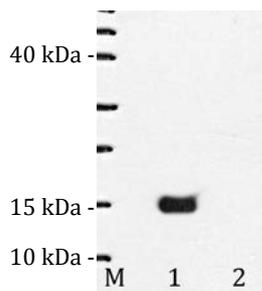
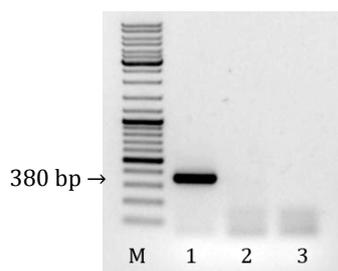


Abbildung 7.04. Western Blot-Analyse des Zell-Lysats. Eine Western Blot-Analyse des Zell-Lysats mit einem p15E-spezifischen Serum (Z346) zeigt, dass p15E expremiert wird (Spur 1). Als Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen aufgeschlossen (Spur 2).

Um die Viren allerdings direkt nachzuweisen, können Virusproteine durch Aufkonzentrierung des zellfreien Virusüberstands nach einer Auftrennung und anschließender Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 7.06.). Zuvor kann mithilfe eines RNA-Isolationskits (innuPREP Virus RNA Kit, Analytik Jena) ebenfalls die Virus-RNA aus dem Überstand isoliert werden. Allerdings kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass freigesetzte RNA-Partikel aus den infizierten Zellen bei der Abnahme des Virusüberstands diesen Nachweis beeinflussen (Abb. 7.05.).



1 = RT-PCR, infizierte Zellen
2 = RT-PCR, nicht-infizierte 293T-Zellen
3 = RT-PCR; Wasserkontrolle

Abbildung 7.05. RT-PCR der isolierten RNA aus dem Zellüberstand. Eine RT-PCR zeigt, dass das env A-Amplikon direkt aus dem Virusüberstand synthetisiert werden konnte.

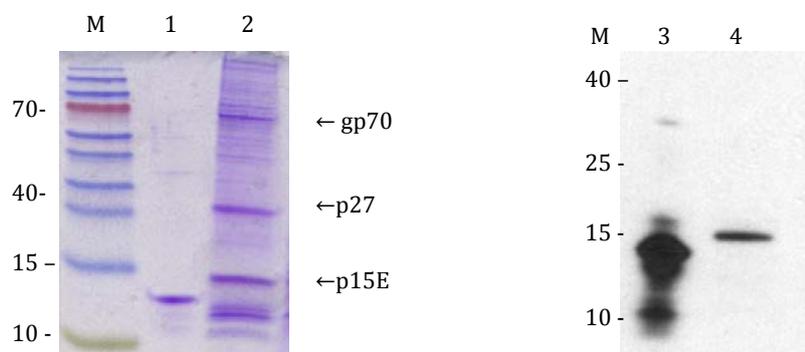


Abbildung 7.06. SDS-PAGE und Western Blot Analyse des aufkonzentrierten zellfreien Virusüberstands. Die SDS-PAGE als auch Western Blot-Analyse zeigen, dass p15E und andere Virusproteine in den aufkonzentrierten Viruspellet vorliegen (Spuren 2 und 4). Als Positivkontrolle wurden in den Spuren 1 und 3 rekombinant aufgereinigtes p15E aufgetragen.

7.3 Zusammenhang zwischen *ct*-Wert und Kopienzahl

Um Auskunft zu erhalten, bei welchen *ct*-Werten wie viele gag-Kopien als Template in der *real-time* PCR vorliegen, wurde ein PERV A-Vektor (AJ133817) ausverdünnt und als Template verwendet. Über die bekannte Größe des eingesetzten Vektors (17.000 Basenpaare) und der eingesetzten Konzentration kann dem gemessenen *ct*-Wert eine Kopienzahl zugeordnet werden. In diesem Versuch wurde ohne *bulk*-DNA, d.h. ohne zusätzliche unspezifische DNA, gearbeitet. Sollte diese Kopienzahl direkt auf die isolierte DNA umgerechnet werden, muss vorher der Einfluss der genomischen DNA auf die Effizienz der *real-time* PCR und somit auf die Kopienzahl-Bestimmung überprüft werden (Fu *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2006).

Im Folgenden ist die Berechnung der Kopienzahl dargestellt. Im ersten Schritt wird die Masse eines Nukleotids [A] und anschließend die des Vektors [B] errechnet. Mithilfe der Vektormasse lässt sich direkt die Anzahl der Plasmide bestimmen [C].

$$[A] \text{ Masse eines einzelnen Nukleotids} = \frac{327 \text{ g/mol}}{6,022 \cdot 10^{-23} \text{ Moleküle/mol}} = 5,43 \cdot 10^{-22} \text{ g/Molekül}$$

$$[B] \text{ Masse eines einzelnen Vektors} = 5,43 \cdot 10^{-22} \text{ g/Molekül} \cdot 17.000 \cdot 2 = 1,85 \cdot 10^{-8} \text{ ng}$$

$$[C] \text{ Anzahl Kopien pro } \textit{real-time} \text{ Ansatz} = \frac{\text{ng Plasmid}}{1,85 \cdot 10^{-8} \text{ ng}}$$

↑ Basenanzahl des Plasmids

Tabelle 8.01. Ergebnis der Berechnung der Kopienanzahl

ng Plasmid	<i>ct</i> -Wert	Kopien
15	7,000	810.810.811
3	11,345	162.162.162
0,3	14,143	16.216.216
0,03	17,250	162.162
0,003	21,227	16.216
0,0003	23,123	1.621
0,00003	26,657	162
0,000003	29,877	16
0,0000003	32,210	2

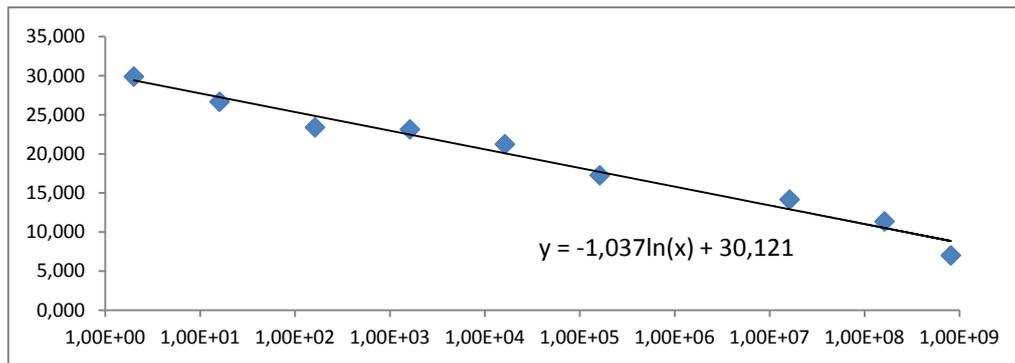


Abbildung 7.05. Zusammenhang zwischen ct-Wert und Kopienzahl.

Nach Tabelle 7.01. werden bei einem *ct*-Wert von 32,2 noch zwei Kopien gemessen. Dieser geringe Wert zeigt, dass es ziemlich unrealistisch ist, den hier dargestellten Zusammenhang zwischen *ct*-Wert und Kopienzahl bei Verwendung des Vektors auf den etablierten NT-Assay anzuwenden. Im Gegensatz zu dem in diesem Versuch aus 100 % bestehenden Vektor-Template, ist das Template im NT-Assay mit verdauten Proteinen, RNA- und DNA-Resten versetzt und somit nicht vergleichbar. Aus diesem Grund ist es wie eingangs schon beschrieben, wichtig, den Einfluss genomischer DNA oder auch der sonstigen Bestandteile im Template des NT-Assays auf die *real-time* PCR zu überprüfen (Fu *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2006).

7.4 Datenbasierender Vergleich des TM-Proteins p15E und gp41 von PERV-A und HIV-1

Um die beiden transmembranen Hüllproteine p15E von PERV und gp41 von HIV-1 in ihrer Struktur vergleichen zu können, wurden in diesem Abschnitt verschiedene datenbasierende Vergleiche anhand der Aminosäuresequenzen von p15E und gp41 durchgeführt. Hauptsächlich wurden Eigenschaften verglichen, die Hinweise auf die Induktion von Antikörper geben können. Dazu zählen:

- Hydrophobizität des Proteins
- Flexibilität des Proteins
- Anteil an α -Helices
- Antigenität bestimmter Bereiche

Tabelle 7.02. Verwendete Sequenzen für den datenbasierenden Vergleich.

P15E von PERV (CAA72927)	AAGVGTGTAALITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTS LSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLR ERLERRREREREADQGWFEFEGWFNRSPWMTTL
Gp41 von HIV-1 (AY426107.1)	AAGSTMGAASMTLTVQARQLLSDIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTV WGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSSGKLICTTAVPWNASWSNK SLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELD KWASLWNWFNITNWLWYI

Um einen Überblick über der Sekundärstruktur der Proteine zu erhalten sind in Tabelle 7.03. die errechneten prozentualen Anteile an bestimmten Strukturelementen festgehalten. Ergänzend zu den betrachtenden TM-Proteinen sind die TM-Proteine von zwei weiteren Gammaretroviren als auch von SIV hinzugefügt (Tab. 7.03.).

