

Aus dem
Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Generierung monoklonaler Antikörper gegen SARS-CoV-2
und ZIKV durch In-Vitro-Immunisierung mittels
zellpermeabler virusähnlicher Partikel als Antigenträger**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Younes Husria
Tierarzt aus Syrien
Berlin 2022

Journal Nr: 4348

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien
Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

Zika virus

monoclonal antibodies

immunization

permeability

hybridoma

animal welfare

Tag der Promotion: 02.08.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)	1
1.1.1	Entdeckung	1
1.1.2	Struktur	4
1.1.3	Lebenszyklus von SARS-CoV-2	5
1.1.4	Klinische Manifestationen / Symptome	9
1.1.5	Therapie und Impfstoffe gegen SARS-CoV-2	10
1.2	Zika-Virus	10
1.2.1	Infektionsverlauf und Therapie	12
1.3	Antikörper	13
1.3.1	Polyklonale Antikörper	14
1.3.2	Monoklonale Antikörper	14
1.3.3	Antikörpertypen	14
1.4	DAS 3R-PRINZIP	14
1.5	Virus-ähnliche Partikel	15
1.6	HBV-Capsid	17
1.7	Translokationsmotiv (TLM)	17
1.8	TLM Trägercapsid	18
1.9	In-Vitro Immunisierung	19
2	Material	22
2.1	Zellen	22
2.1.1	Prokaryotische Zellen	22
2.1.3	Murine primäre Zellen	22
2.2	Plasmide	22
2.3	Oligonukleotide	23
2.4	Antikörper	23
2.4.1	Primärantikörper	23
2.4.2	Sekundärantikörper	24
2.4.3	Antikörper für ELISA	24
2.5	Größenmarker	24
2.6	Patienten und Negativseren	25
2.7	Enzyme	25
2.8	Proteaseinhibitoren	25
2.9	Rekombinantes murines Interleukin	26
2.10	Chemikalien	26

2.11 Verbrauchsmaterial	27
2.12 Puffer	28
2.12.1 Allgemeine Puffer	28
2.12.2 Puffer für Reinigung von Inclusion Bodies.....	29
2.12.3 Puffer für Affinitätschromatografie	29
2.13 Zellkulturmedien.....	30
2.14 Geräte.....	30
2.14.1 Chromatografie Anlagen und Säulen	30
2.14.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	30
2.14.3 PCR-Cycler.....	30
2.14.4 Elektrophorese	30
2.14.5 Zentrifugen.....	31
2.14.6 Mikroskopie	31
2.14.7 Spectrophotometer.....	31
2.14.8 Scales.....	31
2.14.9 pH-Meter	31
2.14.10 Zellaufschluss	31
2.14.11 Inkubatoren, Heizblöcke und Schüttler	32
2.15 Kits	32
2.16 Andere Geräte.....	32
2.17 Software	33
3 Methoden.....	34
3.1 Zellbiologie	34
3.1.1 Prokaryotische Zellkultur	34
3.1.2 Eukaryotische Zellkultur:.....	34
3.1.3 Kultivierung von Hybridoma und Myeloma Zellen	34
3.1.4 Transfektion von Zellen	35
3.1.5 Glycerolstocks	35
3.2 Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1 Isolierung der Plasmid-DNA.....	35
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
3.2.3 Restriktionsverdau	35
3.2.4 Agarosegelelektrophorese	36
3.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	36
3.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	36
3.2.7 Ligation von DNA.....	36

3.2.8 DNA-Sequenzierung	36
3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
3.2.10 Kolonie-PCR:.....	37
3.2.11 Klonierung von SAERS-CoV-2 und ZIKV.E Konstrukten:	37
3.3 Proteinbiochemie	38
3.3.1 Herstellung der rekombinanten Proteine	38
3.3.2 Zellaufschluss.....	38
3.3.3 Reinigung von Inclusion Bodies	38
3.3.4 Solubilisierung von Inclusion Bodies	39
3.3.5 Metallchelatierende-Affinitätschromatographie (IMAC)	39
3.3.6 Rückfaltung der denaturierten Proteine	39
3.3.7 Analyse der Rückfaltung von RBD_mSA.....	40
3.3.8 Produktion und Reinigung von TLM-Capsiden	40
3.3.9 Elektronenmikroskopie.....	40
3.3.10 Sterilfiltration.....	41
3.3.11 Konzentrierung des Proteins	41
3.3.12 Dichte-Gradienten-Zentrifugation.....	41
3.4 Nachweis von Proteinen	41
3.4.1 SDS-PAGE	41
3.4.2 Coomassie-Färbung.....	42
3.4.3 Western Blot	42
3.5 Immunologische Methoden	43
3.5.1 Immunfluoreszenzmikroskopie	43
3.5.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	43
3.5.3 Epitop-Kartierung.....	44
3.6 Immunisierung von Kaninchen gegen SARS-CoV-2.....	44
3.7 Aufreinigung von Antikörpern.....	44
3.7.1 Antigen-spezifische Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	44
3.7.2 Ammoniumsulfat-Fällung.....	45
3.8 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	45
3.9 In-Vitro Immunisierung	45
3.9.1 Präparation der Milz	45
3.9.2 In-Vitro Immunisierung:.....	46
3.10 Fusion.....	47
3.10.1 Biotinylierung von Zell-Oberflächenproteinen	47
3.10.2 Inkubation biotinylierter Myelomzellen mit Antigen und Elektrofusion	47

3.11 Selektion von Hybridoma-Zellen	47
3.12 Mediumwechsel vom HAT Medium in das HT-Medium.....	48
3.13 Klonierung der Hybridoma.....	48
3.14 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	49
3.15 Isotypenbestimmung	49
4 Ergebnisse.....	50
4.1 Produktion von SARS-CoV-2 und ZIKV.E Antigenen.....	50
4.1.1 Herstellung der Konstrukte.....	50
4.1.2 Gewinnung und Darstellung der Proteine:.....	51
4.1.3 Analyse der Rückfaltung von RBD_mSA.....	55
4.2 Produktion und Reinigung von TLMcapsiden:.....	57
4.3 In-Vitro-Assemblierung von TLM-Core Protein	57
4.4 Kopplung von RDB-mSA oder ZIKV_mSA an die Oberfläche der Trägercapside	58
4.5 Die Induktion von spezifischem Antikörper durch In-Vitro Immunisierung:.....	60
4.5.1 In-Vitro Immunisierung mit gekoppelten TLM.Trägercapsiden führt zur besseren Produktion von Antikörpern.....	60
4.5.2 ELISA zum Testen der Fusionen:	61
4.7 Subklonierung von Hybridoma Zellen	62
4.8 Antigenspezifische Affinitätsreinigung ZIKV.E-spezifischer monoklonaler Antikörper von Hybridoma	63
4.9 Anreicherung von Antikörpern gegen die RBD des Spike Proteins von SARS-CoV2 durch Ammoniumsulfat-Fällung.....	64
4.10 Humorale Immunantwort nach Immunisierung von Kaninchen mit RBD_mSA:	64
4.11 Antigenspezifische Affinitätsreinigung von Kaninchen:	67
4.12 Epitop-Kartierung:.....	67
4.13 Isotypenbestimmung	68
4.14 Immunfluoreszenzmikroskopie:	69
4.15 Western Blot mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern	74
4.16 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	75
5 Diskussion	78
5.1 Herstellung von RBD_mSA und ZIKA_mSA:	79
5.2 Herstellung von TLM Trägercapsid und Kopplung von Antigen an die Oberfläche der TLM Trägercapside	79
5.3 Die In-Vitro Immunisierung.....	80
5.4 Elektrofusion	81
5.5 Selektion und Subklonierung von Hybridoma-Zellen	81
5.6 Isotypenbestimmung und Aufreinigungen von Antikörpern.....	82

5.7 Charakterisierung der Antikörper.....	82
5.8 Schlussfolgerung und Ausblick.....	84
6 Zusammenfassung.....	85
7 Summary	87
8 Literaturverzeichnis.....	88
9 Anhang.....	107
9.1 Abkürzungsverzeichnis	107
9.2 Aminosäuresequenzen der hergestellten Proteine.....	109
10 Danksagung.....	112
11 Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte	113
11.1 Finanzierungsquellen.....	113
11.2 Interessenskonflikte.....	113
12 Selbstständigkeitserklärung.....	114

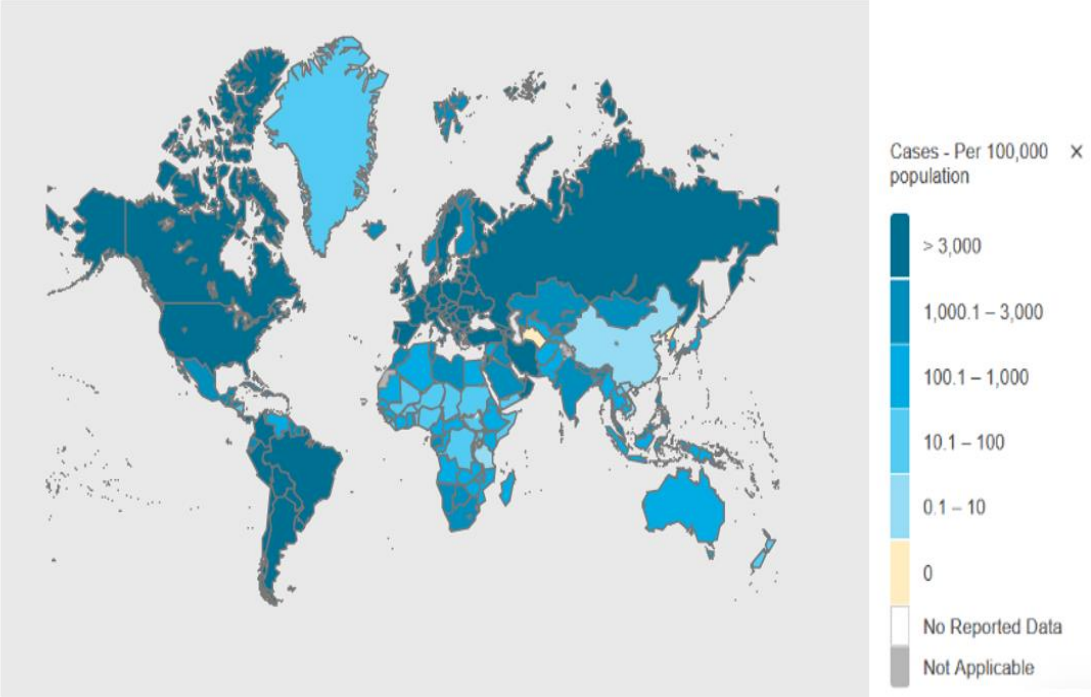
1 Einleitung

1.1 Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)

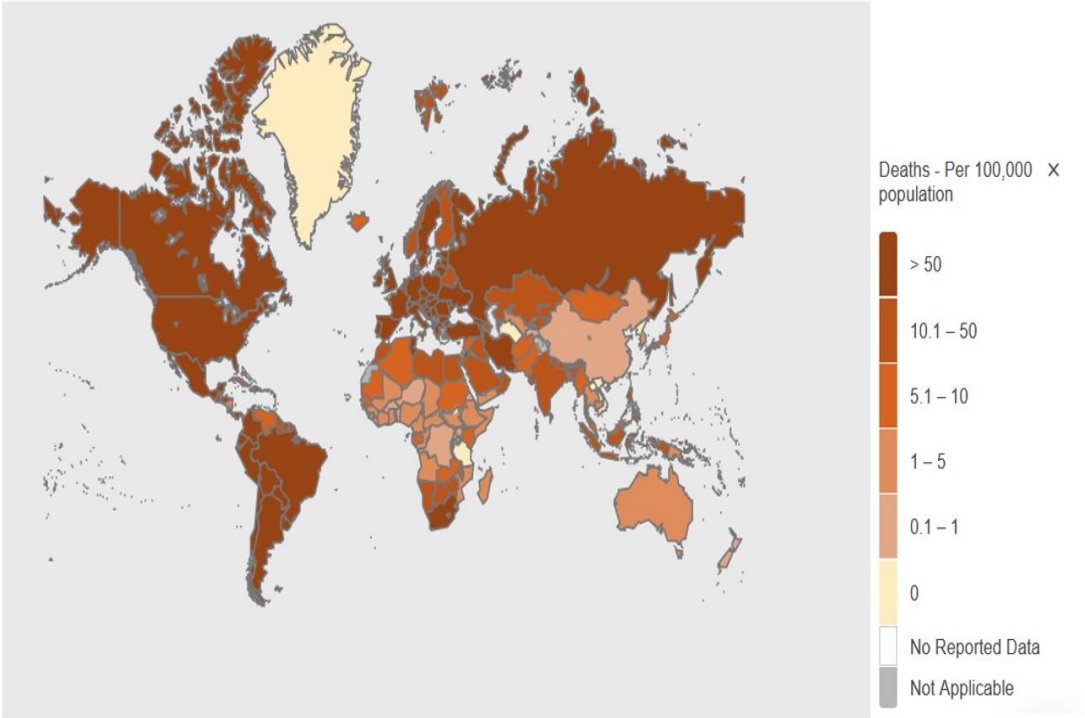
1.1.1 Entdeckung

SARS-CoV-2 wurde erstmals im Dezember 2019 in Wuhan (China) identifiziert. Kurz nach Beginn der Untersuchungen wurde festgestellt, dass ein Betacoronavirus für SARS-CoV-2 verantwortlich war [1,2]. Im März 2020 wurde der SARS-CoV-2 Ausbruch von der Weltgesundheitsorganisation zur Pandemie erklärt. Coronaviren besitzen ein positives, einzelsträngiges RNA-Genom, welche mit einer Größe von 26 bis 32 Kilobasen zu den größten bekannten Genomen der RNA-Viren zählen [8,9]. Die globale Ausbreitung führte aktuell zu über 167 Millionen verzeichneten Coronavirus disease 2019 (COVID-19) -Fällen mit insgesamt 3.482.907 Todesfällen (**Abbildung 1**) (Stand: 27.05.2021) [147,148]. Vor diesem Ausbruch waren die jüngsten Coronavirus-Ausbrüche die SARS-CoV (in China) und MERS-CoV-Ausbrüche (in Saudi-Arabien). SARS-CoV sowie MERS-CoV gehören beide zur Gruppe der Betacoronaviren [73].

A



B



C

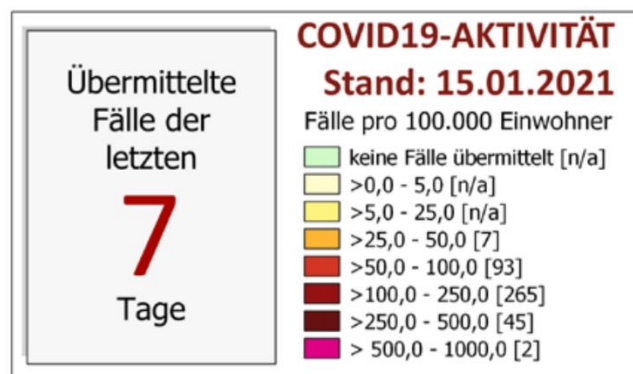
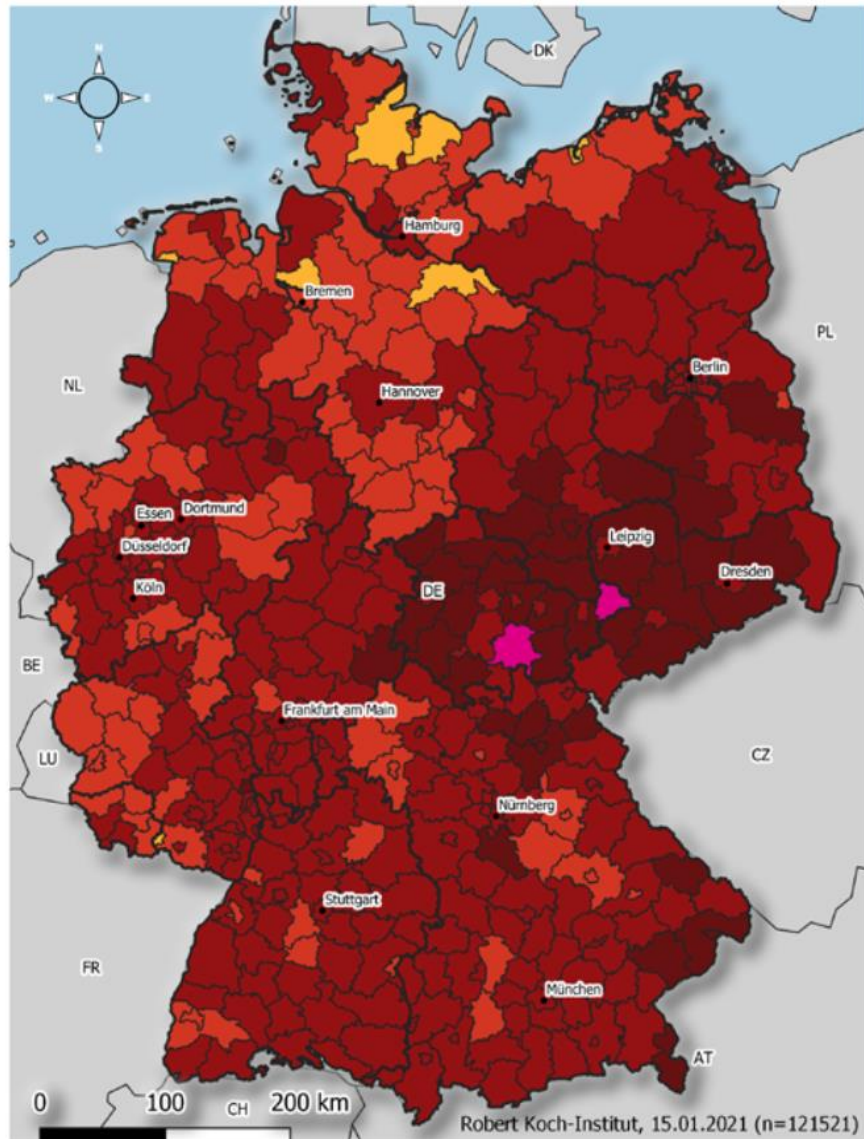


Abbildung 1: Bestätigte Fälle von COVID-19: (A) Ausbreitungsübersicht von COVID-19-bestätigten Fällen weltweit Stand: 27.05.2021. (B) Fallsterblichkeit beim Coronavirus (COVID-19) Stand: 27.05.2021 [147]. (C) An das Robert Koch-Institut übermittelte COVID-19-Fälle mit einem Meldedatum innerhalb der letzten 7 Tage in Deutschland nach Kreis und Bundesland (n = 121.521, 15.01.2021, 0:00 Uhr) [148].

1.1.2 Struktur

SARS-CoV-2 ist ein von einer Lipidmembran umhülltes Virus. Der Durchmesser von SARS-CoV-2 reicht von 80 bis 140 nm. Auf der Oberfläche sind 9 bis 12 nm lange Spikes zu erkennen [2]. Das Genom von SARS-CoV-2 besteht aus einer einzelsträngigen Positiv-Sense-RNA [49]. Der Vergleich der Sequenzanalyse des SARS-CoV-2-Genoms zeigt Ähnlichkeiten mit dem BAT-CoV [3,63]. Außerdem besitzt SARS-CoV-2 folgende Strukturproteine:

Spike-Glykoprotein (S):

Das Spike-Glykoprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese, da es über seine Rezeptorbindedomäne (RBD) an die Wirtszelle bindet [58]. Beim Suchen nach einem Impfstoff spielt das S-Protein eine große Rolle, weil es die Rezeptorbindedomäne (RBD) besitzt und somit die Bindung an die Angiotensinconvertierende Enzyme 2 (ACE2) -Rezeptoren der Zielzelle gewährt [10]. Strukturell enthält das S-Protein eine große Ektodomäne, welche in die Untereinheiten S1 und S2 aufgeteilt ist, eine C-terminale Transmembrandomäne sowie eine kleinere intrazelluläre Region. Insgesamt ist es somit ca. 180 kDa schwer. Beide Untereinheiten spielen eine Rolle beim Eintritt des Virus in die Zielzelle [6,7]. Die Spike-Glykoproteine hüllen sich mit Zuckermolekülen ein, so genannten Glykanen [135].

Hüllprotein (E):

Hüllmembran (E) Proteine sind kleine virale Proteine, die bei der Assemblierung und der Freisetzung der Virionen helfen [65].

Membranprotein (M):

M-Proteine sind 222 Aminosäuren lang und haben eine große Bedeutung für die RNA-Verpackung.

Nucleoprotein (N):

Nucleocapsid-Proteine (N) spielen eine Rolle bei der Verpackung von viraler RNA und vermitteln die virale Assemblierung [69, 57, 59]. Zusätzlich codiert ein Teil des RNA-Genoms für das Polymerase Polyprotein pp1a und pp1ab (Nichtstrukturprotein). Beide spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation der viralen RNA [47,61].

1.1.3 Lebenszyklus von SARS-CoV-2

Der Replikationszyklus von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle kann in mehrere Schlüsselschritte unterteilt werden [65]:

- (a) Zelleintritt
- (b) Transkription der viralen Replikase
- (c) genomische Transkription und Replikation
- (d) Translation von Strukturproteinen
- (e) Zusammenbau und Freisetzung von Virionen.

Das S-Protein vermittelt die Bindung von SARS-CoV-2 an ACE2 auf der Wirtszelle, was zum Viruseintritt und zur Pathogenese führt. Das S-Protein besteht aus zwei Untereinheiten (S1 und S2). Die S1-Untereinheit trägt die Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die direkt mit dem ACE2-Rezeptor interagiert, während die S2-Untereinheit die Membranfusion der Virus-Wirt-Zelle vermittelt, indem sie die für diesen Prozess erforderlichen Elemente enthält (**Abbildung 2**).

ACE2 befindet sich auf der Zelloberfläche vieler Zellen, besonders in Epithelzellen der Lunge und des Dünndarms. Nach proteolytischer Spaltung und Aktivierung des Spike-Proteins durch die zelleigene Furin Protease bindet die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) an das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) der Zielzelle [60,5].

Es gibt zwei Mechanismen für die proteolytische Aktivierung zur Membranfusion: Die Aktivierung über TMPRSS2 oder Cathepsin L [48].

Durch die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) erfolgt eine proteolytische Spaltung in der S2-Untereinheit und das führt zur Fusion der Virus- und Zellmembranen.

Alternativ kann das Virus durch Cathepsin L-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Die lysosomale Protease Cathepsin L aktiviert die SARS-Domäne durch die Spaltung an der S2' Schnittstelle und induziert somit die Membranfusion (**Abbildung 3**).

Nach der Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran wird die virale RNA in das Zytoplasma freigesetzt.

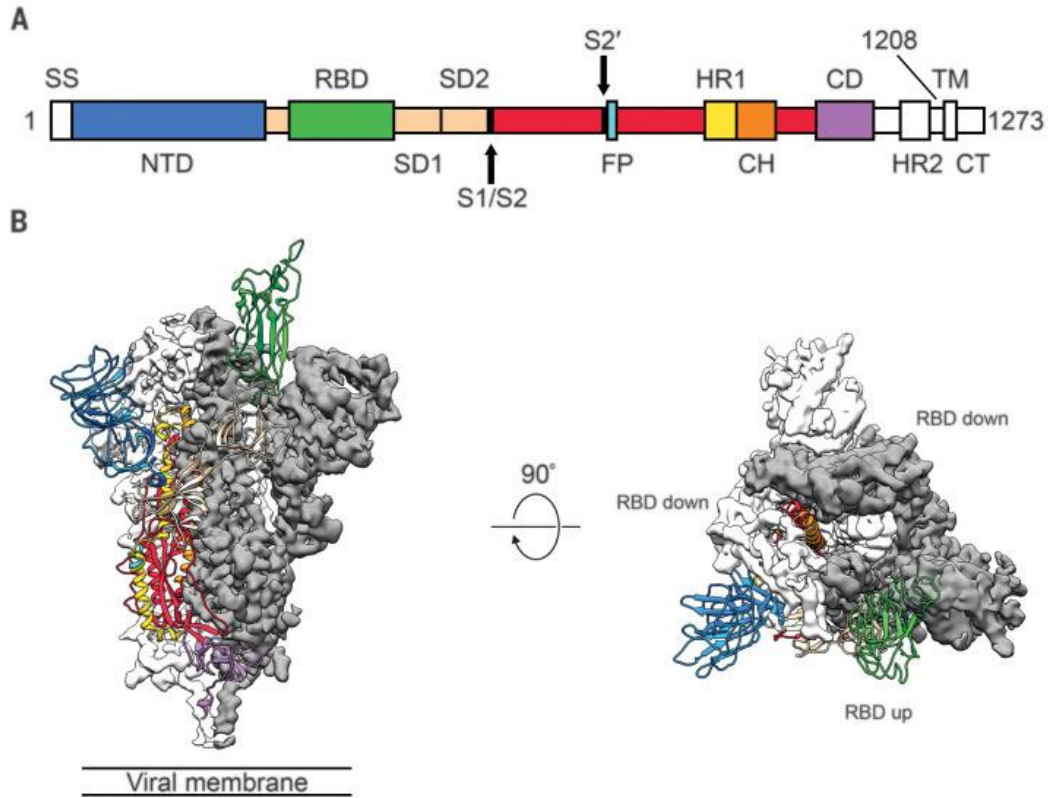


Abbildung 2: Struktur des Spike-Proteins von SARS-CoV-2: (A) Schematischer Aufbau des Spike-Glykoproteins NTD: N-terminale Domäne. RBD: Rezeptorbindedomäne. SD1/2: Subdomäne 1 und 2. FP: Fusions-Peptid. HR1/2: Heptadenmuster 1 und 2. (CD) cytosolische Domäne (CD). Die Transmembran-Domäne (TM). CT zytoplasmatischer Schwanz (B) Struktur des Spike-Proteins und der Rezeptorbindedomäne [133].

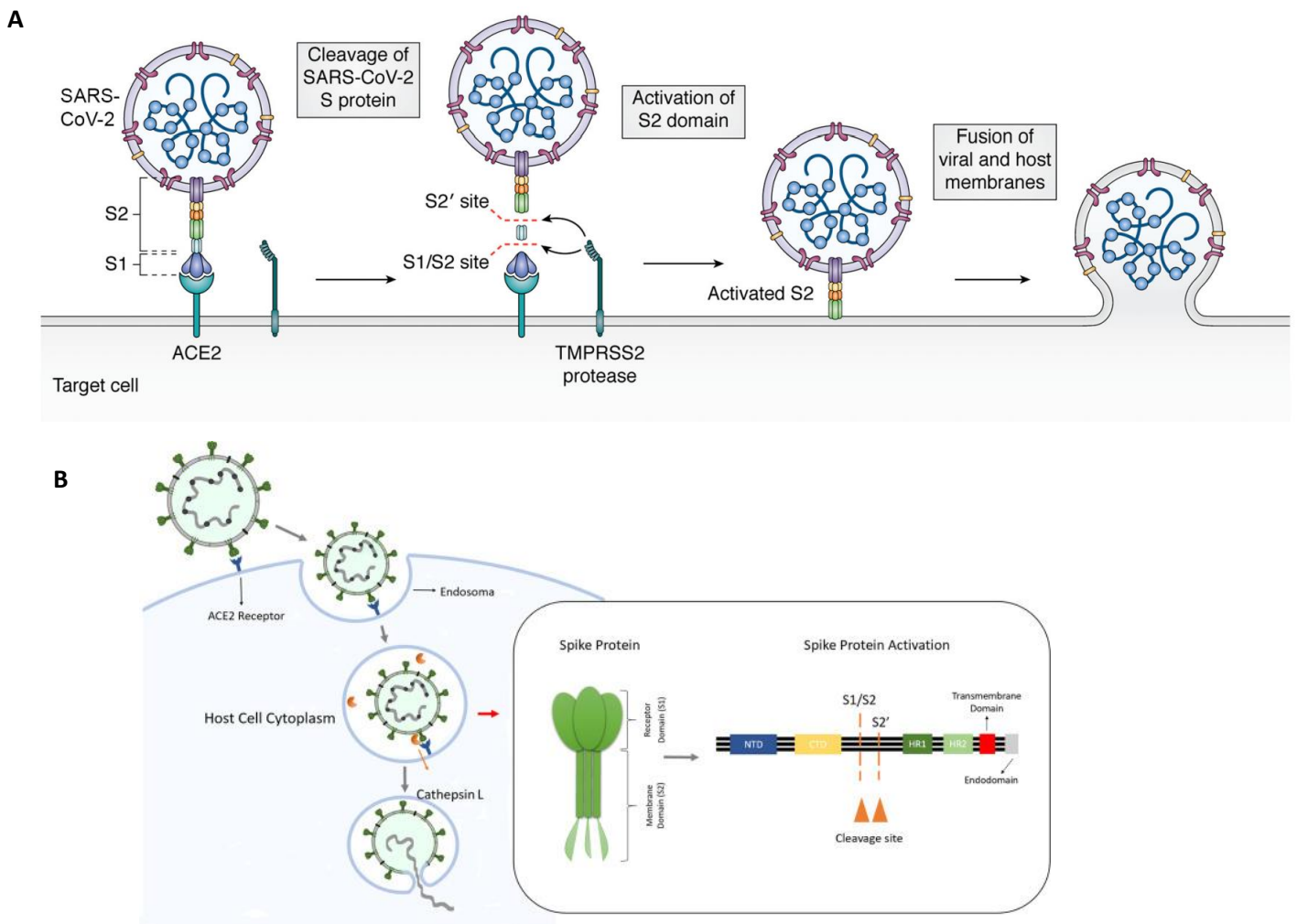


Abbildung 3: Schematische Darstellung des viralen Zelleintritts des SARS-CoV-2 in ACE2-positive Zielzellen. (A) TMPRSS2-abhängige Membranfusion. Die RBD bindet an den ACE2-Rezeptor, wodurch der Schnitt durch TMPRSS2 Proteasen eingeleitet wird. Der Schnitt führt zur Aktivierung der S2-Untereinheit für die folgende Fusion [12]. (B) Cathepsin-abhängige Membranfusion nach Clathrin-abhängiger Endozytose. Unter der Abwesenheit von TMPRSS2 bindet die RBD an ACE2. Die lysosomale Protease Cathepsin L aktiviert die SARS-Domäne durch die Spaltung an der S2' Schnittstelle und induziert somit die Membranfusion [134].

Anschließend wird die virale RNA zu relevanten Proteinen translatiert, ORF1a und ORF1b werden zu Polyprotein pp1a und pp1ab übersetzt. Die autoproteolytische Spaltung von pp1a und pp1ab erzeugt 15–16 nichtstrukturelle Proteine (nsps), die spezifische Funktionen besitzen. Die virale RNA-Synthese produziert mRNA für 7–9 Strukturproteine wie die E, N, M und S Proteine (**Abbildung 5**). Die Polymerase produziert subgenomische RNAs. Die viralen Proteine werden zusammen mit der genomischen RNA im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat zu viralen Partikeln assembliert (**Abbildung 4**). Nach Assemblierung der Virionen werden diese aus der Zelle entlassen [62].

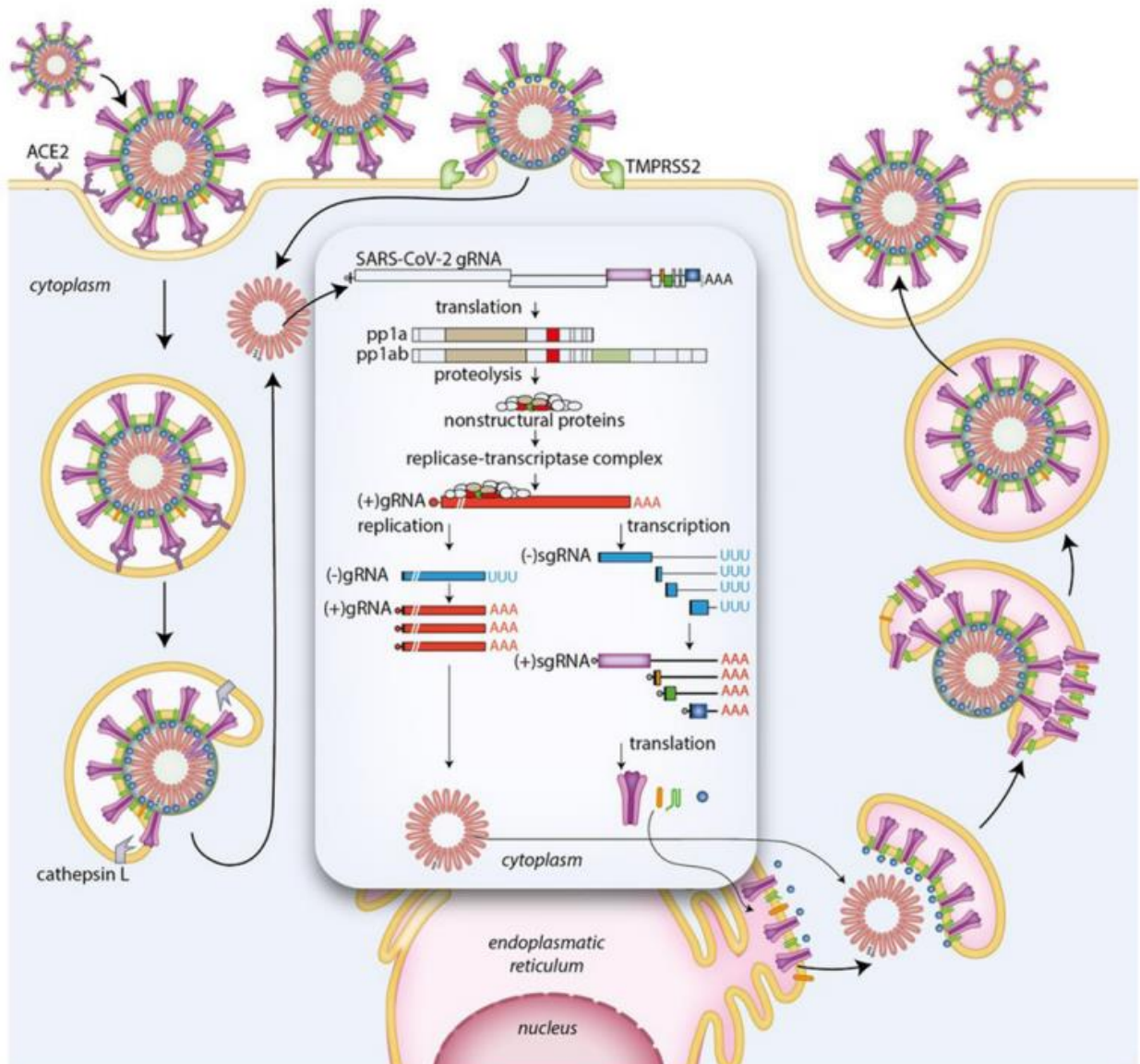


Abbildung 4: Lebenszyklus von SARS-CoV-2: S-Protein bindet an den zellulären Rezeptor ACE2 und vermittelt Endozytose oder Membranfusion. Nach Eintritt wird die virale RNA in das Zytoplasma freigesetzt. Genom-RNA wird in virale Replikase Polyproteine pp1a und 1ab übersetzt, die dann in kleine Produkte durch virale Proteinase aufgeteilt werden. Die Polymerase produziert subgenomische RNAs, die für virale Strukturproteine codieren. Virale Strukturproteine und Genom-RNA werden anschließend in den Virionen im ER und Golgi zusammengesetzt und dann über Vesikel transportiert und aus der Zelle freigesetzt [120].

