

HIV-1 neutralisierende Antikörper als Werkzeuge für prophylaktische und therapeutische Impfansätze

Ringel, Max Oliver
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00012816>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 07 Fachbereich Chemie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/12816>

HIV-1 neutralisierende Antikörper als Werkzeuge für prophylaktische und therapeutische Impfansätze



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT



**vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Max Oliver Ringel**

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Darmstadt 2020

Max Oliver Ringel: HIV-1 neutralisierende Antikörper als Werkzeuge für prophylaktische und therapeutische Impfansätze

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriprints: 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

<http://creativecommons.org/licenses/>

Tag der Einreichung: 31. Januar 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Mai 2020

Für Miri

„Ausdauer wird früher oder später belohnt – meistens aber später.“

Wilhelm Busch



KURZFASSUNG

Im Jahr 2019 lebten laut UNAIDS schätzungsweise rund 37 Millionen Menschen weltweit mit einer HIV-1 Infektion. Zudem infizieren sich jährlich etwa 1,8 Millionen Menschen mit dem humanpathogenen Erreger neu. Das Hauptangriffsziel von HIV-1 sind CD4+ T-Lymphozyten, die eine bedeutende Komponente der humanen adaptiven Immunantwort darstellen. In Folge einer HIV-1 Transmission nimmt die Anzahl an CD4-positiven T-Zellen, bedingt durch produktive Infektionen und eine anhaltende Hyperaktivierung des Immunsystems, kontinuierlich ab. Der massive Verlust an Immunzellen führt schließlich zu einem schweren Immundefekt, auch bekannt als AIDS, welcher in nahezu allen Fällen ohne antiretrovirale Therapie (ART) mit dem Tod des Betroffenen einhergeht. In der Regel werden HIV-positive Patienten heutzutage mit antiretroviralen Medikamenten therapiert, wodurch die HIV-Infektion unter Kontrolle bleibt. Trotz großer Erfolge in der Weiterentwicklung der ART gegen HIV-1, existiert bisher keine Heilung des Virus. Darüber hinaus ist eine lebenslange HIV-Therapie mit antiretroviralen Medikamenten häufig auch mit Nebenwirkungen und der Gefahr auftretender viraler Resistenzen gegenüber den ART-Medikamenten verbunden. Deshalb ist die Entwicklung einer protektiven Impfung, die Menschen vor einer Infektion mit HIV-1 schützen kann, das Hauptziel in der HIV-Forschung. Allerdings konnte dieses Bestreben bis heute nicht erreicht werden. Eine Ursache hierfür liegt unter anderem in der enormen genetischen Diversität und Flexibilität des HI-Virus.

Neben der Impfstoffentwicklung liegt der Fokus auch auf der Erforschung alternativer HIV-Therapien, die weniger toxisch und daher besser verträglich sind. Interessante Kandidaten, die sowohl protektiv als auch therapeutisch besonders geeignet erscheinen, sind Antikörper mit breit neutralisierenden Eigenschaften (bnAbs), die einen Schutz gegen eine Vielzahl genetisch unterschiedlicher HIV-1 Subtypen liefern können. BnAbs sind in der Lage durch Bindung konservierter Bereiche des viralen Hüllproteins (Env), welche für den Viruseintritt in die Zelle von essentieller Bedeutung sind, deren Infektion zu verhindern. Darüber hinaus sind für nahezu alle bnAbs einige besondere Eigenschaften bekannt, wie eine hohe Anzahl somatischer Hypermutationen, außergewöhnlich lange *heavy chain complementary determining regions 3* (HCDR3) und oftmals eine signifikante Poly- oder Autoreaktivität. Aufgrund des andauernden Selektionskreislaufes mit dem mutierenden Virus, werden solche Antikörper erst mehrere Jahre nach der initialen HIV-Infektion infolge von Affinitätsreifungsprozessen im Organismus evolviert. Trotz des detaillierten Wissensstands über bnAbs und deren Epitope innerhalb des HIV-Env, ist es bisher nicht gelungen, solche speziellen Antikörper mit Hilfe geeigneter Immunogene zu induzieren. Dennoch konnte für

einige der potentesten bisher identifizierten bnAbs wie den 3BNC117, den 10-1074 oder den VRC01 in verschiedenen Studien mit nicht-humanen Primaten und auch Menschen das beträchtliche therapeutische Potential solcher Antikörper bereits nachgewiesen werden. Die Applikation einzelner Dosen führte sowohl in den SHIV-infizierten Affen als auch in den HIV-positiven Patienten zu einer rapiden Antikörpertiter-abhängigen Reduktion der Virusreplikation. Allerdings offenbarten die Studienergebnisse auch, dass für eine dauerhafte Kontrolle der Virusinfektion mehrere neutralisierende Antikörper notwendig sind, aufgrund der rapiden Entwicklung viraler Resistenzmutationen gegen einzelne bnAbs. Besonders wirkungsvoll erwiesen sich hierbei Antikörperkombinationen, die verschiedene Domänen des HIV-Hüllproteins erkennen.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Doktorarbeit neue HIV-1 neutralisierende Antikörper mittels zellbasierter Phagen-Display-Technologie selektioniert und deren Bindungs- und Neutralisationseigenschaften charakterisiert. Da das Antigen (HIV-Env) auf der viralen Oberfläche in nur etwa 10 bis 14 „Spikes“ vorliegt, erfolgte die Selektion HIV-spezifischer Antikörper unter Verwendung nativer membranassoziierter Hüllproteine, welche auf der Oberfläche transfizierter HeLa-Zellen präsentiert wurden. Diese Art der Antigenpräsentation, im Zusammenhang mit der Identifikation HIV-spezifischer bnAbs, ist bisher noch nicht publiziert worden und bietet daher möglicherweise eine neue Strategie zur Anreicherung neuartiger potenter bnAbs gegen HIV-1. Insgesamt wurden hierfür zwei Zelllinien mittels stabiler Transfektion generiert, die jeweils eine Variante des HIV-Env-Subtyps B bzw. -Subtyps C in der Plasmamembran exprimieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Zell-Zell-Fusionsassays konnte sowohl die native Konformation als auch die Funktionalität der membranständigen Env-Moleküle nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde für beide HIV-Subtypen eine Anzahl von über 10^4 Env-Spikes pro HeLa-Zelle quantitativ ermittelt. Zudem wurden, ausgehend von einer Kohorte aus sieben rekrutierten *long-term non-progressors* (LTNPs), von vier LTNPs mit einer heterologen Plasma-Neutralisationsaktivität *single-chain variable fragment* (scFv)-Phagenbibliotheken aus dem Antikörpergenrepertoire generiert. LTNPs sind Patienten, die eine chronische HIV-1 Infektion durch verschiedene genetische und immunologische Wirtsfaktoren lang anhaltend ohne ART kontrollieren können. Experimentelle Studien haben bereits belegt, dass bnAbs in einer Gruppe von HIV-*controllers* mit niedriger Viruslast an der Kontrolle der HIV-1 Infektion maßgeblich beteiligt sind. Anhand der subtraktiven Selektion der Patienten-abgeleiteten Immunbibliotheken gegen das native virale Antigen, konnten fünf HIV-1 Env-spezifische Antikörperfragmente identifiziert werden. Drei der fünf selektionierten Antikörperklone waren zudem in der Lage, reformatiert an eine Fc-Domäne eines humanen IgG1, bis zu neun von insgesamt 16 getesteten unterschiedlichen Tier 1 bzw. Tier 2 Env-pseudotypisierten HI-Virusisolaten *in vitro* zu neutralisieren. Verglichen mit dem Neutralisationspotential der zurzeit potentesten bekannten bnAbs, fällt die Neutralisationsaktivität der identifizierten Antikörperklone zwar schwächer aus, allerdings zeigte der Klon scFv#1-Fc überraschenderweise neben seiner Neutralisations- auch eine ADCC-Aktivität. Somit liefern die Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, dass die beiden Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen des scFv#1-Fc-Konstrukts möglicherweise in der Erkennung eines für bnAbs bisher unbekanntes Bereiches in der viralen Hüllproteinstruktur begründet ist. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Beobachtung untermauert, dass die ebenso identifizierten

HIV-1 neutralisierenden Antikörperklone scFv#3-Fc und VHH#2-Fc, trotz der Kopplung an die gleiche Fc-Domäne, keine ADCC-Aktivität aufwiesen.