Schon bei dieser Betrachtung wird erkannt, dass neben der Länge der einzelnen TM-Proteine grundlegende Elemente, die maßgeblich für die Sekundärstruktur und somit auch der Präsentation bestimmter Epitope bei einer Immunisierung gegenüber dem Immunsystem sind, unterschiedlich sind. Vor allem die Differenzen an den berechneten Anteilen an α -Helices und Loopstrukturen zwischen den TM-Proteinen der Gammaretroviren PERV/FelV und den Lentiviren HIV-1/SIV sollen hier erwähnt sein.

Tabelle 7.03. Vergleich der Sekundär-Strukturelemente bei p15E und gp41 und weiteren TM-Proteinen von Retroviren. (Rost *et al.*, 2004)

	Länge des Proteins	Anteil an α -Helices	β -Strängen	Loopstrukturen
p15E (PERV)	115 AA	67,8%	8,7%	23,5 %
gp41 (HIV-1)	158 AA	81,6%	3,8%	14,6%
p15E (FeLV) (AAA93093)	114 AA	64,7%	6,9%	28,4%
gp41 (SIV) (AAA99247)	141 AA	80,9%	7,8%	11,3%

Die Bestimmung der Hydrophobizität und Flexibilität der Proteine erfolgte mit den entsprechenden Tools der Seite „Immune Epitope Database Analysis Resource“ (<http://tools.immuneepitope.org/main/>). Da die Proteinsequenz von gp41 länger ist, wurden die Sequenz von p15E zerteilt und entsprechend des Cysteins-Loop und des WFN-Motivs der MPER an die gp41-Sequenz „ausgerichtet“, um die Helices in der NHR als auch MPER vergleichen zu können.

Die erstellten Abbildungen zur Hydrophobizität und der Flexibilität zeigen, dass die Proteine p15E von PERV und gp41 von HIV-1 starken Strukturunterschieden geprägt sind. Nur im Bereich der MPER sind Ähnlichkeiten zu erkennen, wobei diese sich auf knapp 15 Aminosäuren begrenzen (Abb. 7.06. und 7.07.)

Neben der Betrachtung dieser beiden Eigenschaften sind in Abbildung 7.08. die α -Helices beider Proteine dargestellt. Die Abbildung 7.08. zeigt, dass bei p15E als auch gp41 die NHR sehr stark durch α -Helices gekennzeichnet ist, wobei sich der prozentuale Unterschied aus Tabelle 7.03. ebenfalls in der Abbildung wiederfindet.

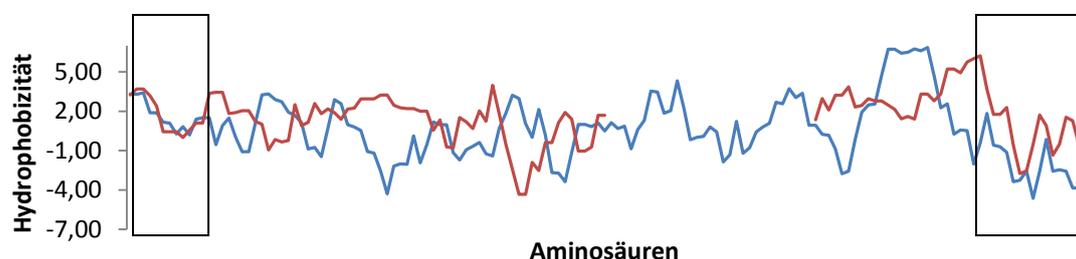


Abbildung 7.06. Vergleich der Hydrophobizität der TM-Proteine gp41 und p15E. Rot = p15E (PERV); Blaue = gp41 (HIV-1). Strukturähnliche Bereiche wurden eingerahmt. (Parker *et al.*, 1986)

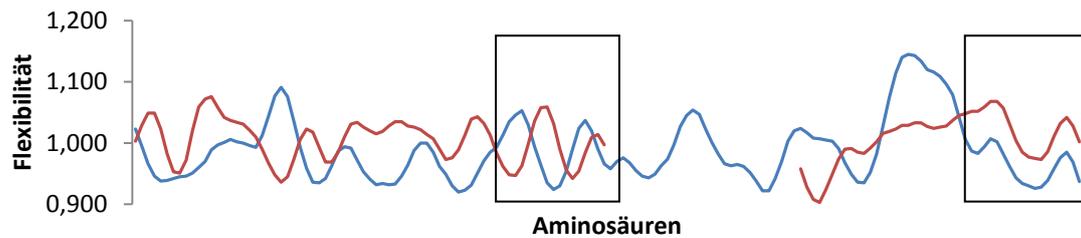


Abbildung 7.07. Vergleich der Flexibilität der TM-Proteine gp41 und p15E. Rot = p15E (PERV); Blaue = gp41 (HIV-1). Strukturähnliche Bereiche wurden eingerahmt. (Karplus & Schulz, 1985)

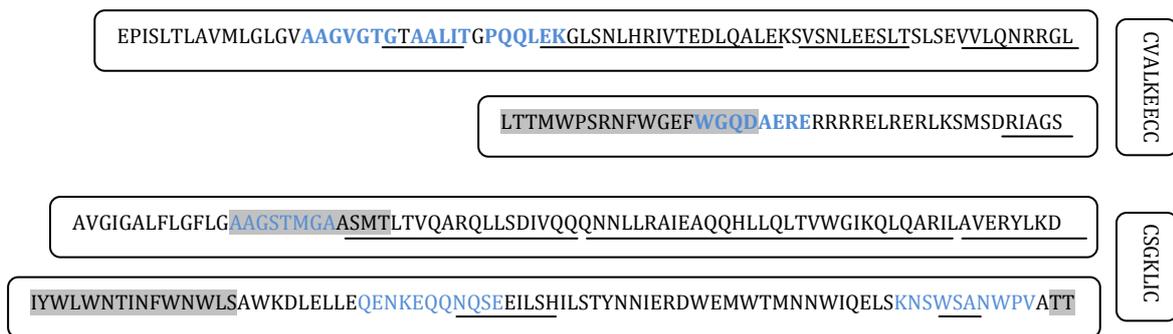


Abbildung 7.08. Vergleich der Alpha-Helices der TM-Proteine gp41 (oben) und p15E (unten). (Rost *et al.*, 2004)

In Abbildung 7.09. wurde durch die Einbeziehung verschiedener Algorithmen der Versuch unternommen, mögliche Antikörper-Epitope zu bestimmen. Besonderem Augenmerk wurde der MPER als auch den Bereichen innerhalb der NHR gewidmet, an welchen die in dieser Arbeit beschriebenen neutralisierende Antikörper sowie bei PERV als auch HIV-1 binden.

Durch Ellipro nach Ponomarenko und Kollegen konnte eine Übereinstimmung in der Antikörper-Vorhersage im Bereich der MPER sowohl für p15E als auch gp41 erbracht werden. Für die restlichen Bereiche in der CHR als auch NHR konnte hingegen mit keinem der verwendeten Tools eine Übereinstimmung mit den beschriebenen Antikörpern gefunden werden. So werden die beschriebenen Epitope der neutralisierenden Antikörper D5 und HK20 gegen HIV-1 und der in dieser Arbeit beschriebene NHR-Antikörper gegen PERV nicht eindeutig mit Hilfe dieser Programme errechnet.

Folglich sind diese Programme nur bedingt einzusetzen, um mögliche Epitope von Antikörpern im Vorfeld einer Immunisierung zu errechnen/bestimmen.



■ *Linear Epitope Prediction.* (Larsen *et al.*, 2006)

■ *Antibody Epitope Prediction; ElliPro.* (Ponomarenko *et al.*, 2008)

— Antigenität. (Kolaskar & Tongaonkar, 1990)

Abbildung 7.09. Darstellung von möglichen Antikörper-Epitopen. Mithilfe von drei verschiedenen Online-Programmen wurden mögliche Epitope von Antikörper als auch antigene Regionen errechnet.

IV. Danksagung

An erster Stelle danke ich der Hans Böckler-Stiftung für die Gewährung eines großzügigen Promotionsstipendiums. Ohne diese Unterstützung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere will ich Frau Dr. Susanne Schedel nennen, die sich mit sehr viel Geduld in den letzten dreieinhalb Jahren meiner Förderung angenommen hat.

Der gleiche Anteil an der vorliegenden Arbeit gebührt Herrn Dr. Joachim Denner, dem ich insbesondere für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung zu Dank verpflichtet bin. Er unterstützte mich zudem bei der Erstellung und Einreichung zweier Publikationen, die aus dieser Arbeit entstanden sind. Bei Frau Dr. Magdalena Eschricht bedanke ich mich für die gute Betreuung und Unterstützung während der ersten beiden Jahren dieser Arbeit.

Prof. Dr. Reinhard Kurth und Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Annahme der Arbeit und deren Begutachtung.

Für die gute Zusammenarbeit in den letzten dreieinhalb Jahren gilt weiterhin mein Dank der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts. Mein ganz besonderer Dank geht an Daniel Ivanuosic sowohl für seine konstruktiven Fachgespräche als auch für die Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie. Bei Herrn Dr. Jürgen Kreutzberger und Frau Martina Keller möchte ich mich für die Unterstützung bei den Aufreinigungen am AktaExplorer sowie bei der Erstellung der Epitop-Kartierungen bedanken.

Für die tägliche Ordnung und Sauberkeit im Labor und auch für manch aufheiterndes Gespräch bedanke ich mich besonders bei Karin Braunmüller.

Dank gebührt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des RKI-eigenen Tierstalls sowie des Bundesamtes für Risikobewertung, die die notwendigen Immunisierungen durchgeführt haben.