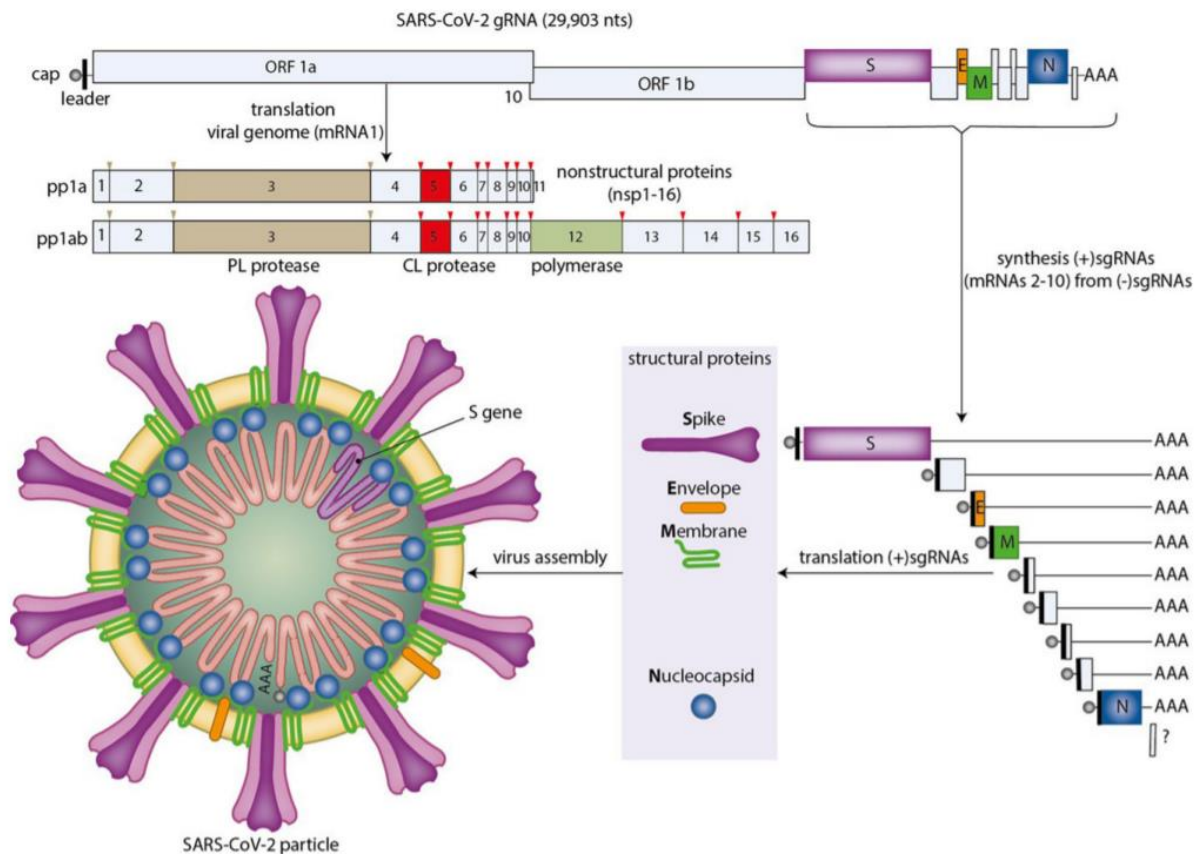


Abbildung 5: Darstellung des SARS-CoV-2 Genoms. Das Genom codiert für Nichtstrukturproteine auf ORF 1a und ORF 1b und für Strukturproteine sowie akzessorische Proteine. ORF 1a und ORF 1b kodieren die Polypeptide pp1a und pp1ab. Die autolytische Spaltung von pp1a und pp1ab erzeugt 16 nichtstrukturelle Proteine (nsps). Die Strukturproteine bestehen aus Spike (S), Envelope (E), Membran (M) und Nucleokapsid (N) Protein [120].

1.1.4 Klinische Manifestationen / Symptome

Bei infizierten Personen treten eine Vielzahl von Symptomen auf, die von Person zu Person unterschiedlich sind. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Husten, Dyspnoe und Müdigkeit [13]. Andere Symptome sind Rhinorrhoe, Kopfschmerzen und Halsschmerzen sowie Hyposmie und Hypogeusie [10]. In schwereren Fällen müssen Personen möglicherweise im Krankenhaus verbleiben und auf die Intensivstation eingewiesen werden [13,4]. Die Erkrankung dieser Patienten kann schnell fortschreiten und Komplikationen wie akutes Atemnotsyndrom (ARDS), Versagen mehrerer Organe und Sekundärinfektion verursachen, die in kurzer Zeit zum Tod führen können [13,4], wobei Infizierte mit Begleiterkrankungen wie beispielsweise Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Bluthochdruck eine schwerwiegendere Symptomatik erfahren können [13]. Im Zusammenhang mit der vermehrten Freisetzung von Zytokinen entsteht ein Zytokinsturm, welcher die Mortalität erhöht [65]. Glücklicherweise treten bei vielen Personen nur leichte Symptome auf [11,46].

1.1.5 Therapie und Impfstoffe gegen SARS-CoV-2

Arzneimittel wie der RNA-Polymerase-Hemmer Remdesivir werden derzeit gegen COVID-19 eingesetzt. Remdesivir zeigte in einer vorläufig veröffentlichten Studie eine Verkürzung der Krankheitsdauer bei hospitalisierten Patienten [150]. Ein weiterer möglicher Therapieansatz stellen monoklonale Antikörper dar. Eine derzeitige klinische Studie befasst sich mit der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, die gegen das Spike-Protein von SARS-CoV-2 gerichtet sind und somit eine Neutralisierung induzieren sollen [149]. Die Kontrolle der Pandemie gelingt nur, wenn sehr schnell umfassend geimpft wird. Im Moment befindet sich beispielsweise ein mRNA-basierter Impfstoff (Comirnaty® BNT162b2, Tozinameran) von Biontech (Deutschland) und Pfizer (USA) [151]. Bei Vektorimpfstoffen wird das Genmaterial für ein Impfantigen in ein infektiöses, gut bekanntes Trägervirus eingebaut (harmlose Viren), das dann als Impfstoff injiziert wird (Covid-19 Vaccine Astra-Zeneca, Vaxzevria) [72].

1.2 Zika-Virus

Das ZIKA-Virus (ZIKV) gehört zu der Familie der Flaviviridae und der Gattung der Flaviviren, wie auch das Gelbfieber, Denguefieber und das Westnil-Virus (**Abbildung 6**). Es wurde 1947 entdeckt und das erste Mal aus einem in Uganda gefangenen infizierten Rhesusaffen erfolgreich isoliert. Es wurde bis 1953 angenommen, dass es nicht auf den Menschen übertragbar sei [121,122]. Das Zika-Virus (ZIKV) war in den Lehrbüchern bislang höchstens im Kleingedruckten zu finden. In den Jahren 2013-14 aber rückte das Virus immer stärker in die öffentliche Wahrnehmung. In Französisch-Polynesien gab es den bis dahin größten Ausbruch mit wahrscheinlich mehr als 30.000 Infizierten, nachdem bereits im Jahre 2007 der erste Ausbruch außerhalb von Afrika auf den Yap Islands erfolgt war. Die WHO und die Gesundheitsbehörden in Südamerika waren also gewarnt (die WHO hatte ZIKV nach dem Ausbruch auf den Yap Islands als "emerging Virus" eingestuft), als im Mai 2015 die ersten Zika-Infektionen in Brasilien auftraten. Allein in Brasilien sind mehr als 3500 Neugeborene mit Mikrozephalie zur Welt gekommen, da es während der Schwangerschaft der Mutter zu einer ZIKV Infektion kam (**Abbildung 7**).

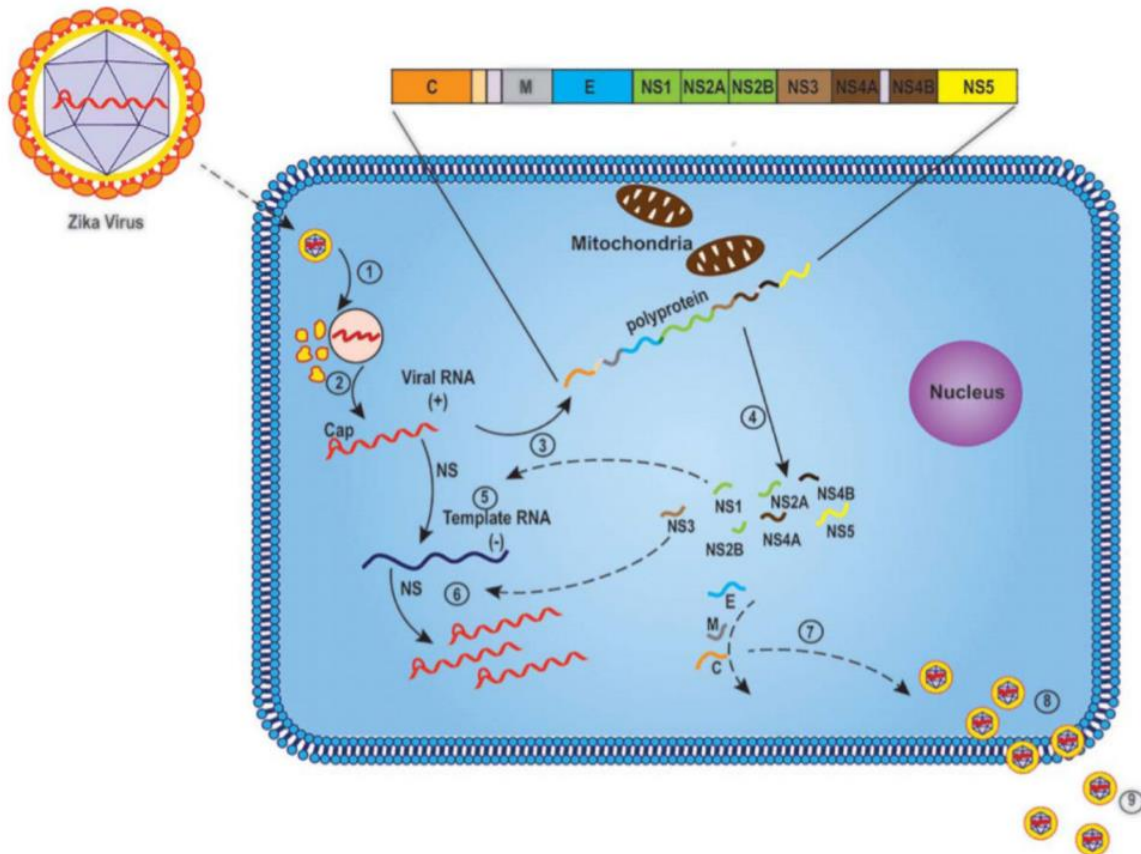


Abbildung 6: Lebenszyklus des Zika-Virus. Das Zika-Virus hat ein einsträngiges positives RNA-Genom, das ca. 11kb lang ist. Nach der Bindung des viralen E-Proteins an ein zelluläres Oberflächenprotein erfolgt das Eintreten des Virions per Endozytose in ein Endosom, wodurch das Capsid ins Zytosol freigesetzt wird. Dort erfolgt die Entpackung des Capsids und des RNA-Genoms. Die RNA wird in ein einzelnes Polyprotein übersetzt. Danach wird es geteilt. Diese Spaltung ergibt insgesamt 10 Proteine: 3 strukturelle Proteine (C, prM, E) und 7 nichtstrukturelle Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5). Die strukturellen Proteine sind am N-Terminus des Polyproteins und die nichtstrukturellen Proteine finden sich am C-Terminus. Der Zusammenbau eines neugebildeten Virions findet im endoplasmatischen Retikulum statt. Nach einem Transfer in den Golgi-Apparat erfolgt die Reifung des Virions und es verlässt die Wirtszelle durch Exozytose [125].

Nachdem bereits im Jahre 2007 der erste Ausbruch außerhalb von Afrika auf den Yap Islands erfolgt war, verursachte ZIKV 2013–2014 eine schwere Epidemie in Französisch-Polynesien im Südpazifik. Dabei wurden rund 28.000 Menschen mit dem Virus infiziert [123]. Von dort breitete sich das Virus nach Südamerika aus. Im Zeitraum von Januar 2015 bis März 2017 wurden allein in Nord- und Südamerika 754.460 ZIKV-Fälle gemeldet, von denen 346.475 in Brasilien auftraten. Aus diesem Anlass bezeichnete die World Health Organization (WHO) die Situation als öffentlichen Gesundheitsnotfall (Public Health Emergency of International Concern PHEIC) [55].



Abbildung 7: Mikrozephalie. Bei Mikrozephalie ist der Schädelumfang des Babys deutlich verkleinert [146].

1.2.1 Infektionsverlauf und Therapie

Die meisten Zikavirus-Infektionen verlaufen ohne Symptome, etwa 70 bis 80 Prozent sind asymptomatisch. Mögliche Symptome sind mildes Fieber, Hautausschläge, Konjunktivitis, Schwäche sowie Kopf- und Gelenkschmerzen [139,140]. Ende 2015 wurde erstmals eine Verbindung zwischen den 20-fach vermehrt auftretenden Fällen angeborener Mikrozephalie und der ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft in Brasilien vermutet. Es ist inzwischen nachgewiesen, dass die Infektion von Schwangeren mit dem Zika-Virus zu Mikrozephalie der Babys führen kann [124,141,142,143]. Weiterhin kann eine ZIKV Infektion zu dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) führen [131]. Das GBS ist eine Autoimmunerkrankung, bei der das körpereigene Immunsystem das periphere Nervensystem angreift und so Nervenschäden, Muskelschwäche und Lähmungen verursacht [144,145]. Bislang gibt es gegen das Zika-Virus weder einen zugelassenen Impfstoff, noch eine spezifische Therapie. Bei schweren Verläufen sollten die Symptome (Fieber, juckender Hautausschlag, Bindehautentzündung etc.) mit entsprechend wirkenden Medikamenten behandelt werden.

1.3 Antikörper

1890 berichteten von Behring und Kitasato über die Existenz eines Wirkstoffs im Blut, der das Diphtherietoxin neutralisieren könnte. Im folgenden Jahr wurde dieser Wirkstoff als Antikörper bezeichnet. Antikörper sind die sekretierte Form des B-Zell-Rezeptors [75]. IgG bildet eine "Y"-förmige Struktur, die aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen Leichtketten besteht. Jede Kette hat zwei unterschiedliche Bereiche: Variable (V) und konstante (C) Regionen (**Abbildung 8**). Die leichte Kette besteht aus zwei Bereichen VL und CL, während die schwere Kette aus (VH, CH1, CH2 und CH3) Bereichen besteht. IgG wird in mehrere Unterklassen eingeteilt: (IgG1– 4) in Menschen und IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 in Mäusen. Die Antigenerkennung von IgG erfolgt durch seine Fab-Regionen, insbesondere durch die VL- und VH-Domänen. Die FC Region beinhaltet die CH2- und CH3-Domänen. Die FC Region interagiert mit der Komponente C1q und Fcγ -Rezeptoren (FcγRs) der Immunzellen [67,68,69]. Die leichten Ketten bestehen entweder aus Kappa κ oder einer Lambda λ-Kette. Eine typische L-Kette hat ungefähr 25 kDa und eine H-Kette mit drei C-Domänen besitzt ungefähr 55 kDa [70,71].

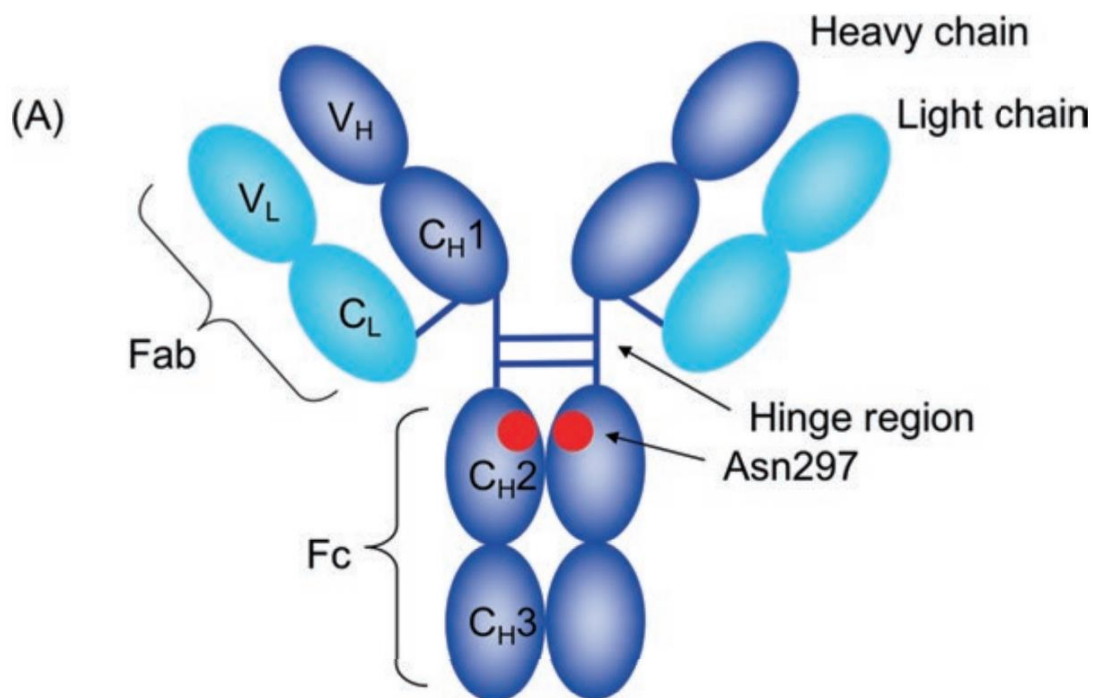


Abbildung 8: Schematische Darstellung von IgG. IgG bildet eine "Y"-förmige Struktur und besteht aus zwei schweren Ketten (blau) und zwei leichten Ketten (Cyan). N-Glykosylierungsstellen werden durch einen roten Kreis angezeigt [76].

1.3.1 Polyklonale Antikörper

Für die Herstellung von Antikörpern wird das Antigen (z. B. ein Protein) in ein Tier (zumeist Maus oder Kaninchen) injiziert. Wirkt die Substanz als Immunogen, regt sie die reifen B-Zellen des Immunsystems an, jeweils einen Zellklon zu produzieren, der Immunglobuline in das Blut sezerniert. Die Antikörpermischung, die von den verschiedenen Zellklonen produziert wird, bezeichnet man als polyklonales Antiserum, da sie von verschiedenen B-Zellklonen stammt [56]. Polyklonale Antiseren enthalten erfahrungsgemäß eine Vielzahl von spezifischen und unspezifischen Antikörpern, die, unabhängig von der Immunisierung mit dem spezifischen Antigen, schon bereits im Serum des Tieres vorhanden waren.

1.3.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden jeweils nur von ein und demselben B-Zell-Klon gebildet. Ein monoklonaler Antikörper erkennt nur ein einziges Epitop auf dem Antigen. Monoklonale Antikörper (mAbs) werden durch Hybridomtechnologie aus Hybridomzellen hergestellt [66]. Seit der Entdeckung von mAbs wurden diese Moleküle als Forschungsinstrument verwendet und haben auch die Bereiche Biotechnologie, Immunologie, Diagnostik und Medizin revolutioniert. Die Technologie wurde erstmals von Köhler und Milstein (1975) entwickelt [64].

1.3.3 Antikörpertypen

Es gibt fünf Klassen von Antikörpern (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE), die nach den C-Terminus-Regionen der schweren Ketten unterschieden werden. Diese Regionen (mit FC bezeichnet) sind wichtig für die Funktionen von Antikörpern. Antikörper haben viele Funktionen, zum Beispiel binden die neutralisierenden Antikörper meist an Proteine in der Oberfläche einer Zelle des Pathogens (bei Bakterien und Pilzen) bzw. auf der Virusoberfläche bei Viren und verhindern die Bindung des Pathogens an die Wirtszelle. Nach der Opsonisierung durch Antikörper können die Fremdzellen durch phagozytierende Zellen wie z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten aufgenommen und eliminiert werden. Antikörper können auch das Komplement aktivieren, was zur Lyse der Fremdzelle führt [75].

1.4 DAS 3R-PRINZIP

1959 haben die britischen Wissenschaftler William Russel und Rex Burch das Prinzip 3R als ein Grundsatz der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit in dem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ veröffentlicht [79]. Die darin beschriebenen Handlungsgrundsätze sollen die Zahl der Tierversuche begrenzen und das Leid der

verwendeten Tiere auf ein unerlässliches Maß verringern (**Abbildung 9**). Die konsequente Umsetzung des 3R-Prinzips in allen Bereichen tierexperimenteller Forschung ist die Voraussetzung, dass Tierversuche von den zuständigen Behörden genehmigt werden [77,78].



Abbildung 9: 3R Prinzip. Ziel des 3R Prinzips ist, Tierversuche vollständig zu vermeiden und die Zahl der Tiere und ihr Leiden in Versuchen auf das unerlässliche Maß zu beschränken [78].

1. Replacement (Vermeidung):

Tierversuche werden soweit möglich durch Alternativmethoden ersetzt, z.B. durch Organismen wie Bakterien, wirbellose Tiere oder Zellen.

2. Reduction (Verringerung):

Reduzierung der Anzahl der Versuchstiere.

3. Refinement (Verbesserung):

Die Tiere müssen artgerecht gehalten werden, also mit genügend Platz und in einer Umgebung, die ihr Wohlbefinden fördert. Durch die ständige Verbesserung der Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise Betäubung, Narkosen und spezielles Tiertraining, werden Stress und Leiden so weit wie möglich reduziert.

1.5 Virus-ähnliche Partikel

Virus-ähnliche Partikel (VLPs) bestehen aus Oberflächenproteinen oder Capsid-Proteinen von Viren. VLPs sind dem lebenden Virus ähnlich, sind aber nicht replikationskompetent [80,81].

Die hohe Dichte der Epitope auf ihrer Oberfläche kann von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) erkannt werden, wodurch die humorale und zelluläre Immunität auf ähnlichen Wegen wie bei den ursprünglichen Krankheitserregern wirksam stimuliert wird [82]. Gleichzeitig haben VLPs keine viralen genetischen Materialien, was bedeutet, dass kein Risiko einer viralen Replikation besteht. Daher gelten VLPs als sichere Impfstoffkandidaten (**Abbildung 10**). In den 1960er Jahren wurden einige leere Viruspartikel (Schären) identifiziert [83]. Dieser Befund wurde als erste natürliche VLPs angesehen. Anschließend wurde nachgewiesen, dass die VLPs des HBV die Immunantwort gegen HBV induzieren können.

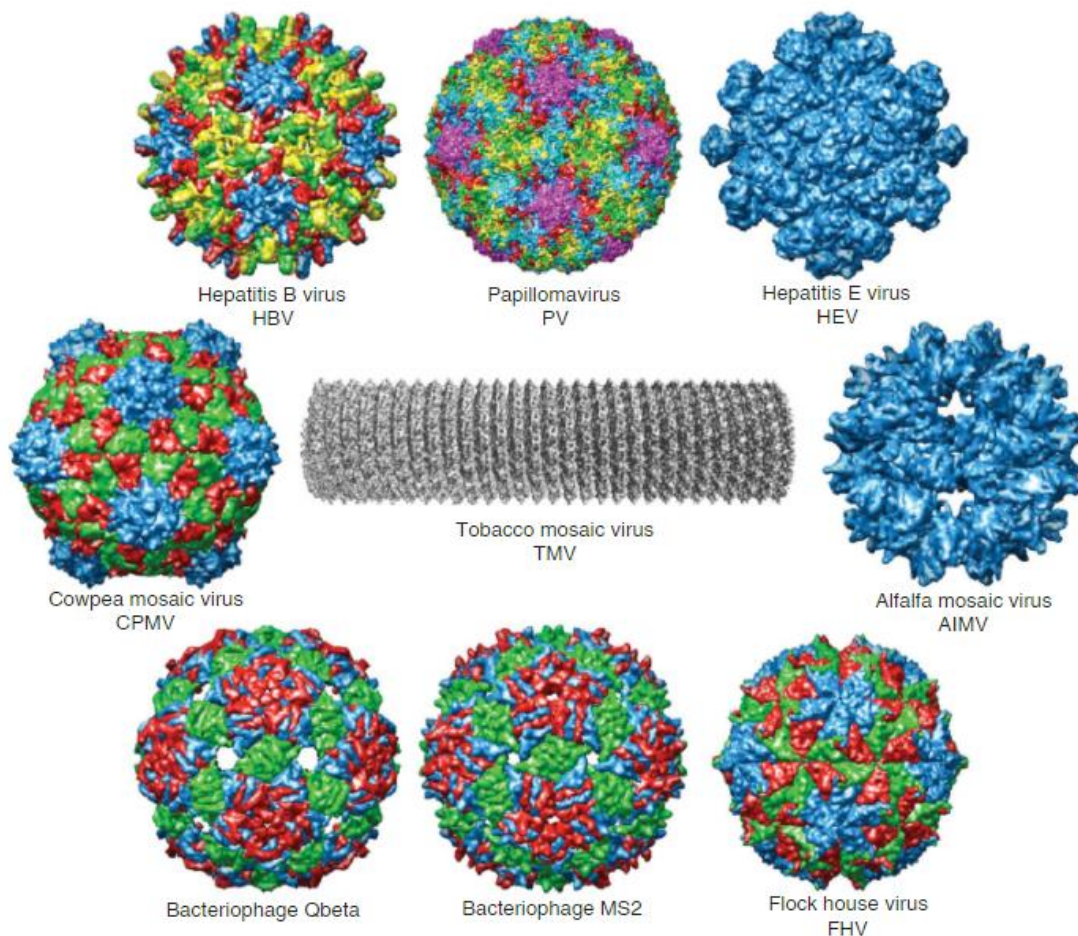


Abbildung 10: Beispiele für verschiedene Virus Capside, die als VLP-Impfstoffe und Plattformen für Antigen entwickelt wurden [84].

VLPs wurden auch auf ihre Fähigkeit untersucht, Krebsmedikamente wie Bleomycin (BLM) in die Zielzellen abzugeben. Die Verwendung von VLPs zur Abgabe von BLM für Hela Zellen zeigte, dass die wirksame Zytotoxizität mit einer 100-mal niedrigeren BLM-Konzentration im Vergleich zu freiem Bleomycin erreicht wurde [85].

1.6 HBV-Capsid

Das Hepatitis B-Virus-Capsid besteht aus dem Kernprotein (C), das je nach Genotyp 183 oder 185 Aminosäurereste (aa) enthält. Der N-terminale Teil bedeckt die ersten 149 oder 151 aa (je nach Genotyp). Es wurde gezeigt, dass der erste Teil für die Assemblierung der Kernpartikel erforderlich ist, während der zweite Teil (34-aa C-terminal) für die Verpackung von DNA wesentlich ist [86]. Nach außen zeigen die Partikel hervorstehende Spikes, die auf der Ausbildung von Coreprotein Dimeren basieren. Spike-tips sind hauptimmunogene Regionen der core-Proteine. Dieser Bereich liegt zwischen den Aminosäuren 78-82 [138].

Es wurde nachgewiesen, dass das HBV-Capsid die Insertion des gesamten grün fluoreszierenden 238-aa-Proteins (GFP) in Spike-tips, ohne die Fähigkeit der Partikelbildung zu beeinträchtigen, tolerieren kann [88]. Durch die geordnete Struktur der Antigene auf der Partikeloberfläche erfolgt eine effiziente Induktion der B-Zellantwort [89].

1.7 Translokationsmotiv (TLM)

Das Translokationsmotiv (TLM) ist eine amphipathische alpha-Helix zwischen den Aminosäuren 41 und 52 (PLSSIFSRIGDP) der PreS2-Domäne von HBV (**Abbildung 11**). Das TLM wird von HBV zu Nutze gemacht, um nach der Endozytose das Endosom zu verlassen und ins Zytoplasma zu gelangen [136]. Das PreS2-TLM hat nur 12 Aminosäuren und eine große Translokationseffizienz (Transfer von Molekülen in Zellen) ohne die Zellintegrität zu zerstören. Neben der Zellpenetration von rekombinanten TLM-Fusionsproteinen wurde nachgewiesen, dass man mithilfe von TLM auch VLP zur Membranpermeabilität befähigen kann [137,91]. Aufgrund der Zellpermeabilität können diese VLPs in Antigen-präsentierende Zellen gelangen, deren Antigen-Präsentation eine effektive T-Zellantwort einleitet. Werden Antigene in hoher Dichte auf den kapsidförmigen VLPs präsentiert, können B-Zellrezeptoren auf den B-Zellen vernetzen und eine starke humorale Immunantwort induzieren [92,93].

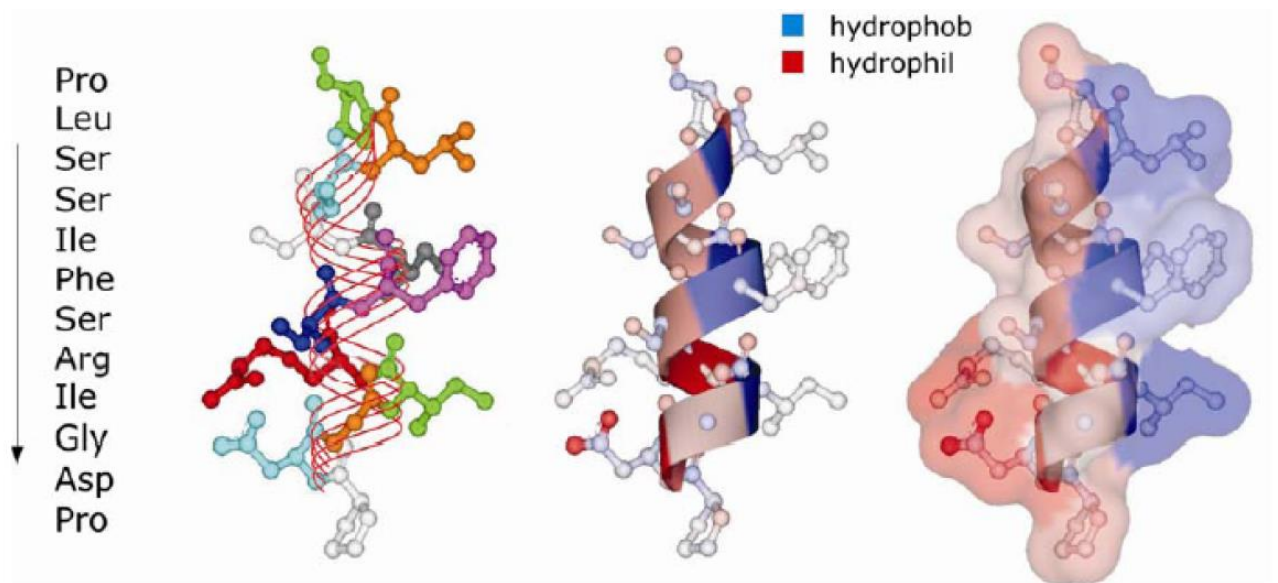


Abbildung 11: Struktur des TLM-Peptids. Das TLM besteht aus 12 Aminosäuren. Die Abbildung zeigt die α -helikale Sekundärstruktur. Hydrophobe Regionen sind blau gefärbt und die hydrophilen Bereiche sind rot markiert [91,94].

1.8 TLM Trägercapsid

VLPs (Virus like particles) werden oft als Antigenträger verwendet [100,101,102]. Ein Vorteil besteht darin, dass auf Grund der repetitiven Anordnung des Antigens an der Oberfläche und der hochgeordneten Struktur eine effiziente B-Zellantwort induziert werden kann. Ein besonders gut in dieser Hinsicht charakterisiertes VLP ist das Capsid vom Hepatitis B Virus (HBV). Das Capsid baut sich aus 120 Dimeren des Core-Proteins auf (T=4 Symmetrie) oder in geringerem Maße aus 90 Dimeren (T=3 Symmetrie) [87]. Die prominente Struktur ist der sog. Spike tip, eine von der Oberfläche des Capsids herausragende Region [103]. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Bereich des Capsids fremde Sequenzen inseriert werden können, ohne die partikuläre Struktur des Capsids zu beeinflussen [104], so dass sich dieser Bereich dazu eignet, Antigene auf der Oberfläche des Partikels zu präsentieren. TLM Translokationsmotiv ist ein Peptid, das aus der PreS2-Region des HBV stammt. TLM-vermittelte Transport durch die Zellmembran von lebenden Zellen, ohne die Membran zerstören. In späteren Untersuchungen konnte zunächst nachgewiesen werden, dass im Bereich des N-Terminus des Core Proteins über einem flexiblen Linker ein Membranpermeabilität vermittelndes Peptid (TLM-Peptid) fusioniert werden kann, so dass Capside entstehen, die 240 Kopien (bzw. 180) des TLM-Peptids exponieren und somit zellpermeabel sind [90,91,92]. Dies konnte zum Transfer von Expressionsvektoren, die in das Innere des Capsids verpackt wurden, verwendet werden [91]. Darauf aufbauend entwickelte die Arbeitsgruppe zellpermeable Carrier-Capside, die einerseits das Zellpermeabilität vermittelnde TLM-Peptid beinhalten und im Bereich des Spike tips einen insertierten Strep-tag

aufweisen. Dies ermöglicht die flexible Beladung mit Antigenen, die an Streptavidin fusioniert sind, so dass zellpermeable VLPs entstehen, die an ihrer Oberfläche mit Antigen beladen sind. Am Beispiel des Modellantigens Ovalbumin konnte das proof of principle erbracht werden, die Beladung charakterisiert, die Zellpermeabilität nachgewiesen und die Induktion einer robusten Ova-spezifischen CTL-Antwort nachgewiesen werden [92,93]. Durch die Verwendung dieser Plattformtechnologie, die einen effizienteren Antigentransfer und eine robustere Immunantwort induziert, soll die geringere Effizienz der in vitro Immunisierung kompensiert werden.