In einem zweiten durchgeführten Projekt wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit das kürzlich identifizierte HIV-1 Epitop EC26-2A4 aufgrund der partiellen Überlagerung mit dem Kernepitop des polyreaktiven monoklonalen Antikörpers (mAb) 2F5 modifiziert. Das Epitop EC26-2A4 ist innerhalb der hochkonservierten *membrane-proximal external region* (MPER) der gp41-Untereinheit des HIV-Hüllproteins lokalisiert und führt nachweislich zur Induktion nAbs in immunisierten Mäusen. Mit Hilfe von Peptidarrays konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung des ursprünglich 29 Aminosäure (AS) langen Peptids auf acht AS (⁶⁵⁹ELLELDKW⁶⁶⁶) und die Substitution des Tryptophans an der Position 666 gegen ein Methionin mit dem Verlust der Epitoperkennung durch den mAb 2F5 einhergeht und darüber hinaus die Bindung EC26-2A4-spezifischer Antikörper nicht beeinträchtigt worden ist. Immunisierungsstudien mit der modifizierten Epitopvariante EC26-2A4ΔM offenbarten zudem die Induktion hoher Epitop-spezifischer Antikörpertiter in NMRI-Mäusen. Außerdem zeigten die Mäuseren mit EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern in standardisierten TZM-bl-Reporterzell-Assays eine vergleichbare *in vitro* Neutralisationsaktivität, wie die mit dem unmutierten EC26-2A4 Peptid behandelten Tiere. Weiterhin wurde zusätzlich die Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper in zwei HIV-Patientenkohorten mittels ELISA evaluiert und mit klassischen klinischen Parametern korreliert: einer ART-positiven (~1000 HIV-Patienten) und einer ART-naiven Kohorte (71 LTNPs). Hierbei konnte für rund 9 % der Patienten, die unter Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten stehen, das Vorhandensein EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. In der ART-naiven Kohorte war der Anteil EC26-2A4ΔM-IgG positiver Patienten sogar um das 3-fache größer. Während für die therapierte Kohorte kein Unterschied bei den beiden bedeutenden HIV-1 Surrogatmarkern, der Viruslast und der CD4-Zellzahl, zwischen den Patienten mit und ohne solcher Epitop-spezifischer Antikörper beobachtet werden konnte, was vermutlich in der HIV-Therapie selbst begründet ist, zeigten Patienten der ART-naiven Kohorte mit EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern im Plasma reduzierte Mengen an viraler RNA und proviraler DNA. Interessanterweise wurde überdies eine nahezu doppelt so starke Reduktion der Viruslast in solchen Patienten ausgemacht, die neben EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern auch Immunglobuline gegen ein weiteres bekanntes MPER-Epitop m3S aufwiesen. Zudem offenbarten die EC26-2A4ΔM-IgG, aufgereinigt aus dem Plasma von acht HIV-Patienten, ebenso eine heterologe Neutralisationsaktivität gegen HIV-1 Pseudoviren von vier unterschiedlichen Env-Subtypen. Des Weiteren konnte auch mittels ELISA für die Patienten-abgeleiteten Antikörper eine fehlende Kreuzreaktivität mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin ausgemacht werden, welche für den 2F5 Antikörper typisch sind. Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass eine Kombination beider gp41-Epitope möglicherweise einen geeigneten Ansatz zur Induktion therapeutisch wirksamer HIV-1 Antikörper darstellt.



SUMMARY

In 2019, UNAIDS estimated the number of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infections worldwide to be about 37 millions and around 1.8 million new infections are added each year. HIV-1 primarily infects CD4+ T lymphocytes, which play an essential role in mediating human immune response. Transmission of HIV-1 results in continuous depletion of CD4+ T cells due to productive infections and persistent immune hyper-activation. The progressive loss of immune cells leads to a severe immunodeficiency, also known as AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), which is mostly lethal in untreated persons. Nowadays, upon HIV infection, patients are normally treated with anti-retroviral therapy (ART), which can control the infection by suppressing HIV-1 replication to undetectable levels. Despite great success of ART, no cure exists so far and life-long ART is associated with side effects. Furthermore, a large number of HIV-infected persons is not aware of their infection, consequently are not treated by ART, but are high-risk transmitters. Therefore, the development of an effective vaccine is an important goal in order to prevent the transmission of HIV-1. However, efforts have not been successful until today. One reason is the vast genetic diversity of the pathogen and its capacity to circumvent the antiviral immune response of the host.

Particularly interesting candidates for efficient vaccines and therapeutic treatments are antibodies with broadly neutralizing properties (bnAbs), which have been identified in a subgroup of HIV-1 positive persons and provide protection against multiple genetic HIV-1 subtypes in animal models. BnAbs are able to inhibit the entry of HIV-1 into host cells by interfering with receptor binding or membrane fusion. Moreover, it is known that many of these broadly and potently neutralizing HIV-1 antibodies contain special properties, such as exceptionally long heavy chain complementary determining region 3 (HCDR3) loops, a high frequency of somatic hypermutations, or significant poly- or auto-reactivity. Due to the ongoing race between the humoral host immune response and the mutating virus, broadly neutralizing antibodies occur only after several years in some infected individuals as consequence of affinity maturation processes. However, various studies in non-human primates and also in humans have shown the considerable therapeutic potential of such already identified bnAbs like the monoclonal antibodies (mAb) 3BNC117, 10-1074 and VRC01. The treatment of single doses of the bnAbs led to an antibody titer-dependent rapid decline in viral replication in SHIV-infected macaques as well as in HIV-positive patients. Nevertheless, the results revealed also that for durable control of HIV-1 infection more than one antibody is necessary due to rapid emerging of viral resistance against single bnAbs.

Combinations of bnAbs targeting different domains within the HIV envelope protein proved to be particularly effective in this regard.

Therefore, in the context of this thesis, new HIV-1 neutralizing antibodies were selected by cell based phage display-technology and analyzed for their binding and neutralization properties *in vitro*. Due to the fact that the envelope protein of HIV-1 is only present in about 10-14 *Spikes* at the surface of the virus particle, the selection of HIV-specific antibodies was performed using native membrane-associated HIV Env complexes displayed on the surface of infected HeLa cells. This way of antigen presentation in connection with the identification of HIV-specific bnAbs has not been published to date and provides possibly a new strategy to enrich novel potent bnAbs against HIV-1. Two cell lines were generated by stable transfection each expressing one variant of HIV-1 Env of subtype B and C, respectively, in the plasma membrane. The native conformation as well the functionality of the membrane-bound Env molecules could be shown by flow cytometry and cell-cell fusion assays. In addition, more than 10⁴ Env *Spikes* per HeLa cell were quantitatively identified for both HIV subtypes. Starting from a cohort of seven recruited HIV-1 infected long-term non-progressors (LTNPs) single-chain variable fragment (scFv)-libraries were constructed from the antibody gene repertoire of four patients with heterologous plasma neutralization activity. LTNPs are individuals chronically infected by HIV, who can control the viremia without anti-retroviral therapy by different genetic and immune host or viral factors. Experimental studies have shown the significant involvement of bnAbs in the control of HIV infection in a group of LTNPs with low viral loads.

By means of subtractive selection, five HIV-1 Env-specific antibody fragments were identified from the patient-derived immune libraries against the natively folded HIV-1 envelope antigens. Furthermore, three of the selected five antibody clones were able to neutralize nine out of 16 tested different Tier 1 and Tier 2 Env-pseudotyped HIV isolates *in vitro*, when reformatted into a Fc region of a humane IgG1. Compared to the neutralization potential of the most potent bnAbs presently known, the neutralization activity of the identified antibody clones is weaker. However, interestingly, clone scFv#1-Fc showed antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in addition to neutralization. Therefore, these results could give a first hint that both antibody-mediated effector functions of clone scFv#1-Fc are may be justified by recognition of a region within the Env structure which is unknown for HIV-1 bnAbs to date. Moreover, this assumption is substantiated by the findings that two further identified HIV-1 neutralizing antibody clones (scFv#3-Fc and VHH#2-Fc) coupled to the same Fc fragment, show no ADCC activity.

In a second project performed within this thesis, the recently identified new HIV-1 epitope EC26-2A4 within the highly conserved membrane-proximal external region (MPER) of the HIV-1 transmembrane protein gp41, which induced neutralizing antibodies upon immunization in mice, was optimized due to a partial overlap with the core epitope of the HIV-neutralizing, but poly-reactive monoclonal antibody (mAb) 2F5. With the help of peptide arrays it was shown that the truncation of the wild type epitope from original 29 amino acids (aa) to 8 aa (⁶⁵⁹ELLELDKW⁶⁶⁶) and the substitution of tryptophan at position 666 against a methionine results in the loss of mAb 2F5 recognition without disturbance of EC26-2A4-IgG binding. Prime boost immunization studies with the optimized peptide variant EC26-2A4ΔM in NMRI mice reveal the induction of high epitope-specific antibody titers. Furthermore, mice

immune sera positive for EC26-2A4ΔM-specific antibodies showed neutralization activity comparable to animals treated with the wild type epitope measured by standardized luciferase based reporter assays in TZM-bl cells *in vitro*.

In addition, the presence of antibodies against the MPER motif were evaluated in the plasma of two HIV patient cohorts (one ART-treated (~1000 HIV patients) and one ART-naïve cohort (71 HIV patients)) by ELISA and correlated subsequently with classical clinical parameters. For approximately 9 % of ART-positive patients EC26-2A4ΔM-specific antibodies could be detected in the plasma samples, whereas the fraction of EC26-2A4ΔM-positive patients in the ART-naïve cohort was about 3-fold higher. In the patient cohort under treatment with antiretroviral drugs no correlation with determining HIV surrogate markers (e.g. viral load and CD4 count) were observed, probably due to the antiviral therapy. In contrast, the presence of EC26-2A4ΔM-specific antibodies in ART-naïve patients correlated with reduced levels in viral RNA and proviral DNA. Surprisingly, individuals of the untreated cohort with antibodies against the EC26-2A4ΔM motif and a second gp41-epitope m3S showed almost twice as much reduction in viral load. Furthermore, antibodies affinity purified with the EC26-2A4ΔM epitope from eight patient sera showed also heterologous neutralization activity against HIV-1 pseudoviruses of four different Env subtypes. Even more, no cross-reactivity with the phospholipids cardiolipin and phosphatidylserine were observed for the patient-derived antibodies. Therefore, based on the above results, it can be concluded that a combination of both MPER epitopes EC26-2A4ΔM and m3S may represent a suitable strategy to induce HIV-1 antibodies with therapeutic efficacy.



INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung	V
Summary	IX
Abbildungsverzeichnis	XVII
Tabellenverzeichnis	XIX
1 Einleitung	1
1.1 Ursprung und Klassifizierung des Humanen Immundefizienz-Virus.....	1
1.2 Struktur, Infektion und Replikationszyklus von HIV-1.....	2
1.2.1 Genom-, Hüllprotein- und Partikelstruktur.....	2
1.2.2 Das HIV-1 Hüllprotein – der Schlüssel für den Zelleintritt.....	4
1.2.3 HIV-1 Replikation.....	5
1.3 Transmission und Pathogenese einer HIV-1 Infektion.....	7
1.3.1 Transmission.....	7
1.3.2 Pathogenese, Latenz und Variabilität.....	8
1.4 HIV-1 Therapie.....	11
1.5 HIV-1 und das Immunsystem.....	13
1.5.1 Angeborene und adaptive Immunantwort.....	13
1.5.2 HIV-1 auf der (Immun)flucht.....	16
1.5.3 Natürliche Kontrolle von HIV-1.....	17
1.6 Breit neutralisierende HIV-1 Antikörper (bnAbs).....	19
1.6.1 Entstehungsprozess und Eigenschaften neutralisierender Antikörper...19	
1.6.2 Neutralisation – eine Begriffserklärung.....	23
1.6.3 Antikörper und ihre Bedeutung in der HIV-1 Impfstoffentwicklung und Therapie.....	23
1.7 Ziel der Arbeit.....	26
2 Material	31
2.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Phagen.....	31
2.1.1 Bakterienstämme.....	31
2.1.2 Zelllinien.....	31
2.1.3 Phagen.....	32
2.2 Kulturmedien.....	32

2.3	Puffer und Lösungen.....	34
2.4	Chemikalien und Reagenzien.....	35
2.5	Kommerzielle Kits.....	36
2.6	DNA-modifizierende Enzyme.....	37
2.7	Größenstandards.....	37
2.8	Plasmide.....	37
2.9	DNA-Oligonukleotide.....	38
3	Methoden.....	41
3.1	Bakterien- und Zellkulturtechnik.....	41
3.1.1	Bakterienkultur.....	41
3.1.2	Langzeitlagerung von Bakterien.....	41
3.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α	41
3.1.4	Transformation elektrokompetenter <i>E.coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	42
3.1.5	Herstellung von 96 Well-Masterplatten.....	42
3.1.6	Zellkultur.....	43
3.1.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
3.1.8	Transiente Transfektion von Säugerzelllinien.....	44
3.1.9	Stabile Transfektion humaner Zellen.....	44
3.1.10	Zell-Zell-Fusionsassay.....	45
3.1.11	<i>In vitro</i> TZM-bl Neutralisations-Assay.....	46
3.1.12	Bestimmung der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC).....	48
3.1.13	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)....	48
3.2	Immunzytochemische Methoden.....	49
3.2.1	Fixierung von Zellen.....	49
3.2.2	Konfokale Mikroskopie.....	49
3.2.3	Durchflusszytometrie.....	50
3.3	Biochemische Methoden.....	52
3.3.1	Protein A-Affinitätschromatographie.....	52
3.3.2	Ultrafiltration.....	52
3.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	53
3.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
3.3.5	Coomassie-Färbung.....	54
3.3.6	Western Blot.....	54
3.3.7	Peptidarray.....	54
3.3.8	Immundetektion.....	55
3.3.9	Produktion löslicher scFv- und VHH-pIII-Fragmente.....	56
3.3.10	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	56
3.3.11	Zellbasierter ELISA.....	57
3.3.12	Autoreaktivitäts ELISA.....	58
3.4	Nukleinsäuretechniken.....	59
3.4.1	Klonierung der HIV-Env- und Antikörperfragment-Fc-Konstrukte.....	59
3.4.2	Restriktion von DNA.....	59
3.4.3	Alkalische Phosphatase-Behandlung.....	60

3.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	60
3.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	61
3.4.6	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR).....	62
3.4.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	63
3.4.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	63
3.4.9	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	63
3.4.10	Sequenzierung von DNA.....	64
3.4.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	64
3.4.12	RNA-Isolation aus PBMCs.....	64
3.4.13	cDNA (engl. <i>complementary DNA</i>)-Synthese aus isolierter RNA.....	64
3.5	Phagen-Display.....	65
3.5.1	Herstellung von Phagenbibliotheken.....	66
3.5.1.1	Konstruktion rekombinanter scFv-Immunbibliotheken.....	66
3.5.1.2	Produktion löslicher Antikörperfragment-präsentierender Phagen.....	67
3.5.1.3	Phagentitration.....	68
3.5.2	<i>Biopanning</i>	68
3.5.2.1	Negativselektion.....	68
3.5.2.2	Positivselektion.....	69
3.5.2.3	Elution gebundener Phagen und Reinfektion von <i>E.coli</i> TG1....	69
3.5.2.4	Produktion löslicher Phagenpartikel im Rahmen des Phagen- Displays.....	70
3.6	Tierversuchsstudien - Prime-Boost-Immunsierung von NMRI-Mäusen.....	70
4	Ergebnisse.....	73
4.1	PROJEKT #1 / Identifikation und Charakterisierung HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente mittels Phagen-Display Technologie.....	73
4.1.1	Generierung membranassoziierter nativer HIV-Hüllproteine als Ziel- struktur für die Selektion neutralisierender Antikörperfragmente.....	73
4.1.2	Charakterisierung der HIV-1 Env exprimierenden Zelllinien.....	79
4.1.3	Analyse der Patientenseren HIV-positiver <i>Long-Term Non-Progressors</i> (LTNPs).....	87
4.1.4	Konstruktion humaner Antikörpergenbibliotheken.....	91
4.1.5	Selektion HIV-1 Env-spezifischer scFv-Fragmente mittels Phagen- Display.....	96
4.1.6	Sequenzanalyse der HIV-1 Env-spezifischen Antikörper- fragmentklone.....	104
4.1.7	Kopplung der scFv- und VHH-Fragmente an eine humane IgG1 Fc-Domäne.....	105
4.1.8	Bestimmung der <i>in vitro</i> Neutralisationsaktivität der selektionierten Antikörperklone.....	107
4.1.9	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der HIV-1 neutralisierenden Antikörperfragmente.....	110
4.1.10	Messung der potentiellen ADCC-Aktivität der selektionierten scFv-/ VHH-Fc-Antikörperkonstrukte.....	112