Für das fleißige Fehlerlesen dieser Arbeit will ich mich besonders bei meiner ehemaligen Kommilitonin Dana Sittner und meinem Opa Dr. Hans Wagner sowie allen weiteren bedanken.

Für private Unterstützung danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern.

V. Eigene Veröffentlichungen

Während der Erstellung dieser Doktorarbeit konnte ihm Rahmen kleinerer und auch größerer Fachtagungen die hier gezeigten Ergebnisse präsentiert werden. Daneben entstanden zwei Artikel in Fachzeitschriften.

Poster

Waechter A., Eschricht M., Denner J. (2010). Mechanism of neutralisation by antibodies against the transmembrane envelope protein of the porcine endogenous retrovirus (PERVs). DipDok-Meeting; Robert Koch-Institut, Berlin

Präsentation

Wächter, A. & Denner, J. (2013). Neutralising antibodies specific for the transmembrane envelope protein of the porcine endogenous retrovirus (PERV). 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel

Veröffentlichungen

Waechter, A., Eschricht, M. & Denner, J. (2012). Neutralisation of the porcine endogenous retrovirus (PERV) by antibodies against the membrane proximal external region (MPER) of the transmembrane envelope protein. J Gen Virol.

Waechter, A. & Denner, J. (2013). Novel neutralising antibodies targeting the N-terminal helical region of the transmembrane envelope protein p15E of the porcine endogenous retrovirus (PERV). Immunol Res.

VI. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

Berlin, den 25.7.2013

Alexander Wächter

Literaturverzeichnis

- Abcam (2013). Tips for designing a good peptide immunogen. by <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11272&pid=11287>. aufgerufen am: 24.07.2013
- Akiyoshi, D. E., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J. L., Banerjee, P. & Fishman, J. A. (1998). Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* 72, 4503-4507.
- Albritton, L. M., Kim, J. W., Tseng, L. & Cunningham, J. M. (1993). Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *Journal of virology* 67, 2091-2096.
- Alving, C. R. (2002). Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 20 Suppl 3, S56-64.
- Alving, C. R., Peachman, K. K., Rao, M. & Reed, S. G. (2012). Adjuvants for human vaccines. *Current opinion in immunology* 24, 310-315.
- Anderson, M. (2006). Xenotransplantation: a bioethical evaluation. *J Med Ethics* 32, 205-208.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Kemmel, V., Humbert, J. P., Aunis, D. & Maitre, M. (2007). Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *Faseb J* 21, 885-895.
- Argaw, T. & Wilson, C. A. (2012). Detailed Mapping of Determinants within the Porcine Endogenous Retrovirus Envelope Surface Unit Identifies Critical Residues for Human Cell Infection within the Proline-Rich Region. *Journal of virology* 86, 9096-9104.
- Armstrong, J. A., Porterfield, J. S. & de Madrid, A. T. (1971). C-type Virus Particles in Pig Kidney Cell Lines. *Journal of General Virology* 10, 195-198.
- Arnold, G. F., Velasco, P. K., Holmes, A. K., Wrin, T., Geisler, S. C., Phung, P., Tian, Y., Resnick, D. A., Ma, X., Mariano, T. M., Petropoulos, C. J., Taylor, J. W., Katinger, H. & Arnold, E. (2009). Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) elicited from human rhinoviruses that display the HIV-1 gp41 ELDKWA epitope. *J Virol* 83, 5087-5100.
- Ashkenazi, A., Viard, M., Wexler-Cohen, Y., Blumenthal, R. & Shai, Y. (2011). Viral envelope protein folding and membrane hemifusion are enhanced by the conserved loop region of HIV-1 gp41. *Faseb J* 25, 2156-2166.
- Atkinson, W. (2012). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book)*: Centers for Disease Control and Prevention.
- Auchincloss, H., Jr. & Sachs, D. H. (1998). Xenogeneic transplantation. *Annual review of immunology* 16, 433-470.
- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C. & O'Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods (San Diego, Calif)* 56, 116-129.
- Bach, F. H. & Ivinson, A. J. (2002). A shrewd and ethical approach to xenotransplantation. *Trends Biotechnol* 20, 129-131.
- Bach, F. H., Robson, S. C., Winkler, H., Ferran, C., Stuhlmeier, K. M., Wrighton, C. J. & Hancock, W. W. (1995). Barriers to xenotransplantation. *Nature medicine* 1, 869-873.
- Backstrom, J. R. & Sanders-Bush, E. (1997). Generation of anti-peptide antibodies against serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *J Neurosci Methods* 77, 109-117.
- Bae, Y., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1997). Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70. *Journal of virology* 71, 2092-2099.
- Bailey, L. L., Nehlsen-Cannarella, S. L., Concepcion, W. & Jolley, W. B. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *Jama* 254, 3321-3329.

- Bannasch, H., Horch, R. E., Tanczos, E. & Stark, G. B. (2000). Treatment of chronic wounds with cultured autologous keratinocytes as suspension in fibrin glue. *Zentralblatt fur Chirurgie* 125 Suppl 1, 79-81.
- Bar, S. & Alizon, M. (2004). Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J Virol* 78, 811-820.
- Barbato, G., Bianchi, E., Ingallinella, P., Hurni, W. H., Miller, M. D., Ciliberto, G., Cortese, R., Bazzo, R., Shiver, J. W. & Pessi, A. (2003). Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol* 330, 1101-1115.
- Barouch, D. H. (2008). Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455, 613-619.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Behrendt, R., Fiebig, U., Kurth, R. & Denner, J. (2012). Induction of Antibodies Binding to the Membrane Proximal External Region of gp36 of HIV-2. *Intervirology* 55, 252-256.
- Bellamy-McIntyre, A. K., Lay, C. S., Baar, S., Maerz, A. L., Talbo, G. H., Drummer, H. E. & Pombourios, P. (2007). Functional links between the fusion peptide-proximal polar segment and membrane-proximal region of human immunodeficiency virus gp41 in distinct phases of membrane fusion. *J Biol Chem* 282, 23104-23116.
- Belshe, R. B., Clements, M. L., Dolin, R., Graham, B. S., McElrath, J., Gorse, G. J., Schwartz, D., Keefer, M. C., Wright, P., Corey, L. & et al. (1993). Safety and immunogenicity of a fully glycosylated recombinant gp160 human immunodeficiency virus type 1 vaccine in subjects at low risk of infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group Network. *J Infect Dis* 168, 1387-1395.
- Bengtsson, A., Svalander, C. T., Molne, J., Rydberg, L. & Breimer, M. E. (1998). Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. III. Studies of plasma complement activation and complement deposition in the kidney tissue. *Xenotransplantation* 5, 176-183.
- Bianchi, E., Joyce, J. G., Miller, M. D., Finnefrock, A. C., Liang, X., Finotto, M., Ingallinella, P., McKenna, P., Citron, M., Ottinger, E., Hepler, R. W., Hrin, R., Nahas, D., Wu, C., Montefiori, D., Shiver, J. W., Pessi, A. & Kim, P. S. (2010). Vaccination with peptide mimetics of the gp41 prehairpin fusion intermediate yields neutralizing antisera against HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10655-10660.
- Binley, J. M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wang, M., Chappay, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C. J. & Burton, D. R. (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 78, 13232-13252.
- Blish, C. A., Nguyen, M. A. & Overbaugh, J. (2008). Enhancing exposure of HIV-1 neutralization epitopes through mutations in gp41. *PLoS medicine* 5, e9.
- Boneva, R. S., Folks, T. M. & Chapman, L. E. (2001). Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiol Rev* 14, 1-14.
- Bosch, S., Arnauld, C. & Jestin, A. (2000). Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *Journal of virology* 74, 8575-8581.
- Breese, S. S., Jr. (1970). Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 30, 401-404.
- Broder, S. & Gallo, R. C. (1985). Human T-cell leukemia viruses (HTLV): a unique family of pathogenic retroviruses. *Annual review of immunology* 3, 321-336.
- Buhler, L., Awwad, M., Treter, S., Chang, Q., Basker, M., Alwayn, I. P., Teranishi, K., Ericsson, T., Moran, K., Harper, D., Kurilla-Mahon, B., Huang, C. A., Sackstein, R., Sykes, M.,