1.9 In-Vitro Immunisierung

Monoklonale Antikörper (MAbs) sind nützlich für die Diagnose und Behandlung verschiedener Krankheiten. Murine MAbs wurden für medizinische Zwecke angewendet wie z. B. die in-vitro-Diagnostik. Unglücklicherweise haben die murinen MAbs einige Nachteile, zum Beispiel die Entwicklung menschlicher Anti-murin-Antikörper (bei der Injektion muriner Antikörper in menschliche Körper) [14]. Außerdem können sie mehrere Arten von Nebenwirkungen auslösen aufgrund der Fremdheit des Mausproteins wie allergische Reaktionen, Leberfunktionsstörungen und Immunkomplex-Bildung in der Niere [21,22]. Die Entwicklung menschlicher MAbs ist eine mögliche Lösung zur Vermeidung dieser Reaktionen [23]. Grundsätzlich haben die menschlichen MAbs keine Antigenität im menschlichen Körper und können direkt in den Körper injiziert werden ohne schädliche Auswirkungen hervorzurufen. Im Gegensatz zur konventionellen Immunisierung zur Erzeugung muriner MAbs begrenzt die Human-In-Vivo-Immunisierung deutlich die Anzahl der Immunogene, die aus ethischen und moralischen Gründen nicht verwendet werden können. Eines der Hauptziele der menschlichen MAb-Technologie ist die Produktion von Antikörpern gegen Tumorantigene. Leider ist die Generierung von MAbs gegen Tumorantigene durch die In-Vivo Immunisierung wegen genannter Schwierigkeiten sehr begrenzt. Eine Lösung für dieses Problem war die Etablierung einer effizienten In-Vitro Immunisierung. Bei der In-Vitro Immunisierung werden primäre B-Zellen in-vitro aktiviert [15,16,17,18,19,20]. Es wurde berichtet, dass die In-Vitro Immunisierung in der Lage ist, MAbs gegen schwache Immunogene und Tumorantigene zu produzieren [24,25].

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper, die durch In-Vitro Immunisierung hergestellt werden.

Antigen	Quelle von Lymphozyten	Literatur
Rhesusfaktor-D	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL) Rh-donor	[37]
Influenza virus	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[38]
Tetanus toxoid	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[39]
Schaferythrozyten (SRBC)	Tonsillen	[40]
Bombesin	Milz	[41]
Prostata-spezifische saure Phosphatase (PAPase)	Milz	[42]
KLH-ARS group B streptococcus or GBS	Milz oder Tonsillen	[26]
Cytomegalo virus	Milz	[43]
Herpes simplex virus	Tonsil	[44]
Schaferythrozyten (SRBC)	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[27]
Lymphoblastoid cell line Normal spleen cell PBL	Milz	[28]
Varizella-Zoster-Virus	Milz	[29]
Purified TAA (Tumor-associated antigens TAA) from urine of sarcoma Pt	Milz	[30]
Trinitrophenyl (TNP)	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[31]
PB1 (glycoprotein of HIV) Digoxin Keyhole limpet hemocyanin (KLH) P97 (melanoma- associated antigen)	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[32 33 34 35]
Humane Lymphozyten	Milz	[36]
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)	Milz	[9]

Choleratoxin (B subunit)	Die Lymphozyten aus peripherem Blut (PBL)	[20]
Interleukin-10	Milz	[45]

Bei der In-Vitro Variante erfolgt die Immunisierung nicht im Tier, sondern in Kultur. Die isolierten B-Lymphozyten werden durch die Zugabe von Antigen stimuliert, um eine Immunreaktion zu induzieren. Mit diesem Verfahren konnten spezifische Antikörperproduzierende Zellen in dem kurzen Zeitraum von 4 bis 7 Tagen erhalten werden.

Die Vorteile der In-Vitro Immunisierung:

- 1) In-Vitro Immunisierung dauert in der Regel weniger als eine Woche.
- 2) Antikörperproduktion gegen schwache oder gefährliche Immunogene wie Tumorzellen.
- (3) In der Regel ist nur eine geringe Menge von Antigen erforderlich.
- (4) Kulturbedingungen können manipuliert werden, um spezifische Isotype zu erhalten.

Die Nachteile der In-Vitro Immunisierung:

Allerdings ist die Anzahl der positiven Klone nach In-Vitro-Immunisierung noch begrenzt [97]. Die geringe Effizienz der In-Vitro-Immunisierung bei der B-Zell-Aktivierung begrenzt die Anzahl der positiven Zellen und führt zu unzureichender Reifung von Antikörperproduzierenden Zellen. Diese Schwierigkeit resultiert aus Mangel an wirksamer Immunstimulation. Eine effektive Stimulation der B-Zellantwort und die Erhöhung der Anzahl positiver Klone besitzen eine entscheidende Bedeutung, um die gewünschten Antikörper zu erhalten. Daher es ist notwendig, die In-Vitro Immunisierungs-Technologie zu verbessern, um die geringere Effizienz der IVI zu kompensieren.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Prokaryotische Zellen

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5- α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe
Rosetta™(DE3) pLysS	F- ompT hsdSB (RB- mB-) gal dcm λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)	Universität Hamburg

2.1.2 Eukaryotische Zellen

Zellen	Beschreibung	Quelle
Huh7.5 Zellen	Humane Hepatom-Zelllinie abgeleitet von der Huh7-Zelllinie	Blight et al. 2002
HEK 293 T	Humane Nierenendothel-Zelllinie [5]	Arbeitskreis Hildt
Sp2/0-Ag14 Myelomzellen	Murine Hematopoiesis Myeloma Zelllinie Balb/c	CLS Cell Lines Service GmbH
Vero	Nierenzellen Grüner Meerkatzen	Yasumura, Y. & Kawakita, Y. (1962)

2.1.3 Murine primäre Zellen

Splenozyten wurden aus der Milz von BALB/C Mäusen entnommen.

2.2 Plasmide

Nama	Quelle
pET-21a (+)	Novagen Pharma, Irene, ZA
pET24d (+)	Novagen, Darmstadt
pET21a (+) _ZIKAV.E truncated_ StreptagIII	Sami Akhras, PEI, Langen
pET24(+)_6xHis_mSA_ZIKAV.E truncated	Younes Husria, PEI, Langen
pET24d (+) _2xTLM/HA/Core/StreptagIII	Sami Akhras, PEI, Langen
pET21a (+)-SARS_CoV_2_Ecto-mSA-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen
pET21a (+)-SARS_CoV_2_S1-mSA-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen

pET21a (+)-SARS_CoV_2_RBD-mSA-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen
pET21a (+)-SARS_CoV_2_Ecto-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen
pET21a (+)-SARS_CoV_2_S1-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen
pET21a (+)-SARS_CoV_2_RBD-6xHis	Younes Husria, PEI, Langen
pcDNA3.1(-)-SARS_CoV_2_Ecto	AK Hildt

2.3 Oligonukleotide

#	Name	Sequenz (5'→3')
1649	NheI-SARS-CoV-2_Ecto-FWD	aaagctagccagtgcggaattgactacaagg
1651	NotI-SARS-CoV-2_Ecto-REV	aaagcggccgcgggccacttgatgtactgctc
1652	NheI-SARS-CoV-2_S1-FWD	aaagctagccagtgcggaattgactacaagg
1653	NotI-SARS-CoV-2_S1-REV	aaagcggccgcaccaatcggaatgtcacactcatag
1654	NheI-SARS-CoV-2_RBD-FWD	aaagctagcgtccaaccaacggaatccattg
1655	NotI-SARS-CoV-2_RBD-REV	aaagcggccgcgaaattcacacattgttcttcaccag
1647	NotI-mSA-FWD	aaagcggccgcaagccaggatctggctagcg
1503	XhoI-mSA-REV	aaactcgagagacgccgcagacgggttaac
1504	BamHI -IEGR_Envelope -FWD	aaaggatccattgaagatggccgcatcaggtgcataggagtcagcaat
	BsrGI -Envelope - REV	aaatgtaca agcagagacggctgtggataagaa

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Hepatitis-B-Virus Core MAB16990	Maus	1:1000	Millipore TEMECULACALIFORNIA
α-SARS-CoV-2 Spike polykonal (40150-T62-COV-2 HD14MA2707	Kaninchen	1:1000	Sino Biological Inc.
Anti ZIKV.E polykonal	Kaninchen	1:1000	Sami Akhras, PEI, Langen

2.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-MausIRDye® 800CW	926-32212	Esel	1:10000 in Roti Block (WB)	LI-COR, Bad Homburg
Anti-MausIRDye® 680LT	926-68022	Esel	1:10000 in Roti Block (WB)	LI-COR, Bad Homburg
Goat anti-Mouse IgM (Heavy chain) Alexa Fluor 488	565626	Ziege	1:1000 in 3% BSA in TBST (IF)	Invitrogen
Anti Kaninchen IRDye® 680LT	926-68023	Esel	1:10000 in Roti Block (WB)	LI-COR, Bad Homburg
Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	A21206	Esel	1:1000 in 3% BSA in TBST (IF)	Invitrogen, Darmstadt
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	A21206	Esel	1:1000 in 3% BSA in TBST (IF)	Invitrogen, Darmstadt

2.4.3 Antikörper für ELISA

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus HRP	NXA931	Schaf	1:1000 in 10% FCS in PBS	GE Healthcare, UK
Anti-Kaninchen-HRP	NA9340v	Esel	1:1000 in 10% FCS in PBS	GE Healthcare, UK
Anti-Mensch IgG-HRP		Ziege	1:1000 in 10% FCS in BPS	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE

2.5 Größenmarker

Marker	Name	Hersteller
Proteinmarker	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe
Proteinmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe
Nukleinsäuremarker	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Nukleinsäuremarker	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.6 Patienten und Negativseren

Serum	Extraktionsdatum des Serums
1	26.03.2020
31	30.04.2020
29	30.04.2020
65	11.05.2020
3	30.04.2020
Negatives Serum	11.01.2017

2.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
Benzonase (100.000 U/vial)	Merck, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon bioscience
Restriktionsendonukleasen (HindIII, NotI, NcoI, BamHI, EcoRI, NotI, XhoI)	NEB, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe
Accutase	Merck Millipore, Schwalbach

2.8 Proteaseinhibitoren

Enzym	Endkonzentration	Hersteller
Aprotinin (Serinproteaseinhibitor)	10 µg/ml	Applichem
Leupeptin (Serin-und Cysteinproteaseinhibitor)	25 µg/ml	Applichem
Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor)	20 µg/ml	Applichem
PMSF (Serinproteaseinhibitor)	1 mM	Applichem

2.9 Rekombinantes murines Interleukin

Interleukin	Hersteller
Recombinant Murine IL-2	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ
Recombinant Murine IL-4	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ
Recombinant Murine IL-21	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ
Recombinant Murine IL-6	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ

2.10 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Genaxxon, Biberach/Riss
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA Fraktion V	PAA, Linz, AT
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Seelze
DAPI	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	NEB, Frankfurt am Main
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Genaxxon BioScience, Ulm
Ethanol, 100% (v/v)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure, 100% (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Lympholyte®-M Cell Separation Media	Cedarlane
FCS	Sigma Aldrich, Seelze
Formaldehyd 37% (v/v)	J.T. Baker, Devender, NL
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerol 99.5%	GERBU Biotechnik, Gaiberg
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
HAT Media Supplement (50x) Hybri-Max™	Sigma Aldrich
HT Media Supplement (50x) Hybri-Max™	Sigma Aldrich
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-DThiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin Carl Roth, Karlsruhe	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol	Sigma Aldrich, Seelze
Methylcellulose	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck, Darmstadt

Natriumpyruvat	Thermo Scientific, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate	Sigma Aldrich
Potassium dihydrogen phosphate	Carl Roth
Penicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Seelze
Streptomycin	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Genaxxon, Biberach
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Seelze
Urea	Carl Roth, Karlsruhe

2.11 Verbrauchsmaterial

Allgemeine Materialien	Hersteller
6-, 12-, 24- und 96-Well- Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen
2 ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
1,5 ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
BD Microtrainer	BD Biosciences, USA
Chirurgisches Einweg-Skalpell	B. Braun, Melsungen
Centricon, Amicon Ultra-0.5 ml, 4 ml, 15 ml MWCO 10 kDa	Millipore, Schwalbach
Dialysemembranen (MWCO 12.000-14.000 Da)	Spectrum Laboratories, USA
Dialysemembranen (MWCO 10.000 Da)	Spectrum Laboratories, USA
Einweg-OP-Kittel	Coldex, CH
Einweg-OP-Mundschutz	Coldex, CH
Mikroskop Objektträger	Carl-Roth, Karlsruhe
Mikroskop Deckgläschen	Carl-Roth, Karlsruhe
Nurses Caps Haarhauben	Barrier, S
Omnifix®-F Spritzen (1, 5, 10, 20 mL)	B. Braun, Melsungen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Peptid-Array	Thomas Holzhauser
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
RotiLabo® Spritzenfilter (0,22 / 0,45 µm)	Carl-Roth, Karlsruhe
Whatman-Papier	GE Healthcare, Freiburg

Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellsieb 70 µm	VWR International, Darmstadt
Zellschaber	TPP, CH
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Überschuhe	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen mit Filter 2-100 µl, 20-300 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 100- 1250 µl, 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Membran	Merck Millipore, Schwalbach

2.12 Puffer

2.12.1 Allgemeine Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20 (TBS-T)	20 mM Tris pH 7,8 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
Lysogeny broth medium (LB)	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % Natriumchlorid (w/v)
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	0,2 M Tris 1 M Acetat 0,05 M EDTA pH 8,8
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 2 M Glycin 1% SDS (w/v) pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 6,7
SDS-Ladepuffer (4x)	4% SDS (w/v) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 10% Glycerol (v/v) 10% β-Mercaptoethanol (v/v) 0,02% Bromphenolblau (w/v)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	136 mM NaCl 2,68 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,1
Anodenpuffer I	20% Ethanol (v/v) 0,3 M Tris
Anodenpuffer II	20% Ethanol (v/v) 25 mM Tris
Kathodenpuffer	20% Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
HEPES Puffer	1 M HEPES pH 7,4
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,5 M EDTA pH 8

2.12.2 Puffer für Reinigung von Inclusion Bodies

Lysepuffer	Tris-HCl 30 mM, NaCl 150 mM, pH 8 0.250 mg/ml Lysozyme 25 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin 20 µg/ml Pepstatin A 0,05 µl/ml Benzonase
Waschpuffer A	100 mM Tris-Cl, pH 8,0 5 mM EDTA 5 mM DTT 0.5 M Urea 2% Triton X-100
Waschpuffer für letzten Waschschrift B	100 mM Tris-HCl, pH 8

2.12.3 Puffer für Affinitätschromatografie

Puffer	Zusammensetzung
Ni-NTA Affinitätschromatografie	6 M Guanidinhydrochlorid
Solubilisierungspuffer (denaturierend)	100 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 10 mM Tris pH 8
Ni-NTA Affinitätschromatografie	6 M Urea
Equilibrierungspuffer (denaturierend)	100 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 10 mM Tris pH 8
Ni-NTA Affinitätschromatografie Waschpuffer (denaturierend)	6 M Urea 100 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 10 mM Tris pH 6,3
Ni-NTA Affinitätschromatografie Elutionspuffer (denaturierend)	6 M Urea 100 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 10 mM Tris 300 mM Imidazol pH 6,3
Strep-Tactin Affinitätschromatografie Laufpuffer	PBS pH 7,4
Strep-Tactin Affinitätschromatografie Elutionspuffer	PBS 2,5 mM Desthiobiotin pH 7,4

2.13 Zellkulturmedien

Medium	Zellen	Hersteller
RPMI 1640, ohne Glutamin	Primäre MausLymphozyten/ Splenozyten	Biowest, Nuaille, Frankreich
LB-Agar nach Luria/Miller	E. coli	Paul-Ehrlich Institut
DMEM high glucose	Huh 7.5 hepatocytes HEK 293	

2.14 Geräte

2.14.1 Chromatografie Anlagen und Säulen

Anlage	Hersteller
ÄKTA Purifier 10	GE Healthcare, Freiburg
HisTrap HP, 1 ml	GE Healthcare, Freiburg
HisTrap HP, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
StrepTrap HP, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg

2.14.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Biacore T200	GE Healthcare, Freiburg
--------------	-------------------------

2.14.3 PCR-Cycler

Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
-----------------------	--------------------

2.14.4 Elektrophorese

Produkt	Hersteller
Elektrophorese Netzteil EPS 301	GE Healthcare, Freiburg
Horizontales Elektrophoresesystem HE33	GE Healthcare, Freiburg
SE250 Series Elektrophoreseeinheit	GE Healthcare, Freiburg
Semidry blotting Chambers TE77	GE Healthcare, Freiburg
Standard power pack P25	Biometra, Göttingen

2.14.5 Zentrifugen

Zentrifuge	Hersteller
Ultracentrifuge Optima™ Max-XP	Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Karlsruhe
Avanti J-26 XPI	Beckman Coulter, Krefeld
Ultracentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Ultracentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter, Krefeld
Sorvall RC5C plus	Thermo Scientific, Karlsruhe
Heraeus multifuge 1 S-R	Thermo Scientific, Karlsruhe
Heraeus Cryofuge 8500	Thermo Scientific, Karlsruhe
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg

2.14.6 Mikroskopie

EM 109	Zeiss, Jena
Agieret 40C	Zeiss, Jena
LSM 510 META	Zeiss, Jena
Nikon Ti-U E20L80	Nikon Metrology GmbH, Alzenau
Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar

2.14.7 Spectrophotometer

DU 730 UV/Vis-Spectrometer	Beckman Coulter, Krefeld
NanoPhotometer P 300	Implen, München

2.14.8 Scales

Analytical Balance M-Power	Sartorius, Göttingen
precision Balance M-Power	Sartorius, Göttingen

2.14.9 pH-Meter

S20 - SevenEasy™ pH	Mettler Toledo
---------------------	----------------

2.14.10 Zellaufschluss

Ultraschall Homogenisator HD2200	Bandelin GmbH, Berlin
----------------------------------	-----------------------

2.14.11 Inkubatoren, Heizblöcke und Schüttler

Gerät	Hesteller
Shaker Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Shaker Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Shaker Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Rocking Platform WT16	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Roller mixer Stuart SRT9	Bibby Scientific, UK
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Incubator series B	Binder, Tuttlingen
CO2-Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Karlsruhe
Mixer and heater IKA RCT classic	IKA, Staufen

2.15 Kits

Kit	Hersteller
QIAquick gel Extraktion Kit	QIAgen, Hilden
QIAGEN Plasmid maxi Kit	QIAgen, Hilden
CD49b (DX5) MicroBeads, mouse	BD IMag™
CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse	BD IMag™

2.16 Andere Geräte

Geräte	Hersteller
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
SterileWerkbank SterilGard®III Advance	The Baker Company, ME, USA
Sterile Werkbank SterilGard®II Type A/B3	The Baker Company, ME, USA
Tecan Infinite M1000	Tecan Group Ltd., Switzerland
Wasserbad	Memmert, Schwabach

2.17 Software

Programm	Hersteller
Unicorn 5.31	GE Healthcare, Freiburg
Vector NTI	Life Technologies, Darmstadt
ZEN 2012	Carl Zeiss AG, Jena
Image Studio Light	LI-COR, Bad Homburg
GraphPad Prism 7	GraphPad, USA
Biacore T200 control	GE Healthcare, Freiburg
Tecan i-control	Tecan Group Ltd., Switzerland
Biacore T200 Evaluation	GE Healthcare, Freiburg

3 Methoden

3.1 Zellbiologie

3.1.1 Prokaryotische Zellkultur

Kompetente *E. coli* Stämme Rosetta™(DE3) pLysS oder DH5- α Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zur Transformation mit Plasmid wurde folgendes Protokoll durchgeführt:

1. Zugabe der Plasmid DNA (1-10 ng) auf Zellen und anschließend 30 min Inkubation auf Eis.
2. Der Hitzeschock erfolgt bei Inkubation bei 42°C für 90 Sekunden. Danach wurden die Zellen wieder auf Eis für 5 min inkubiert.
3. Es wurde 500 μ l LB-Medium hinzugefügt und für 60 Minuten bei 37°C und 600 rpm inkubiert.
4. Anschließend wurden die Zellen auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Eukaryotische Zellkultur:

Für die Experimente wurden HEK 293T, Vero und Huh 7.5 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS superior, 2 mM L-Glutamin und 0,1 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurde dreimal pro Woche passagiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Um die adhärenen Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche abzulösen, wurde Trypsin / EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen wurden 4-5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin Aktivität wurde durch Zugabe von Kulturmedium blockiert und die Zellen wurden in Verhältnissen von 1:5 in Medium verdünnt und in T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Kultivierung von Hybridoma und Myeloma Zellen

Hybridoma und Sp2/0-Ag14 Myelomzellen wurden in RPMI 1640 Medium bei 37°C, 5% CO₂ in sterilen Plastikkulturflaschen kultiviert. Sp2/0-Ag14 Myelomzellen sind Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-negativ (HGPRT⁻). Die Myelomzellen können nicht in dem Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, wachsen. Aminopterin blockiert die de-novo- GTP/TTP-Synthese [130]. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden 20 μ l aus der Zellsuspension entnommen und mit 20 μ l Trypanblau verdünnt. Die lebenden Zellen konnten so in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt werden.

3.1.4 Transfektion von Zellen

Bei einer Transfektion wird Plasmid in eine Zelle eingeschleust. Für die Transfektion von HEK293T Zellen mit der Plasmid DNA wurden am Vortag der Transfektion 1×10^5 Zellen / ml pro Well einer 6-Well Platte ausgelegt. Für jedes Well wurde $1 \mu\text{g}$ DNA sowie $6 \mu\text{l}$ Polyethylenimin (PEI) in PBS verdünnt, vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung ($150 \mu\text{l}$ für jedes Well) tropfenweise zu den zuvor vorbereiteten Zellen pipettiert und danach bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und für weitere 48 h inkubiert.

3.1.5 Glycerolstocks

Eine Kolonie wurde bei 37°C in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum unter Schütteln für 16 h kultiviert. Anschließend wurde 40% Glycerol zugefügt und die Bakterien bei -80°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung der Plasmid-DNA

Die transformierten Zellen wurden in 5 ml oder 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C unter Schütteln für 16 Stunden inkubiert. Plasmid-DNA wurde aus dem Bakterienpellet unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Mini oder Maxi Kits isoliert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde mithilfe des NanoDrop durchgeführt. Dazu wurden $1.5 \mu\text{l}$ verwendet und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Reinheit der DNA wurde durch Messen der Extinktion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ untersucht. Das Verhältnis zwischen A_{260}/A_{280} sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte unter 1,8 deuten auf eine Proteinkontamination hin.

3.2.3 Restriktionsverdau

Die Plasmid DNA wurde mithilfe von Restriktionsenzymen entsprechend den Herstellerangaben geschnitten. $3 \mu\text{g}$ Plasmid wurde mit 10 Units Endonukleaseenzymen in geeignetem Puffer für 2 h bei 37°C restringiert. Die Analyse und Separation der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose wurde in der Konzentration (1-2 %) in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid 0.1 µg/ml hinzugefügt. Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen. Um die Proben Taschen zu erzeugen, wurde ein Kamm in das flüssige Gel gesetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Gelkammer zum Gelelektrophorese-Bad transformiert und mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 Volt und die DNA-Banden wurden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die PCR-Produkte und die verdauten Plasmide wurden auf 1-2% Agarose-Gel getrennt. Unter UV-Licht wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mithilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits gemäß den Herstellerangaben extrahiert und mit 25 µl ddH₂O eluiert.

3.2.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Antarctic phosphatase (NEB) wurde verwendet, um die Autoligation der verdauten Vektor-DNA zu verhindern. Hierfür wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors entfernt. Die Reaktion wurde nach den Anweisungen des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 16 µl Vektor mit 2 µl Antarctic phosphatase und 2 µl Antarctic phosphatase Puffer für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Antarctic phosphatase Enzym durch eine 10-minütige Inkubation bei 68°C inaktiviert.

3.2.7 Ligation von DNA

Bei der Ligation werden Insert und Vektor vereinigt. Für die Ligation wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Die Reaktion erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierungen wurde 1 µg der klonierten DNA zum SeqLab Labor in Göttingen geschickt. Nach der Sequenzierung wurden die Ergebnisse mittels der Software Vector NTI Suite von Invitrogen, Karlsruhe, analysiert.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für das Amplifizieren von DNA-Fragmenten wurde eine Taq-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Ein PCR-Ansatz wurde wie folgendermaßen gewählt:

10-100 ng DNA template

1 µM Vorwärts-Oligonukleotide

1 µM Rückwärts-Oligonukleotide

0.4 mM deoxynucleotide (dATP/dCTP/dGTP/dTTP) (NEB)

1 U Taq DNA polymerase

1 x polymerase buffer E

add 25 µl ddH₂O

Die Polymerasekettenreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Erste Denaturierung für 10 min, 95°C
2. Denaturierung für 30 s, 95°C
3. Annealing für 30 s, 55-58°C
4. Elongation für 1 min/kb DAN 72°C
5. Extension für 10 min, 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25-mal wiederholt.

3.2.10 Kolonie-PCR:

Um die positiven Klone zu identifizieren, wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und in ein 25 µl PCR-Reaktionstube überführt, anschließend wurde PCR durchgeführt. Nach dem PCR-Ergebnis wurden die positiven Klone in 7 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum geimpft und über Nacht inkubiert. Danach wurde die Plasmid-Extraktion durchgeführt.

3.2.11 Klonierung von SAERS-CoV-2 und ZIKV.E Konstrukten:

Für die SARS-CoV-2 Konstrukte wurden die entsprechenden Primer verwendet, um die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und S1, Ecto Domäne und monomere Streptavidin (mSA) Sequenzen zu amplifizieren, wobei die Restriktionsstellen NheI- NotI - XhoI am N- bzw. C-Terminus hinzugefügt wurden. Die amplifizierte RBD, S1 und Ecto Domäne wurden in den Expressionsvektor pET21a (+) mit oder ohne mSA eingefügt.

Die amplifizierte Sequenz von ZIKV.E (Hüllprotein / Envelope Protein) enthält am 5`-Terminus die Restriktionsstelle BamHI und am 3`-Terminus BsrGI. Danach wurde die amplifizierte ZIKV.E-codierende Sequenz in den pRSET-mSA Vektor [126] eingefügt. Anschließend wurde die komplette Sequenz mSA_ ZIKV.E ausgeschnitten und in das Plasmid pET-24a (+) eingefügt. Das neue Plasmid heißt pET24 d -mSA- ZIKV.E. Das klonierte Konstrukt weist zudem einen 6xHis-tag, welcher für die Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie verwendet wurde, auf. Außerdem wurde das Plasmid pet21a_ZIKV.E _Strep tag verwendet [128], um ZIK.V ohne mSA zu produzieren.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Herstellung der rekombinanten Proteine

Die E. coli-Zellen [Rosetta™(DE3) pLysS] mit den Expressions-Plasmiden wurden mit 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 Liter LB-Medium mit 50 ml von der Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Bei einer OD 600 von 0,5 wurde die Genexpression mit 1mM IPTG induziert und die Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C für weitere 4 h kultiviert. Danach wurden die Zellen bei 4°C und 5000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit PBS-Puffer (pH 7.1) resuspendiert und bei 4°C und 4700 rpm für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Zellaufschluss

Die Bakterienpellets wurden in 10 ml Lysepuffer für Bakterien (30 mM Tris, 150 NaCl PH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (Leupeptin, PMSF, Pepstatin und Aprotinin) resuspendiert. Nach der Inkubation für 5 min auf Eis wurden 10 U/ml Benzonase zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei RT inkubiert und danach 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde auf Eis mittels Ultraschallbehandlung (8 x 10 sec, 25%) lysiert, wobei die Proben zwischen den Beschallungen für 2 min auf Eis abgekühlt wurden. Es folgte eine Zentrifugation von 25 min bei 20.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen.

3.3.3 Reinigung von Inclusion Bodies

Bei der Proteinsynthese von rekombinanten Proteinen in E. coli kann das Protein als Proteinaggregat in Einschlusskörperchen (IB, engl. inclusion bodies) vorliegen. In diesem Fall wurden die Pellets nach Zellaufschluss und Zentrifugation in 10 ml Waschpuffer A resuspendiert. Danach wurde eine Ultraschallbehandlung (3 x 5 sec, 15%) auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Probe für 20 min bei 4°C und 20.000 rpm zentrifugiert. Der vorherige Waschschrift (Auflösen

in Waschpuffer A und Zentrifugation) wurde 4-5-mal wiederholt. Das Pellet wurde dann abschließend einmal mit 100 mM Tris-HCl Puffer, pH 8 gewaschen und bei -20°C gelagert.

3.3.4 Solubilisierung von Inclusion Bodies

Inclusion bodies wurden in 10 ml (Guanidinhydrochloridpuffer) und 10 mM Imidazol für 2 h bei RT gelöst, anschließend für 30 min bei 4°C, 20000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Reinigungsschritte gesammelt.

3.3.5 Metallchelatierende-Affinitätschromatographie (IMAC)

Um das gewünschte rekombinante Protein, das einen hexa-his-tag aufwies, zu isolieren, erfolgte eine Affinitätschromatographie bei 4°C unter Verwendung eines ÄKTA Purifiers von GE Healthcare. Zur Reinigung 6xHistidin-markierter Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde eine mit Ni²⁺ beladene HisTrap HP Säule (5 ml) verwendet. Die Säule wurde mit 10 CV ddH₂O gewaschen und anschließend mit Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Danach wurde die Probe auf die Säule geladen. Die Histidine der Proteine besitzen einen Imidazolring, welcher an die Ni²⁺ -Ionen binden kann. Das Waschen erfolgte mit dem Waschpuffer (6 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, 10 mM Tris pH 6,3), um die unspezifischen Bindungen zu entfernen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mithilfe eines Elutionspuffers, der 250 mM Imidazol enthält. Imidazol bindet Ni²⁺ -Ionen kompetitiv und sorgt für die Elution von den 6xHis-markierten Proteinen. Die Fraktion wurde in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.3.6 Rückfaltung der denaturierten Proteine

Um nach der Denaturierung das RBD-mSA Protein wieder in die native Form falten zu können, wurde der Harnstoff schrittweise durch Dialyse entfernt. Dabei wurden folgende Puffer verwendet.

Tabelle 2: Rückfaltungspuffer:

RBD_mSA Dialysepuffer 1 (pH 6,5)	PBS (4, 2, 1, 0.5, 0M) Harnstoff 5% (v/v) Glycerin
RBD_mSA Dialysepuffer 2 (pH 5,5)	50 mM HEPES 20 mM NaCl (4, 2, 1, 0.5, 0M) Harnstoff 5% (v/v) Glycerin

Dazu wurden Dialysemembranen von Spectra/por mit einem Cut-off des 10 kDa verwendet. Die Dialyse wurde bei 4°C unter leichtem Rühren durchgeführt. Anschließend wurde das

Protein bei 4000 rpm, 4°C für 20 min zentrifugiert. Danach wurde die Proteinkonzentration mithilfe des NanoDrops bestimmt.

3.3.7 Analyse der Rückfaltung von RBD_mSA

Dazu wurde das erhaltene Protein aus zwei verschiedenen Rückfaltungsmethoden auf 96-Well-Platten über Nacht bei 4°C immobilisiert. In jedem Well der Mikrotiterplatte befand sich 0,5 µg der RBD_mSA Proteine. Rekonvaleszentenseren (Infektion mit SARS_CoV_2 wurde nachgewiesen) wurden verwendet. Die Seren wurden 1:500 mit 10% FCS in PBS verdünnt und die ELISA wurde wie unter (3.5.2) beschrieben durchgeführt. Als Blank wurde 10 % FCS verwendet. Als Negativseren dient das Humanserum von 2017. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2. Sekundärantikörper war HRP-gekoppeltes Anti-Human IgG. Mittels ELISA wurde die Reaktion zwischen den zwei verschiedenen immobilisierten RBD_mSA und den befindlichen Antikörpern in den Patientenseren quantifiziert.

3.3.8 Produktion und Reinigung von TLM-Capsiden

Das zellpermeable HBVcapsid beinhaltet die TLM-Sequenz als „head to tail“-Dimer (PDGIRSFISLP-SGS-PLSSIFSRIGDP) am N-Terminus und die Strep-tagIII-Sequenz im Spike-tip. Die Antigene RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA binden an Strep-tagIII in den Spike-tips und werden so auf der Oberfläche der Capside präsentiert. Das TLM-core Protein wurde in E. coli produziert. Das Bakterienpellet wurde unter nativen Bedingungen mit Tris Puffer lysiert und das klare Lysat wurde auf eine 5 ml Streptactin-Säule zur Reinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatografie gegeben. Nach dem Waschen mit PBS Puffer pH 7.4 wurde das Protein durch Anwendung des Elutionspuffers, der Desthiobiotin enthält, eluiert. Die Identität und Reinheit des gereinigten rekombinanten Proteins wurden durch Western Blot und Coomassie-gefärbte SDS-Gele analysiert.

3.3.9 Elektronenmikroskopie

Um die Assemblierung der Capside zu untersuchen, wurden die Proben mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Dazu wurden 15 µl der Proben auf beglimmte Karbon Grids pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 25 µl ddH₂O wurde 10 µl von 2% Wolframatophosphorsäure in ddH₂O für 10 s bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Grids getrocknet und mit dem Elektronenmikroskop (EM) 109 von Zeiss untersucht.

3.3.10 Sterilfiltration

Die Proben wurden mit Rotilabo- oder Millex-GV-Filtern (0,22 µm oder 0.45 µm) filtriert.

3.3.11 Konzentrierung des Proteins

Um die optimale Konzentration der gewünschten Proteine zu erhalten, wurden Amicon® Ultra Zentrifugalfilter mit einem MW cut - off von 10.000Da oder 30.000 Da verwendet.

3.3.12 Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Zur Untersuchung der Bindung zwischen ZIKA E _mSA oder RBD _mSA und den TLM.core wurde eine Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt. Der Gradient wurde von unten nach oben mit (70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% ,10%) (w/v) Sucrose in PBS zu je einem Volumen von 1 ml geschichtet. Anschließend wurde die Probe auf den Gradienten gegeben Dazu wurden die Proben für 4 h bei 4°C, Rotor SW41,41.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden insgesamt 8 Fraktionen von je 1 ml von oben nach unten gesammelt und per Western Blot analysiert.

3.4 Nachweis von Proteinen

3.4.1 SDS-PAGE

Um ein Proteingemisch nach Molekulargewicht unter einem elektrischen Feld zu trennen, wurde SDS-PAGE verwendet [95]. Das Gel bestand aus zwei Teilen: Trenngel mit einem pH-Wert von 8,3 und Sammelgel (pH 6,8). Das Sammelgel hat eine Polymerdichte von 4%. In diesem Gel werden die Proteine konzentriert. Das Trenngel besitzt Polymerdichten (10 – 14) % je nach Molekulargewicht (MW) der Proteine. In diesem Gel erfolgt eine Trennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht. Zur Denaturierung wurden die Proteine mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die reduzierende Wirkung des Mercaptoethanol zerstört die Disulfidbrücken. Die Herstellung des Sammelgels und Trenngels wurde wie folgt durchgeführt:

Sammelgel	Menge für ein Gel (4%)
Sammelgelpuffer	1.5 ml
Rotiphorese 40 (29:1)	0.6 ml
ddH ₂ O	3.9 ml
TEMED	6 µl
10% APS (in ddH ₂ O)	60 µl

Trenngel	Menge für ein Gel 10%	Menge für ein Gel 12%	Menge für ein Gel 14%
Sammelgelpuffer	2 ml	2ml	2ml
Rotiphorese 40 (29:1)	2 ml	2.4ml	2.8ml
ddH ₂ O	4 ml	3.6ml	3.2ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
10% APS (in dd H ₂ O)	80 µl	80 µl	80 µl

3.4.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde nach der SDS-PAGE für 1 h bei Raumtemperatur in Coomassieblue-Lösung angefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung mehrmals ausgewaschen. Danach wurde die Bande analysiert.