4.2	PROJEKT #2 / Optimierung des EC26-2A4-Epitops in der gp41-MPER des HIV-1 Hüllproteins.....	115
4.2.1	Modifikation des EC26-2A4-Kernepitops für eine differenzielle Bindung durch HIV-1 neutralisierende Antikörper.....	115
4.2.2	Bestimmung der Immunogenität der modifizierten Epitop-Variante EC26-2A4ΔM.....	118
4.2.3	Evaluation der klinischen Relevanz EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper.....	123
4.2.3.1	Analyse der Seroprävalenz Epitop-spezifischer Antikörper in Plasmaproben HIV-positiver Patienten.....	123
4.2.3.2	Charakterisierung Patienten-abgeleiteter EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper.....	125
5	Diskussion.....	129
5.1	PROJEKT #1 / Identifikation und Charakterisierung HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente mittels Phagen-Display Technologie.....	129
5.1.1	Generierung von zwei HeLa-Zelllinien, die native HIV-1 Hüllproteine konstitutiv auf der Zelloberfläche präsentieren.....	131
5.1.2	Konstruktion von vier scFv-Immunistibliotheken aus dem Antikörper-repertoire HIV-positiver Patienten.....	135
5.1.3	Identifikation von fünf HIV-1 Env-spezifischen Antikörperphagen mittels subtraktiver zellbasierter Selektionsstrategie.....	138
5.1.4	Drei der fünf selektionierten Antikörperklone zeigen <i>in vitro</i> Neutralisationsaktivität.....	141
5.1.5	Der Klon scFv#1-Fc vermittelt eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität.....	145
5.2	PROJEKT #2 / Optimierung des EC26-2A4-Epitops in der gp41-MPER des HIV-1 Hüllproteins.....	147
5.2.1	Der Austausch einer Aminosäure im EC26-2A4-Kernepitop führt zum Verlust der Bindung durch den kreuzreaktiven mAb 2F5.....	147
5.2.2	Die Immunisierung mit dem EC26-2A4ΔM-Epitop führt zur Induktion neutralisierender Antikörper in Mäusen.....	149
5.2.3	Evaluation der klinischen Relevanz EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper.....	151
6	Ausblick.....	157
	Literatur.....	161
	Appendix.....	XXI
	Abkürzungsverzeichnis.....	XXVII
	Lebenslauf.....	XXXI
	Danksagung.....	XXXIII
	Erklärungen.....	XXXV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Klassifizierung und Häufigkeit von HIV-1.....	2
Abb. 1.2	HIV-Struktur und Genomorganisation.....	4
Abb. 1.3	Schematisch dargestellter Ablauf des HIV-1 Eintritts in eine Wirtszelle.....	5
Abb. 1.4	Lebenszyklus von HIV-1.....	7
Abb. 1.5	Natürlicher Verlauf einer unbehandelten HIV-1 Infektion.....	10
Abb. 1.6	Ansatzpunkte der für die Behandlung einer HIV-1 Infektion zugelassenen Substanzklassen.....	13
Abb. 1.7	Schematische Übersicht zur angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen HIV-1.....	15
Abb. 1.8	Darstellung der Ansatzpunkte zellulärer Restriktionsfaktoren und deren viraler Antagonisten.....	17
Abb. 1.9	Schematische Darstellung eines potentiellen Entstehungsprozesses sowie bekannte Zielregionen HIV-1 Hüllprotein-spezifischer breit neutralisierender Antikörper (bnAbs).....	22
Abb. 1.10	Darstellung einer konzentrationsabhängigen Neutralisationsaktivität.....	23
Abb. 1.11	Grundlagen der Immunisierung.....	26
Abb. 1.12	Antikörper und Antikörperfragmente.....	28
Abb. 1.13	Gp41 MPER-Epitop EC26-2A4.....	30
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der Funktionsweise des <i>in vitro</i> Neutralisations-Assays.....	47
Abb. 3.2	Schematische Darstellung der Phasenbildung einzelner Blutbestandteile nach der Dichtegradientenzentrifugation.....	49
Abb. 3.3	Schematische Darstellung eines Bakteriophagen M13.....	66
Abb. 4.1	Analyse der Env-Oberflächenexpression des HIV-1 Subtyp B (HIV-EnvB) und Subtyp C (HIV-EnvC) Klons nach transienter Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	75
Abb. 4.2	Stabile Integration des HIV-1 <i>envB</i> - und <i>envC</i> -Gens ins Genom von HeLa-HF1-3 Zellen mittels <i>Flp-InTM</i> System.....	78
Abb. 4.3	Analyse der CMV- und EFS-Promotor-abhängigen Env-Oberflächenexpression der HIV-1 Subtyp B (HIV-EnvB) und C (HIV-EnvC) Klone nach stabiler Transfektion von HeLa-HF1-3-Zellen.....	80
Abb. 4.4	Quantitative Analyse der Anzahl exprimierter HIV-1 Hüllprotein- <i>Spikes</i> auf der Zelloberfläche generierter Env-Zelllinien.....	82

Abb. 4.5	Nachweis der Fusiogenität funktionaler membranassoziierter HIV-1 Hüllproteine.....	84
Abb. 4.6	Charakterisierung der Antigenintegrität in der Zelloberfläche exprimierter HIV-Hüllproteine.....	85
Abb. 4.7	Untersuchung des Einflusses stringenter Waschzyklen auf die HIV-Hüllproteinestabilität.....	86
Abb. 4.8	Bestimmung der <i>in vitro</i> Plasma-Neutralisationsaktivität der rekrutierten LTNPs.....	89
Abb. 4.9	Nachweis der Erkennung des HIV-EnvB Klons durch Antikörper in den LTNP-Plasmaproben.....	90
Abb. 4.10	Übersicht der Amplifikationsschritte zur Herstellung von Patienten-abgeleiteten scFv-Fragment-Phagenbibliotheken.....	92
Abb. 4.11	Qualitätskontrolle der generierten scFv-Phagenbibliotheken.....	94
Abb. 4.12	Schematische Darstellung der Phagen-Display-Strategie zur Selektion HIV-Env-spezifischer scFv-/ VHH-Fragmente.....	96
Abb. 4.13	Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #1 - #3.....	98
Abb. 4.14	Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #4 und #5.....	99
Abb. 4.15	Qualitätskontrolle der VHH-Phagenbibliothek und Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #6 -#8.....	101
Abb. 4.16	Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #9 und #10.....	102
Abb. 4.17	Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #11 - #13.....	103
Abb. 4.18	Nachweis der HIV-1 Env-Spezifität selektionierter Antikörperfragmentphagen...	103
Abb. 4.19	Qualitätskontrolle der HIV-1 spezifischen Antikörperfragmente, reformatiert an eine Fc-Domäne eines humanen IgG1.....	106
Abb. 4.20	Nachweis der Hüllprotein-spezifischen Bindung der selektionierten HIV-1 neutralisierenden Antikörperfragmente.....	111
Abb. 4.21	Analyse der Antikörperfragment-vermittelten ADCC-Aktivität.....	113
Abb. 4.22	Modifikation des EC26-2A4 Epitops für eine differenzielle Reaktivität mit dem EC26-2A4-spezifischen Patienten-abgeleiteten Antikörper und dem polyreaktiven mAb 2F5.....	117
Abb. 4.23	Analyse der Induktion HIV-1 Epitop-spezifischer Antikörper in immunisierten Mäusen.....	120
Abb. 4.24	Nachweis der Serumneutralisationsaktivität immunisierter Mäuse.....	122
Abb. 4.25	Korrelation HIV-1 relevanter klinischer Parameter in Abhängigkeit der Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper im Patientenplasma.....	124
Abb. 4.26	Untersuchung der Kreuzreaktivität Patienten-abgeleiteter EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper.....	126
Abb. 5.1	Korrelation der Viruslast in Abhängigkeit der Anwesenheit EC26-2A4ΔM- und m3S-spezifischer Antikörper im Plasma ART-naiver HIV-positiver Patienten der ARNS CO15 ALT-Kohorte (n = 71).....	154

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Kennzeichen der zwei Subgruppen an HIV-1 <i>Long Term Non-Progressors</i> (LTNPs).....	19
Tab. 1.2	Eigenschaften einiger breit neutralisierender Antikörper gegen HIV-1.....	21
Tab. 3.1	Verwendete Ansätze für die transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	44
Tab. 3.2	Ansatz für die stabile Transfektion von HeLa-HF1-3 Zellen.....	45
Tab. 3.3	Für die Bestimmung der Neutralisationsaktivität verwendete HIV-1 Pseudoviren.....	47
Tab. 3.4	In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper.....	50
Tab. 3.5	Einstellungen des Durchflusszytometers für die Zell- und Bead-Analyse.....	51
Tab. 3.6	In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	51
Tab. 3.7	Pipettierschema für das SDS-Sammelgel.....	53
Tab. 3.8	Pipettierschema für das SDS-Trenngel.....	54
Tab. 3.9	Für die Immundetektion verwendete Antikörper.....	55
Tab. 3.10	Für die ELISA-Experimente verwendete Antikörper.....	57
Tab. 3.11	Für den zellbasierten ELISA verwendete Antikörper.....	58
Tab. 3.12	Restriktionsansatz für die Klonierung von HIV-Env- bzw. Antikörperfragment-Fc-Konstrukten.....	60
Tab. 3.13	Restriktionsansätze für die Konstruktion von scFv-Immunbibliotheken.....	60
Tab. 3.14	Reaktionsansätze für die DNA-Ligation.....	61
Tab. 3.15	Ansätze für die Polymerase-Kettenreaktion.....	61
Tab. 3.16	Protokolle für die Polymerase-Kettenreaktion.....	62
Tab. 3.17	Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR.....	62
Tab. 3.18	Protokoll für die Kolonie-PCR.....	63
Tab. 3.19	Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese.....	65
Tab. 3.20	Peptid-Boost-Ansätze für die Immunisierung von NMRI-Mäusen.....	71
Tab. 4.1	Übersicht der für die Generierung membranständiger HIV-Hüllproteine verwendeter HIV-1 Env-Klone.....	74
Tab. 4.2	Anzahl ausgebildeter Hygromycin B-resistenter Zellkolonien je Promotorkonstrukt.....	77
Tab. 4.3	Bestimmung der Bindungskapazitäten HIV-1 Env-spezifischer Antikörper mit den generierten HeLa-Env Zelllinien.....	81
Tab. 4.4	Übersicht verschiedener klinischer Parameter der rekrutierten HIV-1 positiven Patienten ohne antiretrovirale Therapie.....	88

Tab. 4.5	Zusammenfassung der ermittelten <i>in vitro</i> Plasma-Neutralisationsaktivität (ID ₅₀) der 7 LTNPs gegen 5 unterschiedliche HIV-Pseudovirusisolate.....	88
Tab. 4.6	Zusammenfassung der Anzahl isolierter Blutzellen, der cDNA-Ausbeuten sowie der Bakterien- und Phagentiter der einzelnen HIV-positiven Patienten im Zuge der Generation von scFv-Immunistheken.....	95
Tab. 4.7	Übersicht der selektierten HIV-1 Env-spezifischen Antikörperfragmente.....	105
Tab. 4.8	Charakterisierung der <i>in vitro</i> Neutralisationsaktivität der fünf selektierten Antikörperfragmente gegen Tier1 bzw. autologe HIV-1 Pseudoviren.....	108
Tab. 4.9	Charakterisierung der <i>in vitro</i> Neutralisationsaktivität der Klone scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc gegen Referenzviren (12 HIV-1-Pseudoviren) der Gruppe Tier 2.....	109
Tab. 4.10	Übersicht der zwei evaluierten HIV-1 Patientenkohorten bezüglich der Anzahl EC26-2A4ΔM-seropositiver Patienten.....	124
Tab. 4.11	Charakterisierung der <i>in vitro</i> Neutralisationsaktivität der EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper abgeleitet von acht HIV-1 positiven Patienten gegen bis zu sieben genetisch unterschiedliche HIV-1 Pseudoviren.....	127