- White-Scharf, M. E., Sachs, D. H., Down, J. D. & Cooper, D. K. (2002a). Pig hematopoietic cell chimerism in baboons conditioned with a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade. *Transplantation* 73, 12-22.
- Buhler, L. H., Spitzer, T. R., Sykes, M., Sachs, D. H., Delmonico, F. L., Tolkoff-Rubin, N., Saidman, S. L., Sackstein, R., McAfee, S., Dey, B., Colby, C. & Cosimi, A. B. (2002b). Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 74, 1405-1409.
- Caffrey, M. (2001). Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochim Biophys Acta* 1536, 116-122.
- Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1997). Determination of the secondary structure and global topology of the 44 kDa ectodomain of gp41 of the simian immunodeficiency virus by multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of molecular biology* 271, 819-826.
- Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E., Thali, M., Repke, H. & Sodroski, J. (1993). Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J Virol* 67, 2747-2755.
- Cardoso, R. M., Zwick, M. B., Stanfield, R. L., Kunert, R., Binley, J. M., Katinger, H., Burton, D. R. & Wilson, I. A. (2005). Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity* 22, 163-173.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681-684.
- Chiang, C. Y., Pan, Y. R., Chou, L. F., Fang, C. Y., Wang, S. R., Yang, C. Y. & Chang, H. Y. (2007). Functional epitopes on porcine endogenous retrovirus envelope protein interacting with neutralizing antibody combining sites. *Virology* 361, 364-371.
- Chong, H., Yao, X., Qiu, Z., Qin, B., Han, R., Waltersperger, S., Wang, M., Cui, S. & He, Y. (2012). Discovery of critical residues for viral entry and inhibition through structural insight of HIV-1 fusion inhibitor CP621-652. *J Biol Chem* 287, 20281-20289.
- Clemenceau, B., Lalain, S., Martignat, L. & Sai, P. (1999). Porcine endogenous retroviral mRNAs in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen-free pigs. *Diabetes Metab* 25, 518-525.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & et al. (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.
- Coffin, J. M. (1996). Retroviridae and their replication In *Virology*, pp. 1767-1848. Edited by B. N. F. e. al.: Raven Press, New York.
- Colman, P. M. & Lawrence, M. C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 309-319.
- Cooper, D. K., Koren, E. & Oriol, R. (1994). Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol Rev* 141, 31-58.
- Corti, D., Langedijk, J. P., Hinz, A., Seaman, M. S., Vanzetta, F., Fernandez-Rodriguez, B. M., Silacci, C., Pinna, D., Jarrossay, D., Balla-Jhaghoorsingh, S., Willems, B., Zekveld, M. J., Dreja, H., O'Sullivan, E., Pade, C., Orkin, C., Jeffs, S. A., Montefiori, D. C., Davis, D., Weissenhorn, W., McKnight, A., Heeney, J. L., Sallusto, F., Sattentau, Q. J., Weiss, R. A. & Lanzavecchia, A. (2010). Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 5, e8805.
- Currier, J. R., Ngauy, V., de Souza, M. S., Ratto-Kim, S., Cox, J. H., Polonis, V. R., Earl, P., Moss, B., Peel, S., Slike, B., Sriplienchan, S., Thongcharoen, P., Paris, R. M., Robb, M. L., Kim, J., Michael, N. L. & Marovich, M. A. (2010). Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. *PLoS One* 5, e13983.

- Czauderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R. & Tonjes, R. R. (2000). Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J Virol* 74, 4028-4038.
- Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I. A. & Ayares, D. L. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20, 251-255.
- Davis, M. M. (2008). A prescription for human immunology. *Immunity* 29, 835-838.
- DBK (1998). Xenotransplantation - Eine Hilfe zur ethischen Urteilsbildung. by http://www.dbk.de/fileadmin/redaktion/veroeffentlichungen/gem-texte/GT_13.pdf. aufgerufen am: 12. November 2012
- de la Arada, I., Julien, J. P., de la Torre, B. G., Huarte, N., Andreu, D., Pai, E. F., Arrondo, J. L. & Nieva, J. L. (2009). Structural constraints imposed by the conserved fusion peptide on the HIV-1 gp41 epitope recognized by the broadly neutralizing antibody 2F5. *The journal of physical chemistry B* 113, 13626-13637.
- Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P. & Isacson, O. (1997). Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature medicine* 3, 350-353.
- Denner, J. (2008). Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Archives of virology* 153, 1421-1426.
- Denner, J. (2011). Towards an AIDS vaccine: the transmembrane envelope protein as target for broadly neutralizing antibodies. *Human vaccines* 7 Suppl, 4-9.
- Denner, J. (2012). Immunising with the transmembrane envelope proteins of different retroviruses including HIV-1: A comparative study. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9.
- Denner, J., Mihica, D., Kaulitz, D. & Schmidt, C. M. (2012). Increased titers of neutralizing antibodies after immunization with both envelope proteins of the porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology journal* 9, 260.
- Denner, J., Schuurman, H. J. & Patience, C. (2009). The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* 16, 239-248.
- Denner, J., Specke, V., Thiesen, U., Karlas, A. & Kurth, R. (2003). Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology* 314, 125-133.
- Denner, J. & Tonjes, R. R. (2012). Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev* 25, 318-343.
- Di Nicuolo, G., D'Alessandro, A., Andria, B., Scuderi, V., Scognamiglio, M., Tammaro, A., Mancini, A., Cozzolino, S., Di Florio, E., Bracco, A., Calise, F. & Chamuleau, R. A. (2010). Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver. *Xenotransplantation* 17, 431-439.
- Dieckhoff, B., Kessler, B., Jobst, D., Kues, W., Petersen, B., Pfeifer, A., Kurth, R., Niemann, H., Wolf, E. & Denner, J. (2009). Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 16, 64-73.
- DoH (2003). Law and Ethics of Xenotransplantation - Bibliography and Abstracts of Key Articles: Department of Health and the UKXIRA.
- Dolin, R., Graham, B. S., Greenberg, S. B., Tacket, C. O., Belshe, R. B., Midthun, K., Clements, M. L., Gorse, G. J., Horgan, B. W., Atmar, R. L. & et al. (1991). The safety and immunogenicity of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) recombinant

- gp160 candidate vaccine in humans. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *Ann Intern Med* 114, 119-127.
- Dorling, A., Riesbeck, K., Warrens, A. & Lechler, R. (1997). Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* 349, 867-871.
- Dressler, S. & Wienold, M. (2001). *AIDS-Taschenwörterbuch*. Berlin ; Hannover: Bristol-Myers Squibb.
- DSO (2012). *Organspende und Transplantation in Deutschland - Jahresbericht 2011*. Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation.
- DSO (2013). *Organspende und Transplantation in Deutschland - Jahresbericht 2012*. Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001a). Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11187-11192.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001b). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual review of biochemistry* 70, 777-810.
- Edelman, R. (1980). Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis* 2, 370-383.
- Ehl, S. (2006). Immunologische Grundlagen der Impfung gegen Viren. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 11, 1111-1122
- Einsiedel, E. F. (2004). Commentary: On the position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Transplantation* 78, 1110-1111.
- Einsiedel, E. F. & Ross, H. (2002). Animal spare parts? A Canadian public consultation on xenotransplantation. *Science and engineering ethics* 8, 579-591.
- Ekser, B., Ezzelarab, M., Hara, H., van der Windt, D. J., Wijkstrom, M., Bottino, R., Trucco, M. & Cooper, D. K. (2012). Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 379, 672-683.
- Elder, J. H., McGee, J. S., Munson, M., Houghten, R. A., Kloetzer, W., Bittle, J. L. & Grant, C. K. (1987). Localization of neutralizing regions of the envelope gene of feline leukemia virus by using anti-synthetic peptide antibodies. *J Virol* 61, 8-15.
- Ellermann, V. & Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbibliothek Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten* 46, 595-609.
- Elliott, R. B., Escobar, L., Garkavenko, O., Croxson, M. C., Schroeder, B. A., McGregor, M., Ferguson, G., Beckman, N. & Ferguson, S. (2000). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell transplantation* 9, 895-901.
- Emanuel, E. J., Wendler, D. & Grady, C. (2000). What makes clinical research ethical? *Jama* 283, 2701-2711.
- Ericsson, T. A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S. F., Wood, J. C., Oldmixon, B. A., Suling, K. M., Ishii, J. K., Kitagawa, Y., Miyazawa, T., Salomon, D. R., Weiss, R. A. & Patience, C. (2003). Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6759-6764.
- Eurotransplant (2012). Eurotransplant - Annual Report 2011. by http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2011.pdf. aufgerufen am: 12. November 2012
- Eurotransplant (2013). Eurotransplant.org - Yearly Statistics. by <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=yearlystats>. aufgerufen am: 06.03.2013
- Fauci, A. S. (2008). 25 years of HIV. *Nature* 453, 289-290.
- Fenouillet, E., Barbouche, R. & Jones, I. M. (2007). Cell entry by enveloped viruses: redox considerations for HIV and SARS-coronavirus. *Antioxid Redox Signal* 9, 1009-1034.
- Fiebig, U. (2008). Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I*. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin.
- Fiebig, U., Hartmann, M. G., Bannert, N., Kurth, R. & Denner, J. (2006). Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol* 80, 5651-5654.

- Fiebig, U., Stephan, O., Kurth, R. & Denner, J. (2003). Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* 307, 406-413.
- Finnegan, C. M., Berg, W., Lewis, G. K. & DeVico, A. L. (2002). Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J Virol* 76, 12123-12134.
- Fishman, J. A. (2001). Infection in xenotransplantation. *J Card Surg* 16, 363-373.
- Forthal, D. N. & Moog, C. (2009). Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 388-393.
- Freed, E. O. & Risser, R. (1987). The role of envelope glycoprotein processing in murine leukemia virus infection. *Journal of virology* 61, 2852-2856.
- Frey, G., Chen, J., Rits-Volloch, S., Freeman, M. M., Zolla-Pazner, S. & Chen, B. (2010). Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1486-1491.
- Fu, J., Li, D., Xia, S., Song, H., Dong, Z., Chen, F., Sun, X. & Tang, Z. (2009). Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine. *Anal Sci* 25, 675-680.
- Fuchimoto, Y., Huang, C. A., Yamada, K., Gleit, Z. L., Kitamura, H., Griesemer, A., Scheier-Dolberg, R., Melendy, E., White-Scharf, M. E. & Sachs, D. H. (2001). Induction of kidney allograft tolerance through mixed chimerism in miniature swine. *Transplantation proceedings* 33, 77.
- Fuchs, W., Veits, J. & Mettenleiter, T. C. (2006). [Recombinant viruses of poultry as vector vaccines against fowl plague]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 119, 160-166.
- Furuichi, Y., Shatkin, A. J., Stavnezer, E. & Bishop, J. M. (1975). Blocked, methylated 5'-terminal sequence in avian sarcoma virus RNA. *Nature* 257, 618-620.
- Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C. & Montelaro, R. C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS research and human retroviruses* 5, 431-440.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. & Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S. & Blumenthal, R. (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614, 36-50.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- GE-Healthcare, G. (2007). *Affinity Chromatography: Principles and Methods*: GE Healthcare.
- George, J. F. (2006). Xenotransplantation: an ethical dilemma. *Current opinion in cardiology* 21, 138-141.
- Gifford, R. & Tristem, M. (2003). The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 26, 291-315.
- Girard, M. P., Osmanov, S., Assossou, O. M. & Kieny, M. P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. *Vaccine* 29, 6191-6218.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine* 305, 1425-1431.
- Gray, K. D. & Roth, M. J. (1993). Mutational analysis of the envelope gene of Moloney murine leukemia virus. *Journal of virology* 67, 3489-3496.

- Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G. & Lerner, R. A. (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* 28, 477-487.
- Grundner, C., Mirzabekov, T., Sodroski, J. & Wyatt, R. (2002). Solid-Phase Proteoliposomes Containing Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* 76, 3511-3521.
- Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. & Gupta, C. K. (1993). Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11, 293-306.
- Gustchina, E., Li, M., Louis, J. M., Anderson, D. E., Lloyd, J., Frisch, C., Bewley, C. A., Gustchina, A., Wlodawer, A. & Clore, G. M. (2010). Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS pathogens* 6, e1001182.
- Harrison, I., Takeuchi, Y., Bartosch, B. & Stoye, J. P. (2004). Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J Virol* 78, 13871-13879.
- Haynes, B. F., Fleming, J., St Clair, E. W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scarce, R. M., Plonk, K., Staats, H. F., Ortel, T. L., Liao, H. X. & Alam, S. M. (2005). Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308, 1906-1908.
- Hazama, K., Miyagawa, S., Miyazawa, T., Yamada, J., Tomonaga, K., Ota, M., Matsuda, H. & Shirakura, R. (2003). The significance of N-linked glycosylation in pig endogenous retrovirus infectivity. *Biochemical and biophysical research communications* 310, 327-333.
- Heard, J. M. & Danos, O. (1991). An amino-terminal fragment of the Friend murine leukemia virus envelope glycoprotein binds the ecotropic receptor. *Journal of virology* 65, 4026-4032.
- Hermanson, G. T. (1996). Preparation of Hapten-Carrier Immunogen Conjugates. In *Bioconjugate Techniques*, pp. 419-455. San Diego: Academic Press.
- Herring, C., Cunningham, D. A., Whittam, A. J., Fernandez-Suarez, X. M. & Langford, G. A. (2001). Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV. *Clinical biochemistry* 34, 23-27.
- Hinz, A., Schoehn, G., Quendler, H., Hulsik, D. L., Stiegler, G., Katinger, H., Seaman, M. S., Montefiori, D. & Weissenhorn, W. (2009). Characterization of a trimeric MPER containing HIV-1 gp41 antigen. *Virology* 390, 221-227.
- Ho, J., Uger, R. A., Zwick, M. B., Luscher, M. A., Barber, B. H. & MacDonald, K. S. (2005). Conformational constraints imposed on a pan-neutralizing HIV-1 antibody epitope result in increased antigenicity but not neutralizing response. *Vaccine* 23, 1559-1573.
- Holland, C. A., Anklesaria, P., Sakakeeny, M. A. & Greenberger, J. S. (1987). Enhancer sequences of a retroviral vector determine expression of a gene in multipotent hematopoietic progenitors and committed erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8662-8666.
- Houen, G., Olsen, D. T., Hansen, P. R., Petersen, K. B. & Barkholt, V. (2003). Preparation of bioconjugates by solid-phase conjugation to ion exchange matrix-adsorbed carrier proteins. *Bioconjugate chemistry* 14, 75-79.
- Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M. K., Doria-Rose, N. A., Longo, N. S., Imamichi, H., Bailer, R. T., Chakrabarti, B., Sharma, S. K., Alam, S. M., Wang, T., Yang, Y., Zhang, B., Migueles, S. A., Wyatt, R., Haynes, B. F., Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Connors, M. (2012). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491, 406-412.
- Huarte, N., Lorizate, M., Kunert, R. & Nieva, J. L. (2008). Lipid modulation of membrane-bound epitope recognition and blocking by HIV-1 neutralizing antibodies. *FEBS letters* 582, 3798-3804.
- Huarte, N., Lorizate, M., Perez-Paya, E. & Nieva, J. L. (2011). Membrane-transferring regions of gp41 as targets for HIV-1 fusion inhibition and viral neutralization. *Current topics in medicinal chemistry* 11, 2985-2996.

- Ibrahimi, I. M., Eder, J., Prager, E. M., Wilson, A. C. & Arnon, R. (1980). The effect of a single amino acid substitution on the antigenic specificity of the loop region of lysozyme. *Molecular immunology* 17, 37-46.
- Irgang, M., Sauer, I. M., Karlas, A., Zeilinger, K., Gerlach, J. C., Kurth, R., Neuhaus, P. & Denner, J. (2003). Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 28, 141-154.
- Janeway, C. (2002). *Immunologie*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.
- Jaroslava, T. (2002). Affinity chromatography. In *Biochromatography: Theory and Practice*. Edited by M. A. Vijayalakshmi: CRC Press.
- Jones, M. & Einsiedel, E. (2011). Institutional policy learning and public consultation: the Canadian xenotransplantation experience. *Soc Sci Med* 73, 655-662.
- Kaaden, O. & Dietzschold, B. (1971). Isolation and characterization of extracellular virus-like particles from BHK cells. Brief report. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 35, 317-321.
- Karlas, A., Irgang, M., Votteler, J., Specke, V., Ozel, M., Kurth, R. & Denner, J. (2010). Characterisation of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society* 15, 45-54.
- Karplus, P. A. & Schulz, G. E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72, 212-213.
- Kaulitz, D. (2012). PERV und Xenotransplantation: Impfstoffe, RNAi und genotypische Selektion. In *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. Berlin: Freie Universität.
- Kaulitz, D., Fiebig, U., Eschricht, M., Wurzbacher, C., Kurth, R. & Denner, J. (2011). Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology* 411, 78-86.
- Kielian, M. & Rey, F. A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* 4, 67-76.
- Kim, M., Qiao, Z., Yu, J., Montefiori, D. & Reinherz, E. L. (2007). Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* 25, 5102-5114.
- Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G. & Wolf, E. (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev* 77, 209-221.
- Koff, W. C., Burton, D. R., Johnson, P. R., Walker, B. D., King, C. R., Nabel, G. J., Ahmed, R., Bhan, M. K. & Plotkin, S. A. (2013). Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* 340, 1232910.
- Kolaskar, A. S. & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters* 276, 172-174.
- Kumada, Y., Zhao, C., Ishimura, R., Imanaka, H., Imamura, K. & Nakanishi, K. (2007). Protein-protein interaction analysis using an affinity peptide tag and hydrophilic polystyrene plate. *Journal of biotechnology* 128, 354-361.
- Kumar, R., Tuen, M., Li, H., Tse, D. B. & Hioe, C. E. (2011). Improving immunogenicity of HIV-1 envelope gp120 by glycan removal and immune complex formation. *Vaccine* 29, 9064-9074.
- Labrecque, J., Metz, M., Lau, G., Darkes, M. C., Wong, R. S., Bogucki, D., Carpenter, B., Chen, G., Li, T., Nan, S., Schols, D., Bridger, G. J., Fricker, S. P. & Skerlj, R. T. (2011). HIV-1 entry inhibition by small-molecule CCR5 antagonists: a combined molecular modeling and mutant study using a high-throughput assay. *Virology* 413, 231-243.
- Langhammer, S., Fiebig, U., Kurth, R. & Denner, J. (2005). Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine* 23, 3341-3348.
- Langhammer, S., Hubner, J., Jarrett, O., Kurth, R. & Denner, J. (2011). Immunization with the transmembrane protein of a retrovirus, feline leukemia virus: absence of antigenemia following challenge. *Antiviral research* 89, 119-123.