3.4.3 Western Blot

Nach der Trennung mittel SDS-PAGE wurden die Proteine durch elektrische Spannung auf eine PVDF-Membran transferiert [96]. Für den Transfer wurde eine Kammer für Semi-Dry Blotting und ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (**Abbildung 12**). Das Blotting wurde für 1 h durchgeführt und eine Stromstärke von 1,3 mA/cm² Membran angelegt. Nach dem Blotting wurde die Blockierung der Membran mit Roti-Block für 1 h bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit primärem Antikörper oder Hybridomakulturüberständen (mit Roti-Block verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit IRDye-gekoppeltem (LI-Cor) Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Das Signal wurde mit den LI-COR Imaging Systems (LI-COR ODYSSEY) detektiert.

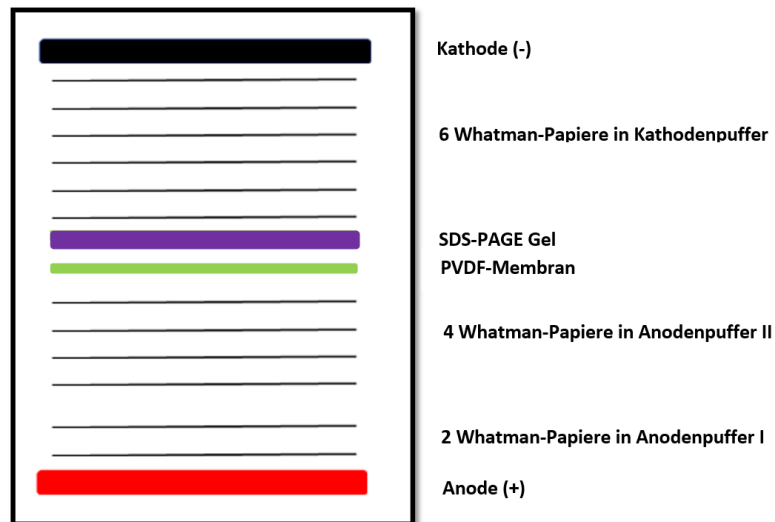


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Semi-Dry Western Blot. Whatman-Papiere wurden in die entsprechenden Puffer getaucht und mit dem SDS-Gel und die in Methanol aktivierte PVDF-Membran wie beschrieben angeordnet.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist ein Verfahren zur Lokalisierung von Proteinen im subzellulären Bereich. Vero- oder Hek293T Zellen wurden in 12-Well-Platten auf Deckgläschen ausgelegt und behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 20 min bei Raumtemperatur oder mit eiskaltem Ethanol: Aceton (1:1) für 15 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung wurden die Zellen für 15 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert und danach einmal in PBS gewaschen. Zunächst wurden die Zellen für 60 min mit 2 % BSA / PBS geblockt. Der Primärantikörper oder Hybridoma Überstand wurde in Blockierungslösung verdünnt und mit den Zellen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (um das Austrocknen zu vermeiden wurde in einer Feuchtkammer gearbeitet) und anschließend dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper und DAPI wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträger gelegt (Zellenseite nach unten) und mit Mowiol fixiert. Für die Analyse der Immunfluoreszenzproben diente das Leica TCS SP8 CLSM.

3.5.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis von Antikörpern in Hybridomaüberständen wurden 96-Well-Platten mit 0,5 g/ml Antigen über Nacht bei 4°C immobilisiert. Das Antigen wurde in 50 mM Natriumcarbonatpuffer pH:9 verdünnt. Die Platte wurde danach viermal mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Oberfläche der Wells mit 100 µl 10% FCS in PBS für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Der Hybridomaüberstand wurde in 10% FCS in PBS verdünnt und zu je 50 µl für 1 h bei

Raumtemperatur auf den Boden der Wells gegeben. Die Wells wurden viermal gewaschen, anschließend wurde ein HRP-konjugierter anti-Maus-IgG Antikörper (1:1000 in 10% FCS in PBS verdünnt) dazugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligen Waschen wurden 75 µl Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Waschschritte lösen nicht die gebundenen Substanzen von der Platte. Anschließend wurde die Reaktion mit 1N H₂SO₄ gestoppt und die Signale bei einer Wellenlänge von 450 nm abgelesen.

3.5.3 Epitop-Kartierung

Zur Bestimmung der Epitope von RBD, welche von Antikörpern im Serum immunisierter Kaninchen erkannt werden, wurde ein Peptidspot-Array verwendet. Zuerst wurden die Peptid-Microarrays mit Blockierungspuffer Rotiblock für 2 h bei RT inkubiert. Die gereinigten Seren wurden in Blockierungspuffer verdünnt auf Endkonzentration von 1 µg / ml und wurden danach für 2 h bei RT auf die Arrays aufgetragen. Anschließend wurden die Peptid-Microarrays mit TBST 3-mal für 10 min gewaschen. Die sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (IRDye® 800CW Anti-Kaninchen) wurden in demselben Blockierungspuffer verdünnt, auf die Arrays aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert. Danach folgte ein letzter Waschschritt mit TBST und anschließend die Detektion mit dem Fluoreszenzscanner Odyssey von LI-COR.

3.6 Immunisierung von Kaninchen gegen SARS-CoV-2

Es wurden zwei Kaninchen mit rekombinant hergestelltem und isoliertem RBD-mSA immunisiert (Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee, Deutschland). Die Kaninchen K40 und K50 wurden mit RBD_mSA immunisiert. Das Serum wurde vor der Immunisierung (Präimmenserum) und auch nach der Immunisierung (Hyperimmunserum) entnommen.

3.7 Aufreinigung von Antikörpern

3.7.1 Antigenspezifische Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Isolierung von RBD spezifischen Antikörpern aus dem Kaninchenserum wurden die RBD Proteine gemäß des Protokolls des Herstellers an NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, München, Deutschland) gekoppelt. Die NHS-aktivierte Sepharose wurde in geeignete Säulen gefüllt und das ÄKTA-purifier Chromatographiesystem (GE Healthcare, München, Deutschland) wurde zur Reinigung des Serums angewendet. Das gesammelte Serum wurde filtriert und für jede Reinigung wurde 2 ml auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Antikörper mit 0,1 M Glycin. HCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 2,7 eluiert und in jeweils 1 ml Fraktionen aufgefangen. Durch die sofortige Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer 1 M Tris-HCl pH 8,5 wurde der pH-Wert der Eluate wieder auf pH 7,5 eingestellt.

3.7.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Zunächst wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung hergestellt. Dazu wurde das Ammoniumsulfat-Salz auf destilliertes Wasser gegeben, bis es nicht mehr in Lösung zu bringen war. Eine gesättigte Lösung enthält bei 25°C 4,1 M Ammoniumsulfat.

Der Hybridomaüberstand wurde bei 3000 rpm für 20 min zentrifugiert. Danach wurde die gesättigte Ammoniumsulfatlösung langsam und tropfenweise bis zu 50% Sättigung unter Rühren bei 4°C auf den Hybridomaüberstand gegeben. Anschließend wurde die Lösung eine Stunde lang bei 4°C gerührt. Nach der Zentrifugation bei 3000 rpm für 20 min befinden sich die Antikörper im Pellet. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert.

3.8 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Um die Bindungskapazität von Antikörpern an das RBD oder ZIKV.E Protein zu bestimmen, wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) mit dem Biacore T200 verwendet. ZIKA_mSA Protein oder RBD_mSA und S1 Domäne vom SARS-CoV-2 Protein wurden unter Verwendung von Sulfo-NHS und EDC kovalente Bindung auf einem CM5 Chip immobilisiert. Nach der Proteinimmobilisierung wurde die Chipoberfläche mit Ethanolamin behandelt, um den Überschuss von reaktiven Gruppen zu deaktivieren. Als Negativkontrolle dienten die Durchflusszellen FC-1, die kein immobilisiertes Protein aufweisen. Die Auswertung erfolgte durch die Software Biacore T200 control und Biacore T200 Evaluation.

3.9 In-Vitro Immunisierung

3.9.1 Präparation der Milz

4 BALB /c Mäuse wurden nach der tiefen Narkose mit Isofluran getötet und mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Bauchdecke wurde steril eröffnet und die Milz isoliert. Danach wurde die Milz mit PBS unter der Sterilbank gewaschen. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Milz in einer Petrischale zerkleinert und durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit RPMI 1640 Medium ohne FCS in einem 50 ml Falcontube verdünnt. Danach wurde bei 1200 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mit RPMI-1640 gewaschen und danach in PBS resuspendiert. Die roten Blutkörperchen und die Granulozyten wurden unter Verwendung von Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories, Kanada) entfernt. Dazu wurde 5 ml Lympholyte[®]-M in einen 15 ml Falcontube gegeben. Mit einer Pipette wurde 5 ml der Zellsuspension 1×10^7 langsam und vorsichtig an die Grenzfläche des Falcontube gegeben. Die Lympholyte[®]-M hat eine größere Dichte als die Zellsuspension, deswegen wird eine deutliche Grenzfläche gebildet. Später wurde für 20 Minuten bei 1500 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine definierte Lymphozytenschicht ersichtlich. Anschließend wurden die Lymphozyten vorsichtig entfernt und in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert. Die isolierten

Lymphozyten wurden mit RPMI 1640 Medium verdünnt und für 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen. CD8-positive T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) wurden mit negativer Selektion aus den Lymphozyten entfernt. Die Isolierung erfolgt durch Verwendung von Anti-CD8 und Anti-CD49b Antikörper-beschichteten Magnetkügelchen gemäß den Herstellerangaben.

3.9.2 In-Vitro Immunisierung:

Bei der Herstellung von Antikörpern müssen zunächst B-Lymphozyten dazu gebracht werden, Antikörper zu erzeugen – es muss also immunisiert werden. Man hat die Wahl zwischen der (gängigen) in vivo und einer in vitro Immunisierung. Bei der in vitro Variante erfolgt die Immunisierung nicht im Tier, sondern in Kultur. Für die Immunisierung gegen ZIKV.E Antigen wurden die isolierten B-Lymphozyten bei 37°C für 2 Tage in RPMI 1640 und 20% FBS inkubiert. Als Antigen dienten ZIKV.E_mSA gekoppelt an TLMcapside oder freies ZIV.E_mSA in Konzentration von 10 µg/ml. Als Kontrolle wurde die äquivalente Menge PBS dem Medium zugesetzt und auf B-Lymphozyten gegeben. Nach zwei Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und nochmal mit der Kontrolle und denselben Antigenen in Konzentration von 2 µg/ml für zwei Tage inkubiert. Die Immunisierung wurde in einer 96 Well Platte und in Zelldichte von 4×10^6 durchgeführt. Für die Immunisierung gegen RBD von SARS-CoV-2 wurden die isolierten B-Lymphozyten bei 37°C für 2 Tage in RPMI-1640 20% FBS mit folgenden Stimulanzen (0,25 uM MDP, IL-2 bei 10 ng / ml, IL-4 bei 2,5 ng / ml und IL-21 bei 10 ng / ml für 2 Tage inkubiert [97]. Als Antigen dient TLMcapside gekoppelt mit RBD _mSA in Konzentration von 10 µg/ml. Für die sekundäre Antigenstimulation wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und nochmal mit folgenden Stimulanzen 0,25 uM MDP (Sigma Aldrich), IL-2 bei 10 ng / ml, IL-4 bei 2,5 ng / ml und IL-21 bei 10 ng / ml und mit demselben Antigen in Konzentration von 2 µg/ml für zwei Tagen inkubiert. Nach 4 Tagen war die Immunisierung abgeschlossen (**Abbildung 13**) und die Zellen nun bereit für die Fusion mit Myeloma Zellen, um B-Zellen zu immortalisieren.

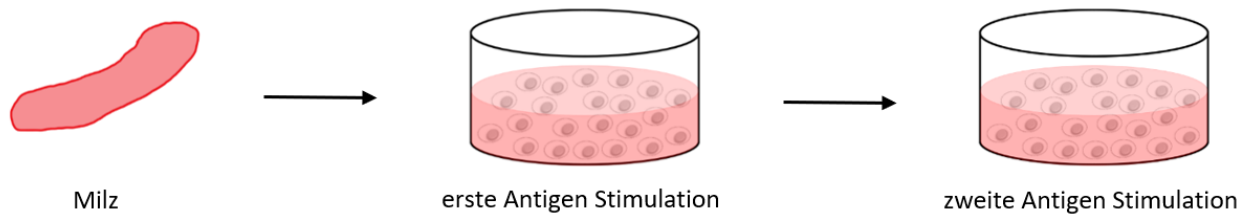


Abbildung 13: Die Verfahren zum Induzieren der Antikörperproduktion in Splenozyten durch in vitro Immunisierung besteht aus 2 Schritten: die erste Stimulation mit (ZIKV.E _ beladene TLM Capside) für zwei Tage. Die zweite Stimulation wurde nach dem Waschen von Zellen für weitere zwei Tage noch mal mit demselben Antigen wiederholt.

3.10 Fusion

3.10.1 Biotinylierung von Zell-Oberflächenproteinen

Sp2/0-Ag14 Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS (pH 8,0) gewaschen, um die Aminosäuren und kontaminierenden Proteine zu entfernen.

Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von 10×10^6 Zellen / ml in PBS (pH 8,0) suspendiert. Eine 10 mM Lösung von Sulfo-NHS-SS-Biotin wurde direkt vor der Verwendung vorbereitet und 80 μ l davon pro Milliliter Reaktionsvolumen zugegeben. Anschließend wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS (pH 8,0) gewaschen.

3.10.2 Inkubation biotinylierter Myelomzellen mit Antigen und Elektrofusion

RBD-mSA oder mSA- ZIKV.E Protein wurden mit biotinylierten Myelomzellen für eine Stunde inkubiert. Die B-Zellen 1×10^7 Zellen /ml wurden mit Myeloma Zellen 1×10^7 Zellen /ml für eine Stunde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne FCS auf einem Roller bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit einem Puffer niedriger Ionenstärke (1.5 mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 272 mM Saccharose) gewaschen. Danach wurden die beiden Zellen 1×10^8 Zellen /ml im gleichen Puffer resuspendiert [132]. Die Elektrofusion wurde in 0.5 ml Zellsuspension durchgeführt mit folgenden Gene Pulse Bedingungen: 200 V, 25 μ F, 3 Pulse. Die elektrischen Pulse wurden in Standarden Bio-Rad- 0.4 cm Elektroporationsküvetten durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 40 ml HAT/ RPMI 1640 Medium + IL6 verdünnt und in zwei 96 Well-Platten ausplattiert. Daraufhin wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 für 14 Tagen inkubiert.

3.11 Selektion von Hybridoma-Zellen

Die Selektion von Hybridoma-Zellen aus dem Gemisch (B-Zellen/Myeloma), (B-Zellen, B-Zellen) (Myeloma/Myeloma) der Hybriden und nicht fusionierten Zellen erfolgte durch HAT/ RPMI 1640 Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin). 14 Tage nach der Inkubation im HAT Medium können nur Hybridoma-Zellen überleben, weil die B-Zellen das Enzym HGPRT

aufweisen. Das Enzym HGPRT ist notwendig, um GTP aus dem Hypoxanthin über einen alternativen Syntheseweg zu synthetisieren. TTP wird aus dem zugesetzten Thymidin synthetisiert, weil die normale de-novo- GTP/TTP-Synthese durch das Aminopterin inhibiert ist. Einzelne B-Zellen sowie (B-Zell/B-Zell) Hybride überleben in Kultur naturgemäß nicht länger als 10 Tage. Einzelne Myelomazellen und (Myeloma/Myeloma Hybride) können zwar grundsätzlich langfristig kultiviert werden, sind aber im HAT-Medium wegen ihres Mangels an HGPRT nicht überlebensfähig. Ausschließlich die (B-Zell/Myelomazellen Hybride) verfügen nun einerseits über das erforderliche Enzym HGPRT zur GTP-Synthese und andererseits über die Eigenschaften Kultivierbarkeit und Unsterblichkeit. Daher bleiben nach Inkubation im HAT-Medium ausschließlich Hybridomazellen übrig (**Abbildung 14**).

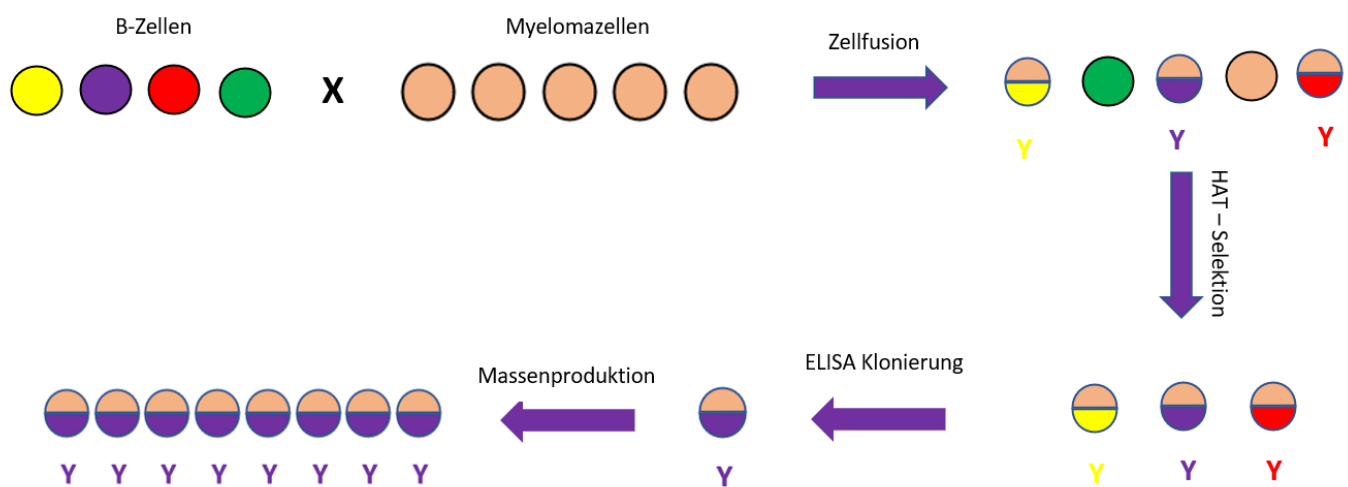


Abbildung 14: Hybridom-Technik. 1) Fusionierung von B und Myelom Zellen. 2) Die Selektion von Hybridoma-Zellen. 3) Sub Klonierung der Hybridoma-Zellen. 4) Antikörper-Produktion in vitro.

3.12 Mediumwechsel vom HAT Medium in das HT-Medium

Nach ca. 20 Tagen erfolgt die Umsetzung der Klone vom HAT Medium in das HT-Medium. Dazu wurden die Klone aus dem HAT Medium in das HT-Medium schrittweise umgesetzt. Um die Klone vom HT Medium zu entwöhnen, wurde wieder schrittweise aus dem HT-Medium in das normale RPMI 1640 Medium mit 10% FCS gewechselt.

3.13 Klonierung der Hybridoma

Mittels einer geeigneten Nachweis-Methode, z. B. ELISA, können diejenigen Zellklone detektiert werden, welche die gewünschten Antikörper synthetisieren. Mithilfe der Klonierung durch (Grenzverdünnungsklonierung) konnten aus Zellgemischen einzelne Zellen isoliert werden (Goding, 1996).

Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Subklonierung wurde dreimal durchgeführt, um monoklonale Antikörper von einer Zelle zu erhalten.

3.14 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. 4×10^6 Zellen/ml wurden im (Medium mit Zusatz von 10% DMSO und 20 % FCS) resuspendiert. Die Kryoröhrchen werden in Einfrierboxen bei -80°C gestellt. Für eine Konservierung der Klone für längere Zeit werden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen schnell im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und mit 5 ml Medium mit 15% FCS in einer Zellkulturflasche bei 37°C inkubiert.

3.15 Isotypenbestimmung

Um Isotypen von Antikörpern zu bestimmen, wurde der Hybridomaüberstand mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C gekocht. Danach wurde der Überstand auf SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach der Blockierung mit Roti Block Puffer wurde die Membran mit HRP-gekoppelter Anti IgM oder Anti IgG Maus für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

4 Ergebnisse

4.1 Produktion von SARS-CoV-2 und ZIKV.E Antigenen

4.1.1 Herstellung der Konstrukte

Als Antigen wurde die RBD von SARS-CoV-2 oder das ZIKV.E Protein benutzt. Die Kopplung des Antigens an das Trägercapsid wird über eine Bindung von monomerem Streptavidin (mSA) an den Strep-tagIII im Spike-tip des TLM.core durchgeführt. Aus diesem Grund wurde monomeres Streptavidin (mSA) mit RBD oder ZIKV. E als Fusionsprotein produziert. Außerdem wurde ein C-terminaler 6xHis-tag angefügt für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. Als Plasmid wurden pET24d für die recombinante Expression von mSA_ZIKV.E und pET 21a für RBD_mSA und andere SARS-CoV-2 Proteine (RBD, S1, Ecto) benutzt, siehe Beschreibung der Konstrukte (**Abbildung 15,16,17**). Nach Transformation von Rosetta™(DE3) pLysS E. coli Bakterien mit diesen Plasmiden konnten die entsprechenden Fusionsproteine produziert werden.

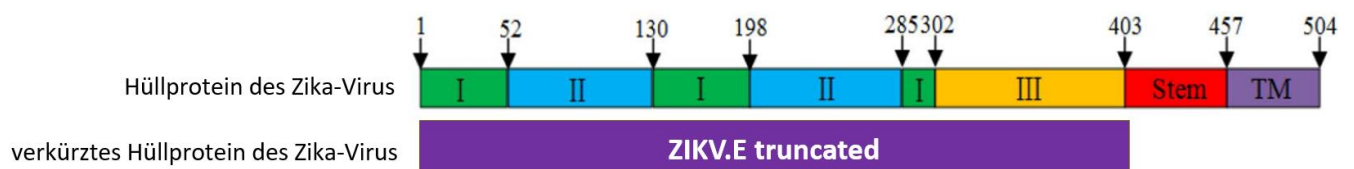
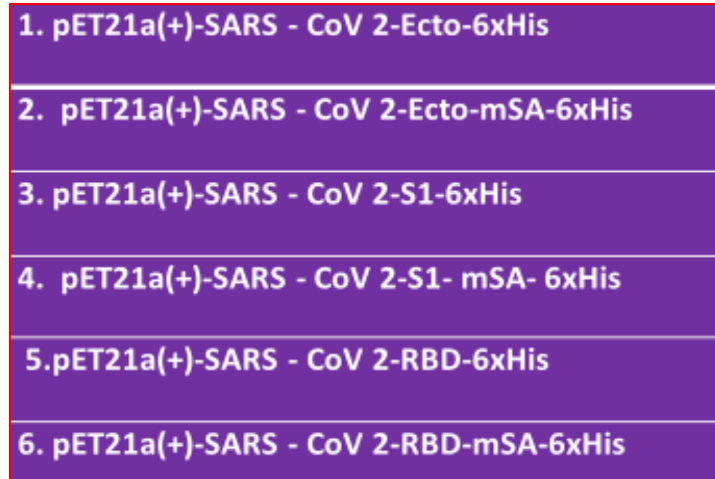


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Hüllproteins des Zika-Virus. Verkürztes Hüllprotein des Zika-Virus besitzt nur 409 Aminosäure.



Abbildung 16: Konstruktion des Vektors PET24d mSA-ZIKA E. Schematische Darstellung des Antigenkonstrukts kodierend für monomeres Streptavidin und ZIKV.E als Fusionsprotein. mSA dient als Adapterprotein für die Kopplung an Strep-tagIII-fusionierte Trägerpartikel und der 6xHistag für Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. IEGR ist eine enzymatische Schnittstelle für Factor Xa Protease.



1. pET21a(+)-SARS - CoV 2-Ecto-6xHis
2. pET21a(+)-SARS - CoV 2-Ecto-mSA-6xHis
3. pET21a(+)-SARS - CoV 2-S1-6xHis
4. pET21a(+)-SARS - CoV 2-S1- mSA- 6xHis
5.pET21a(+)-SARS - CoV 2-RBD-6xHis
6. pET21a(+)-SARS - CoV 2-RBD-mSA-6xHis

Abbildung 17: Konstruktion des Vektors PET 21a SARS- CoV-2 Antigen. Schematische Darstellung des Antigenkonstrukts kodierend für monomeres Streptavidin und SARS- CoV 2 Antigen als Fusionsprotein mSA dient als Adapterprotein für die Kopplung an Strep-tagIII-fusionierte Trägerpartikel und der 6xHistag der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. Konstrukt 1 ,3, 5 sind SARS- CoV 2 Antigen ohne monomeres Streptavidin.

4.1.2 Gewinnung und Darstellung der Proteine:

Dazu wurde das Plasmid pET 24d, das für mSA-ZIKV.E kodiert, und pET 21a Plasmide, die für das SARS-CoV-2 Antigen kodieren, in den *E. coli*-Rosetta™(DE3) pLysS hineintransformiert. Das Verwenden des 6xHis-Tags ermöglicht, dass das rekombinante Protein mittels Ni-NTA-Säule gereinigt werden kann. Das rekombinante Protein lag in Form von inclusion bodies in den Bakterien vor. Aus diesem Grund musste die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wurden inclusion bodies, wie unter Methoden beschrieben, isoliert. Anschließend wurden die inclusion bodies in Guanidinhydrochlorid Puffer solubilisiert und über eine 5 ml Ni-NTA-Säule gegeben. Nach dem Waschen mit Waschpuffer wurde das Protein mit 300 mM Imidazol eluiert. Mittels Coomassiefärbung und Western Blot konnte die Reinheit des überproduzierten Proteins analysiert werden (**Abbildung 18,19,20,21,22,23**). Außerdem wurde ZIKV.E ohne mSA produziert.

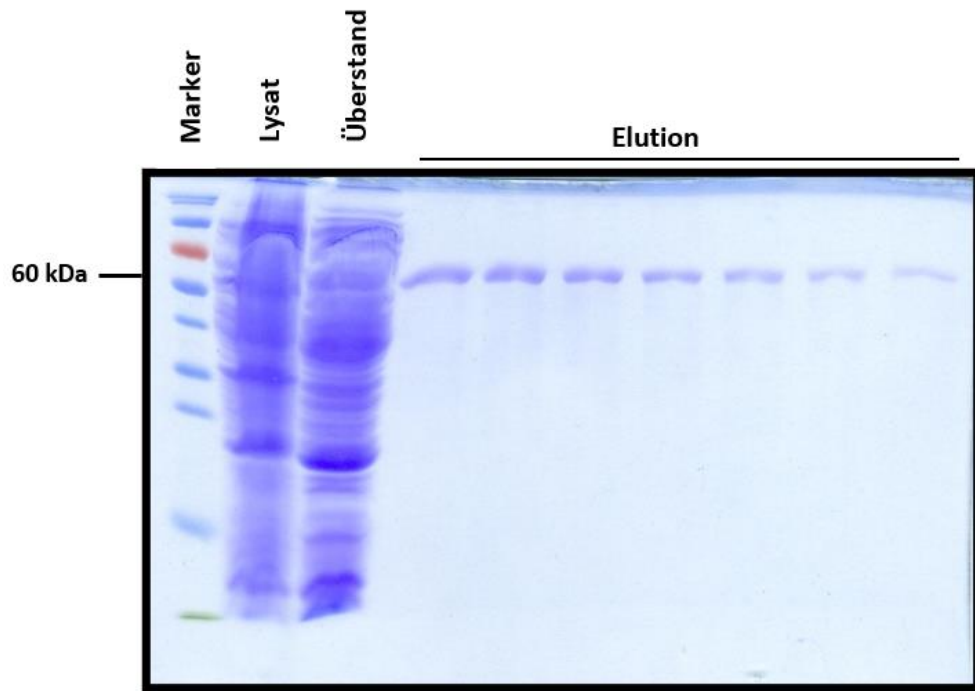


Abbildung 18: Proteinreinigung von rekombinatem mSA_ZIKV.E mittels Affinitätschromatografie. Die Proteinreinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt eine hohe Reinheit des produzierten Fusionsproteins. Denaturiertes Eluat wurde schrittweise gegen PBS dialysiert, um die Rückfaltung zu initiieren.

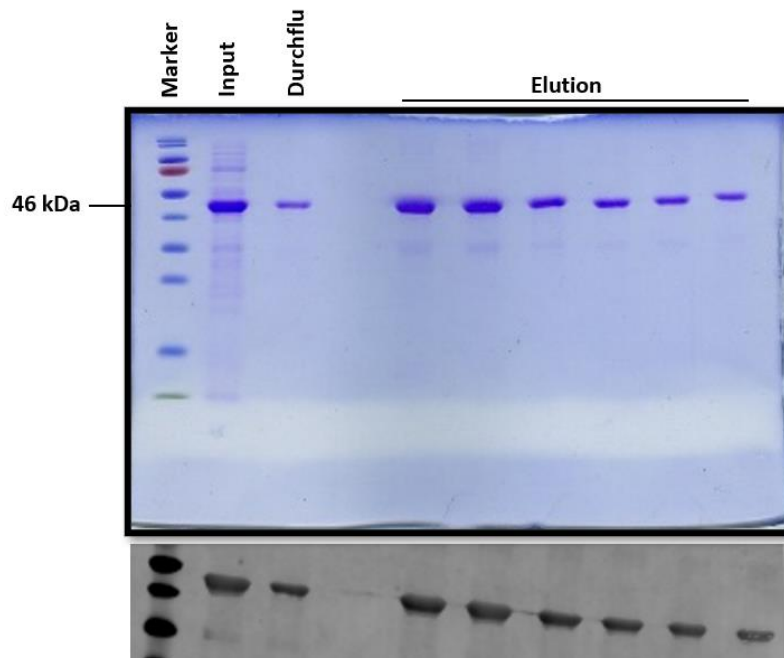


Abbildung 19: Proteinreinigung von rekombinatem ZIKV.E ohne mSA mittels Streptactin - Affinitätschromatografie. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel und Western Blot zeigen eine hohe Reinheit des produzierten Proteins.

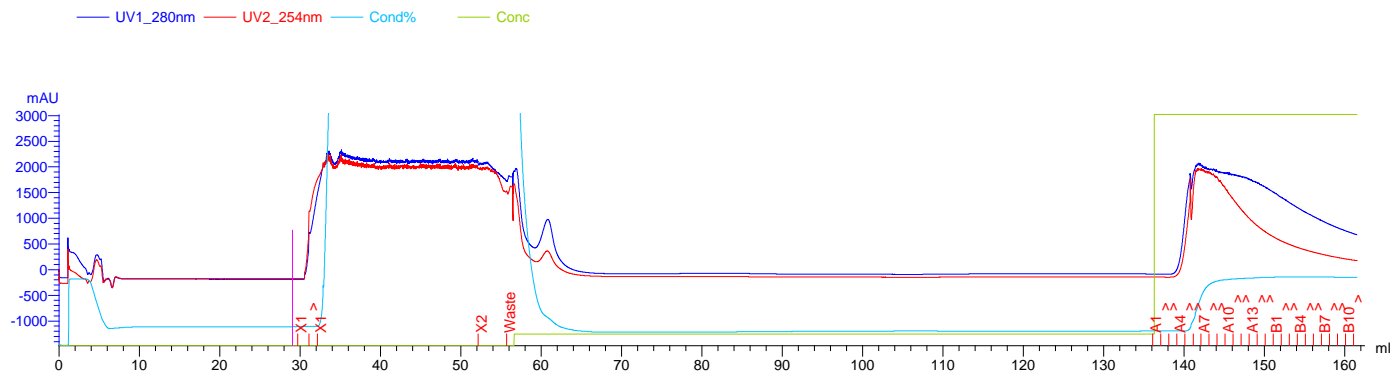


Abbildung 20: Chromatogramm der affinitätschromatographischen Reinigung von RBD_mSA unter denaturierenden Bedingungen. Rekombinantes Protein wurde im denaturierten Zustand auf der Säule gebunden, danach erfolgt die Waschung mit Waschpuffer. Die Elution erfolgte in einem Stufengradienten bei 250 mM Imidazol. Die Fraktionsgröße betrug 1000 μ l.

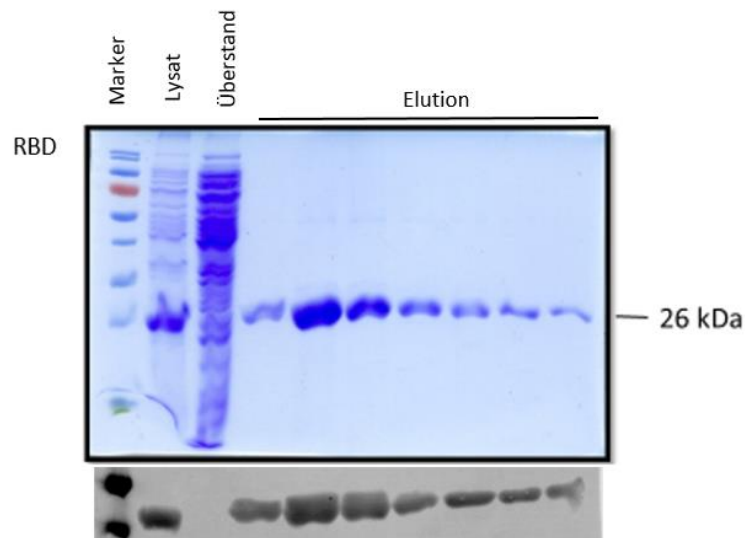


Abbildung 21: Proteinreinigung von rekombinantem RBD mittels Affinitätschromatografie. Proteinreinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule gegeben. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt eine hohe Reinheit des produzierten Fusionsproteins. Für Western Blot wurde der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2 benutzt.