1 EINLEITUNG

1.1 Ursprung und Klassifizierung des Humanen Immundefizienz-Virus

Anfang der Achtziger identifizierten die Franzosen Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier sowie der US-Amerikaner Robert Gallo unabhängig von einander ein Retrovirus, welches bei Betroffenen zum Ausbruch des erworbenen Immunschwächesyndroms, abgekürzt AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) führte (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984). Dieses Virus ist heute bekannt als Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) (Coffin et al., 1986). Abhängig von der Abstammung des Virus wird HIV in zwei Typen eingeteilt, HIV-1 und HIV-2, wobei die Viren des Typ 1 hauptverantwortlich für die globale HIV-Epidemie sind (Abbildung 1.1A). Seit der Entdeckung hat sich die HIV-1-Infektion zu einer der verheerendsten Pandemien unserer Zeit entwickelt. Bis heute haben sich rund 76 Millionen Menschen weltweit mit dem HI-Virus infiziert und etwa 38 Millionen Betroffene sind an den Folgen einer HIV-1 Infektion gestorben. Zudem schätzt UNAIDS die Zahl an weltweiten Neuinfektionen im Jahr 2016 auf rund 2 Millionen Menschen (UNAIDS, 2019).

Der Ursprung der globalen HIV-1 Epidemie geht zurück auf zoonotische Infektionen mit simianen Immundefizienz-Viren (SIV) afrikanischer Primaten. Insgesamt sind vier unabhängige spezies-übergreifende Infektionsereignisse von Affen auf Menschen bekannt, drei von Schimpansen (SIV_{CPZ}) und eine von Gorillas (SIV_{GOR}). Aufgrund der unterschiedlichen Abstammung der ursprünglich übertragenen Immundefizienz-Viren wird HIV-1 in vier Gruppen unterteilt: M, N, O und P (Charneau et al., 1994; Leys et al., 1990; Plantier et al., 2009; Simon et al., 1998). Jede Gruppe repräsentiert ein unabhängiges Transmissionsereignis, wobei Viren der Gruppe M die pandemische Form von HIV-1 darstellen und Ursache der weltweiten HIV-1-Epidemie sind (Sharp & Hahn, 2011). HI-Viren des Typ 1 M werden zusätzlich in neun Subtypen untergliedert: A-D, F-H, J und K, zudem gibt es noch einige rekombinante Formen. Diese Klassifizierung ist abhängig von der genetischen Diversität des viralen Genoms (Hemelaar et al., 2006; Robertson et al., 2000). Genetische Flexibilität ist eine grundlegende Eigenschaft von Viren, um sich an den jeweiligen Wirt anzupassen und so der wirtseigenen Immunantwort zu entfliehen. Das Ausmaß der Diversität wird durch die Fehlerhaftigkeit der viralen RNA und DNA-Polymerasen bestimmt (Duffy et al., 2008).

Die höchste globale Prävalenz haben die Subtypen A, B und C, wobei etwa 50 % aller HIV-1 Infektionen weltweit durch den Serotyp C verursacht werden (Abbildung 1.1B). HIV-1 Subtyp C tritt prädominant in Afrika und Indien auf, während in den Regionen Westeuropa,

Amerika und Australien der Subtyp B die vorherrschende genetische Form ist (Hemelaar et al., 2011).

HI-Viren des Typs 2 kommen hingegen hauptsächlich in westafrikanischen Regionen vor und werden in die epidemischen Gruppen A und B sowie die nicht-epidemischen Gruppen C-G klassifiziert. Der Ursprung von HIV-2 geht auf eine virale Zoonose von Rußmangaben (*Cercocebus atys*, SIV_{SM}) auf den Menschen zurück (Lemey et al., 2003).

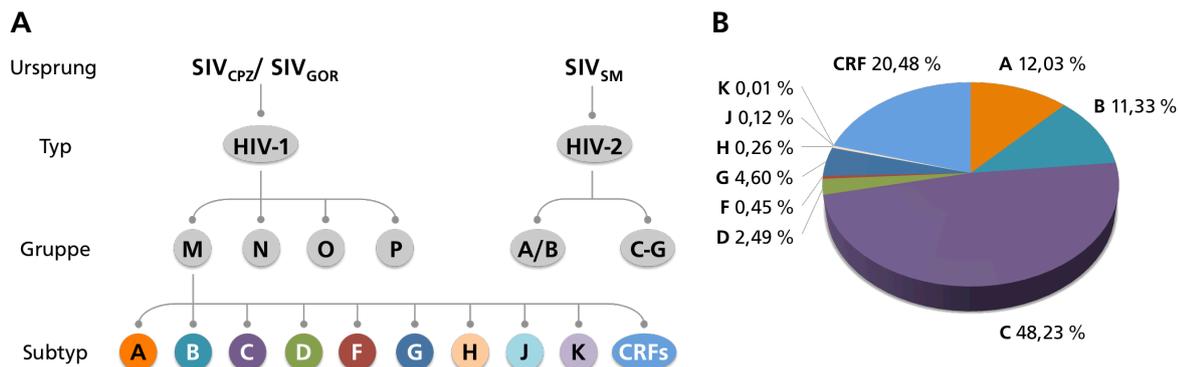


Abbildung 1.1 Klassifizierung und Häufigkeit von HIV. (A) Vereinfachte Darstellung der Klassifikation des humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Es sind zwei Typen von HI-Viren bekannt (HIV-1 und HIV-2). Typ 1 Viren wurden ursprünglich von Schimpansen (SIV_{CPZ}) und Gorillas (SIV_{GOR}) auf den Menschen übertragen und werden in vier Gruppen unterteilt. Die Gruppe M wird zusätzlich in neun Subtypen und weitere zirkulierende rekombinante Formen (CRFs, engl. *circulating recombinant forms*) unterschieden. HI-Viren der Gruppe M stellen die pandemische Form des Erregers dar und sind für nahezu alle HIV-Infektionen weltweit verantwortlich. HIV-2 geht ursprünglich auf eine zoonotische Infektion mit einem SIV von Rußmangaben (SIV_{SM}) zurück und wird in die epidemischen Gruppen A und B sowie die nicht-ansteckenden Gruppen C-G unterteilt. (B) Analyse der globalen Prävalenz der unterschiedlichen HIV-1 M Subtypen von 2000 bis 2007. Etwa die Hälfte der globalen Infektionen wird durch Subtyp C-Viren verursacht, gefolgt von CRF und Viren des Subtyps A und B (Hemelaar et al., 2011).

1.2 Struktur, Infektion und Replikationszyklus von HIV-1

1.2.1 Genom-, Hüllprotein- & Partikelstruktur

Taxonomisch gehört das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 zur Familie der Retroviren und stellt den wohl bekanntesten Vertreter der Gattung der Lentiviren dar. Wie bei allen Viren dieser Familie ist die genetische Information auf zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen kodiert, welche im umhüllten Kern des Viruspartikels lokalisiert sind (Engelman & Cherepanov, 2012). Das etwa 10 Kilobasen große HIV-1-Genom umfasst 9 Gene, welche für 15 virale Struktur- und Regulatorproteine kodieren (Abbildung 1.2A). Diese werden zunächst in Form von Vorläufer-Polypeptiden synthetisiert und anschließend durch proteolytische Spaltung posttranslational zu individuellen Proteinen prozessiert (Pettit et al., 1994). Im Durchmesser misst ein ausgereiftes HIV-1 Viruspartikel in etwa 100 nm – 150 nm. Der Kern eines HI-Virions, in dem neben der genomischen RNA auch die Replikationsenzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) sowie einige akzessorische Proteine (Vif, Nef, Vpr & p7) vorliegen, ist von zwei Kapsidschichten umschlossen: einer inneren konischen Kapsel, gebildet aus assemblierten HIV-Capsid Proteinen p24 (CA) und einer äußeren Matrix,