- Langhammer, S., Hubner, J., Kurth, R. & Denner, J. (2006). Antibodies neutralizing feline leukaemia virus (FeLV) in cats immunized with the transmembrane envelope protein p15E. *Immunology* 117, 229-237.
- Larsen, J. E., Lund, O. & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research* 2, 2.
- Laurencin, C. T. & El-Amin, S. F. (2008). Xenotransplantation in orthopaedic surgery. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 16, 4-8.
- Lavillette, D. & Kabat, D. (2004). Porcine endogenous retroviruses infect cells lacking cognate receptors by an alternative pathway: implications for retrovirus evolution and xenotransplantation. *Journal of virology* 78, 8868-8877.
- Lavillette, D., Ruggieri, A., Russell, S. J. & Cosset, F. L. (2000). Activation of a cell entry pathway common to type C mammalian retroviruses by soluble envelope fragments. *Journal of virology* 74, 295-304.
- Law, M., Cardoso, R. M., Wilson, I. A. & Burton, D. R. (2007). Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J Virol* 81, 4272-4285.
- Le Tissier, P., Stoye, J. P., Takeuchi, Y., Patience, C. & Weiss, R. A. (1997). Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389, 681-682.
- Lederman, D. M., Kung, R. T. & McNair, D. S. (2002). Therapeutic potential of implantable replacement hearts. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2, 297-301.
- Lee, J. H., Webb, G. C., Allen, R. D. & Moran, C. (2002). Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs. *J Virol* 76, 5548-5556.
- Lee, W. R., Yu, X. F., Syu, W. J., Essex, M. & Lee, T. H. (1992). Mutational analysis of conserved N-linked glycosylation sites of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J Virol* 66, 1799-1803.
- Lenz, O., Dittmar, M. T., Wagner, A., Ferko, B., Vorauer-Uhl, K., Stiegler, G. & Weissenhorn, W. (2005). Trimeric membrane-anchored gp41 inhibits HIV membrane fusion. *The Journal of biological chemistry* 280, 4095-4101.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. & Gregory, T. J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265, 10373-10382.
- Levy, M. F., Crippin, J., Sutton, S., Netto, G., McCormack, J., Curiel, T., Goldstein, R. M., Newman, J. T., Gonwa, T. A., Banchereau, J., Diamond, L. E., Byrne, G., Logan, J. & Klintmalm, G. B. (2000). Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 69, 272-280.
- Li, J., Chen, X., Jiang, S. & Chen, Y. H. (2008). Deletion of fusion peptide or destabilization of fusion core of HIV gp41 enhances antigenicity and immunogenicity of 4E10 epitope. *Biochemical and biophysical research communications* 376, 60-64.
- Lin, G. & Nara, P. L. (2007). Designing immunogens to elicit broadly neutralizing antibodies to the HIV-1 envelope glycoprotein. *Current HIV research* 5, 514-541.
- Liu, S., Jing, W., Cheung, B., Lu, H., Sun, J., Yan, X., Niu, J., Farmer, J., Wu, S. & Jiang, S. (2007). HIV gp41 C-terminal heptad repeat contains multifunctional domains. Relation to mechanisms of action of anti-HIV peptides. *J Biol Chem* 282, 9612-9620.
- Lori, F., Trocio, J., Bakare, N., Kelly, L. M. & Lisziewicz, J. (2005). DermaVir, a novel HIV immunisation technology. *Vaccine* 23, 2030-2034.
- Lorzate, M., de la Arada, I., Huarte, N., Sanchez-Martinez, S., de la Torre, B. G., Andreu, D., Arrondo, J. L. & Nieva, J. L. (2006). Structural analysis and assembly of the HIV-1 Gp41 amino-terminal fusion peptide and the pretransmembrane amphipathic-at-interface sequence. *Biochemistry* 45, 14337-14346.

- Lu, M. & Kim, P. S. (1997). A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 15, 465-471.
- Luftig, M. A., Mattu, M., Di Giovine, P., Geleziunas, R., Hrin, R., Barbato, G., Bianchi, E., Miller, M. D., Pessi, A. & Carfi, A. (2006). Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat Struct Mol Biol* 13, 740-747.
- Luo, M., Yuan, F., Liu, Y., Jiang, S., Song, X., Jiang, P., Yin, X., Ding, M. & Deng, H. (2006). Induction of neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by immunization with gp41 membrane-proximal external region (MPER) fused with porcine endogenous retrovirus (PERV) p15E fragment. *Vaccine* 24, 435-442.
- Ma, B. J., Alam, S. M., Go, E. P., Lu, X., Desaire, H., Tomaras, G. D., Bowman, C., Sutherland, L. L., Scarce, R. M., Santra, S., Letvin, N. L., Kepler, T. B., Liao, H. X. & Haynes, B. F. (2011). Envelope deglycosylation enhances antigenicity of HIV-1 gp41 epitopes for both broad neutralizing antibodies and their unmutated ancestor antibodies. *PLoS pathogens* 7, e1002200.
- Magre, S., Takeuchi, Y. & Bartosch, B. (2003). Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Reviews in medical virology* 13, 311-329.
- Mahdi, Y. (2009). Antiretrovirale Impfstoffe: Immunisierung mittels Hüllproteinen von γ -Retroviren. In *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. Berlin: Freie Universität
- Mang, R., Maas, J., Chen, X., Goudsmit, J. & van Der Kuyl, A. C. (2001). Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *The Journal of general virology* 82, 1829-1834.
- Marcucci, K. T., Argaw, T., Wilson, C. A. & Salomon, D. R. (2009). Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry. *Retrovirology* 6, 3.
- Martin, U., Kiessig, V., Blusch, J. H., Haverich, A., von der Helm, K., Herden, T. & Steinhoff, G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352, 692-694.
- Martinez-Navio, J. M. & Desrosiers, R. C. (2012). Neutralizing capacity of monoclonal antibodies that recognize peptide sequences underlying the carbohydrates on gp41 of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 86, 12484-12493.
- Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annual review of immunology* 28, 413-444.
- Mattiuzzo, G., Matouskova, M. & Takeuchi, Y. (2007). Differential resistance to cell entry by porcine endogenous retrovirus subgroup A in rodent species. *Retrovirology* 4, 93.
- Matyas, G. R., Beck, Z., Karasavvas, N. & Alving, C. R. (2009a). Lipid binding properties of 4E10, 2F5, and WR304 monoclonal antibodies that neutralize HIV-1. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 660-665.
- Matyas, G. R., Wiczorek, L., Beck, Z., Ochsenbauer-Jambor, C., Kappes, J. C., Michael, N. L., Polonis, V. R. & Alving, C. R. (2009b). Neutralizing antibodies induced by liposomal HIV-1 glycoprotein 41 peptide simultaneously bind to both the 2F5 or 4E10 epitope and lipid epitopes. *AIDS* 23, 2069-2077.
- McCoy, L. E. & Weiss, R. A. (2013). Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *The Journal of experimental medicine* 210, 209-223.
- McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O. D., Carter, D. K., Hural, J., Akondy, R., Buchbinder, S. P., Robertson, M. N., Mehrotra, D. V., Self, S. G., Corey, L., Shiver, J. W. & Casimiro, D. R. (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372, 1894-1905.
- Mestas, J. & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology* 172, 2731-2738.
- Miller, M. D., Geleziunas, R., Bianchi, E., Lennard, S., Hrin, R., Zhang, H., Lu, M., An, Z., Ingallinella, P., Finotto, M., Mattu, M., Finnefrock, A. C., Bramhill, D., Cook, J., Eckert,

- D. M., Hampton, R., Patel, M., Jarantow, S., Joyce, J., Ciliberto, G., Cortese, R., Lu, P., Strohl, W., Schleif, W., McElhaugh, M., Lane, S., Lloyd, C., Lowe, D., Osbourn, J., Vaughan, T., Emini, E., Barbato, G., Kim, P. S., Hazuda, D. J., Shiver, J. W. & Pessi, A. (2005). A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14759-14764.
- Millipore, C. E. (2013). Antibodies tutorial, Antigen tutorial and Antigen-Antibody interaction - Millipore. by <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/antibodiestutorial>. aufgerufen am: 07.02.2013
- Miyagawa, S., Nakatsu, S., Hazama, K., Nakagawa, T., Kondo, A., Matsunami, K., Yamamoto, A., Yamada, J., Miyazawa, T. & Shirakura, R. (2006). A novel strategy for preventing PERV transmission to human cells by remodeling the viral envelope glycoprotein. *Xenotransplantation* 13, 258-263.
- Mizutani, S., Boettiger, D. & Temin, H. M. (1970). A DNA-dependent DNA polymerase and a DNA endonuclease in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 228, 424-427.
- Moalic, Y., Felix, H., Takeuchi, Y., Jestin, A. & Blanchard, Y. (2009). Genome areas with high gene density and CpG island neighborhood strongly attract porcine endogenous retrovirus for integration and favor the formation of hot spots. *Journal of virology* 83, 1920-1929.
- Moazami, N., Hoercher, K. J., Fukamachi, K., Kobayashi, M., Smedira, N. G., Massiello, A. & Horvath, D. J. (2013). Mechanical circulatory support for heart failure: past, present and a look at the future. *Expert Rev Med Devices* 10, 55-71.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.
- Montero, M., van Houten, N. E., Wang, X. & Scott, J. K. (2008). The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 72, 54-84.
- Munier, C. M., Andersen, C. R. & Kelleher, A. D. (2011). HIV vaccines: progress to date. *Drugs* 71, 387-414.
- Munoz, A., Ramis, G., Pallares, F. J., Martinez, J. S., Oliva, J. E., Martinez, M., Munitiz, V., Yelamos, J., Ramirez, P. & Parrilla, P. (1999). Surgical procedure for specific pathogen free piglet production by modified terminal hysterectomy. *Transplantation proceedings* 31, 2627-2629.
- Muronetz, V. I., Sholukh, M. & Korpela, T. (2001). Use of protein-protein interactions in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 49, 29-47.
- Murphy, J. E. & Goff, S. P. (1989). Construction and analysis of deletion mutations in the U5 region of Moloney murine leukemia virus: effects on RNA packaging and reverse transcription. *J Virol* 63, 319-327.
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rucker, F. & Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67, 6642-6647.
- Nakaya, Y., Hoshino, S., Yasuda, J. & Miyazawa, T. (2011a). Mapping of a neutralizing epitope in the surface envelope protein of porcine endogenous retrovirus subgroup B. *The Journal of general virology* 92, 940-944.
- Nakaya, Y., Shojima, T., Yasuda, J., Imakawa, K. & Miyazawa, T. (2011b). Epigenetic regulation on the 5'-proximal CpG island of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13, 49-57.
- National Academy of Sciences (US), k. (1996). *Xenotransplantation: Science, Ethics, and Public Policy*.
- Nelson, J. D., Kinkead, H., Brunel, F. M., Leaman, D., Jensen, R., Louis, J. M., Maruyama, T., Bewley, C. A., Bowdish, K., Clore, G. M., Dawson, P. E., Frederickson, S., Mage, R. G., Richman, D. D., Burton, D. R. & Zwick, M. B. (2008). Antibody elicited against the

- gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* 377, 170-183.
- Nermut, M. V. & Hockley, D. J. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 214, 1-24.
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J. R., Wyatt, R. & Kwong, P. D. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* 78, 10724-10737.
- Onions, D., Cooper, D. K., Alexander, T. J., Brown, C., Claassen, E., Foweraker, J. E., Harris, D. L., Mahy, B. W., Minor, P. D., Osterhaus, A. D., Pastoret, P. P. & Yamanouchi, K. (2000). An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 7, 143-155.
- Overbaugh, J. & Morris, L. (2012). The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007039.
- Pan, C., Cai, L., Lu, H., Qi, Z. & Jiang, S. (2009). Combinations of the first and next generations of human immunodeficiency virus (HIV) fusion inhibitors exhibit a highly potent synergistic effect against enfuvirtide-sensitive and -resistant HIV type 1 strains. *J Virol* 83, 7862-7872.
- Pan, C., Liu, S. & Jiang, S. (2010). HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 109, 94-105.
- Pang, W., Tam, S. C. & Zheng, Y. T. (2009). Current peptide HIV type-1 fusion inhibitors. *Antiviral chemistry & chemotherapy* 20, 1-18.
- Paradis, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W. M., Chapman, L. E., Lockey, C., Onions, D. & Otto, E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285, 1236-1241.
- Park, K. M., Park, S. M., Yang, S. R., Hong, S. H. & Woo, H. M. (2013). Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver. *Journal of bioscience and bioengineering* 115, 207-215.
- Parker, J. M., Guo, D. & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425-5432.
- Patience, C., Patton, G. S., Takeuchi, Y., Weiss, R. A., McClure, M. O., Rydberg, L. & Breimer, M. E. (1998). No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352, 699-701.
- Patience, C., Switzer, W. M., Takeuchi, Y., Griffiths, D. J., Goward, M. E., Heneine, W., Stoye, J. P. & Weiss, R. A. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *Journal of virology* 75, 2771-2775.
- Patience, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R. A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature medicine* 3, 282-286.
- Pellequer, J. L. & Westhof, E. (1993). PREDITOP: a program for antigenicity prediction. *J Mol Graph* 11, 204-210, 191-202.
- Petersen, B., Carnwath, J. W. & Niemann, H. (2009). The perspectives for porcine-to-human xenografts. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32, 91-105.
- Phogat, S., Svehla, K., Tang, M., Spadaccini, A., Muller, J., Mascola, J., Berkower, I. & Wyatt, R. (2008). Analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane proximal external region arrayed on hepatitis B surface antigen particles. *Virology* 373, 72-84.
- Pierson, R. N., 3rd, Dorling, A., Ayares, D., Rees, M. A., Seebach, J. D., Fishman, J. A., Hering, B. J. & Cooper, D. K. (2009). Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation* 16, 263-280.
- Pinter, A., Kopelman, R., Li, Z., Kayman, S. C. & Sanders, D. A. (1997). Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope

- protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *J Virol* 71, 8073-8077.
- Polzer, S., Dittmar, M. T., Schmitz, H. & Schreiber, M. (2002). The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* 304, 70-80.
- Ponomarenko, J., Bui, H. H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, P. E., Sette, A. & Peters, B. (2008). ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC bioinformatics* 9, 514.
- Popp, S. K., Mann, D. A., Milburn, P. J., Gibbs, A. J., McCullagh, P. J., Wilson, J. D., Tonjes, R. R. & Simeonovic, C. J. (2007). Transient transmission of porcine endogenous retrovirus to fetal lambs after pig islet tissue xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 85, 238-248.
- Powell, S. K., Gates, M. E., Langford, G., Gu, M. L., Lockey, C., Long, Z. & Otto, E. (2000). Antiretroviral agents inhibit infection of human cells by porcine endogenous retroviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3432-3433.
- Qari, S. H., Magre, S., Garcia-Lerma, J. G., Hussain, A. I., Takeuchi, Y., Patience, C., Weiss, R. A. & Heneine, W. (2001). Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *Journal of virology* 75, 1048-1053.
- Qi, Z., Pan, C., Lu, H., Shui, Y., Li, L., Li, X., Xu, X., Liu, S. & Jiang, S. (2010). A recombinant mimetics of the HIV-1 gp41 prehairpin fusion intermediate fused with human IgG Fc fragment elicits neutralizing antibody response in the vaccinated mice. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 506-512.
- Quereda, J. J., Herrero-Medrano, J. M., Abellaneda, J. M., Garcia-Nicolas, O., Martinez-Alarcon, L., Pallares, F. J., Ramirez, P., Munoz, A. & Ramis, G. (2012). Porcine Endogenous Retrovirus Copy Number in Different Pig Breeds is not Related to Genetic Diversity. *Zoonoses Public Health* 59, 401-407.
- Quinnan, G. V., Jr., Zhang, P., Dong, M., Chen, H., Feng, Y. R., Lewis, M. & Broder, C. C. (2013). Neutralizing antibody responses in macaques induced by human immunodeficiency virus type 1 monovalent or trivalent envelope glycoproteins. *PLoS One* 8, e59803.
- Ragheb, J. A. & Anderson, W. F. (1994). pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p12E_{TM} in viral entry. *Journal of virology* 68, 3220-3231.
- Rajik, M. & Yusoff, K. (2011). Peptide inhibitors against influenza virus. *Antiviral chemistry & chemotherapy* 21, 151-154.
- Regula, L. K., Harris, R., Wang, F., Higgins, C. D., Koellhoffer, J. F., Zhao, Y., Chandran, K., Gao, J., Girvin, M. E. & Lai, J. R. (2013). Conformational Properties of Peptides Corresponding to the Ebolavirus GP2 Membrane-Proximal External Region in the Presence of Micelle-Forming Surfactants and Lipids. *Biochemistry*.
- Robin, T. (1993). Immobilized affinity ligand techniques. In *Journal of Immunological Methods*, pp. 282-283. Edited by G. T. Hermanson, A. Krishna Mallia and P.K. Smith: Academic Press, San Diego, CA.
- Ross, A. L., Brave, A., Scarlatti, G., Manrique, A. & Buonaguro, L. (2010). Progress towards development of an HIV vaccine: report of the AIDS Vaccine 2009 Conference. *The Lancet infectious diseases* 10, 305-316.
- Rost, B., Yachdav, G. & Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic acids research* 32, W321-326.
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *The Journal of experimental medicine* 13, 397-411.
- Roux, K. H. & Taylor, K. A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Current opinion in structural biology* 17, 244-252.
- Rubinstein, N. D., Mayrose, I., Halperin, D., Yekutieli, D., Gershoni, J. M. & Pupko, T. (2008). Computational characterization of B-cell epitopes. *Molecular immunology* 45, 3477-3489.

- Sabin, C., Corti, D., Buzon, V., Seaman, M. S., Lutje Hulsik, D., Hinz, A., Vanzetta, F., Agatic, G., Silacci, C., Mainetti, L., Scarlatti, G., Sallusto, F., Weiss, R., Lanzavecchia, A. & Weissenhorn, W. (2010). Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS pathogens* 6, e1001195.
- Sachs, D. H. (1994). The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 185-191.
- Sachs, D. H. (2000). Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Clin Immunol* 95, S63-68.
- Sattentau, Q. J., Zolla-Pazner, S. & Poignard, P. (1995). Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* 206, 713-717.
- Saunders, K. O., Rudicell, R. S. & Nabel, G. J. (2012). The design and evaluation of HIV-1 vaccines. *AIDS* 26, 1293-1302.
- Schaaper, W. M., Lankhof, H., Puijk, W. C. & Meloen, R. H. (1989). Manipulation of antipeptide immune response by varying the coupling of the peptide with the carrier protein. *Molecular immunology* 26, 81-85.
- Schmidt, A. G., Yang, P. L. & Harrison, S. C. (2010). Peptide Inhibitors of Dengue-Virus Entry Target a Late-Stage Fusion Intermediate. *PLoS pathogens* 6, e1000851.
- Schmoeckel, M., Bhatti, F. N., Zaidi, A., Cozzi, E., Waterworth, P. D., Tolan, M. J., Pino-Chavez, G., Goddard, M., Warner, R. G., Langford, G. A., Dunning, J. J., Wallwork, J. & White, D. J. (1998). Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* 65, 1570-1577.
- Schumacher, J. M., Elias, S. A., Palmer, E. P., Kott, H. S., Dinsmore, J., Dempsey, P. K., Fischman, A. J., Thomas, C., Feldman, R. G., Kassissieh, S., Raineri, R., Manhart, C., Penney, D., Fink, J. S. & Isacson, O. (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* 54, 1042-1050.
- Sen, J., Jacobs, A., Jiang, H., Rong, L. & Caffrey, M. (2007). The disulfide loop of gp41 is critical to the furin recognition site of HIV gp160. *Protein science : a publication of the Protein Society* 16, 1236-1241.
- Shi, M., Wang, X., Okamoto, M., Takao, S. & Baba, M. (2009). Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral research* 83, 201-204.
- Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Green, N. & Lerner, R. A. (1983). Synthetic peptide immunogens as vaccines. *Annual review of microbiology* 37, 425-446.
- Singh, M. (2006). No vaccine against HIV yet--are we not perfectly equipped? *Virology journal* 3, 60.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1998). Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95, 871-874.
- Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. (1995). Protein-peptide interactions. *Current opinion in structural biology* 5, 103-113.
- Starzl, T. E., Fung, J., Tzakis, A., Todo, S., Demetris, A. J., Marino, I. R., Doyle, H., Zeevi, A., Warty, V., Michaels, M. & et al. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 341, 65-71.
- Starzl, T. E., Marchioro, T. L., Peters, G. N., Kirkpatrick, C. H., Wilson, W. E., Porter, K. A., Rifkind, D., Ogden, D. A., Hitchcock, C. R. & Waddell, W. R. (1964). Renal Heterotransplantation from Baboon to Man: Experience with 6 Cases. *Transplantation* 2, 752-776.
- Stephan, O., Schwendemann, J., Specke, V., Tacke, S. J., Boller, K. & Denner, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation* 8, 310-316.
- Strynadka, N. C., Redmond, M. J., Parker, J. M., Scraba, D. G. & Hodges, R. S. (1988). Use of synthetic peptides to map the antigenic determinants of glycoprotein D of herpes simplex virus. *J Virol* 62, 3474-3483.