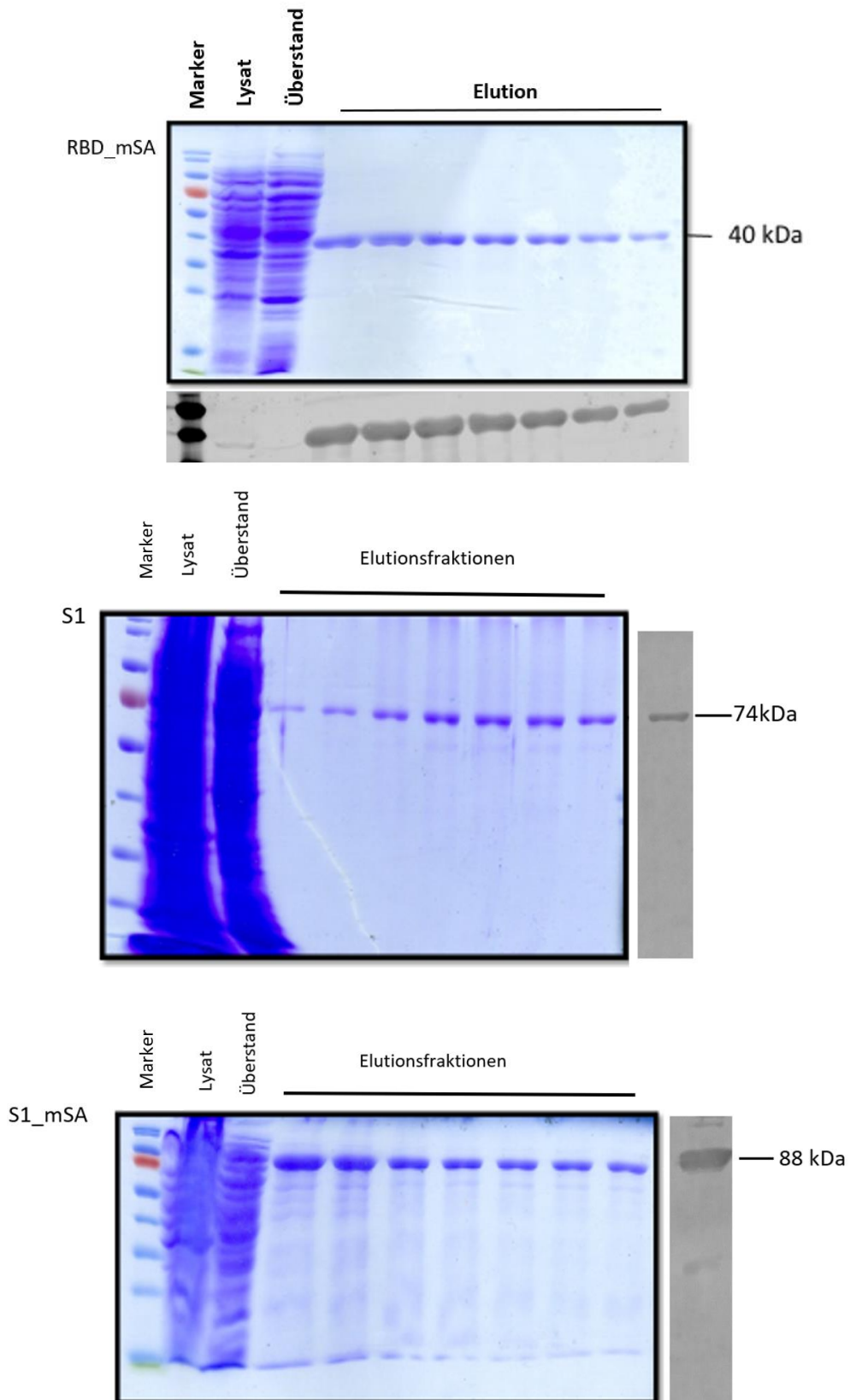


Abbildung 22: Proteinreinigung von rekombinantem RBD_mSA, S1 und S1_mSA Domän von E. coli mittels Affinitätschromatografie. Proteinreinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule gegeben. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt die hohe Reinheit des produzierten Fusionsproteins. Für die Western Blot Analyse wurde der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2 benutzt.

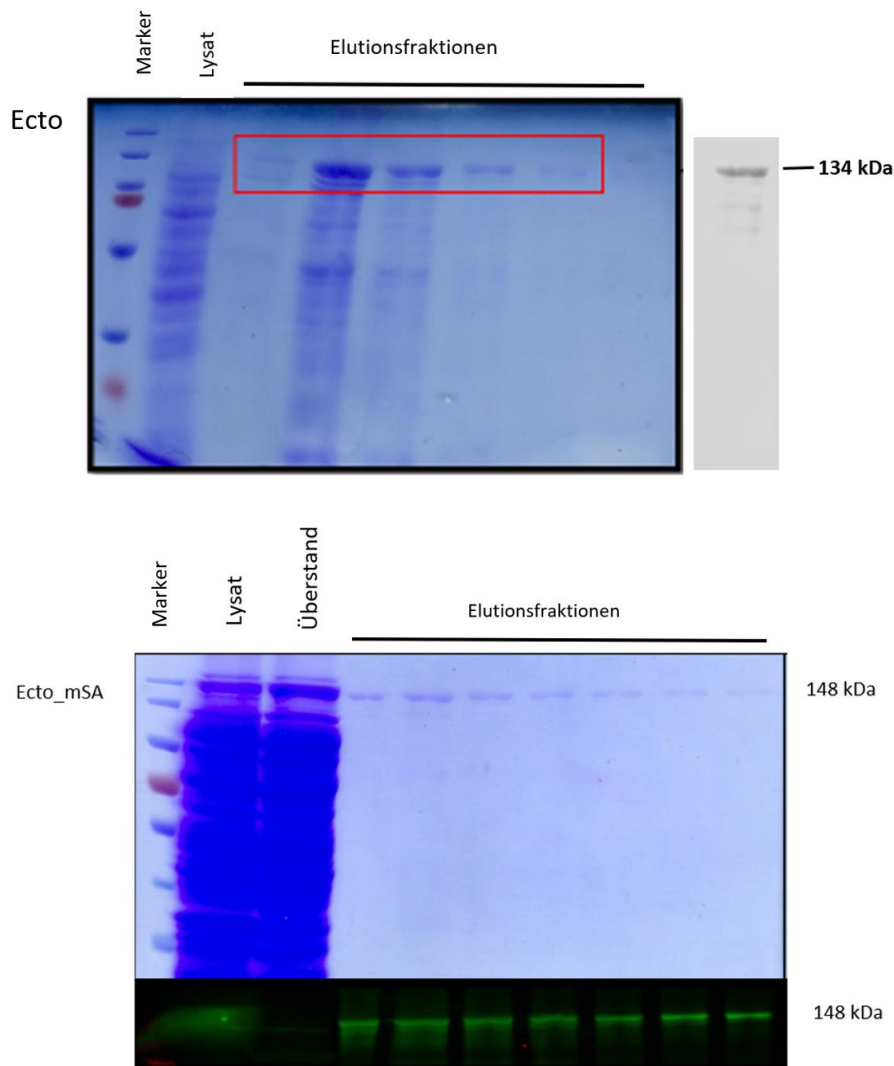


Abbildung 23: Proteinreinigung von rekombinantem Ecto und Ecto_mSA Protein mittels Affinitätschromatografie. Die Proteinreinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Alle Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Primärantikörper: Anti-SARS-CoV-2 Spike. Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen IRDye® 800CW. Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

4.1.3 Analyse der Rückfaltung von RBD_mSA

Die Rückfaltung mit Dialysepuffer 1 führt zu einem Verlust von 75% des löslichen Proteins. Während der Rückfaltung mit Dialysepuffer 2 kommt es zu einem Verlust von nur 5% des löslichen Proteins. Um die Rückfaltung der zwei verwendeten RBD_mSA zu analysieren, wurden mittels ELISAS untersucht inwieweit die rückgefalteten Proteine durch Patientenseren erkannt sind. Als Kontrolle dienten Seren von SARS-CoV2 negativen Spendern. Entsprechend der ELISA Ergebnisse wurde festgestellt, dass Rückfalten mit Dialysepuffer 2 (50 mM HEPES ,20 mM NaCl) zu überwiegend fehlgefalteten Proteinen führt (**Abbildung 24**).

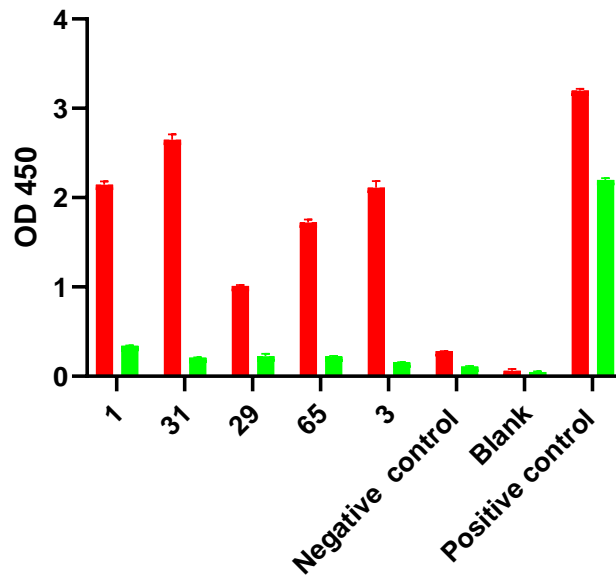


Abbildung 24: Analyse zur Bindung von Antikörpern der Patientenseren (P1, P31, P29, P65, P3) und des Negativserums an zwei verschiedene immobilisierte RBD_mSA mittels ELISA. Jedes Well der Mikrotiterplatte enthielt 0,5 µg RBD_mSA. Rot Rückfaltung mit Dialysepuffer 1, Grün Rückfaltung mit Dialysepuffer 2. Für den Blank wurde 10 % FCS verwendet. Die Detektion fand durch Verwendung des sekundärem Antikörper Anti-human IgG-HRP statt. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2, der durch den sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG-HRP detektiert wurde.

4.2 Produktion und Reinigung von TLMcapsiden:

Das TLM.core Protein wurde in *E. coli* produziert und mittels Streptactin-Affinitätschromatografie unter nativen Bedingungen gereinigt (**Abbildung 25**). Das aufgereinigte TLM.core liegt als Dimer, Monomere vor

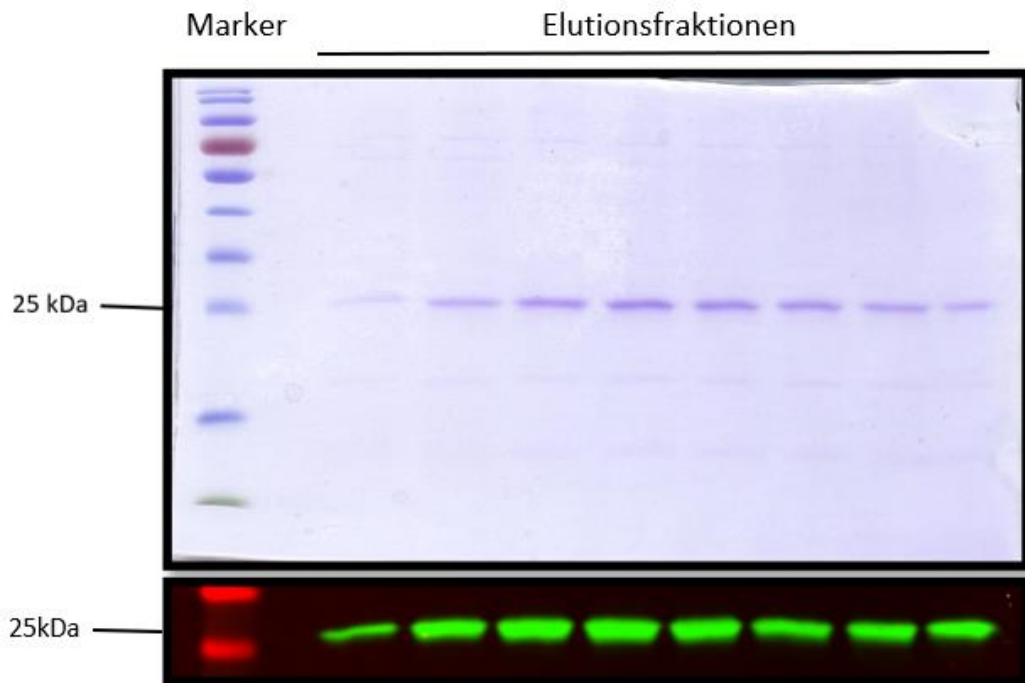


Abbildung 25: Proteinreinigung von rekombinantem TLM.core Protein mittels Affinitätschromatografie. Die Proteinreinigung wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Alle Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gel und Western Blot zeigen die Banden von TLM.core. Primärantikörper: Anti-Hepatitis-B-Virus Core MAB16990. Sekundärantikörper: Anti-Maus IRDye® 800CW.

4.3 In-Vitro-Assemblierung von TLM-Core Protein

Die Assemblierung der HBcAg-Dimere zu Capsiden wurde durch Zugabe von 400 mM NaCl im Dialysepuffer für 24 Stunden bei 4°C durchgeführt. Durch die Dialyse wurde auch Desthiobiotin von den Proben entfernt. Desthiobiotin musste entfernt werden, um die spätere Kopplung mit RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA nicht zu stören, da Desthiobiotin mit mSA um die Bindung des Strep-tags von TLM.core konkurriert. Mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde die Bildung von den TLM.core Capsiden analysiert (**Abbildung 26**).

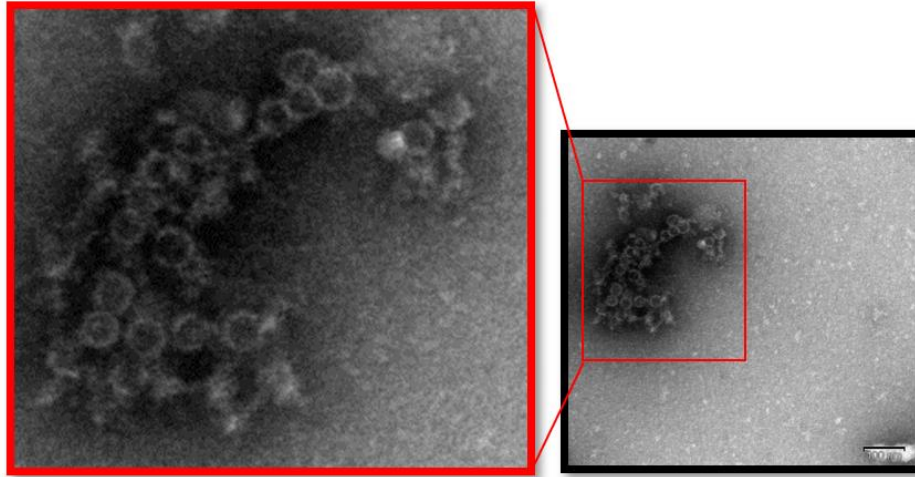


Abbildung 26: TEM-Aufnahme von assemblierten Capsiden. Der Dialysepuffer ist PBS mit 400 mM NaCl und einem pH-Wert von 7,4. Die assemblierten Capside wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gescannt. Maßstab = 100 nm

4.4 Kopplung von RDB-mSA oder ZIKV_mSA an die Oberfläche der Trägercapside

Nun musste untersucht werden, ob die Fusionsproteine RBD_mSA bzw. ZIKV.E_mSA an den Strep-TagIII auf der Oberfläche der Trägercapside binden können (**Abbildung 27**). Deswegen wurden die Capside in einem Verhältnis von 3:1 (Capsid:Antigen) mit dem jeweiligen Cargoantigen für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Kopplung wurde eine Sucroседichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Als Kontrolle wurde freies RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA aufgetragen. Nach 4 stündiger Zentrifugation bei +4°C und 40000 rpm wurden die Fraktionen von oben nach unten gesammelt und durch Western Blot analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte zwischen freiem RBD – mSA (40 kDa) bzw. mSA -ZIKA E (60 kDa) und Trägercapsiden (~ 6000 kDa für T = 4 und ~ 4600 kDa für T = 3) sollten diese in unterschiedlichen Fraktionen nachgewiesen werden. Die gekoppelten RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA sollten in Fraktionen mit höherem Sucrosegehalt zusammen mit den Capsiden detektiert werden (**Abbildung 28**).

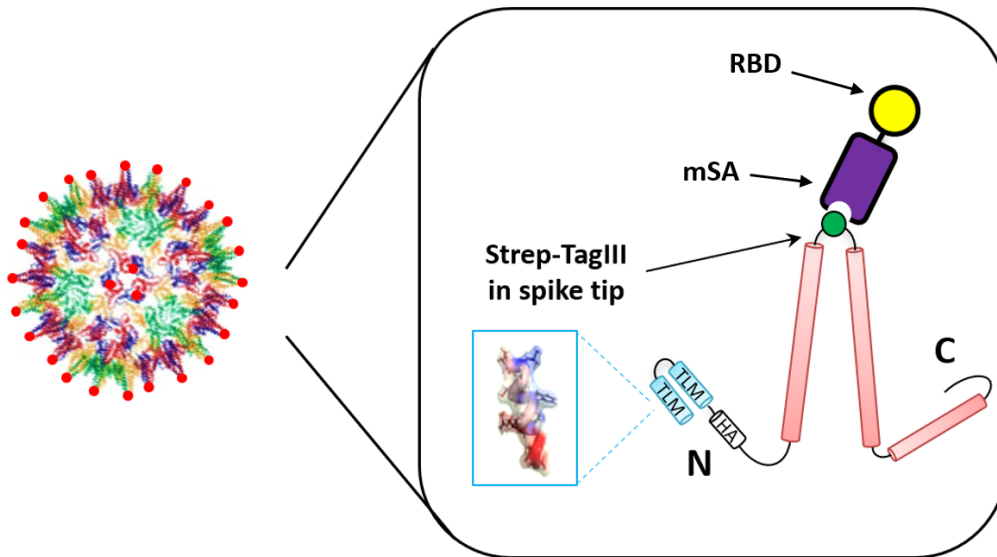


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Kopplung von RDB-mSA an die Oberfläche der Trägercapside. Das zellpermeable TLM.core besitzt ein 2xTLM am N-Terminus und ein Strep-tagIII im Spike-tip. Monomeres Streptavidin mSA dient als Adapterprotein für die Kopplung RDB an Strep -TagIII.

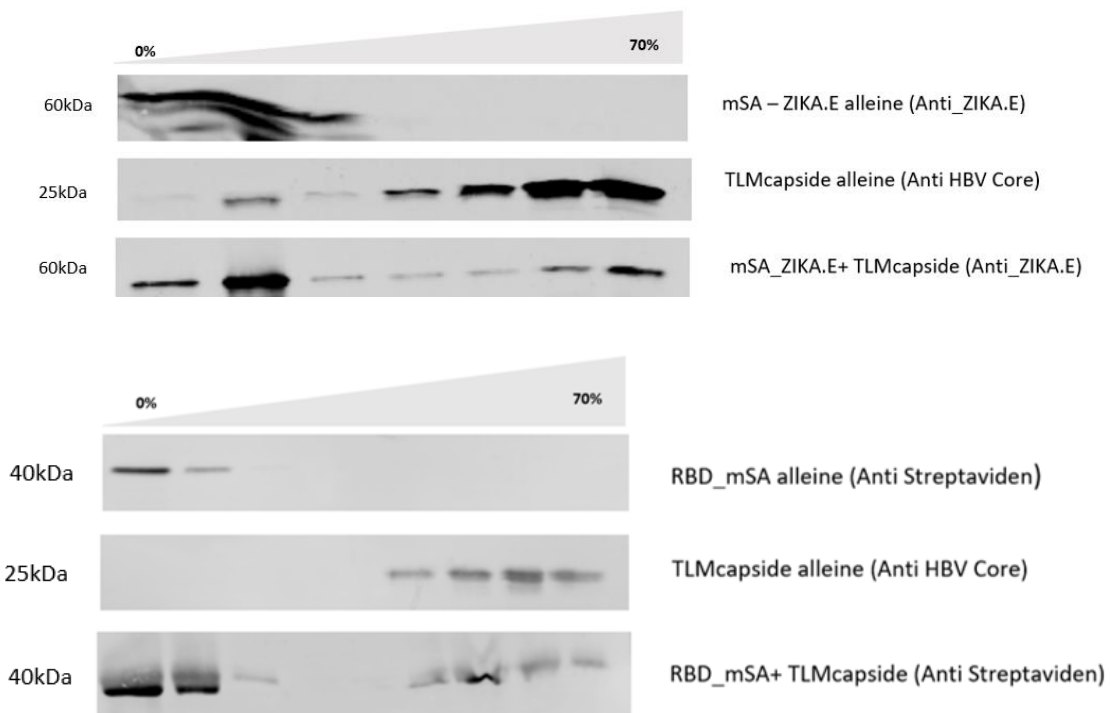


Abbildung 28: Kopplung von mSA_ZIKV.E und RBD_mSA an der Oberfläche der Trägercapside. Western Blot eines Sucrosedichtegradienten. TLM.capside konnten in Fraktionen mit höherer Dichte detektiert werden. Als Kontrolle wurde freies mSA_ZIKV.E und RBD_mSA ohne Kopplung mit Trägercapsiden auf den Saccharosegradienten geladen. Freies mSA_ZIKV.E und RBD_mSA kann nur in den ersten Fraktionen mit niedriger Dichte detektiert werden. Nach Kopplung von TLMcapsiden mit mSA_ZIKV.E oder RBD_mSA wird das Antigen in den Fraktionen mit höherer Dichte detektiert.

4.5 Die Induktion von spezifischem Antikörper durch In-Vitro Immunisierung:

Die In-Vitro Immunisierung wurde wie unter (3.9.2) beschrieben durchgeführt. Vier Tage nach der Immunisierung wurde eine Elektrofusion mit Myeloma Zellen durchgeführt, um die B-Zellen zu immortalisieren. Die elektrischen Pulse wurden in Elektroporationsküvetten mit den Gene Pulse Bedingungen 200 V, 25uF, 3Pulse durchgeführt (**Abbildung 29**). Danach wurden die Zellen mit 40 ml HAT/ RPMI 1640 Medium + IL6 verdünnt und in 96 Well-Platten ausplattiert.

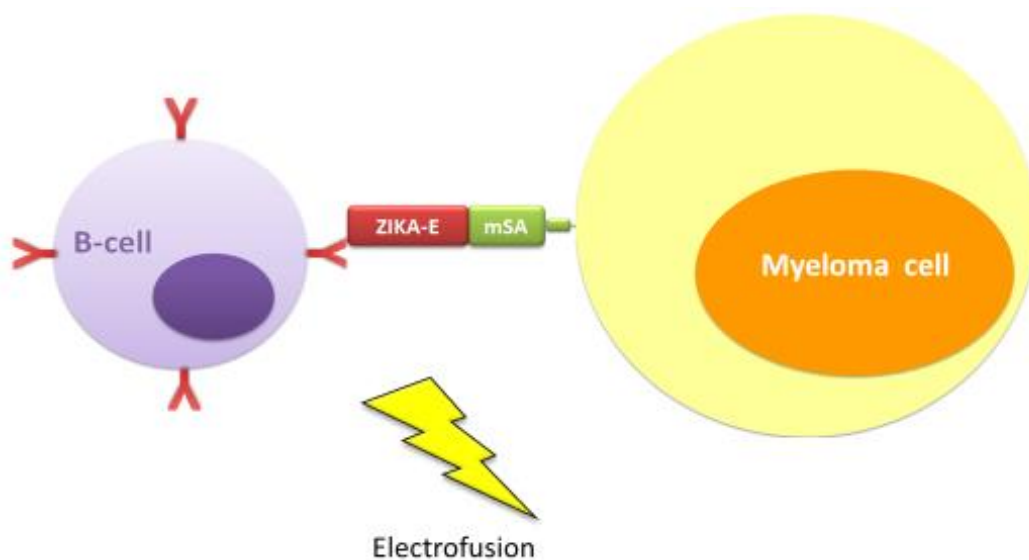


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Elektrofusion zwischen B-Zellen und Myeloma Zellen. Myeloma Zellen wurden in Sulfo-NHS-SS-Biotin-Lösung inkubiert, um eine Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen auszuführen. Danach erfolgt die Inkubation der biotinylierten Myelomzellen mit (RBD-mSA oder mSA- ZIKV.E) Protein. Monomerische Streptavidin Binding mit Biotin in Zelloberflächen. Anschließend wurden die B-Zellen mit Myeloma für eine Stunde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Puffer niedriger Ionenstärke gewaschen und resuspendiert. Die elektrischen Pulse wurden in Standarden Bio-Rad- 0.4 cm Elektroporationsküvetten durchgeführt.

4.5.1 In-Vitro Immunisierung mit gekoppelten TLM.Trägercapsiden führt zur besseren Produktion von Antikörpern

4 Tage nach der In-Vitro Immunisierung wurden ELISAs durchgeführt, um die Antikörper im Überstand zu detektieren und zu quantifizieren. Dazu wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4°C mit 0,5 g/ml (RBD-mSA oder ZIKV.E_mSA) immobilisiert. Als Positivkontrolle für die ELISAs wurden polyklonale Kaninchenserum Anti ZIKV.E oder Anti Spike -SARS-CoV-2

verwendet. Die Grafik zeigt deutlich, dass der höchste Antikörper-Spiegel nach In-Vitro Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden gefunden wurde (**Abbildung 30**).

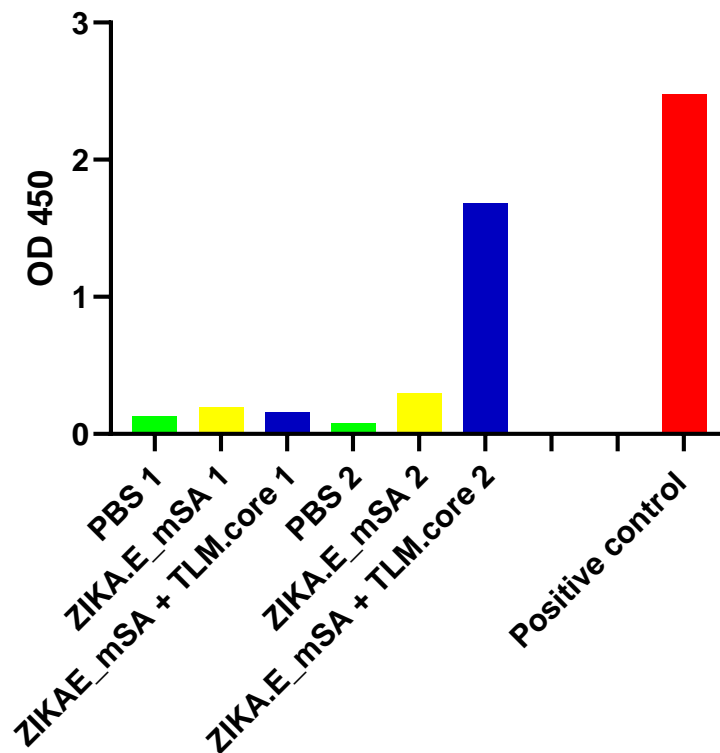


Abbildung 30: Nachweis von Anti ZIKV.E_mSA Antikörpern 4 Tage nach In-Vitro Immunisierung. 1 ist prime Immunisierung und die 2 ist boost (zwei Tage nach Prime). Die Säulendiagramme: Grüne Säule Immunisierung mit PBS, Gelbe Säule Immunisierung nur mit ZIKV.E_mSA, Blaue Säule Immunisierung mit TLM.core gekoppelt mit ZIKV.E_mSA. 96 Mikrotiterplatte wurde mit 0,5 µg / Well mSA_ZIKA. E Protein beschichtet. 50 µl Lymphozytenüberstand wurde entnommen und auf ELISA Platten gegeben. Als Negativkontrolle dient der Überstand von Lymphozyten, die nur mit PBS immunisiert wurden. Polyklonale Antikörper K87 Anti ZIKV.E dienen als positive Kontrolle. Sekundäntikörper war HRP-gekoppelter Anti-Maus IgG (H+L).

4.5.2 ELISA zum Testen der Fusionen:

Dazu wurde das Antigen in ELISA Platten immobilisiert. Danach wurde der Überstand der Vertiefungen untersucht, um die positiven Klone nach der Fusion herauszufinden (**Abbildung 31,32**). Um die Anzahl der Klone etwas einzugrenzen, wurden nur Klone mit hohem Signal weiter kultiviert.

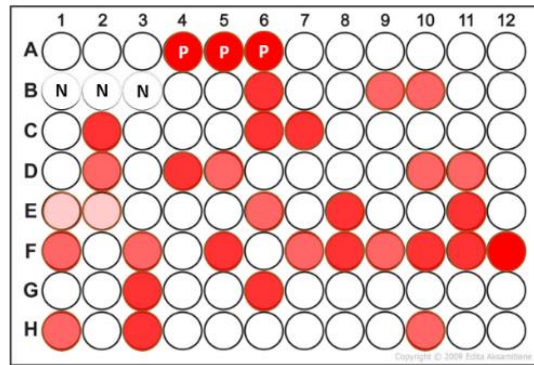


Abbildung 31: Schematische Darstellung der 96 Well Platten nach ELISA Untersuchung. 15 Tage nach v HAT Selektion wurde ELISA durchgeführt, um die Antikörper gegen ZIKV.E in Überstand zu detektieren. Rot: Positive Klone, helles Rot: mittel positive Klone, Rosa: leichte positive, Weiß: negative Klone, **P**: Positivkontrolle, **N**: Negativkontrolle. Die stark positiven Klone wurden weiterkultiviert und untersucht.

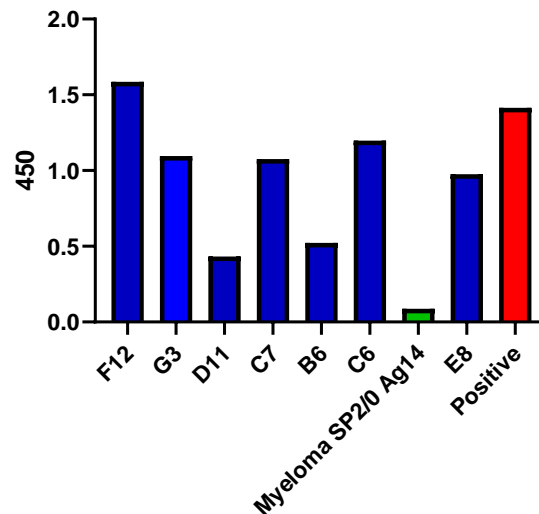


Abbildung 32: Nachweis von Anti ZIKA E Antikörpern im Hybridomaüberstand mittels ELISA. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit 0,5 µg / Well ZIKA. E Protein ohne mSA beschichtet. 50 µl Hybridomaüberstand wurde entnommen und auf ELISA Platten gegeben. Die Säulendiagramme F12, G3, D11, C7, B6, C6, E8 zeigen die positiven Klone. Als Negativkontrolle dient der Überstand von Myeloma SP2/0 Ag 14 Zellen. Polyklonale Antikörper K87 Anti - ZIKA E dienen als positive Kontrolle. Sekundärantikörper war HRP-gekoppeltes Anti-Maus IgG.

4.7 Subklonierung von Hybridoma Zellen

Subklonierungen wurden durchgeführt, um die Monoklonalität des Antikörpers sicherzustellen. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen durchgeführt und die Zellen auf 96 Zellkulturplatten ausgesät, um nur 0.5 Zellen pro Vertiefung zu erhalten. Für ZIKA.E wurde der Klon F12 verwendet. Nach der Subklonierung wurde der Klon F12C8 verwendet. Für die Subklonierung der RBD Klone wurde der Klon G1 benutzt. Überstände der Klone nach der zweiten Klonierung wurden mittels ELISA getestet. Nach der dritten Subklonierung wurde

nochmals der Klon H12 isoliert. 15 Tage nach der Subklonierung wurden die Klone mittels ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper gegen das RBD oder ZIKV.E getestet.

4.8 Antigen-spezifische Affinitätsreinigung ZIKV.E-spezifischer monoklonaler Antikörper von Hybridoma

Das an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelte rekombinante in *E. coli* hergestellte ZIKV.E_mSA Protein wurde benutzt, um die spezifischen Antikörper gegen ZIKV.E anzureichern. Nach Reinigung der Antikörper wurde ein ELISA durchgeführt, um die Bindungskapazität der gereinigten Antikörper zu prüfen (**Abbildung 33**).

Bis zu einer Verdünnung von 1:12800 konnte eine Bindung nachgewiesen werden.

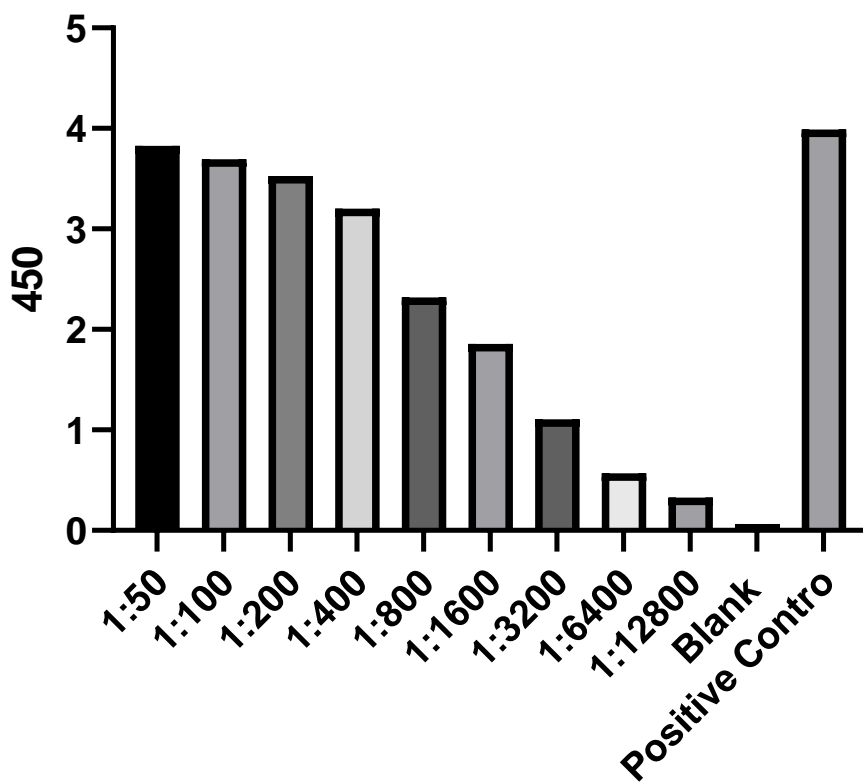


Abbildung 33: Nachweis der Bindungskapazität der gereinigten monoklonalen Antikörper des Hybridoma an die ZIKV.E ohne mSA durch ELISA. Eine antigenspezifische Affinitätsreinigung des Hybridomaüberstands des Klons F12 C8 wurde durchgeführt. Eine Reihenverdünnung der gereinigten Antikörper wurde angewendet. Für die Leerkontrolle wurde 10 % FCS verwendet. Das polyklonale Antiserum K87 Anti - ZIKA E diente als Positivkontrolle. Als Sekundärantikörper diente HRP-gekoppeltes Anti-Maus IgG bzw. bei der Positivkontrolle HRP-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG.

4.9 Anreicherung von Antikörpern gegen die RBD des Spike Proteins von SARS-CoV2 durch Ammoniumsulfat-Fällung

Um die Bindungskapazität von Antikörpern gegen das Spike Protein von SARS-CoV2 zu überprüfen, die mittels Ammoniumsulfat-Fällung angereichert worden waren, wurden ELISAs unter Verwendung des immobilisierten RBD Proteins durchgeführt (**Abbildung 34**).

Bis zu einer Verdünnung von 1:12800 konnte eine Bindung nachgewiesen werden.