aufgebaut aus dem viralen Protein p17 (MA) (Gao et al., 1999; Niedrig et al., 1994). Die äußerste Hülle eines HIV-1 Viruspartikels besteht aus einer von der Plasmamembran der Zelle abgeleiteten Doppellipidschicht und den darin inkorporierten HIV-1 Hüllproteinen (Env) (Abbildung 1.2B). Das native HIV-1 Env ist ein trimerer Glykoprotein-Komplex (HIV-Spike), der sich aus drei nicht-kovalent assoziierten Heterodimeren zusammensetzt (Abbildung 1.2C) (Lu et al., 1995). Jedes Heterodimer besteht aus einem Oberflächen-Glykoprotein gp120 und einem Transmembran-Glykoprotein gp41, welche aus dem Vorläuferprotein gp160, nach Spaltung mit Furin, gebildet werden. Die gp120-Untereinheit besitzt fünf variable Domänen (V1 – V5), durchsetzt mit fünf relativ konstanten Regionen (C1 – C5) (Checkley et al., 2011). Zudem hat das gp120 mehrere hoch konservierte Cysteinreste, welche für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Hüllproteins notwendig sind (Leonard et al., 1990). Die gp41-Untereinheit des Hüllproteins wird hingegen in drei Bereiche eingeteilt: eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne (TM) und in einen C-terminalen zytoplasmatischen Teil (CT). In der extrazellulären Domäne sind unter anderem das Fusionspeptid (FP) lokalisiert und α -helikale *Coiled-Coil* Struktur motive, wie die *heptad-repeat regions* (HR-N & HR-C) und ein hochkonservierter Bereich, bezeichnet als *membrane-proximal external region* (MPER) (Montero et al., 2008). Elektronentomographische Analysen von HIV-1 Wildtypviren haben gezeigt, dass ein Virion im Schnitt 8 – 10 native Hüllproteinkomplexe (*Spikes*) auf der Partikeloberfläche präsentiert. Ursachen für die geringe Anzahl intakter HIV-*Spikes* ist unter anderem die relativ schwache und nicht-kovalente Natur der gp120-gp41 Interaktion, wodurch es häufig zur Abspaltung der gp120-Untereinheit von der Virus- bzw. Zelloberfläche kommt (Zhu et al., 2003). Darüber hinaus vermitteln funktionelle Domänen des CT, beim Zusammenbau der Viruspartikel an der Plasmamembran, die Internalisierung membranständiger Hüllproteine durch Endozytose (Boge et al., 1998). Ein weiteres wesentliches Merkmal des HIV-1 Hüllproteins ist eine starke und differierende Glykosylierung. Die gp120-Untereinheit besitzt 20 bis 35 N-gekoppelte Glykane, die etwa die Hälfte der molekularen Masse des gp120 ausmachen. Im gp41 gibt es 3 bis 5 N-Glykosylierungsstellen. Für HIV-1 hat die Glykosylierung eine existenzielle Bedeutung, da sie (I) die Viruspartikel weniger immunogen macht und dadurch das Virus vor der Erkennung durch das Wirtsimmunsystem schützt (Abschnitt 1.5.2), (II) zur korrekten Faltung des Hüllproteins beiträgt und (III) das Virion bei der Bindung an die Wirtszelloberfläche unterstützt (Li et al., 2008; Montefiori et al., 1988; Raska & Novak, 2010).

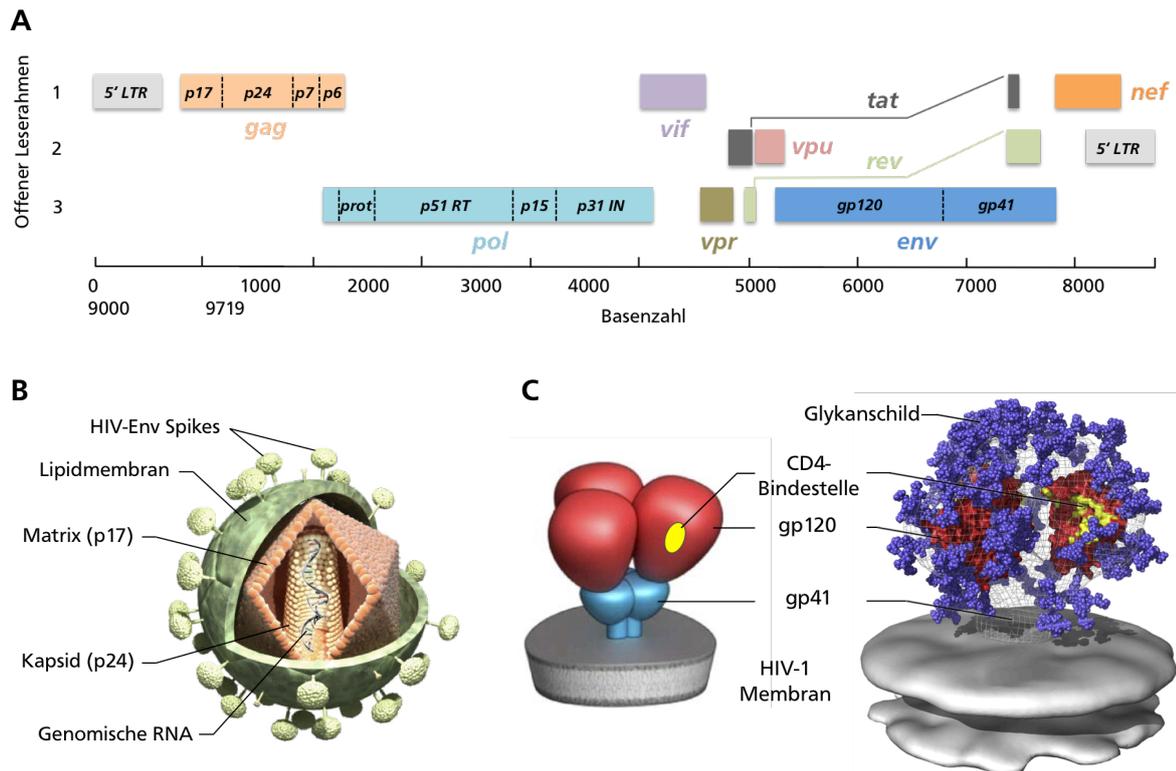


Abbildung 1.2 HIV-Struktur und Genomorganisation. (A) Organisation des HIV-1 Genoms. Gezeigt sind die offenen Leserahmen sowie die Lokalisation der Gene innerhalb eines HIV-Genoms, welches für insgesamt 15 Struktur- und Regulatorproteine kodiert. Verwendete Abkürzungen, LTR: *long terminal repeat*, gag: *group specific antigen*, pol: *polymerase*, vif: *viral infectivity factor*, vpr: *virus protein r*, tat: *transactivator of transcription*, rev: *RNA splicing regulator*, vpu: *virus protein unique*, env: *envelope*, nef: *negative regulating factor*. Als Referenz diente das Genom des HIV-1 HXB2-Isolates (Abbildung in Anlehnung an HIV Database). (B) Dreidimensionale Modellansicht eines HIV-1 Viruspartikels mit dem Fokus auf virale Hüllstrukturen (Abbildung in Anlehnung an Medical Grafics). (C) Darstellung des HIV-Hüllproteins (Env) ohne Glykanschild (links) und mit computermodellierter Glykosylierung (lila, rechts). Das virale Oberflächenprotein besteht aus drei nichtkovalent miteinander verbundenen Heterodimeren, welche sich aus je einem gp120- (rot) und einem gp41-Glykoprotein (blau) zusammensetzen. Die starke Glykosylierung schützt das Hüllprotein unter anderem vor der wirtseigenen Immunantwort. Das HIV-Env ist der Schlüssel für die Infektion einer Wirtszelle über die Interaktion mit dem CD4-Wirtszellrezeptor (CD4-Bindestelle = gelb) und einem Co-Rezeptor (CCR5/ CXCR4) (Abbildung in Anlehnung an Tran et al., 2012; Burton et al., 2012).

1.2.2 Das HIV-1 Hüllprotein – der Schlüssel für den Zelleintritt

Initiiert wird die Infektion einer Wirtszelle mit HIV-1 durch die Interaktion des viralen Hüllproteins mit dem CD4-Wirtszellrezeptor (engl. *cluster of differentiation 4*), dem primären Rezeptor der Primaten-Lentiviren (NIH). Die Erkennung des CD4-Rezeptors erfolgt durch konservierte, konformationelle Regionen der konstanten Domänen C1, C3 und C4 des gp120 (Lasky et al., 1987). Resultierend aus der CD4-Bindung erfährt das Hüllprotein starke strukturelle Änderungen, wodurch die variablen Schleifen V1/V2 und V3 neu angeordnet werden. In Folge dieser Repositionierung kommt es zur Ausbildung des sogenannten *bridging sheets*, welches die Bindestelle für den Co-Rezeptor darstellt (Wilén et al., 2012). Als Co-Rezeptor nutzt HIV-1 hauptsächlich den Chemokinrezeptor 5 (CCR5), alternativ auch den Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) auf der Wirtszelloberfläche (Berger et al., 1998). Durch die Bindung des Co-Rezeptors wird eine erneute Konformationsänderung innerhalb des gp41

bewirkt, welche zunächst die Insertion des hydrophoben Fusionspeptids in die Wirtszellmembran induziert. In Folge dessen werden die helikalen HR-N und HR-C Regionen der drei gp41-Untereinheiten räumlich zusammengeführt und es kommt zur Ausbildung eines 6-Helix Bündel-Motivs (6HB). Die Bildung dieses Strukturmotivs ist letztlich die treibende Kraft, welche die Virus- und Wirtszellmembran in eine enge nachbarschaftliche Position bringt. Dies führt schließlich zur Formation einer Fusionspore zwischen dem Virus und der CD4-positiven (CD4+) Wirtszelle, wodurch das Viruspartikel in die Zelle eindringen kann (Abbildung 1.3) (Melikyan, 2008).