- Sun, Z. Y., Oh, K. J., Kim, M., Yu, J., Brusica, V., Song, L., Qiao, Z., Wang, J. H., Wagner, G. & Reinherz, E. L. (2008). HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. *Immunity* 28, 52-63.
- Sykes, M., d'Apice, A. & Sandrin, M. (2004). Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Transplantation* 78, 1101-1107.
- Tacke, S. J., Kurth, R. & Denner, J. (2000). Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* 268, 87-93.
- Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R. A., Banerjee, P. T., Le Tissier, P. & Stoye, J. P. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72, 9986-9991.
- Tam, J. P., Wu, C. R., Liu, W. & Zhang, J. W. (1991). Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society* 113, 6657-6662.
- Tarlinton, R., Meers, J. & Young, P. (2008). Endogenous retroviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3413-3421.
- Tarlinton, R. E., Meers, J. & Young, P. R. (2006). Retroviral invasion of the koala genome. *Nature* 442, 79-81.
- Temin, H. M. (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 21, 599-600.
- Thomas, D. J., Wall, J. S., Hainfeld, J. F., Kaczorek, M., Booy, F. P., Trus, B. L., Eiserling, F. A. & Steven, A. C. (1991). gp160, the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1, is a dimer of 125-kilodalton subunits stabilized through interactions between their gp41 domains. *J Virol* 65, 3797-3803.
- Tonjes, R. R. & Niebert, M. (2003). Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J Virol* 77, 12363-12368.
- Tran, E. E., Borgnia, M. J., Kuybeda, O., Schauder, D. M., Bartesaghi, A., Frank, G. A., Sapiro, G., Milne, J. L. & Subramaniam, S. (2012). Structural Mechanism of Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein Activation. *PLoS pathogens* 8, e1002797.
- Trier, N. H., Hansen, P. R. & Houen, G. (2012). Production and characterization of peptide antibodies. *Methods (San Diego, Calif)* 56, 136-144.
- Trubetskoy, A. M., Okenquist, S. A. & Lenz, J. (1999). R region sequences in the long terminal repeat of a murine retrovirus specifically increase expression of unspliced RNAs. *J Virol* 73, 3477-3483.
- Tusnady, G. E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- UNAIDS (2012). Global Report - UNAIDS Report to the global AIDS epidemic. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Urh, M., Simpson, D. & Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology* 463, 417-438.
- Vacchino, J. F. & McConnell, H. M. (2001). Peptide Binding to Active Class II MHC Protein on the Cell Surface. *The Journal of Immunology* 166, 6680-6685.
- Valdes-Gonzalez, R., Dorantes, L. M., Bracho-Blanchet, E., Rodriguez-Ventura, A. & White, D. J. (2010). No evidence of porcine endogenous retrovirus in patients with type 1 diabetes after long-term porcine islet xenotransplantation. *Journal of medical virology* 82, 331-334.
- Van Regenmortel, M. H. (2011). Two meanings of reverse vaccinology and the empirical nature of vaccine science. *Vaccine* 29, 7875.
- Vicari, D., Foy, K. C., Liotta, E. M. & Kaumaya, P. T. (2011). Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *J Biol Chem* 286, 13612-13625.
- Waechter, A. & Denner, J. (2013). Novel neutralising antibodies targeting the N-terminal helical region of the transmembrane envelope protein p15E of the porcine endogenous retrovirus (PERV). *Immunol Res.*

- Waechter, A., Eschricht, M. & Denner, J. (2012). Neutralisation of the porcine endogenous retrovirus (PERV) by antibodies against the membrane proximal external region (MPER) of the transmembrane envelope protein. *J Gen Virol*.
- Walker, B. D. & Burton, D. R. (2008). Toward an AIDS vaccine. *Science* 320, 760-764.
- Wang, J., Tong, P., Lu, L., Zhou, L., Xu, L., Jiang, S. & Chen, Y. H. (2011a). HIV-1 gp41 core with exposed membrane-proximal external region inducing broad HIV-1 neutralizing antibodies. *PLoS One* 6, e18233.
- Wang, W., Mo, Z., Ye, B., Hu, P., Liu, S. & Yi, S. (2011b). A clinical trial of xenotransplantation of neonatal pig islets for diabetic patients. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences* 36, 1134-1140.
- Wang, W., Nie, J., Prochnow, C., Truong, C., Jia, Z., Wang, S., Chen, X. & Wang, Y. (2013). A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology* 10, 14.
- Watanabe, R., Miyazawa, T. & Matsuura, Y. (2005). Cell-binding properties of the envelope proteins of porcine endogenous retroviruses. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 658-665.
- West, C. M., Keng, P. C., Siemann, D. W. & Sutherland, R. M. (1987). A human colon adenocarcinoma xenograft--radiation response, cellular composition, and tumor disaggregation. *J Natl Cancer Inst* 78, 371-376.
- what-when-how.com (2013). Retroviruses Part 1 (Molecular Biology). by The-Crankshaft Publishing. <http://what-when-how.com/molecular-biology/retroviruses-part-1-molecular-biology/>. aufgerufen am: 04.03.2013
- Wijesundara, D. K., Jackson, R. J., Ramshaw, I. A. & Ranasinghe, C. (2011). Human immunodeficiency virus-1 vaccine design: where do we go now? *Immunol Cell Biol* 89, 367-374.
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D. & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 112, 531-552.
- Wilson, C. A., Wong, S., VanBrocklin, M. & Federspiel, M. J. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *Journal of virology* 74, 49-56.
- Wilson, K. A., Maerz, A. L., Bär, S., Drummer, H. E. & Pombourios, P. (2007). An N-terminal glycine-rich sequence contributes to retrovirus trimer of hairpins stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359, 1037-1043.
- Xu, J. Y., Gorny, M. K., Palker, T., Karwowska, S. & Zolla-Pazner, S. (1991). Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* 65, 4832-4838.
- Xu, Y., Lou, Z., Liu, Y., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F. & Rao, Z. (2004). Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J Biol Chem* 279, 49414-49419.
- Yang, X., Lee, J., Mahony, E. M., Kwong, P. D., Wyatt, R. & Sodroski, J. (2002). Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibrin. *Journal of virology* 76, 4634-4642.
- Yanover, C. & Hertz, T. (2005). Predicting protein-peptide binding affinity by learning peptide-peptide distance functions. In *Proceedings of the 9th Annual international conference on Research in Computational Molecular Biology*, pp. 456-471. Cambridge, MA: Springer-Verlag.
- Yin, J., Dai, A., Lecureux, J., Arango, T., Kutzler, M. A., Yan, J., Lewis, M. G., Khan, A., Sardesai, N. Y., Montefiore, D., Ruprecht, R., Weiner, D. B. & Boyer, J. D. (2011). High antibody and cellular responses induced to HIV-1 clade C envelope following DNA vaccines delivered by electroporation. *Vaccine* 29, 6763-6770.

- Yonezawa, A., Masuda, S., Katsura, T. & Inui, K. (2008). Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C632-641.
- Yu, X., Lu, L., Cai, L., Tong, P., Tan, S., Zou, P., Meng, F., Chen, Y. H. & Jiang, S. (2012). Mutations of Gln64 in the HIV-1 gp41 N-Terminal Heptad Repeat Render Viruses Resistant to Peptide HIV Fusion Inhibitors Targeting the gp41 Pocket. *J Virol* 86, 589-593.
- Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, H., Wilkins, O., Lau, S. K., Hycza, M., Jayabalasingham, B., Jin, J., McLaurin, J., Tsao, M. S. & Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic acids research* 34, e85.
- Yuste, E., Bixby, J., Lifson, J., Sato, S., Johnson, W. & Desrosiers, R. (2008). Glycosylation of gp41 of simian immunodeficiency virus shields epitopes that can be targets for neutralizing antibodies. *Journal of virology* 82, 12472-12486.
- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15812-15817.
- Zwick, M. B., Jensen, R., Church, S., Wang, M., Stiegler, G., Kunert, R., Katinger, H. & Burton, D. R. (2005). Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* 79, 1252-1261.
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. & Parren, P. W. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75, 10892-10905.