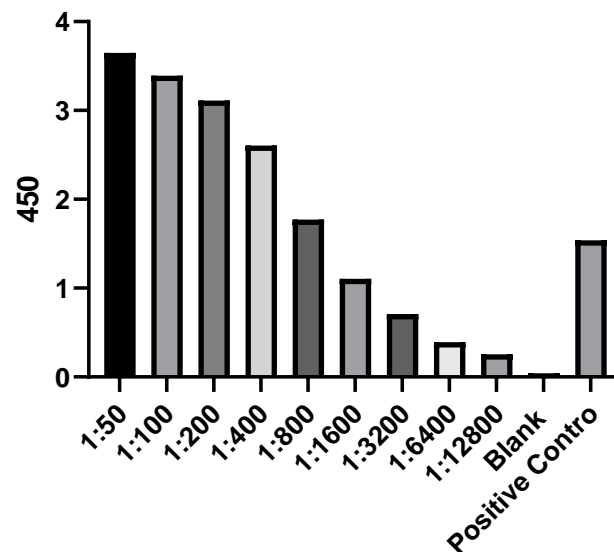


Abbildung 34: Nachweis der Bindungskapazität der gereinigten monoklonalen Antikörper des Hybridoma an die RBD Domäne von SARS-CoV-2 durch ELISA. Reihenverdünnungen der mittels Ammoniumsulfatfällung angereicherten Antikörper wurden angewendet. Für die Leerkontrolle wurde 10 % FCS verwendet. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2. Sekundärantikörper war HRP-gekoppelter Anti-Maus IgG(H+L).

4.10 Humorale Immunantwort nach Immunisierung von Kaninchen mit RBD_mSA:

Die nach Immunisierung von zwei Kaninchen erhaltenen Seren wurden in einem selbstentwickelten ELISA unter Verwendung von immobilisiertem RBD-Protein oder S1 Domäne hinsichtlich des Antikörpertiters untersucht. Als Kontrollen für die methodische Funktionalität des ELISA wurden der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2 als Positivkontrolle und 10% FCS als Negativkontrolle verwendet. Es zeigte sich, dass das höchste Antikörper-Level nach Immunisierung gegen RBD gefunden wurde (**Abbildung 35**). Außerdem wurde nachgewiesen, dass das Antikörper-Level gegen RBD in K50 und K40 fast identisch ist. Das Signal im Fall der S1 Proteine zeigt geringe Werte im Vergleich zu RBD. Allerdings ist der Antikörper-Spiegel im Kaninchen K50 besser als bei K40 im Fall der S1 Domäne als Antigen (**Abbildung 36**).

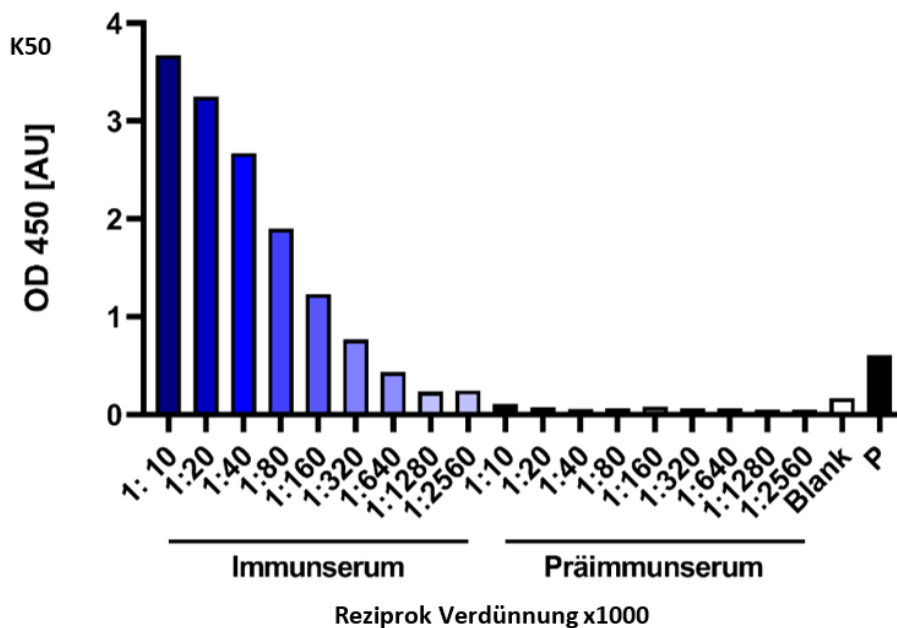
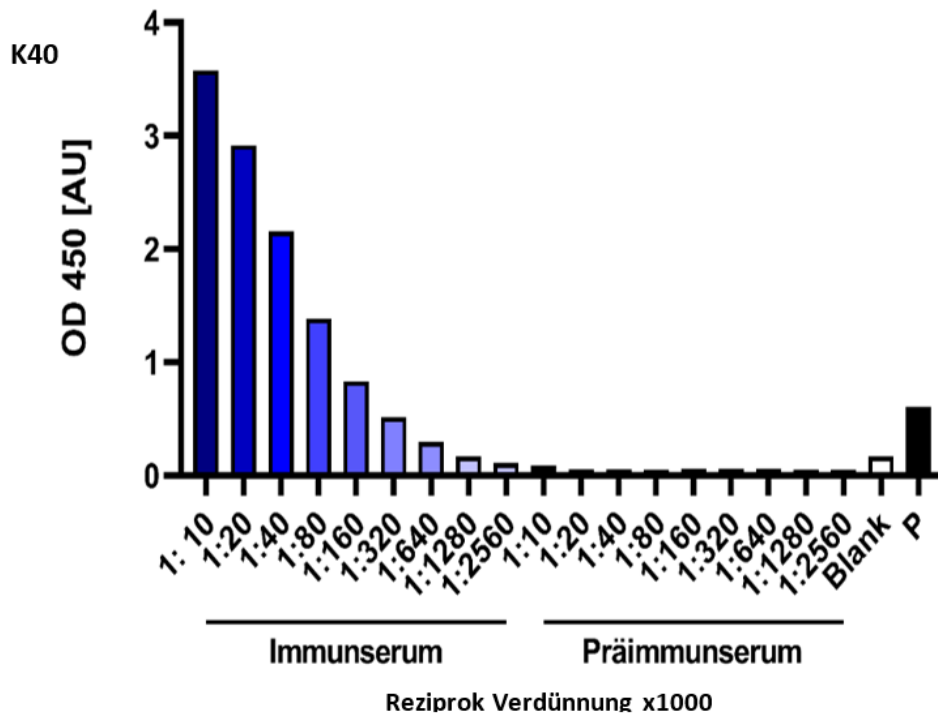


Abbildung 35: Quantifizierung spezifischer Antikörper von immunisierten Kaninchen gegen die RBD von SARS-CoV-2. Die Kaninchen K40 und K50 wurden mit 1,5 mg RBD-mSA immunisiert. Das Serum der Kaninchen wurde vor der ersten Immunisierung (Präimmuneserum) und nach der prime Immunisierung mittels selbstentwickeltem Anti-RBD-spezifischem ELISA untersucht. In jedem Well der Mikrotiterplatte befand sich 0,5 µg der RBD. Die Seren wurden zunächst um den Faktor 1000 verdünnt. Für die Leerkontrolle wurde 10 % FCS verwendet. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2. Sekundärantikörper war HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG(H+L) Antikörper.

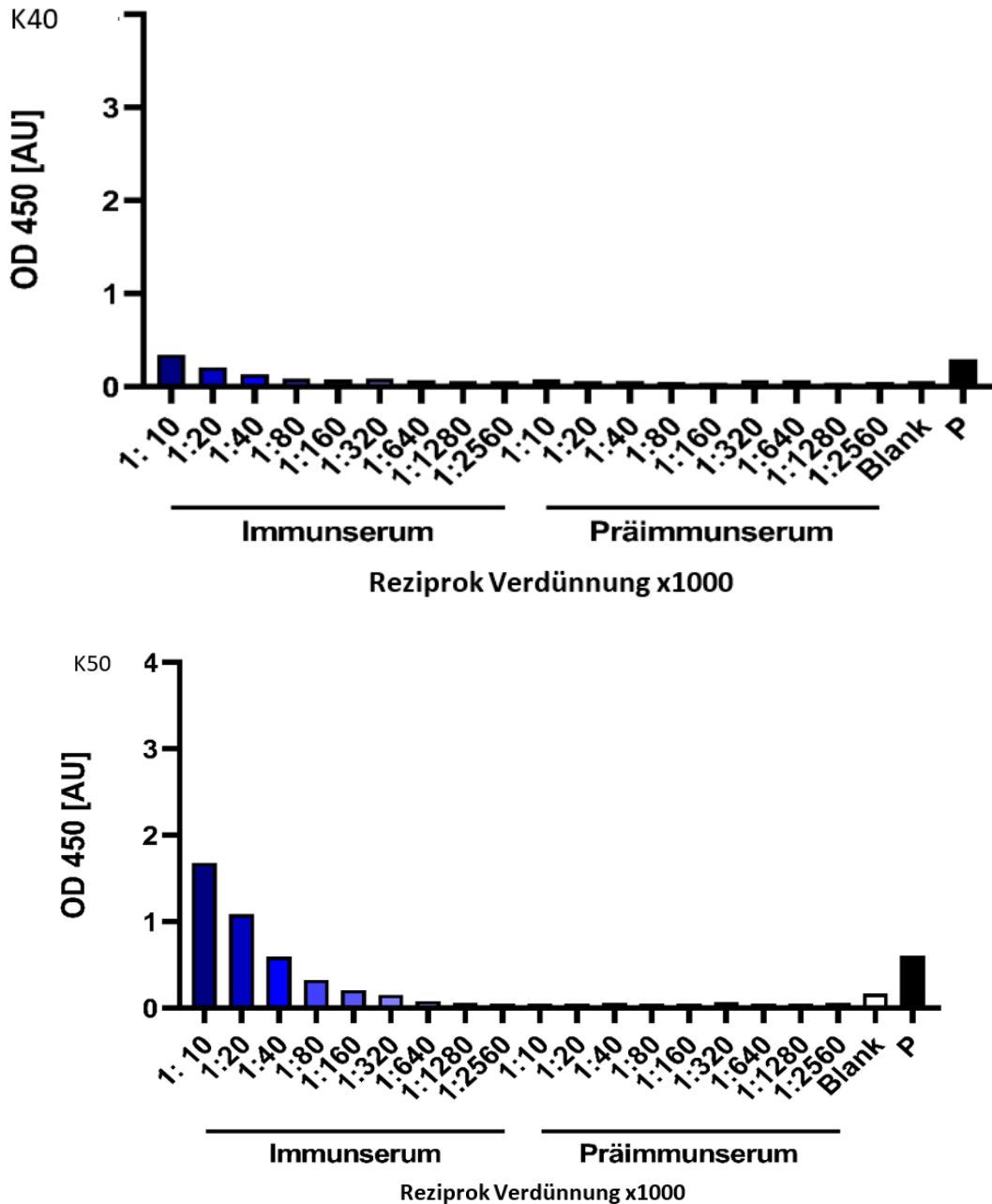


Abbildung 36: Quantifizierung spezifischer Antikörper immunisierter Kaninchen gegen die S1 Domäne von SARS-CoV-2. Die Kaninchen K40 und K50 wurden mit 1,5 mg RBD-mSA immunisiert. Das Serum der Kaninchen wurde vor der ersten Immunisierung (Präimmunserum) und nach der prime Immunisierung mittels selbstentwickeltem Anti S1 spezifischem ELISA untersucht. In jedem Well der Mikrotiterplatte befand sich 0,5 µg der S1 Protein von E. coli. Die Seren wurden zunächst um den Faktor 1000 verdünnt. Für die Leerkontrolle wurde 10 % FCS verwendet. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2. Sekundärantikörper war HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG (H+L) Antikörper.

4.11 Antigen-spezifische Affinitätsreinigung von Kaninchen:

Das an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelte RBD Protein, das rekombinant in E-coli hergestellt worden war, wurde benutzt, um die spezifischen Antikörper gegen RBD zu isolieren. Nach der Aufreinigung der Antikörper von Kaninchen K40 wurde Elisa durchgeführt, um die Bindungskapazität der gereinigten polyklonalen Antikörper zu prüfen (**Abbildung 37**).

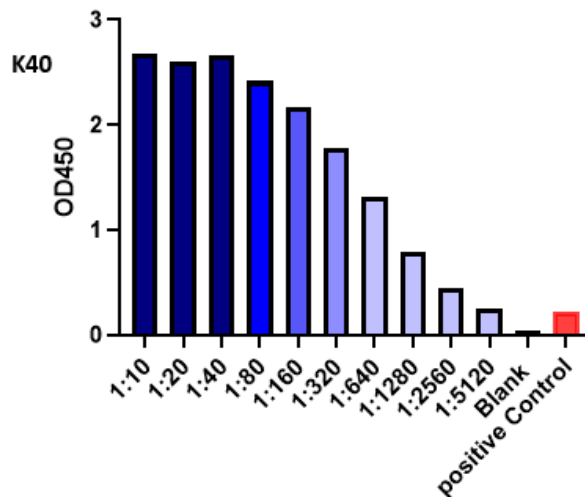
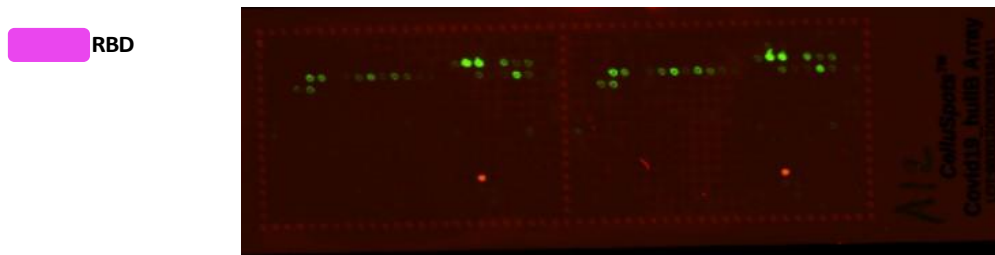


Abbildung 37: Nachweis der Bindungskapazität der gereinigten Kaninchen Antikörper an die RBD Domäne von SARS-CoV-2 durch ELISA. Reihenverdünnungen der gereinigten Kaninchen Antikörper K40 wurden angewendet. Für die Leerkontrolle wurde 10 % FCS verwendet. Als Positivkontrolle diente der Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2. Sekundärantikörper war HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG (H+L) Antikörper.

4.12 Epitop-Kartierung:

Zur Bestimmung der sequentiellen Epitope von RBD, welche von gereinigten polyklonalen Antikörpern von Kaninchen erkannt werden, wurde ein Peptidspot-Array verwendet. Die Detektion wurde mit dem Fluoreszenzscanner Odyssey von LI-COR ausgeführt (**Abbildung 38**). Die Bindungsstellen wurden in grün gezeigt.



MASQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFG
 TTLDSKTQSLIVNANNATNVVIVKCEFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYV SQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKI
 YSKHTPINLVRLDPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTLLKYNNENGTITDAVDCALDPLSEKCTL
 KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGGEVFNATRFASVYAWNRRKISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIR
 GDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFRKSNLKPFRDISEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLOS YGFQP
 TNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNINFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSF GGVS
 ITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAHEVNNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIAY
 TMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPI
 KDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAA
 LQIPFAMQMAYRFNGIGVTVQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVNLNLDLSRLDKVEAE
 VQIDRLITGRQLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNF TAPAICHGDK
 AHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGVNNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDISGINASV VNIQKEI
 DRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP

Abbildung 38: Bestimmung der Bindungsstellen der gereinigten polyklonalen Antikörper aus Kaninchenserum. Das Microarray enthält die Peptidsequenz von der Ecto-Domäne von SARS-CoV-2. Die Peptidspot-Arrays wurden mit den gereinigten polyklonalen Antikörpern von Kaninchen inkubiert. Fluorophor-konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper dienten als Sekundärantikörper. Die Detektion wurde mit dem Fluoreszenzscanner Odyssey von LI-COR durchgeführt. Die Signale im Bereich der Rezeptorbindedomäne (Rosa) wurden detektiert. Bindungsstellen der polyklonalen Antikörper wurden in Rot dargestellt.

4.13 Isotypenbestimmung

Mittels Western Blot wurde eine Isotypbestimmung durchgeführt. Die monoklonalen Antikörper des Klons F12C8 (Anti ZIKV.E) gehören dem Isootyp IgG an. Der Klon H12 (Anti RBD) besitzt eine schwere Kette des Isootyps IgM (**Abbildung 39**).

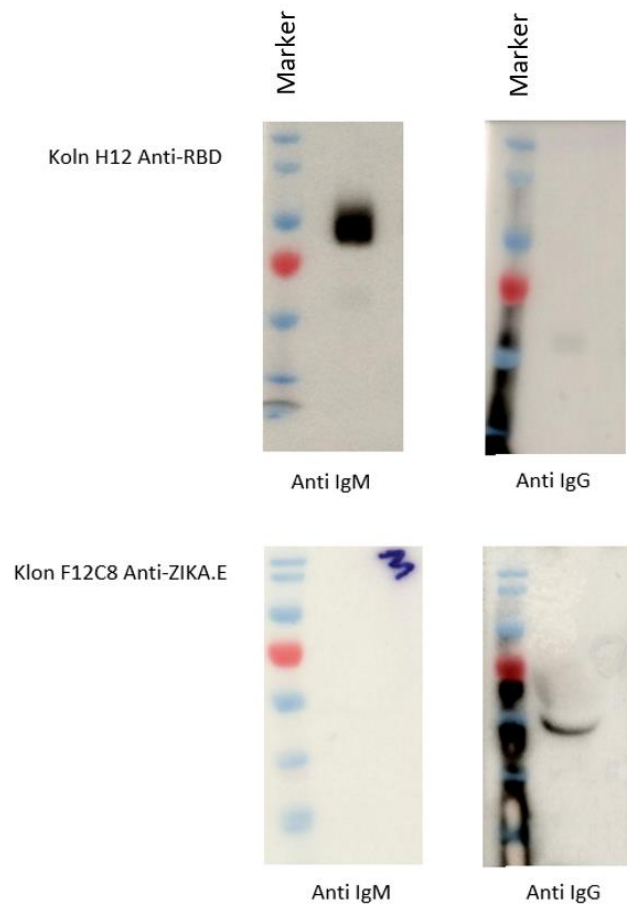


Abbildung 39: Isotypenbestimmung: Überstand von Hybridoma wurde auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Isotyp von Anti RBD ist IgM und der Isotyp von Anti ZIKV.E ist IgG. Antikörper sind HRP-gekoppelter Anti-Maus IgM (Heavy chain) oder HRP-gekoppelter Anti-Maus IgG.

4.14 Immunfluoreszenzmikroskopie:

Um die Eignung der gewonnenen Immunsereen/monoklonalen Antikörper für Immunfärbungen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Für den ZIKV-E-spezifischen Antikörper (Klon F12) wurden Vero Zellen, die mit den ZIKV Isolaten Uganda oder Polynesia infiziert worden waren, verwendet. Uninfizierte Vero Zellen dienten als Negativkontrolle. Die mittels CLSM durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen eine deutliche positive Reaktion im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (**Abbildung 40**). Für die Detektion von SARS-CoV-2 Antigenen wurden die transfizierten Hek293T Zellen, die mit Plasmiden, die entweder für die RBD oder die Ecto Domäne kodieren, transfiziert und mit Formaldehyd (Konformationelle Epitope bleiben erhalten) oder Ethanol/Aceton (für die Detektion sequentieller Epitope) fixiert und danach gefärbt. Im Gegensatz zu den positiven Zellen konnte in den nicht transfizierten Zellen kein intrazelluläres Signal detektiert werden (**Abbildung 41,42,43,44**).

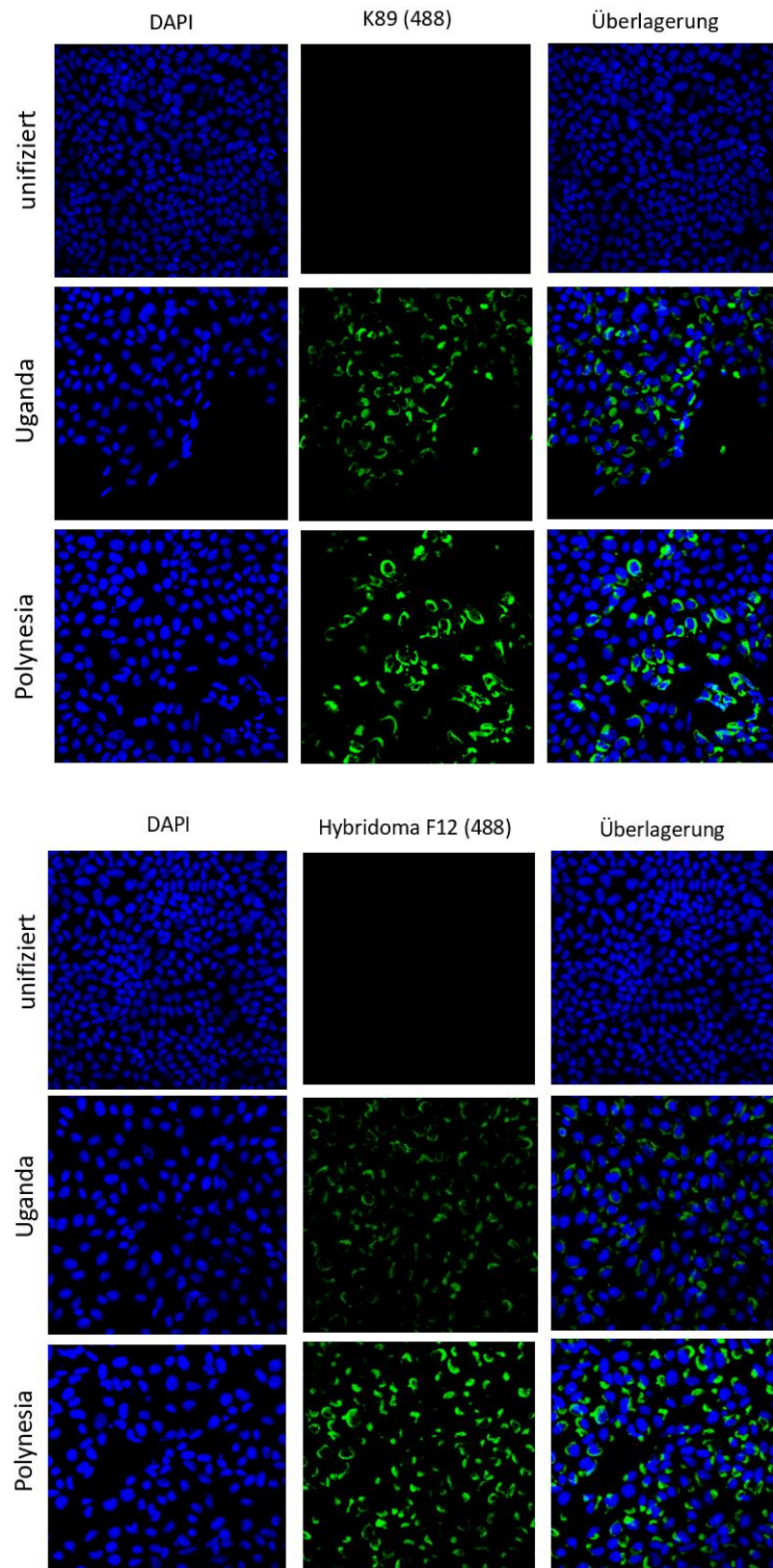


Abbildung 40: Immunfluoreszenzmikroskopie, Erkennung von ZIKV E-Protein in infizierten Zellen durch den Hybridomaüberstand (Klon F12). Nach Fixierung der Zellen wurden die infizierten oder nicht infizierten Vero Zellen mit Überstand des Hybridoma Klon F12 für eine Stunde bei RT inkubiert. Polyklonale Antikörper K87 Anti - ZIKA E dienten als Positivkontrolle. Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper und DAPI wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

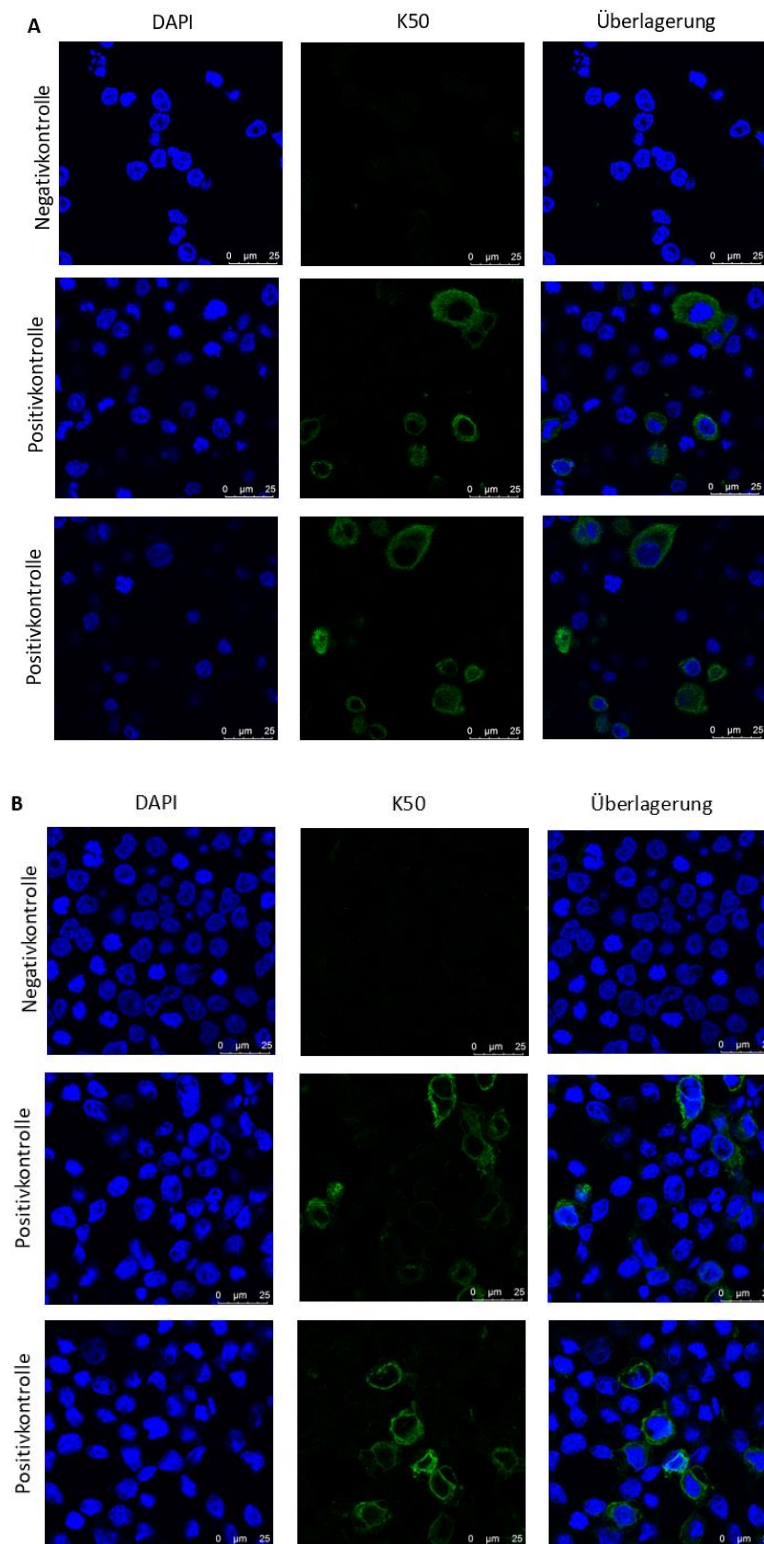


Abbildung 41: Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen, die mit einem für die Ecto-Domäne von SARS-CoV-2 spike kodierenden Plasmid transfiziert worden waren. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Formaldehyd (A) oder Ethanol/Aceton (B). Um die Zellen nach der FA-Fixierung zu permeabilisieren, wurden sie für 15 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert. Die transfizierten oder nicht-transfizierten Hek293T Zellen wurden mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Kaninchenserum K50 (Anti-RBD) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Inkubation mit Fluorophor-konjugiertem Sekundäntikörper und DAPI erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

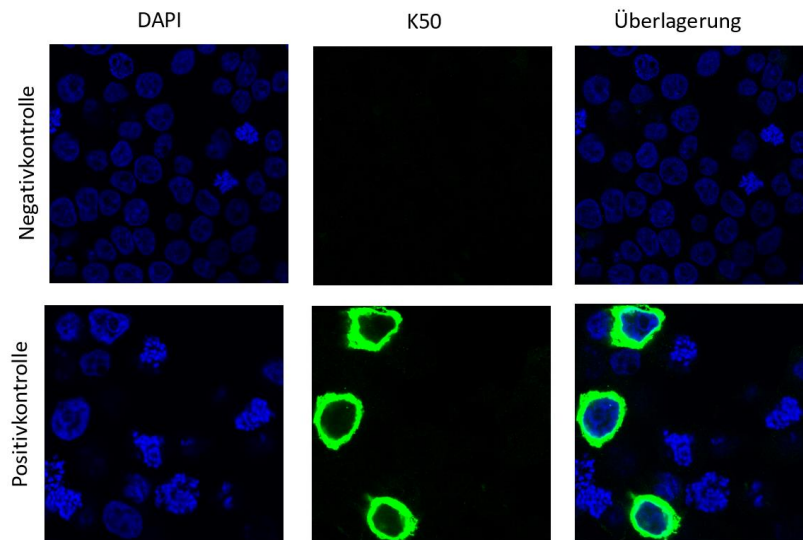


Abbildung 42: Immunfluoreszenzmikroskopie, Erkennung von RBD Protein in transfizierten Zellen mit Plasmid kodiert für RBD Domäne von SARS-CoV-2. Die Fixierung der Zellen war mit Formaldehyd. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie für 15 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert. Die transfizierten oder nicht transfizierten Hek293T Zellen wurden mit selbst hergestellten polyklonalen Kaninchen K50 Anti-RBD Antikörpern für eine Stunde bei RT inkubiert. Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper und DAPI wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

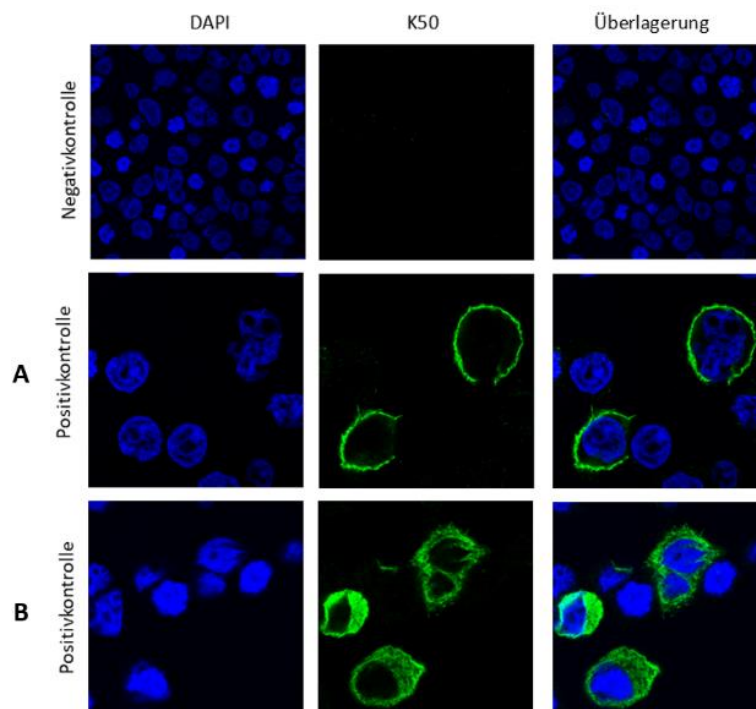


Abbildung 43: Immunfluoreszenzmikroskopie, Erkennung von Ecto Protein in transfizierten Zellen mit Plasmid kodiert für Ecto-Domäne von SARS-CoV-2. Die Fixierung der Zellen war mit Formaldehyd **A** oder mit Ethanol/Aceton **B** und ohne permeabilisieren mit Triton X-100. Die transfizierten oder nicht transfizierten Hek293T Zellen wurden mit selbst hergestellten polyklonalen Kaninchen K50 Anti-RBD Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper und DAPI wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

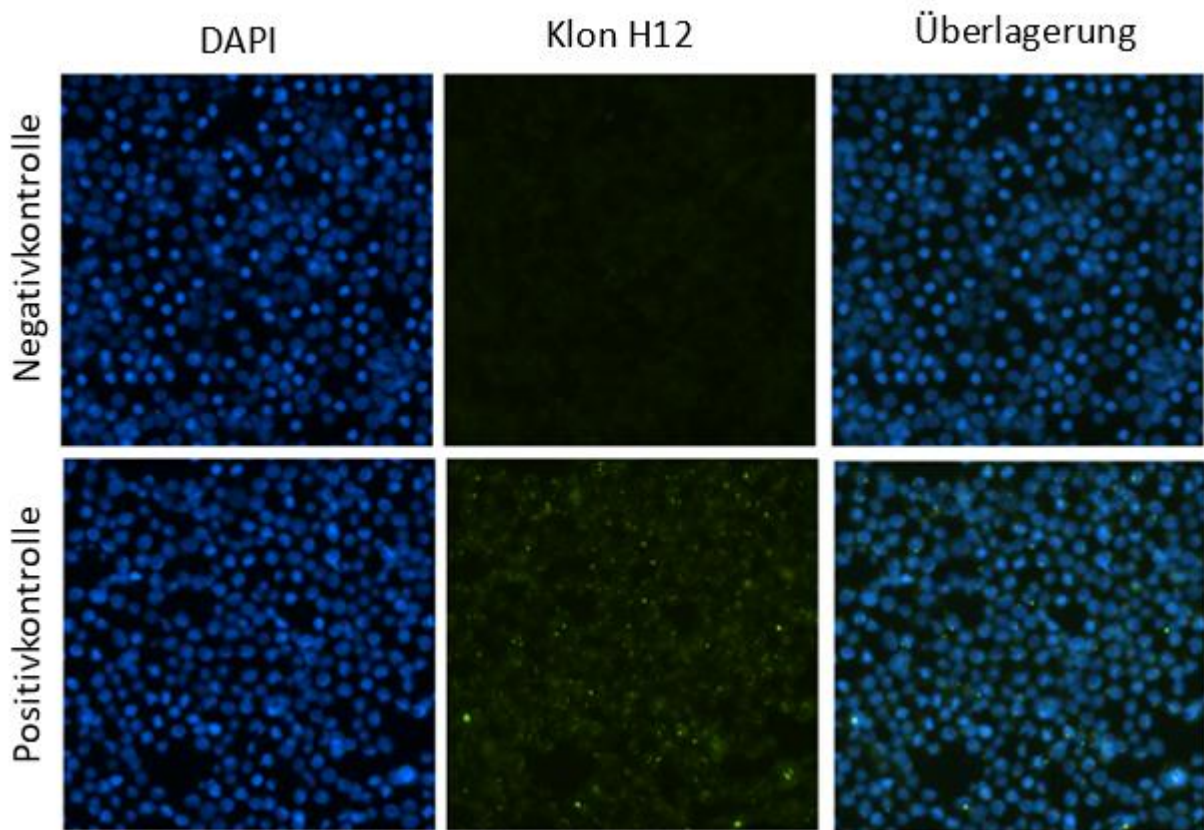


Abbildung 44: Immunfluoreszenzmikroskopie, Erkennung von Ecto Protein in transfizierten Zellen mit Plasmid kodiert für Ecto-Domäne von SARS-CoV-2. Die Fixierung der Zellen war mit Ethanol/Aceton. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie für 15 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert. Die transfizierten oder nicht transfizierten Hek293T Zellen wurden mit dem Überstand von Hybridoma Klon H12 für eine Stunde bei RT inkubiert. Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper Anti-Maus IgM (schwere Kette) Alexa Fluor 488 und DAPI wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

4.15 Western Blot mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern

Die Überstände des Subklons H12 (anti-RBD) wurden in den Verdünnungen 1:100 (in Blocklösung 1% BSA in PBS) getestet. Als Negativkontrolle wurde Zell-Lysat von Rosetta™(DE3) pLysS, die mit Plasmid PET 21a RBD transfiziert aber nicht mit IPTG induziert waren, verwendet. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes RBD Protein benutzt (**Abbildung 45,46**).