Neben der essentiellen Bedeutung, die dem HIV-1 Env bei der Infektion zukommt wird ebenso deutlich, dass auch eine native Konformation des Hüllproteins für die Infektion von enormer Wichtigkeit ist. Beispielsweise sind die konservierten Bereiche für die CD4-Rezeptorbindung in der primären Proteinsequenz in diskontinuierlichen Segmenten lokalisiert, aber in funktionaler, räumlicher Nachbarschaft in der nativen Quartärstruktur des HIV-1 Hüllproteins (Olshevsky et al., 1990). Darüber hinaus konnten verschiedene Studien belegen, dass eine native trimere Konformation die extreme Flexibilität und Stabilität des HIV-1 Env ermöglicht, welche für die umfangreichen Strukturänderungen und Immun-*Escape*-Mechanismen benötigt wird (Abschnitt 1.5.2) (Checkley et al., 2011).

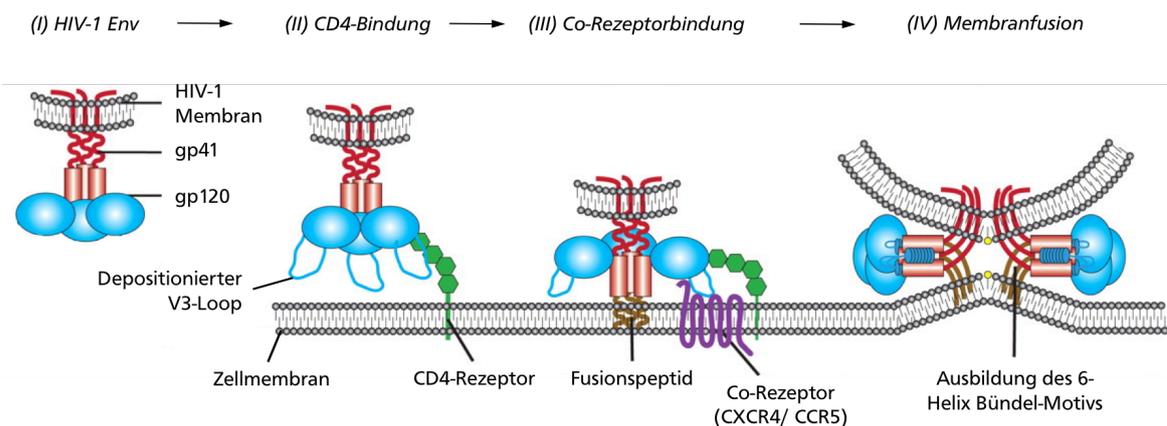


Abbildung 1.3 Schematisch dargestellter Ablauf des HIV-1 Eintritts in eine Wirtszelle. Für die Infektion von Zielzellen benötigt HIV-1 das Hüllprotein (Env), bestehend aus den gp120- und gp41-Untereinheiten (I). Zuerst erfolgt die Bindung des CD4-Rezeptors, wodurch das HIV-Env verschiedene Konformationsänderungen erfährt (II). Diese ermöglichen in der Folge die Anlagerung an den Co-Rezeptor (CCR5/ CXCR4), vermittelt durch den V3-Loop (III). Anschließend führen weitere Strukturänderungen innerhalb des HIV-Env zur Insertion des gp41-Fusionspeptides in die Wirtszellmembran. Die erfolgreiche Fusion des Virus mit der Wirtszelle wird final durch die Ausbildung des 6-Helix Bündel-Motivs ermöglicht (IV). (Abbildung in Anlehnung an Wilen et al., 2012).

1.2.3 HIV-Replikation

Eine erfolgreiche Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran führt zur Übertragung des HIV-1 Kapsids in das Zytoplasma der CD4+ Zelle. Dort wird das Kapsid in endosomalen Kompartimenten partiell aufgelöst, sodass das HIV-1 RNA-Genom sowie die viralen Proteine im sogenannten Präintegrationskomplex (PIC, engl. *pre-integration complex*) zytoplasmatischen Faktoren zugänglich sind (*Uncoating*) (Sierra et al., 2005). Nach der Freisetzung wird die HIV-1 RT aktiv und transkribiert das einzelsträngige virale RNA-Genom in cDNA (engl. *complementary DNA*) (Goto et al., 1998). Zeitgleich baut die RNase H, eine katalytische Domäne der retroviralen RT, den RNA-Strang enzymatisch ab. Der so entstandene cDNA-Einzelstrang wird abschließend durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT in doppelsträngige DNA (provirale DNA) konvertiert (Hu & Hughes, 2012). Im Anschluss an die Konversion der HIV-RNA in DNA wird diese im Präintegrationskomplex, bestehend aus der linearen proviralen DNA, HIV-1 Proteinen und verschiedenen Wirtszellproteinen, in den Nukleus transportiert (Ruff et al., 2014). Im Nukleus angekommen induziert die HIV-1 IN die Insertion der viralen DNA in das Wirtszellgenom. Das integrierte HIV-1 Genom wird auch als Provirus bezeichnet und persistiert in einem latenten, transkriptionsinaktiven Zustand in der infizierten Zelle (Abbildung 1.4) (Van Maele & Debysier, 2005).

Nach Aktivierung der HIV-1 infizierten Zelle, werden virale RNAs durch die wirtszelleigene Transkriptionsmaschinerie synthetisiert. Ausschlaggebend für eine effiziente Transkription neuer viraler mRNA (engl. *messenger RNA*) und genomischer RNA ist ein synergistisches Zusammenspiel verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren und dem viralen Transaktivator Tat, welche die Bindung und Prozessivität der RNA-Polymerase II begünstigen (Coiras et al., 2009). Die viralen, zum Teil vielfach gespleißten mRNAs werden nachfolgend im Zytoplasma in regulatorische und strukturelle HIV-1 Proteine translatiert und zur Plasmamembran transportiert. Anschließend kommt es an der Zellmembran zur Assemblierung der Virusproteine und der genomischen HIV-RNA (Sierra et al., 2005). Die daraus resultierenden neuen HIV-1 Viruspartikel treten durch Knospung aus der Wirtszelle heraus, wobei das HIV-Virion von der zellulären Doppellipidschicht der Plasmamembran umschlossen wird (Sundquist & Kräusslich, 2012). Während des Knospungsprozesses werden die assemblierten Gag/Pol-Polyproteine durch die HIV-1 Protease enzymatisch gespalten. Diese posttranslationale Modifikation, auch Reifung genannt, führt nach der Freisetzung zu einer massiven Änderung der Partikelstruktur und damit verbunden zur Infektiosität des HIV-1 Virions. Die gp160 Env-Vorläuferproteine werden dagegen im Golgi-Apparat durch die zelluläre Protease Furin gespalten (Freed, 2015).

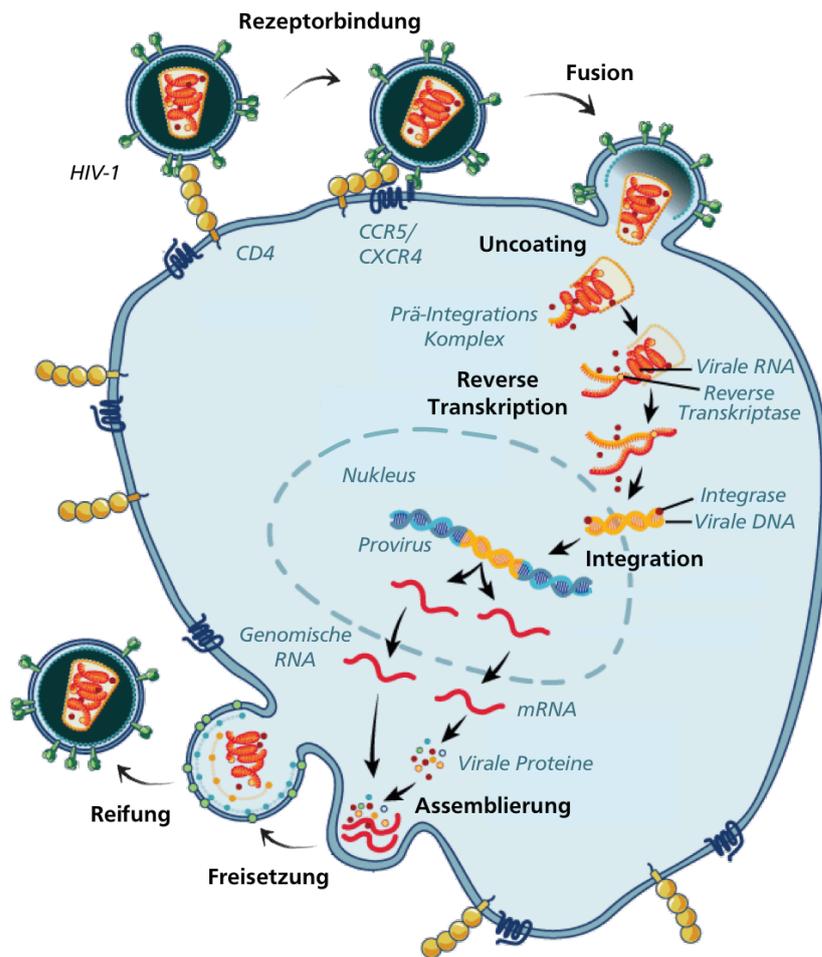


Abbildung 1.4 Lebenszyklus von HIV-1. HIV-1 infiziert Wirtszellen durch die Bindung an den CD4-Rezeptor und einen Co-Rezeptor (CCR5/ CXCR4) (Rezeptorbindung). In der Folge fusioniert das Viruspartikel mit der Wirtszelle (Fusion). Das virale Genom wird durch partielle Auflösung des Kapsids und unter Bildung des Präintegrationskomplexes ins Zytoplasma freigesetzt (Uncoating) und durch die viruseigene Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Anschließend gelangt die Virus-DNA in den Nukleus, in dem die HIV-Integrase das virale Genom in die Wirtszell-DNA integriert (Integration). Die Aktivierung einer infizierten Zelle führt zur Amplifikation des proviralen HIV-Genoms durch die zelleigene Replikationsmaschinerie. Die neu synthetisierten HIV-Proteine und RNAs wandern an die Zellmembran und schließen sich zu neuen unreifen Viruspartikeln zusammen (Assemblierung). Nach der Freisetzung der Virionen prozessiert die HIV-Protease eingelagerte Polyproteine in einzelne funktionale Proteine (Reifung), wodurch das unreife HI-Viruspartikel infektiös wird und weitere Wirtszellen infizieren kann. (Abbildung in Anlehnung an NIH).