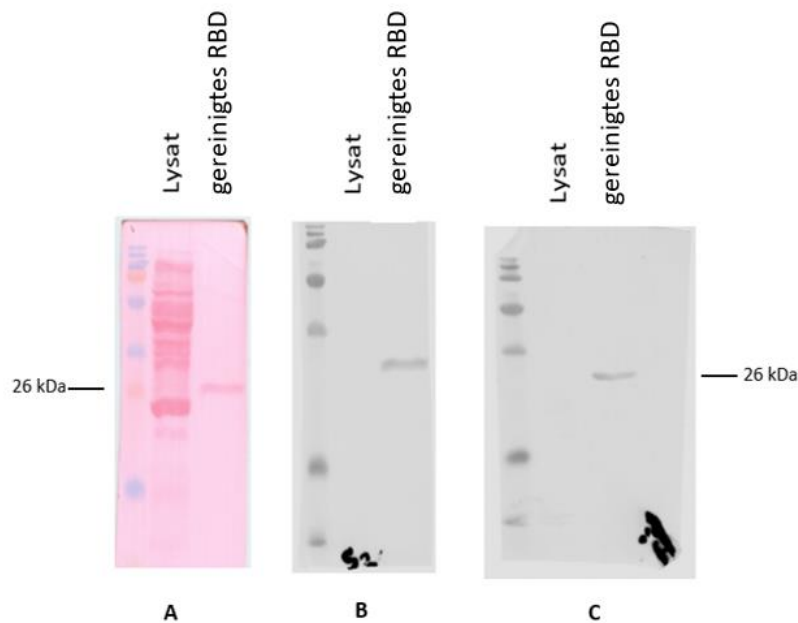


Abbildung 45: Western Blot mit monoklonalen Antikörpern: Als Negativkontrolle wurde Lysat verwendet, das kein RBD Protein enthält. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes RBD Protein benutzt. A) Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt. B) die Membran wurde mit dem Primärantikörper Anti-Spike SARS-CoV-2 inkubiert. C) die Membran wurde mit Überstand des Hybridoma Klons H12 nach Verdünnungen 1:100 inkubiert. Als Sekundärantikörper dient Anti-MausIRDye® 800CW.

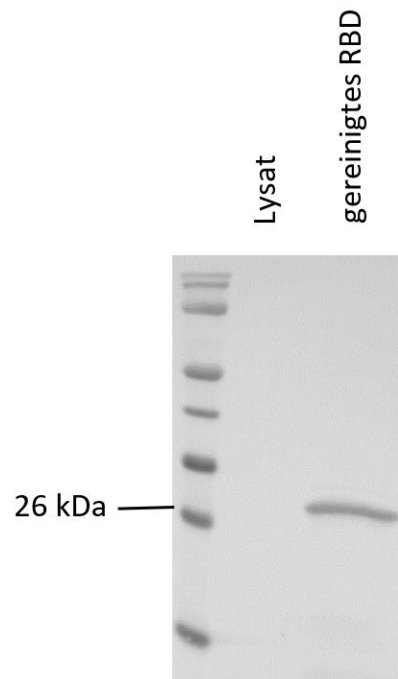


Abbildung 46: Western Blot mit polyklonalen Antikörpern von Kaninchen K 50: Als Negativkontrolle wurde Lysat verwendet, das kein RBD Protein enthält. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes RBD Protein benutzt. Die Membran wurde mit Antikörpern von Kaninchen K 50 in Verdünnungen 1:1000 inkubiert. Als Sekundärantikörper dient Anti-Kaninchen IRDye® 800CW.

4.16 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Um die Bindungsaffinität von Antikörpern an das RBD und S1 Domäne von SARS-CoV-2 oder ZIKV.E zu bestimmen, wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) unter Verwendung eines Biacore Systems angewandt. RBD-mSA oder ZIKV.E wurde auf einem CM5-Chip immobilisiert und die Antikörper in verschiedenen Verdünnungen über die Chips gegeben. Als Negativkontrolle dienten die Durchflusszellen FC-1, die kein immobilisiertes Protein aufwiesen. Als Lauf-Puffer wurde PBS, pH=7,1, 0,05% Tween20 und 3 mM EDTA benutzt. Die Messungen zeigen deutlich, dass Antikörper dosisabhängig an immobilisiertes Protein binden (**Abbildung 47,48,49**).

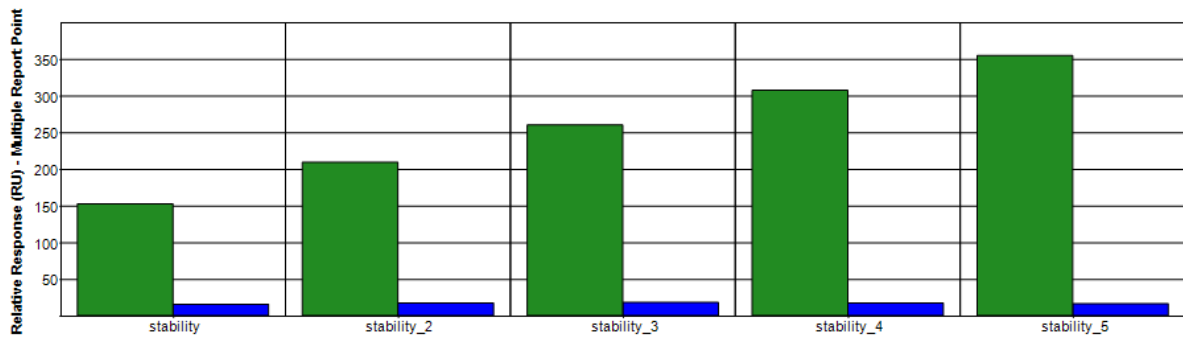


Abbildung 47: SPR-Analyse zur Bindung von Antikörpern der Hybridoma Klone F12C8 an ZIKV.E mSA. ZIKV.E_mSA Protein wurde auf CM5-Chips immobilisiert. Der Überstand wurde gegen PBS, pH=7,1, 0,05% Tween20 und 3 mM EDTA dialysiert und mit verschiedenen Verdünnungen (100%,50%,25%,12,5%, 6,25%) inkubiert. Als Negativkontrolle dient das Medium. Die Bindung des Antikörpers an das Protein ist konzentrationsabhängig.

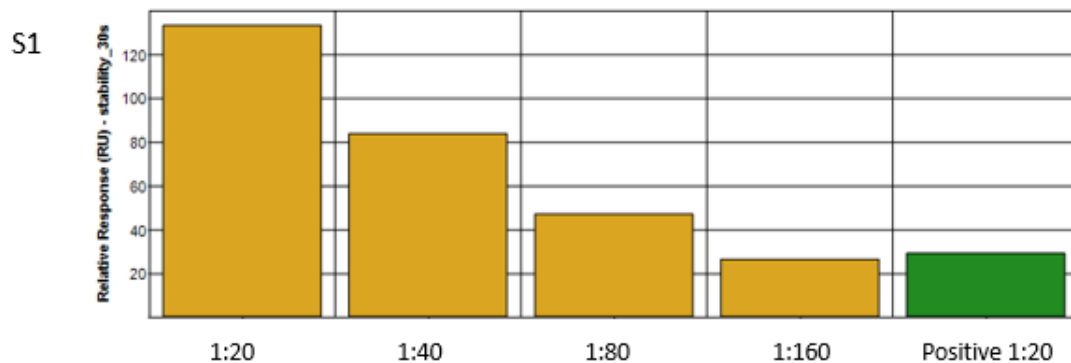
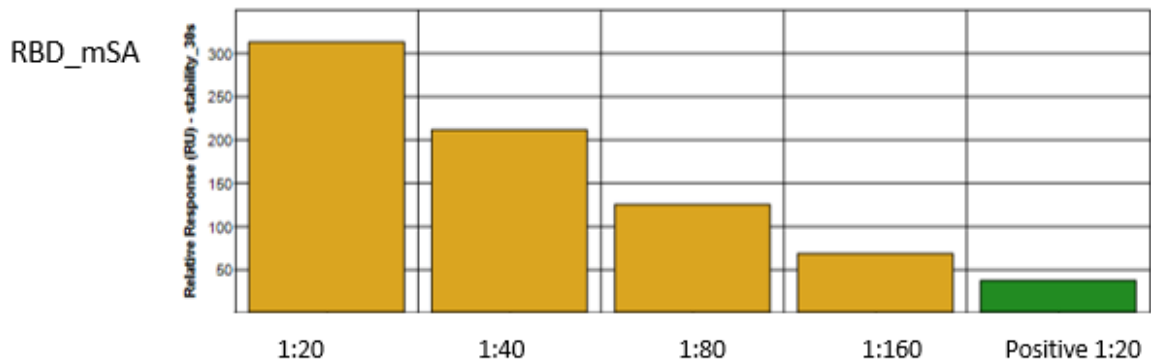


Abbildung 48: SPR-Analyse zur Bindung von Antikörpern der Hybridoma Klone G1 an RBD_mSA oder S1 Protein. RBD_mSA oder S1 Protein wurde auf CM5-Chips immobilisiert. Aufreinigung von Anti-RBD Antikörpern wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Anschließend wurde mit verschiedenen Verdünnungen (1:20,1:40,1:80,1:160) inkubiert. Als Positivkontrolle diente Anti Spike -SARS-CoV-2 in Verdünnung von (1:20). Die Bindung des Antikörpers an das Protein ist konzentrationsabhängig,

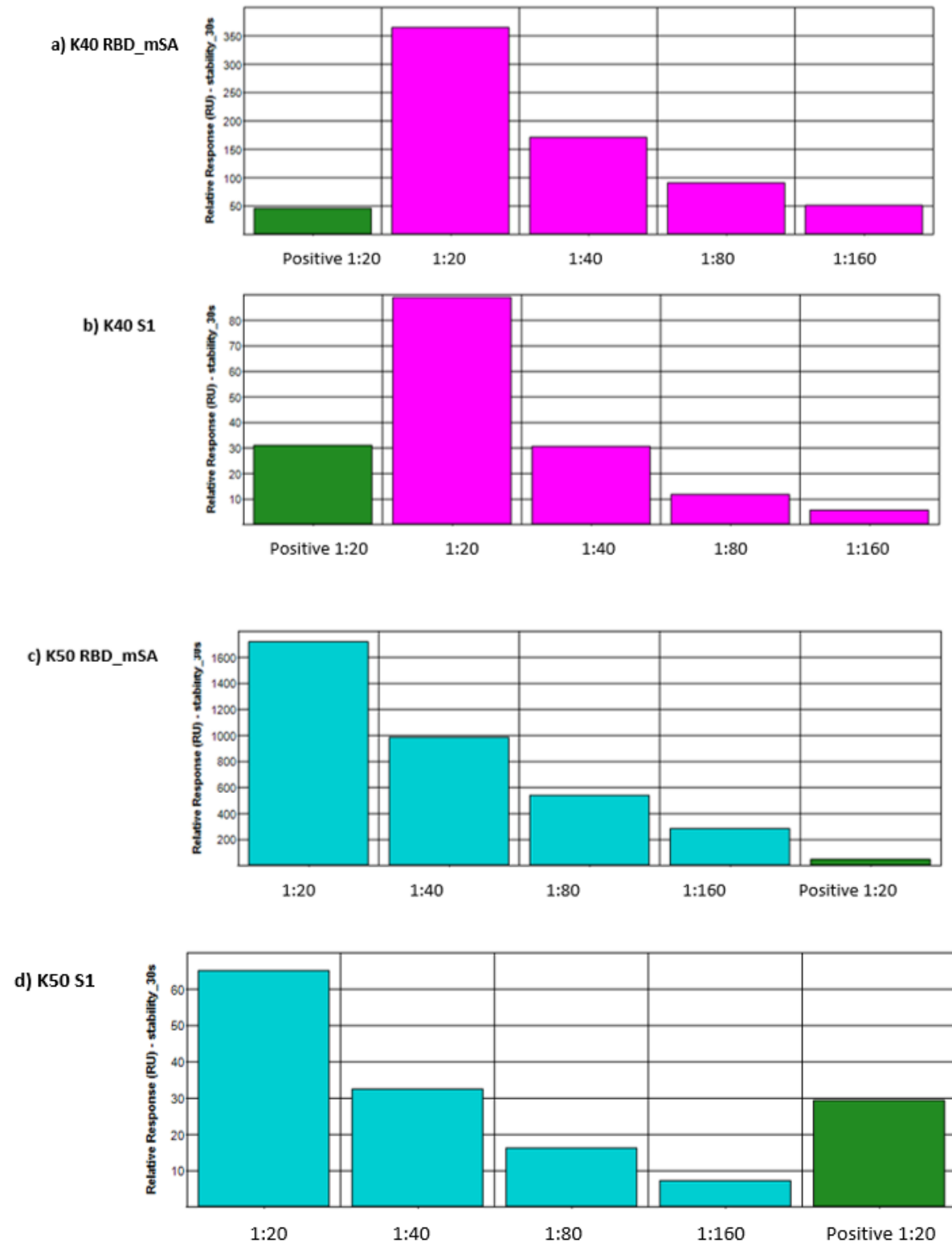


Abbildung 49: SPR-Analyse zur Bindung von Antikörpern von Kaninchen K 50 an RBD_mSA oder S1 Protein. RBD_mSA oder S1 Protein wurde auf CM5-Chips immobilisiert. Anschließend wurden die reinsten polyklonalen Kaninchen-Antikörper mit verschiedenen Verdünnungen (1:20,1:40,1:80,1:160) inkubiert. Als Positivkontrolle diente Anti Spike -SARS-CoV-2 in Verdünnung von (1:20). Die Bindung des Antikörpers an das Protein ist konzentrationsabhängig.

5 Diskussion

Die Gewinnung von Antikörpern durch konventionelle Immunisierung geht mit einer Belastung der Versuchstiere einher. Generell sollte auch folgender Auszug aus der Tierschutz-Richtlinie 3.04 „Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren“ des Bundesamtes für Veterinärwesen berücksichtigt werden:

Die Gewinnung von Antikörpern ist ein bewilligungspflichtiger Tierversuch, bei dessen Durchführung einem Tier Schmerzen, Leiden oder Schäden nur zugefügt werden dürfen, soweit dies für den verfolgten Zweck unvermeidlich ist. Alternativmethoden ist Beachtung zu schenken.

Durch die Benutzung von Adjuvantien zur Verbesserung der Immunantwort, wie z.B. das Freundschsche Adjuvans, wird das Versuchstier belastet. Alle tierexperimentell arbeitenden Wissenschaftler/innen sind sich der großen Verantwortung bewusst, die sie für das Wohlergehen der Versuchstiere tragen. Obwohl Tierversuche in der Forschung unerlässlich sind, besteht Einigkeit darüber, sie auf ein notwendiges Minimum zu beschränken. Als Richtlinie gilt dabei das ethische Prinzip der „3R“: Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern) und Refine (Verbessern). Die darin beschriebenen Handlungsgrundsätze sollen die Zahl der Versuche begrenzen und das Leid der verwendeten Tiere auf ein unerlässliches Maß verringern. Außerdem, wenn möglich, werden Tierversuche durch Alternativmethoden ersetzt. Es wird immer geprüft, ob es zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung ausreicht, einfache Organismen wie Zellen oder andere Ersatzmethoden zu verwenden. Der erste Bericht einer In-Vitro-Immunisierung war im Jahr 1978 [98]. Die In-Vitro Immunisierung (IVI) hat gegenüber der konventionellen Immunisierung eine Reihe von Vorteilen:

- (a) Immunisierungszeit dauert nur 4-5 Tage statt mehrerer Wochen.
- (b) die Antigenmenge ist extrem niedrig im Vergleich zur In-Vivo Immunisierung.
- (c) Antikörper, die aufgrund von giftigen Antigenen, Immunsuppression oder Toleranz nicht in vivo erzeugt werden konnten, können bei In-Vitro Immunisierungen generiert werden [98].

Allerdings ist jedoch die Anzahl der positiven Klone nach In-Vitro Immunisierung begrenzt, außerdem ist die Affinität der Antikörper relativ gering. Aus diesem Grund könnte die Verbesserung der Antigenaufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Strategie zur Induktion einer robusten B-Zellantwort darstellen. In diesem Projekt wird ein neuartiges In-Vitro Immunisierungsprotokoll und Technik zur Hybridom-Fusion durchgeführt. Durch diese Ersatzmethoden werden das Leiden und die Anzahl der Versuchstiere in der Antikörper-Produktion drastisch reduziert.

5.1 Herstellung von RBD_mSA und ZIKA_mSA:

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Proteine hergestellt, die sowohl für die In-Vitro Immunisierung als auch zur Testung der Hybridomzellklone verwendet wurden. Als Zielantigene dienten die Domänen RBD von SARS-CoV2 spike und ZIKV.E, die jeweils als Fusionsprotein mit monomerem Streptavidin und einem 6His-tag hergestellt wurden. Dazu wurde das Plasmid pET21a _RBD_mSA und pET24d _mSA_Zika E verwendet. Die Induktion erfolgte in Rosetta, einem von BL21 (DE3) abgeleiteten Bakterienstamm, der die Ausbeute von eukaryotischen Proteinen erhöht, deren codierende Sequenz Codons aufweisen, die in normalen E. coli Stämmen selten vorkommen. So enthält der Rosetta-Stamm das pRARE-Plasmid, das für die tRNA des Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA kodiert. Da der Vektor für rekombinante Proteine mit einem C-terminalen Histidin-tag kodiert, konnte das Protein mittels Ni²⁺-Säule gereinigt werden. Das Protein war unlöslich, aus diesem Grund wurden für die Reinigung zunächst unlösliche inclusion bodies angereichert und die Isolierung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden acht verschiedene Fusionsproteine in E. coli gebildet und dann isoliert: RBD, RBD_mSA, S1, S1_mSA, Ecto, Ecto_mSA, ZIKV.E, ZIKV.E_mSA. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt die hohe Reinheit der affinitätschromatographisch isolierten Fusionsproteine (**Abbildung 18, 19, 21, 22,23**). Um eine Rückfaltung auszuführen, wurde eine Dialyse mit (4M,2M,4M,0.5M,0M) Urea schrittweise durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene Dialysepuffer verwendet (**Tabelle 2**). Die Dialyse gegen PBS bei der Rückfaltung von RBD_mSA führt zu einem Proteinverlust von 75 %. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Rückfaltung gegen Hepes Puffer mit pH-Werten von 5,5 und 20 mM NaCl durchgeführt, was die Löslichkeit deutlich verbessern konnte. Um die Rückfaltung der zwei verwendeten RBD_mSA zu analysieren, wurden mittels ELISAS untersucht inwieweit die rückgefalteten Proteine durch Patientenseren erkannt sind. Allerdings entstehen durch die neue Rückfaltungsmethode mit niedriger Salzkonzentration auch ungefaltete Proteine oder eine Fehlfaltung von rekombinanten Proteinen (**Abbildung 24**). Deswegen wurde PBS als Rückfaltungspuffer verwendet, um das korrekt gefaltete rekombinante Protein zu erhalten. Die Produktion und Isolierung von allen benötigten Antigenen war erfolgreich, daher wurden die hergestellten Antigene für die In-Vitro-Immunisierung und ELISA verwendet.

5.2 Herstellung von TLM Trägercapsid und Kopplung von Antigen an die Oberfläche der TLM Trägercapside

TLM Trägercapside dienten in dieser Arbeit als Grundgerüst. Das TLM.core Protein wurde in E. coli produziert. Die Identität und Reinheit des gereinigten rekombinanten Proteins wurde durch Western Blot und Coomassie nachgewiesen (**Abbildung 25**). Nach der Isolierung des TLM.core Proteins mussten die TLMcapside mittels Erhöhung der Ionenstärke in vitro

assembliert werden. Zusätzlich sind nicht vollständig assemblierte TLMcapside zu erkennen. Anschließend wurden die Capside mittels Elektronenmikroskopie analysiert (**Abbildung 26**). Alles in allem konnte eine ausreichende Anzahl erfolgreich assemblierter Capside produziert werden. Das Antigen besteht aus TLM Trägercapsid und (RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA). Es sollte durch eine Streptavidin-Strep-tagIII-Interaktion hergestellt werden. Nach der Kopplung wurde eine Sucroседichte gradientenzentrifugation durchgeführt. Die gekoppelten RBD_mSA oder ZIKV.E_mSA wurden in Fraktionen mit höherem Sucrosegehalt zusammen mit den Capsiden detektiert (**Abbildung 28**). Um ein optimales Verhältnis von Antigen und TLM Trägercapsid bestimmen zu können, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5.3 Die In-Vitro Immunisierung

Für die Immunisierung in vitro wurden zellpermeable Virus like particles (HBV-Capside) als Carrier für RBD oder ZIKV.E verwendet, um eine effiziente Immunantwort zu induzieren. Unser Verfahren zum Induzieren der Antikörperproduktion in Splenozyten durch In-Vitro Immunisierung besteht aus 2 Schritten (**Abbildung 13**):

- 1) die erste Stimulation mit (RBD_mSA oder ZIKV.E _ beladenen TLMcapsiden) für zwei Tage.
- 2) die zweite Stimulation wurde nach dem Waschen von Zellen für weitere zwei Tage noch einmal mit (RBD_mSA oder ZIKV.E _ beladenen TLMcapsiden) wiederholt.

Mit unserem Verfahren konnten spezifische Antikörper-produzierende Zellen in dem kurzen Zeitraum von 4 Tagen erhalten werden. Das Entfernen von CD8 positiven Helfer T-Zellen und NK-Zellen war vor dem IVI notwendig, weil diese Zellen zum Tod von B-Zellen führen [105]. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen RBD von SARS-CoV-2 wurde bei der In-Vitro Immunisierung ein Cocktail von Zytokinen dazu gegeben. Die Zelldichte von Lymphozyten verstärkt die Zell-Zell Interaktion und ist ein wichtiger Faktor für die Induktion von Antigen-spezifischen Antikörpern [106]. Diese hohe Dichte war jedoch schlecht für die Zellen. Um die Kulturbedingungen zu verbessern, haben wir die Zellen nach jeder Aktivierung mittels Zentrifugation gesammelt und im frischen Medium mit dem Antigen wieder kultiviert. Die Antikörperlevel nach der ersten Stimulation (nur 2 Tage) waren sehr gering. Daher ist die zweite Stimulation erforderlich. Die Anwesenheit von Antikörpern im Überstand wurde mittels ELISA untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die Immunisierung mittels gekoppelten Antigens mit TLMcapsiden zu einer robusten Aktivierung von Splenozyten und einem besseren Antikörperlevel im Vergleich zur Immunisierung mit freiem Antigen führt (**Abbildung 30**). Für eine weitere Verbesserung der Anzahl positiver Klone von IVI ist eine effizientere Aktivierung erforderlich. Die Co-Kultur von Splenozyten mit folliculären dendritischen Zellen und T-Helferzellklonen führt zu mehr Aktivierung von B-Zellen und induziert den

Klassenwechsel [107,108]. In letzter Konsequenz zeigen die Ergebnisse, dass unser neues Protokoll für die In-Vitro Immunisierung erfolgreich ist.

5.4 Elektrofusion

Die B-Zellen waren 4 Tage nach der In-Vitro Immunisierung für die Fusion mit Myelomzellen bereit. In diesem Projekt haben wir für die Fusion das Anlegen eines elektrischen Feldes als Alternative zu Polyethylenglykol angewendet, um Hybridoma zu erzeugen. In allen Experimenten war die Hybridomausbeute bei der Elektrofusion höher im Vergleich zur Fusion mit Polyethylenglykol [109,110,111,112]. Das elektrische Feld wurde für die Zellfusion im Jahr 1982 verwendet [113]. Die Elektrofusion hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber der PEG Fusion. So ist die Effizienz der Elektrofusion deutlich höher als die der PEG-Fusion. Die PEG-Fusion hat eine durchschnittliche Fusionseffizienz von 5×10^{-6} , während die Elektrofusionsmethoden eine Effizienz auf 4×10^{-4} [114,115,116,117,119] erreichten. Der Erfolg der Elektrofusion hängt von der Art der Fusionspartner und Art und Zustand der Aktivierung von B-Zellen ab. In unserem Projekt wurde eine Streptavidinbrücke zwischen B-Zellen und Myelomzellen eingefügt. Dazu wurde eine Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen der Sp2/0-Ag14 Zellen durchgeführt. Monomeres Streptavidin von RBD_mSA- oder ZIKV.E_mSA-Fusionsproteinen bindet an das Biotin auf den Zelloberflächen. Auf der anderen Seite konnte das Antigen an Oberflächen von B-Zellen binden. Nach Inkubation von B-Zellen mit Myeloma Zellen entsteht eine Verbindung zwischen den beiden Zellen. Anschließend erfolgt die Elektrofusion von Zellsuspension in einem Puffer mit niedriger Ionenstärke (**Abbildung 29**).

5.5 Selektion und Subklonierung von Hybridoma-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Myelomazellen SP2/0 Ag 14 verwendet. SP2/0 Ag14 Zellen haben keine Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, jedoch eine Defizienz des Enzyms Hypoxanthinphosphoribosyltransferase (HGPRT). Aus diesem Grund konnte das HAT-Medium als Selektionsmedium verwendet werden [64]. Nach der Elektrofusion wurden die Zellen mit HAT/ RPMI 1640 Medium + IL6 verdünnt und in zwei 96 Well-Platten ausplattiert, um die Selektion und erste Subklonierung durchführen zu können. Es wurden unter den Selektionsbedingungen nur fusionierte Zellen weiter kultiviert.

Um die Monoklonalität der Antikörper sicherzustellen, mussten noch zwei weitere Subklonierungen durchgeführt werden.

Für Hybridoma Zellen, die Anti ZIKV.E Antikörper produziert haben, haben wir den Klon F12 isoliert. Der Klon F12 zeigte eine starke Wachstumstendenz und konnte mittels ELISA positiv getestet werden.

Danach wurde der Klon F12 nochmals subkloniert. Der Klon F12C8 wurde wieder isoliert und mittels ELISA positiv getestet.

Für Hybridoma Zellen, die Anti-RBD Domäne von SARS-CoV-2 Antikörper produziert haben, wurden vier Klone isoliert und die Subklonierung wurde mit Klon G1 durchgeführt. Bei der zweiten Subklonierung von Klon G1 wurden mehrere positive Klone mittels ELISA detektiert, aber nur die Klone H12 und E12 konnten letztlich isoliert werden.

5.6 Isotypenbestimmung und Aufreinigungen von Antikörpern

Anti-RBD Antikörper der Klone H12 und E12 gehören der IgM Klasse an (**Abbildung 39**). IgM ist der erste Antikörper, der während einer Immunantwort aufgebaut wird. Er ist für die Agglutination und zytolytische Reaktionen verantwortlich. IgM hat eine hohe Avidität, da es aufgrund seiner pentameren Struktur 10 freie Antigen-Bindungsstellen aufweist. Aufgrund von Konformationsbeschränkungen ist IgM nicht so vielseitig wie IgG. Protein A und Protein G binden nicht an IgM Antikörper, weil Bindungsstellen an den FC-Regionen von IgM durch seine pentamere Struktur behindert werden. Deswegen wurden die Antikörper mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung des Hybridomüberstands isoliert. Antikörper fallen bei niedrigeren Ammoniumsulfatkonzentrationen (40%) aus als die meisten anderen Proteine und Bestandteile des Überstands.

Anti ZIKA-E Antikörper gehören der IgG Klasse an, IgG-Antikörper entstehen durch den Isotyp Switch, welcher nach der boost Immunisierung zustande kommt [127].

IgG ist das wichtigste Immunglobulin im Blut und spielt eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort. IgG-Moleküle können mit Fc γ -Rezeptoren reagieren, die auf der Oberfläche von Makrophagen, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen vorhanden sind, und das Komplementsystem aktivieren. Die Anti-ZIKV.E Antikörper wurden mittels Protein G und antigenspezifischer Affinitätsreinigung des Überstands isoliert. Allerdings ist die Antikörperkonzentration von Anti-RBD viel besser im Vergleich zum Anti-ZIKV.E Antikörper.

5.7 Charakterisierung der Antikörper

Um die Anti-ZIKV.E Antikörper zu produzieren, wurden verkürzte ZIKV E-Proteine (aa 1- 409) für die Immunisierung als Antigen hergestellt. Die Benutzung von verkürzten ZIKV.E Proteinen (Transmembrandomänen wurden entfernt) führt zu einer effizienten Produktion der rekombinanten Proteine in E. coli. ELISA Daten zeigten die Fähigkeit unserer Antikörper an die immobilisierten ZIKV.E Proteine zu binden (**Abbildung 33**).

Im weiteren Verlauf der Versuche wurden die spezifischen IgM monoklonalen Antikörper gegen die RBD Domäne von SARS-CoV-2 mittels ELISA quantifiziert (**Abbildung 34**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Immunisierung der Kaninchen mittels RBD-mSA zu einer Bildung spezifischer Antikörper gegen die RBD Domäne geführt hat. Allerdings war das Signal beim Kaninchen K50 besser als K40 (**Abbildung 35,36**), was auf der unterschiedlichen Immunantwort der Tiere beruhen kann [129].

Um die Stärke der Bindung zwischen den monoklonalen oder polyklonalen Kaninchen-Antikörpern und Antigen zu ermitteln, wurde das Antigen auf einem CM5-Chip immobilisiert und über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie die Bindung zum Antikörper untersucht. Die verschiedenen Verdünnungen des Antikörpers wurden auf den Chip gegeben.

Es wurde ermittelt, dass Antikörper dosisabhängig an immobilisiertes Protein binden. Im Vergleich zu RBD bleibt das Signal von (SPR) und ELISA bei monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen S1-Untereinheit sehr gering. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die RBD teilweise durch Strukturen der S1-Untereinheit maskiert ist (**Abbildung 47,48,49**). Es wurde mithilfe (SPR) bestätigt, dass unsere generierten Antikörper durch In-Vitro Immunisierung eine geringere Affinität aufweisen. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass die Affinitätsreifung bei unseren Verfahren nicht ausreichend war. Die Affinitätsreifung in vivo findet bei ausgereiften B-Lymphozyten innerhalb des Lymphknotenmarks statt. In diesen Zellen findet sich eine erhöhte Mutationsrate, welche die Affinität der Lymphozyten zum entsprechenden Antigen erhöht [75]. Die Induktion der Antikörper-Affinitätsreifung in vitro ist eine Möglichkeit um dieses Problem zu lösen [74]. Es wurde durch die Signale im Peptidarray nachgewiesen, dass polyklonale Anti-RBD Antikörper von Kaninchen K50 gegen mehrere lineare Epitope gerichtet sind. Die Bindungsstellen der polyklonalen Antikörper wurden in Rot dargestellt (**Abbildung 38**). Die Auswertung der Western Blot ergab, dass H12 Klone spezifische Antikörper gegen das RBD produzierten (**Abbildung 45**). Unsere produzierten monoklonalen Anti-ZIKV.E Antikörper konnten das ZIKV.E Protein aus infizierten Vero Zellen (asiatischer und afrikanischer Stamm) unter Verwendung von Immunfluoreszenzmikroskopie erkennen (**Abbildung 40**). Außerdem wurden HEK293T-Zellen, die mit (RBD oder Ecto Domäne Plasmid) transfiziert waren, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls untransfizierte Zellen untersucht. Mittels polyklonaler Anti-RBD Antikörper von Kaninchen konnten spezifische Signale für die Ectodomäne und RBD detektiert werden. Daneben konnte gezeigt werden, dass durch polyklonale Anti-RBD Antikörper die Konformationsepitope und sequentiellen Epitope erkennbar sind (**Abbildung 41,42,43**). Demgegenüber konnten durch die monoklonalen RBD-spezifischen Antikörper H12 nur denaturierte Proteine (sequentielle Epitope) detektiert werden (**Abbildung 44**).

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieser neuartige Ansatz zur In-Vitro Immunisierung vielversprechend ist. Durch die Verwendung der Plattformtechnologie (Zellpermeabilität Trägercapsid), die einen effizienteren Antigentransfer und eine robustere Immunantwort induziert, wurde die geringere Effizienz der In-Vitro Immunisierung kompensiert. Nach dem 3R-Prinzip zielte dieses Projekt darauf ab, SARS-CoV-2 und ZIKV.E-spezifische monoklonale Antikörper durch In-Vitro Immunisierung zu erzeugen. Durch diese Ersatzmethoden werden das Leiden und die Anzahl der Versuchstiere in der Antikörper-Produktion drastisch reduziert. Bei der Generierung von humanen monoklonalen Antikörpern durch die In-Vivo-Immunisierung können nur sehr wenige Antigene aus ethischen Gründen benutzt werden. Eine Wirksamkeit der In-Vitro-Immunisierung ist daher für die universelle Anwendbarkeit der Human-Hybridom-Technologie von entscheidender Bedeutung. Die Technologie der rekombinanten Antikörper eröffnet neue Perspektiven für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Wirkstoffe. Die Extraktion und Isolierung von mRNA aus B-Lymphozyten nach (In-Vitro-Immunisierung) und Klonierung eines Plasmidvektorsystems ermöglichen die Expression von rekombinatem Antikörper. Im Zusammenhang mit konstruierten Antikörpern bringt die Fusion vom Translokationsmotiv (TLM) mit scFv-Fragmenten (single chain variable fragment) einen zellpermeablen Antikörper. Diese Technologie spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung der intrazellulären Antigene in lebenden Zellen sowie bei der Immuntherapie.

6 Zusammenfassung

Generierung monoklonaler Antikörper gegen SARS-CoV-2 und ZIKV durch In-Vitro-Immunsierung mittels zellpermeabler virusähnlicher Partikel als Antigen-träger

SARS-CoV-2 und ZIKV sind zwei neu auftretende Krankheitserreger. Ein wesentliches Werkzeug für die Charakterisierung des viralen Lebenszyklus sind Antikörper. Monoklonale Antikörper (MAbs) sind ein immunologisches Instrument mit vielfältigen Anwendungen in Forschung, Diagnose und Therapie. Die konventionelle Herstellung von MAbs ist jedoch zeitaufwändig, kostspielig und erfordert die Verwendung vieler Tiere und geht außerdem mit einer Belastung der Versuchstiere einher. Alle tierexperimentell arbeitenden Wissenschaftler sind sich der großen Verantwortung bewusst, die sie für das Wohlergehen der Versuchstiere tragen. Obwohl Tierversuche in der Forschung unerlässlich sind, besteht Einigkeit darüber, sie auf ein notwendiges Minimum zu beschränken. Als Richtlinie gilt dabei das ethische Prinzip der „3R“: Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern) und Refine (Verbessern). Nach dem 3R-Prinzip zielte dieses Projekt darauf ab, SARS-CoV-2 und ZIKV-spezifische monoklonale Antikörper durch In-Vitro Immunsierung zu erzeugen. In diesem Projekt wurden zellpermeable Carrier-Capside benutzt, die einerseits die Zellpermeabilität vermittelnde TLM-Peptid beinhalten und im Bereich des Spike tips einen insertierten Strep-tag aufweisen. Dies ermöglicht die flexible Beladung mit Antigenen, die an Streptavidin fusioniert sind, so dass zellpermeable VLPs entstehen, die an ihrer Oberfläche mit Antigen beladen sind. Durch die Verwendung dieser Plattformtechnologie, die einen effizienteren Antigen-transfer und eine robustere Immunantwort induziert als eine konventionelle Immunsierung mit dem freien Antigen, soll die geringere Effizienz der In-Vitro Immunsierung kompensiert werden. Rekombinante Antigene und VLPs konnten in *E. coli* hergestellt und durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dichtegradientenzentrifugation und Elektronenmikroskopie zeigten den Aufbau der vlp's und die Beladung mit den Antigenen. Diese Antigen-beladenen Partikel wurden zur In-Vitro Immunsierung von Milz-abgeleiteten Lymphozyten verwendet. Bei der In-Vitro Immunsierung erfolgt die Immunsierung nicht im Tier, sondern in Kultur. Nach 4 Tagen war die Immunsierung abgeschlossen und die Zellen bereit für die Fusion mit Myeloma Zellen, um Hybridoma herzustellen. Wir haben ein Elektrofusionsprotokoll zur Fusion von B-Zellen mit Myelomzellen erstellt. B-Zellen und Myelomzellen werden über Komplexe aus Biotin- und Streptavidin-gekoppeltem Antigen verknüpft. Dazu wurde eine Biotinylierung von Oberflächenproteinen der Sp2/0-Ag14 Zellen durchgeführt. Fusionsproteine bestehend aus monomerem Streptavidin und ZIKV.E oder spike RBD können an das Biotin auf der Zelloberfläche binden. Auf der anderen Seite kann das Antigen an Oberflächen von B-Zellen binden. Nach Inkubation der B-Zellen mit Myeloma

Zellen entstehen Verbindungen zwischen beiden Zellen, was zu einer effizienten Fusion führt. Anschließend erfolgt die Elektrofusion der Zellsuspension in einem Puffer niedriger Ionenstärke. Die monoklonalen Antikörper werden von den Zellen an das Medium abgegeben und können daraus in großen Mengen in vitro gewonnen werden. Durch diesen Ansatz wurden SARS-CoV2-Spike-RBD- und ZIKV.E-spezifische Antikörper-Mabs in vitro erhalten. Die Antikörperbindung wurde durch die Oberflächenplasmonresonanz auf einem Biacore-System charakterisiert. Somit können diese Antikörper zum Nachweis von SARS-CoV2-Spike bzw. ZIKV.E durch Western-Blot- oder Immunfluoreszenzmikroskopie und zur Quantifizierung von SARS-CoV2 S oder ZIKV.E durch spezifische ELISAs verwendet werden. In Übereinstimmung mit dem 3R-Prinzip haben wir ein Protokoll zur In-Vitro Immunisierung und Erzeugung monoklonaler Antikörper entwickelt. Es wurden hochspezifische Antikörper zum Nachweis und zur Quantifizierung von entweder SARS-CoV2-Spike oder ZIKV-Hüllprotein erhalten.

7 Summary

Generation of SARS-CoV-2 and ZIKV-specific monoclonal antibodies by in vitro immunization using cell-permeable virus-like particles as antigen carrier

ZIKV and SARS-CoV-2 are two emerging pathogens. For detailed characterization of the viral life cycle, specific monoclonal antibodies for viral proteins are required. Monoclonal antibodies (MAbs) are an established immunological tool with multiple applications in research, diagnosis and therapy. However, the conventional production of MAbs is time-consuming, costly and requires the use of many animals. The 3R principle aims to avoid animal experiments altogether (replacement), to limit the number of animals (reduction) and their suffering (refinement). According to the 3R principle, this project aimed to generate SARS-CoV-2 and ZIKV-specific monoclonal antibodies by in vitro immunization. The HBV capsid is highly immunogenic and helps to trigger a strong B-cell response against the antigens. In this project, TLM-HBV core fused to Streptavidin serves as membrane permeable antigen carrier and monomeric streptavidin fused to RBD of SARS-CoV-2 or ZIKV envelope (E) is used as cargo. TLM-HBV core served as antigen carrier. Recombinant antigens and vLps could be produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Density gradient centrifugation and electron microscopy revealed the assembly of the vLps and the loading with the respective antigens. These antigen-loaded particles were used for immunization of spleen-derived lymphocytes. We established an electrofusion protocol for fusing B-cells with myeloma partners. This was achieved by Streptavidin-mediated coupling of B-cells to biotinylated myeloma cells to generate hybridomas secreting functional monoclonal antibodies. By this approach SARS-CoV-2 spike-RBD and ZIKV.E specific antibodies mAbs were obtained in vitro. Antibody binding was characterized by surface plasmon resonance on a Biacore system. Thus, these antibodies can be used for detection of SARS-CoV-2 spike or ZIKV.E, respectively by western blot or immunofluorescence microscopy and for quantification of SARS-CoV-2 or ZIKV.E by specific ELISAs. In line with the 3R principle we developed a protocol for in vitro immunization and generation of monoclonal antibodies. Highly specific antibodies for detection and quantification of either SARS-CoV-2 spike or ZIKV envelope protein were obtained.

8 Literaturverzeichnis

1. Zheng, J. (2020). SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *International journal of biological sciences*, 10, 1678–1685.

2. hu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & . (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 8, 727–733.

3. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., Zhao, K., Chen, Q. J., Deng, F., Liu, L. L., Yan, B., Zhan, F. X., Wang, Y. Y., Xiao, G. F., & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 7798, 270–273.

4. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 10223, 497–506.

5. Ren, L. L., Wang, Y. M., Wu, Z. Q., Xiang, Z. C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y. Z., Xiong, Y., Li, Y. J., Li, X. W., Li, H., Fan, G. H., Gu, X. Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J. Y., Yang, F., Wang, X. M., Wu, C., Chen, L., Liu, Y. W., Liu, B., Yang, J., Wang, X. R., Dong, J., Li, L., Huang, C. L., Zhao, J. P., Hu, Y., Cheng, Z. S., Liu, L. L., Qian, Z. H., Qin, C., Jin, Q., Cao, B., & Wang, J. W. (2020). Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese medical journal*, 9, 1015–1024.

6. Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, 1, 1620.

7. Arafah, A., Ali, S., Yattoo, A. M., Ali, M. N., & Rehman, M. U. (2020). S1 Subunit and Host Proteases as Potential Therapeutic Avenues for the Treatment of COVID-19. *Archives of medical research*, 7, 718–720.
8. Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in microbiology*, 6, 490–502.
9. Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., & Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA biology*, 2, 270–279.
10. Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., Miao, X., Li, Y., & Hu, B. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA neurology*, 6, 683–690.
11. Chan, J. F., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C., Poon, R. W., Tsoi, H. W., Lo, S. K., Chan, K. H., Poon, V. K., Chan, W. M., Ip, J. D., Cai, J. P., Cheng, V. C., Chen, H., Hui, C. K., & Yuen, K. Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet (London, England)*, 10223, 514–523.
12. Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of biological chemistry*, 37, 12910–12934.
13. Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 11, 1061–1069.

14. Schroeder, T. J., First, M. R., Mansour, M. E., Hurtubise, P. E., Hariharan, S., Ryckman, F. C., Munda, R., Melvin, D. B., Penn, I., & Ballistreri, W. F. (1990). Antimurine antibody formation following OKT3 therapy. *Transplantation*, 1, 48–51.
15. Koda, K., & Glassy, M. C. (1990). In vitro immunization for the production of human monoclonal antibody. *Human antibodies and hybridomas*, 1, 15–22.
16. Power, D. A., Gerkis, V., & d'Apice, A. J. (1990). Production of human monoclonal antibodies to B lymphocyte cell surface antigens by in vitro immunization and human-human hybridoma technology. *Human antibodies and hybridomas*, 1, 34–41.
17. Hoffmann, P., Jimenez-Diaz, M., Loleit, M., TrÄ¶ger, W., WiesmÄ¶ller, K. H., Metzger, J., Jung, G., Kaiser, I., StÄ¶cklin, S., & Lenzner, S. (1990). Preparation of human and murine monoclonal antibodies: antigens combined with or conjugated to lipopeptides constitute potent immunogens for in vitro and in vivo immunizations. *Human antibodies and hybridomas*, 3, 137–144.
18. Gupta, K. C., Agha, R., Santos, E., & Brodeur, B. R. (1992). Isolation of human monoclonal antibodies binding to B fragment of diphtheria toxin. *Human antibodies and hybridomas*, 1, 25–31.
19. Alexander, H., Harpprecht, J., Podzuweit, H. G., Rautenberg, P., & MÄ¶ller-Ruchholtz, W. (1994). Human monoclonal antibodies recognize early and late viral proteins of human cytomegalovirus. *Human antibodies and hybridomas*, 1-2, 81–90.
20. Ichikawa, A., Katakura, Y., Teruya, K., Hashizume, S., & Shirahata, S. (1999). In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*, 1-2, 133–141.
21. Larrick, J. W., and Buck, D. W., 1984, Practical aspects of human monoclonal antibody production, *Bio Techniques* 1:6–14.
22. Thompson, K. M. (1988). Human monoclonal antibodies. *Immunology today*, 4, 113–117.
23. Rosén, A., Gergely, P., Jondal, M., Klein, G., & Britton, S. (1977). Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature*, 5606, 52–54.

24. de Boer, M., Ossendorp, F. A., Al, B. J., Hilgers, J., de Vijlder, J. J., & Tager, J. M. (1987). Production of monoclonal antibodies to thyroglobulin by in vitro immunization with a free synthetic peptide. *Molecular immunology*, 10, 1081–1086.
25. Borrebaeck, C. A. (1988). Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunology today*, 11, 355–359.
26. Wasserman, R. L., Budens, R. D., & Thaxton, E. S. (1986). In vitro stimulation prior to fusion generates antigen-binding human-human hybridomas. *Journal of immunological methods*, 2, 275–283.
27. Terashima, M., Shimada, S., Komatsu, H., & Osawa, T. (1987). Production of human--human hybridomas secreting antibody to sheep erythrocytes after in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. *Immunology letters*, 1, 89–93.
28. Hulette, C. M., Effros, R. B., & Walford, R. L. (1987). Immunization of normal human splenocytes in vitro to produce human monoclonal antibodies to cellular antigens. *Tissue antigens*, 1, 25–33.
29. Sugano, T., Matsumoto, Y., Miyamoto, C., & Masuho, Y. (1987). Hybridomas producing human monoclonal antibodies against varicella-zoster virus. *European journal of immunology*, 3, 359–364.
30. Huth, J. F., Saxton, R. E., Morton, D. L., & Irie, R. F. (1987). A human monoclonal antibody produced by in vitro sensitization of human lymphocytes with an antigen from urine of a sarcoma patient. *The Journal of surgical research*, 6, 591–596.
31. Golding, B., Inghirami, G., Peters, E., Hoffman, T., Balow, J. E., & Tsokos, G. C. (1987). In vitro generated human monoclonal trinitrophenyl-specific B cell lines. Evidence that human and murine anti-trinitrophenyl monoclonal antibodies cross-react with *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 12, 4061–4066.
32. Borrebaeck, C. A. (1988). Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunology today*, 11, 355–359.

33. Borrebaeck, C. A., Danielsson, L., & Möller, S. A. (1987). Human monoclonal antibodies produced from L-leucine methyl ester-treated and in vitro immunized peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 3, 941–946.
34. Borrebaeck, C. A., Danielsson, L., & Möller, S. A. (1988). Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11, 3995–3999.
35. Borrebaeck, C. A. (1987). Development of in vitro immunization in murine and human hybridoma technology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 8, 783–792.
36. Harpprecht, J., Hansmann, M. L., Westphal, E., & Mäüller-Ruchholtz, W. (1988). Human monoclonal antibody against human lymphocytic cells. A human monoclonal antibody that reacts preferentially with human lymphocytic cells. *International archives of allergy and applied immunology*, 4, 400–404.
37. Astaldi, G. C., Wright, E. P., Willems, C., Zeijlemaker, W. P., & Janssen, M. C. (1982). Increase of hybridoma formation by human lymphocytes after stimulation in vitro; effect of antigen, endothelial cells, and PWM. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 6, 2539–2542.
38. Crawford, D. H., Callard, R. E., Muggeridge, M. I., Mitchell, D. M., Zanders, E. D., & Beverley, P. C. (1983). Production of human monoclonal antibody to X31 influenza virus nucleoprotein. *The Journal of general virology*, 697–700.
39. Kozbor, D., & Roder, J. C. (1984). In vitro stimulated lymphocytes as a source of human hybridomas. *European journal of immunology*, 1, 23–27.
40. Strike, L. E., Devens, B. H., & Lundak, R. L. (1984). Production of human-human hybridomas secreting antibody to sheep erythrocytes after in vitro immunization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 4, 1798–1803.
41. Ho, M. K., Rand, N., Murray, J., Kato, K., & Rabin, H. (1985). In vitro immunization of human lymphocytes. I. Production of human monoclonal antibodies against bombesin and tetanus toxoid. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 6, 3831–3838.

42. Yamaura, N., Makino, M., Walsh, L. J., Bruce, A. W., & Choe, B. K. (1985). Production of monoclonal antibodies against prostatic acid phosphatase by in vitro immunization of human spleen cells. *Journal of immunological methods*, 1-2, 105–116
43. Matsumoto, Y., Sugano, T., Miyamoto, C., & Masuho, Y. (1986). Generation of hybridomas producing human monoclonal antibodies against human cytomegalovirus. *Biochemical and biophysical research communications*, 1, 273–280.
44. Masuho, Y., Sugano, T., Matsumoto, Y., Sawada, S., & Tomibe, K. (1986). Generation of hybridomas producing human monoclonal antibodies against herpes simplex virus after in vitro stimulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2, 495–500.
45. Guzman, J., Frei, K., & Nadal, D. (1995). In vitro immunization: generation of neutralizing monoclonal antibodies to human interleukin-10. *Journal of immunological methods*, 2, 265–268.
46. World Health Organization Q&A: Similarities and Differences – COVID-19 and Influenza. (2020). Available online at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza> (accessed June 22, 2020)
47. Graham, R. L., Sparks, J. S., Eckerle, L. D., Sims, A. C., & Denison, M. R. (2007). SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis. *Virus research*, 1, 88–8100.
48. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 2, 271-280.e8.
49. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 7803, E7.

50. DICK, G. W., KITCHEN, S. F., & HADDOW, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 5, 509–520.
51. MACNAMARA, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2, 139–145.
52. Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., Sall, A. A., & Musso, D. (2014). Zika virus, French Polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 6, 1085–1086.
53. Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., PopoviÄ±, M., PoljÄ±ak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodujek, V., Vizjak, A., PiÄ±em, J., Petrovec, M., & AvÄ±jiÄ±. Ä±upanc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine*, 10, 951–958.
54. White, M. K., Wollebo, H. S., David Beckham, J., Tyler, K. L., & Khalili, K. (2016). Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of neurology*, 4, 479–489.
55. Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2016). 2015 outbreak of Zika virus disease declared as Public Health Emergency of International Concern: Justification, consequences, and the public health perspective. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 55.
56. McCullough, K. C., & Summerfield, A. (2005). Basic concepts of immune response and defense development. *ILAR journal*, 3, 230–240.
57. Lu, R., Wang, Y., Wang, W., Nie, K., Zhao, Y., Su, J., Deng, Y., Zhou, W., Li, Y., Wang, H., Wang, W., Ke, C., Ma, X., Wu, G., & Tan, W. (2015). Complete Genome Sequence of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) from the First Imported MERS-CoV Case in China. *Genome announcements*, 4,

58. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 7807, 215–220.
59. Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gnanther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., & Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 5624, 1394–1399.
60. Astuti, I., & Ysrafil, . (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & metabolic syndrome*, 4, 407–412.
61. Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 3, 181–192.
62. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of advanced research*, 91–98.
63. Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 2, 223–227.
64. Köhler, G., & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*, 7, 511–519.
65. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). Reduction and Functional Exhaustion

of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in immunology*, , 827.

66. Zhang, C. (2012). Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 117–135.

67. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., & Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature*, 6793, 267–273.

68. Kato, K., Sautö's-Fridman, C., Yamada, W., Kobayashi, K., Uchiyama, S., Kim, H., Enokizono, J., Galinha, A., Kobayashi, Y., Fridman, W. H., Arata, Y., & Shimada, I. (2000). Structural basis of the interaction between IgG and Fc gamma receptors. *Journal of molecular biology*, 2, 213–224.

69. Yogo, R., Yanaka, S., Yagi, H., Martel, A., Porcar, L., Ueki, Y., Inoue, R., Sato, N., Sugiyama, M., & Kato, K. (2017). Characterization of conformational deformation-coupled interaction between immunoglobulin G1 Fc glycoprotein and a low-affinity Fc γ 3 receptor by deuteration-assisted small-angle neutron scattering. *Biochemistry and biophysics reports*, 1–4.

70. Williams, A. F., & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annual review of immunology*, 381–405

71. Torres RM, Imboden J, Schroeder HW., Jr. Antigen receptor genes, gene products, and co-receptors. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW Jr., Frew AJ, Weyand CM, editors. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 3 ed. London: Mosby Elsevier; 2008. pp. 53–77.

72. Knoll, M. D., & Wonodi, C. (2020). Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet* (London, England), 10269, 72–74.

73. (2020) the species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
74. Wang, J., An, L., Zhao, Y., Zhang, C., Li, S., Ye, C., Jing, S., & Hang, H. (2019). In vitro affinity maturation of antibody against membrane-bound GPCR molecules. *Applied microbiology and biotechnology*, 18, 7703–7717
75. Murphy K: *Janeway's Immunobiology*, London, New York, Garland Science, 2012
76. Yagi, H., Yanaka, S., & Kato, K. (). *Structure and Dynamics of Immunoglobulin G Glycoproteins*. *Advances in experimental medicine and biology*, 219–235.
77. Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R)
78. <https://www.tierversuche-verstehen.de/das3rprinzip/>
79. Vitale, A., Manciooco, A., & Alleva, E. (2008). The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 1, 33–47.
80. Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 1, 58–83.
81. Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (2014). Virus-like particles as vaccine. *Acta biochimica Polonica*, 3, 531–539.

82. Keller, S. A., Bauer, M., Manolova, V., Muntwiler, S., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2009). Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1, 26–29.
83. Alter, H. J. (2003). The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera [J Am Med Assoc 1965; 191:541-546]. *Journal of hepatology*, 2, 149–152.
84. Plummer, E. M., & Manchester, M. (2010). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2, 174–196.
85. Zochowska, M., Paca, A., Schoehn, G., Andrieu, J. P., Chroboczek, J., Dublet, B., & Szolajska, E. (2009). Adenovirus dodecahedron, as a drug delivery vector. *PloS one*, 5, e5569.
86. Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World journal of gastroenterology*, 1, 65–73.
- 87 Dryden, K. A., Wieland, S. F., Whitten-Bauer, C., Gerin, J. L., Chisari, F. V., & Yeager, M. (2006). Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Molecular cell*, 6, 843–850.
88. Kratz, P. A., Bottcher, B., & Nassal, M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5, 1915–1920.
89. Milich, D. R., & McLachlan, A. (1986). The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 4782, 1398–1401.

90. Oess, S., & Hildt, E. (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene therapy*, 9, 750–758.
91. Brandenburg, B., Stockl, L., Gutzeit, C., Roos, M., Lupberger, J., Schwartlander, R., Gelderblom, H., Sauer, I. M., Hofschneider, P. H., & Hildt, E. (2005). A novel system for efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 6, 1300–1309.
92. Akhras, S., Toda, M., Boller, K., Himmelsbach, K., Elgner, F., Biehl, M., Scheurer, S., Gratz, M., Vieths, S., & Hildt, E. (2017). Cell-permeable capsids as universal antigen carrier for the induction of an antigen-specific CD8 T-cell response. *Scientific reports*, 1, 9630.
93. Zahn, T., Akhras, S., Spengler, C., Murra, R. O., Holzhauser, T., & Hildt, E. (2020). A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections. *Vaccine*, 15, 3105–3120.
94. Michael Heilmann, Generierung, Isolierung und funktionelle Charakterisierung von zellpermeablen virus like particles (HBV-Capside) als Carrier für HCV-Antigene zur effizienten Induktion einer B- und T-Zellantwort, 2013-08-16T08:40:06.394Z, <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/5462>
95. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 5259, 680–685.
96. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9, 4350–4354.
97. Kato, M., Yan, H., Tsuji, N. M., Chiba, T., & Hanyu, Y. (2012). A method for inducing antigen-specific IgG production by in vitro immunization. *Journal of immunological methods*, 1-2, 60–69.
98. Hengartner, H., Luzzati, A. L., & Schreier, M. (1978). Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8. *Current topics in microbiology and immunology*, , 92–99.

99. Moller, S.A. and Borrebaeck, C.A.K. (1988) Development of an in vitro immunization technique for the production of murine monoclonal antibodies using small amounts of antigen and weak immunogens. In: C.A.K. Borrebaeck (Ed.), *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology*, Vol. 5, Progress in Biotechnology. Elsevier, Amsterdam, p.
100. Plummer, E. M., & Manchester, M. (2010). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2, 174–196.
101. Zhang, Y. L., Guo, Y. J., Wang, K. Y., Lu, K., Li, K., Zhu, Y., & Sun, S. H. (2007). Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus. *Scandinavian journal of immunology*, 4, 320–328.
102. Pumpens, P., & Grens, E. (2001). HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, 2-3, 98–9114.
103. Wynne, S. A., Crowther, R. A., & Leslie, A. G. (1999). The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular cell*, 6, 771–780.
104. Kratz, P. A., Böttcher, B., & Nassal, M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5, 1915–1920.
105. Zafiroopoulos, A., Andersson, E., Krambovitis, E., & Borrebaeck, C. A. (1997). Induction of antigen-specific isotype switching by in vitro immunization of human naive B lymphocytes. *Journal of immunological methods*, 1-2, 181–190.
106. Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., & Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nature communications*, 465.
107. Nishikawa, Y., Hikida, M., Magari, M., Kanayama, N., Mori, M., Kitamura, H., Kurosaki, T., & Ohmori, H. (2006). Establishment of lymphotoxin beta receptor signaling-dependent cell lines with follicular dendritic cell phenotypes from mouse lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 8, 5204–5214.

108. Uthoff, S., & Böldicke, T. (1993). In vitro immunization of mouse spleen cells for the production of monoclonal IgG1 antibodies using an antigen-specific T helper cell clone (D.10.G4.1). *Journal of immunological methods*, 2, 165–175.
109. Karsten, U., Stolley, P., Walther, I., Papsdorf, G., Weber, S., Conrad, K., Pasternak, L., & Kopp, J. (1988). Direct comparison of electric field-mediated and PEG-mediated cell fusion for the generation of antibody producing hybridomas. *Hybridoma*, 6, 627–633.
110. Orentas, R. J., Schauer, D., Bin, Q., & Johnson, B. D. (2001). Electrofusion of a weakly immunogenic neuroblastoma with dendritic cells produces a tumor vaccine. *Cellular immunology*, 1, 4–13.
111. Radomska, H. S., & Eckhardt, L. A. (1995). Mammalian cell fusion in an electroporation device. *Journal of immunological methods*, 2, 209–217.
112. Kreutz, F. T., Xu, D. Z., & Suresh, M. R. (1998). A new method to generate quadromas by electrofusion and FACS sorting. *Hybridoma*, 3, 267–273.
113. Zimmermann, U., & Vienken, J. (1982). Electric field-induced cell-to-cell fusion. *The Journal of membrane biology*, 3, 165–182.
114. Fong, S. K., & Perkins, S. (1989). Electric field-induced cell fusion and human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, 1, 117–122.
115. Yu, X., McGraw, P. A., House, F. S., & Crowe, J. E. (2008). An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, 2, 142–151.
116. Ohnishi, K., Chiba, J., Goto, Y., & Tokunaga, T. (1987). Improvement in the basic technology of electrofusion for generation of antibody-producing hybridomas. *Journal of immunological methods*, 1-2, 181–189.
117. Schmitt, J. J., Zimmermann, U., & Neil, G. A. (1989). Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion. *Hybridoma*, 1, 107–115.

118. Steenbakkers, P. G., van Wezenbeek, P. M., & Olijve, W. (1993). Immortalization of antigen selected B cells. *Journal of immunological methods*, 1, 33–40.
119. Vienken, J., & Zimmermann, U. (1985). An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells. *FEBS letters*, 2, 278–280.
120. de Vries, A. A. F. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: a primer for cardiologists. *Netherlands heart journal: monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, 7-8, 366–383.
121. DICK, G. W., KITCHEN, S. F., & HADDOW, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 5, 509–520.
122. MACNAMARA, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2, 139–145.
123. Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., Sall, A. A., & Musso, D. (2014). Zika virus, French Polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 6, 1085–1086.
124. Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovič, M., Poljčak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodušek, V., Vizjak, A., Pišcem, J., Petrovec, M., & Avšič-Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine*, 10, 951–958.
125. White, M. K., Wollebo, H. S., David Beckham, J., Tyler, K. L., & Khalili, K. (2016). Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of neurology*, 4, 479–489.
126. Lim, K. H., Huang, H., Pralle, A., & Park, S. (2012). Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnology and bioengineering*, 1, 57–67.

127. Abdul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010.

128. Akhras, S., Herrlein, M. L., Elgner, F., Holzhauser, T., & Hildt, E. (2019). ZIKV Envelope Domain-Specific Antibodies: Production, Purification and Characterization. *Viruses*, 8,

129. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (eds) (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.

130 Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 5517, 495–497.

131. Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, O. T., Martínez-Vega, R., Porgo, T. V., Haefliger, A., Broutet, N. J., Low, N., & . (2017). Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain- Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS medicine*, 1, e100220

132. Barbara Torres, hybridoma production by electrofusion, Research and Development Department, Laboratory. Products Division, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547. Biotinylation of KLH.

133. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N.Y.)*, 6483, 1260–1263.

134. Gomes, C. P., Fernandes, D. E., Casimiro, F., da Mata, G. F., Passos, M. T., Varela, P., Mastroianni-Kirsztajn, G., & Pesquero, J. B. (2020). Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, , 589505.

135. Jeffers, S. A., Tusell, S. M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E. M., Achenbach, J. E., Babcock, G. J., Thomas, W. D., Thackray, L. B., Young, M. D., Mason, R. J., Ambrosino, D. M., Wentworth, D. E., Demartini, J. C., & Holmes, K. V. (2004). CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44, 15748–15753.
136. Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., & Hildt, E. (2006). Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17, 6730–6734.
137. Hillemann, A., Brandenburg, B., Schmidt, U., Roos, M., Smirnow, I., Lemken, M. L., Lauer, U. M., & Hildt, E. (2005). Protein transduction with bacterial cytosine deaminase fused to the TLM intercellular transport motif induces profound chemosensitivity to 5-fluorocytosine in human hepatoma cells. *Journal of hepatology*, 3, 442–450.
138. Bottcher, B., Wynne, S. A., & Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 6620, 88–91.
139. Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2017). Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Frontiers in microbiology*, , 581.
140. Bradford A. Zika Virus: Symptoms, Risk, Treatment & Prevention. <https://www.livescience.com/53510-zika-virus.html>. Published 2016. Zugegriffen Juli 9, 2018.
141. Victora, C. G., Schuler-Faccini, L., Matijasevich, A., Ribeiro, E., Pessoa, A., & Barros, F. C. (2016). Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *Lancet (London, England)*, 10019, 621–624.
142. Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M., Horovitz, D. D., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., Doriqui, M. J., Neri, J. I., Neto, J. M., Wanderley, H. Y., Cernach, M., El-Husny, A. S., Pone, M. V., Serao, C. L., Sanseverino, M. T., & , . (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 3, 59–62.

143. Passemard, S., Kaindl, A. M., & Verloes, A. (2013). Microcephaly. Handbook of clinical neurology, , 129–141.

144. Yuki, N., & Hartung, H. P. (2012). Guillain- Barré syndrome. The New England journal of medicine, 24, 2294–2304.

145. Sudulagunta, S. R., Sodalagunta, M. B., Sepehrar, M., Khorram, H., Bangalore Raja, S. K., Kothandapani, S., Noroozpour, Z., Aheta Sham, M., Prasad, N., Sunny, S. P., Mohammed, M. D., Gangadharappa, R., & Nidsale Sudarshan, R. (2015). Guillain- Barré syndrome: clinical profile and management. German medical science: GMS e-journal, , Doc16.

146. <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> (accessed 18 Apr. 2018).

147. World Health Organisation. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>.

148. Robert Koch-Institut. Täglicher Lagebericht des RKI zur Coronavirus-Krankheit-2019(COVID-19) 15.01.2021 – AKTUALISIERTER STAND FÜR DEUTSCHLAND.

149. Eli Lilly and Company; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; AbCellera Biologics Inc. A Phase 3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of LY3819253 in Preventing SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 in Skilled Nursing and Assisted Living Facility Residents and Staff; a NIAID and Lilly Collaborative Study: NCT04497987, 18063. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04497987> (accessed on 18 September 2020).

150. (2020.000Z) Medikamente gegen Coronavirus – Der aktuelle Forschungsstand | vfa. <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/therapeutische-medikamente-gegen-die-coronavirusinfektion-covid-19>. Accessed 20 Aug 2020.742Z

151. Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J. L., Pérez Marc, G., Moreira, E. D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K. A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W. V., Cooper, D., Frenck, R. W., Hammitt, L. L., Özlem Türeci. —., Nell, H., Schaefer, A., Ünal, S., Tresnan, D. B., Mather, S., Dormitzer, P. R., Sahin, U., Jansen, K. U., Gruber, W. C., & , . (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine*, 27, 2603–2615.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (angiotensin converting enzyme 2)
ADE	Antikörper-abhängige Verstärkung (antibody-dependent enhancement)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
cm	Zentimeter
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019 (coronavirus disease 2019)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
g	Mittlere Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
His-Tag	Polyhistidin-Sequenz
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgA	Immunoglobulin A
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA

Abkürzung	Bedeutung
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBD	Rezeptorbindedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SARS-CoV	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (Tris-buffered saline with Tween20)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
u/ml	Einheiten pro Milliliter (units per milliliter)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
RBD	Rezeptorbindedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (Tris-buffered saline with Tween20)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
u/ml	Einheiten pro Milliliter (units per milliliter)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
RBD	Rezeptorbindedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SARS-CoV	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus)
ml	Milliliter
N	Normalität/ Äquivalentkonzentration
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (nickel-nitrilotriacetic acid)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
s	Sekunde(n)
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SGP	Sammelgelpuffer

9.2 Aminosäuresequenzen der hergestellten Proteine

RBD:

ASVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKC
YGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNL
DSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNG
VGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFAAALEHHHHHH

RBD-mSA:

ASVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKC
YGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNL
DSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNG
VGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFAAASQDLASAEAGITGTWYNQS
GSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSR
TEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEGGSGPATEQQQDTFTKVKPSAASLEHHHHHH

S1:

ASQCVNL TTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWTFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSL LIVN NATNVVIKVCE FQFC
NDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKN
IDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTL LALHRSYLT PGDSSSGWTA
GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQP
TESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP
YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI
ADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAAALEHHHHHH

S1-mSA

ASQCVNL TTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWTFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSL LIVN NATNVVIKVCE FQFC
NDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKN
IDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTL LALHRSYLT PGDSSSGWTA
GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQP
TESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP
YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI
ADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAAASQDLASAEAGITGTWYNQSGSTF
TVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEW
RGQYQGGAEARINTQWNLTYEGGSGPATEQQQDTFTKVKPSAASLEHHHHHH

Ecto:

ASQCVNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDLSDKTQSLIVNINATNVVIVKCEQFC
NDPFLGVVYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKN
IDGYFKIYKHTPINLVRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSSGWTA
GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQP
TESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRFLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP
YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDI
ADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFVGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNPRRARSVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLL
FNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGW
TFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLI
RAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVVPAQEK
NFTTAPAICHGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNN
TVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDIGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLID
LQELGKYEQYIKWPAAALEHHHHHH

Ecto-mSA

ASQCVNLTRRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDLSDKTQSLIVNINATNVVIVKCEQFC
NDPFLGVVYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKN
IDGYFKIYKHTPINLVRDLPGGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSSGWTA
GAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQP
TESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP
TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNLYRFLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP
YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQGFGRDI
ADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFVGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNPRRARSVASQSIIA
YTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLL
FNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGW
TFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQ
DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLI
RAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTVVPAQEK
NFTTAPAICHGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNN
TVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDIGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLID
LQELGKYEQYIKWPAAASQDLASAEAGITGTWYNQSGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQG
TGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYE
GGSGPATEQQQDTFTKVKPSAASLEHHHHHH

ZIKV.E_mSA:

MGSSHHHHHSQDLASAEAGITGTWYNQSGSTFTVTAGADGNL
TGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENC
HSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYE GGS GPATEQQGQDTFT
KVKPSAASGSGSGIEGRIRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLE
HGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTT VSNMAEVR SYCYEASISDMAS
DSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD R G W G N G C G L F G K G S
LVTC AKFACSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIVNDT
GHETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSD
LYYLT MNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGT PHWNNKEALV
EFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSS
GHLKCRLKMDKLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEV
QYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTENSKM
MLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGK STOP

ZIKV.E

MIRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTT VSNMAEVR SY
CYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD R G W G N G C G L F G K G S
LVTC AKFACSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL
GFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYYLT MNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGT PHWNNKE
ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLKCRLKMDKLRL
KGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITAN
PVITESTENSKMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKGS AW SHPQFEK-

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Eberhard Hildt bedanken. Danke vielmals für die freundliche Unterstützung, Motivation, Geduld und Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut durchzuführen und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Benedikt Kaufer für die Betreuung an der Freien Universität Berlin sowie für die Begutachtung dieser Arbeit. Danke auch an Dr. Sami Akhras und Dr. Tobias Zahn für die fächerübergreifende Expertise und für ihre fachliche Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Ise und Dani für ihre aufmunternde Unterstützung bei den Biacor Experimenten bedanken. Herzlichen Dank für all die großen und kleinen Hilfestellungen beim Durchführen der Versuche: Robin, Mirco, Gert, Fabian, Dagmar, Jasminka, Patrycja, Vanessa, Sarah, Bingfu, Yan, Jan, Hussein, Catarina. Meiner Familie und meiner Frau danke ich für ihre stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Auch möchte ich mich bei Frauke für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

11 Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte

11.1 Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, Langen, Deutschland.

11.2 Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

12 Selbstständigkeitserklärung

Geistiges Eigentum anderer Autoren wurde als entsprechend gekennzeichnet. Ebenso versichere ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form an keiner anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Younes Husria

Langen, den 02.01.2022