1.3 Transmission und Pathogenese einer HIV-Infektion

1.3.1 Transmission

Die Transmission des HI-Virus von einem Wirt zum nächsten erfolgt über infektiöse Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Blut, Sperma oder Scheidenflüssigkeit. Je nach Art der HIV-1-Übertragung unterscheidet man drei Haupt-Transmissionswege: (I) den sexuellen Kontakt, (II) die parenterale Inokulation und (III) die vertikale Transmission. Der intime Sexualkontakt stellt mit rund 88 % der HIV-1-Infektionen weltweit die mit Abstand häufigste Ursache für eine Übertragung des HI-Virus dar (Shaw & Hunter, 2012). Treibende Faktoren,

die eine sexuelle Transmission begünstigen, sind unter anderem häufig wechselnde Geschlechtspartner, Prostitution, sexuelle Übergriffe, aber auch fehlende Aufklärung, eingeschränkter Zugang zur antiretroviralen Therapie (ART), Unwissenheit über den Infektionsstatus sowie Koinfektionen der Genitalorgane mit anderen Infektionserregern (Maartens et al., 2014). Etwa 8 % der HIV-1-Infektionen weltweit werden durch parenterale Inokulation verursacht, in Form von Kontakt mit verunreinigten Blutprodukten oder durch die gemeinsame Verwendung kontaminierten Injektionsmaterials wie z.B. beim intravenösen Drogengebrauch. Der dritte Übertragungsweg, die vertikale Transmission, macht rund 4 % der weltweiten HIV-1-Infektionen aus. Unter der vertikalen Transmission versteht man die Übertragung des Virus von der Mutter auf ihr Kind. Zu einer Infektion kann es unter Umständen direkt während des Geburtsvorgangs kommen oder nach der Geburt über die Muttermilch (Simon et al., 2006). Der verhältnismäßig geringe Anteil vertikaler Virustransmissionen ist vor allem in der Verfügbarkeit hoch wirksamer antiretroviraler Therapien begründet (Abschnitt 1.4).

Aufgrund verschiedener physikalischer Barrieren, die das Virus bei der Transmission überwinden muss, variiert die Wahrscheinlichkeit einer Infektion stark zwischen den unterschiedlichen Übertragungswegen. Das größte Risiko einer Transmission besteht bei direktem Blut-Kontakt, wie beispielsweise bei einer Bluttransfusion. In diesem Fall liegt die Infektionsrate bei 9250 Infektionen pro 10000 Kontakten (Patel et al., 2014). Ebenfalls hoch, aber dennoch deutlich geringer, ist das Transmissionsrisiko bei einer Mutter-zu-Kind-Übertragung (2260 pro 10000 Expositionen). Bei sexuellem Kontakt variiert die Wahrscheinlichkeit einer Transmission von nahezu 0 bei Oralsex bis zu 138 Infektionen pro 10000 Kontakten bei Analverkehr.

Ein substantieller Faktor, welcher das Risiko einer HIV-1 Übertragung beeinflusst, ist die Viruslast (VL). Die Viruslast ist definiert als die Anzahl zirkulierender Viruspartikel im Blutplasma. Im Falle von HIV-1 wird die VL als Konzentration der HIV-1 RNA-Genomkopien pro Milliliter Blut angegeben. Quinn und Kollegen konnten anhand einer klinischen Studie belegen, dass der Anstieg der VL um eine \log_{10} -Stufe mit einer 2,45-fachen Zunahme des Infektionsrisikos bei sexueller Übertragung assoziiert ist (Quinn et al., 2000). Je höher also die Viruslast im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten des infizierten Wirtes ist, desto höher ist auch das Risiko einer HIV-Transmission.

1.3.2 Pathogenese, Latenz und Variabilität

Ein einzelnes transmittiertes infektiöses HI-Viruspartikel ist ausreichend, um eine neue systemische Infektion in einem Menschen zu etablieren (Swanstrom & Coffin, 2012). Für die Infektion einer Körperzelle benötigt HIV-1, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, das Oberflächenmolekül CD4. Zu den CD4-exprimierenden Zelltypen zählen hauptsächlich Zellen des Immunsystems, wie CD4 T-Lymphozyten (T-Helferzellen), Monozyten/ Makrophagen und dendritische Zellen (Liu et al., 1999). Eine HIV-Infektion ist in der Folge mit einem progressiven Verlust an CD4+ Zellen im Körper assoziiert. Aus diesem Grund ist die CD4-Zellzahl ein bedeutender Surrogatmarker, um den Progressionsstatus einer HIV-1 Infektion zu bestimmen. Die CD4-Zellzahl wird pro Mikroliter Blut angegeben (CDC, 1992). Ein zweiter

wichtiger klinischer Parameter ist die Viruslast (Abschnitt 1.3.1). Sie liefert wichtige Hinweise darauf, wie hoch das Risiko einer Krankheitsprogression ist. Der natürliche Verlauf einer unbehandelten systemischen HIV-1 Infektion kann in drei Phasen eingeteilt werden, (I) in eine akute, (II) in eine asymptomatische und (III) in die AIDS-Phase (Abbildung 1.5A) (Maartens et al., 2014). Der Zeitraum innerhalb der ersten drei bis sechs Monate nach der Virustransmission wird als akute Infektion bezeichnet und ist gekennzeichnet durch einen massiven Verlust an CD4+ T-Zellen und einen dramatischen Anstieg an Viruspartikeln im Plasma. Während dieser frühen Phase der Infektion vermehrt sich das Virus rasant und breitet sich im gesamten Körper aus. Die starke Depletion an CD4+ Zellen wird hauptsächlich durch produktive HIV-Infektionen der Zielzellen verursacht, wobei es zur Freisetzung neuer Viruspartikel kommt (Zhang et al., 1997). Mit dem Einsetzen der wirtseigenen Immunantwort sinkt die Viruslast im Blut temporär deutlich ab und es kommt zu einer Erholung der CD4-Zellzahl (Phillips, 1996). Die wirtseigenen Immunabwehrmechanismen werden im Abschnitt 1.5.1 detaillierter beschrieben. Durch die Aktivierung der humoralen Immunantwort wird die initiale Phase nach der HIV-Infektion häufig von leichten unspezifischen Symptomen begleitet, wie Fieber oder angeschwollenen Lymphknoten (Swanstrom & Coffin, 2012). Die akute Phase wird durch eine asymptomatische Phase abgelöst, in der die Patienten weitestgehend symptomfrei sind. Abhängig von der Konstitution des Immunsystems und der viralen Fitness kann diese Phase viele Jahre andauern und wird deshalb auch als chronische Infektion bezeichnet. Neben der direkten Infektion, wird der kontinuierliche Abfall an CD4+ Zellen in dieser Zeit hauptsächlich durch sogenannte *Bystander*-Effekte verursacht. Mit Bystander-Effekten ist die Eliminierung von HIV-1 uninfizierten T-Zellen gemeint. Die Depletion erfolgt beispielsweise durch die chronische Hyperaktivierung des Immunsystems, Synzytienbildung oder Pyroptose (Maartens et al., 2014). Zusätzlich führt auch eine verringerte Produktion neuer, gereifter CD4+ Zellen im Verlauf einer HIV-1 Infektion zum progressiven Verlust an Immunzellen und zu einer zunehmenden Erschöpfung des Immunsystems (Lackner et al., 2012). Bei einer CD4-Zellzahl unter 300 Zellen/ μ L ist das Immunsystem so dramatisch geschwächt, dass sich opportunistische Infektionen und HIV-assoziierte Tumore im Wirt entwickeln (Seitz, 2016). In der Folge erleiden die Patienten schwerwiegende Schädigungen verschiedenster Organe, wie bspw. dem zentralen Nervensystem, der Lunge, der Leber oder auch der Niere. Dieses Stadium ist laut CDC (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*) als AIDS definiert und führt in nahezu allen Fällen zum Tod der Betroffenen (CDC, 1992). Der Verlauf einer unbehandelten HIV-1 Infektion zu AIDS dauert im Mittel 8 bis 10 Jahre (Braibant et al., 2006).

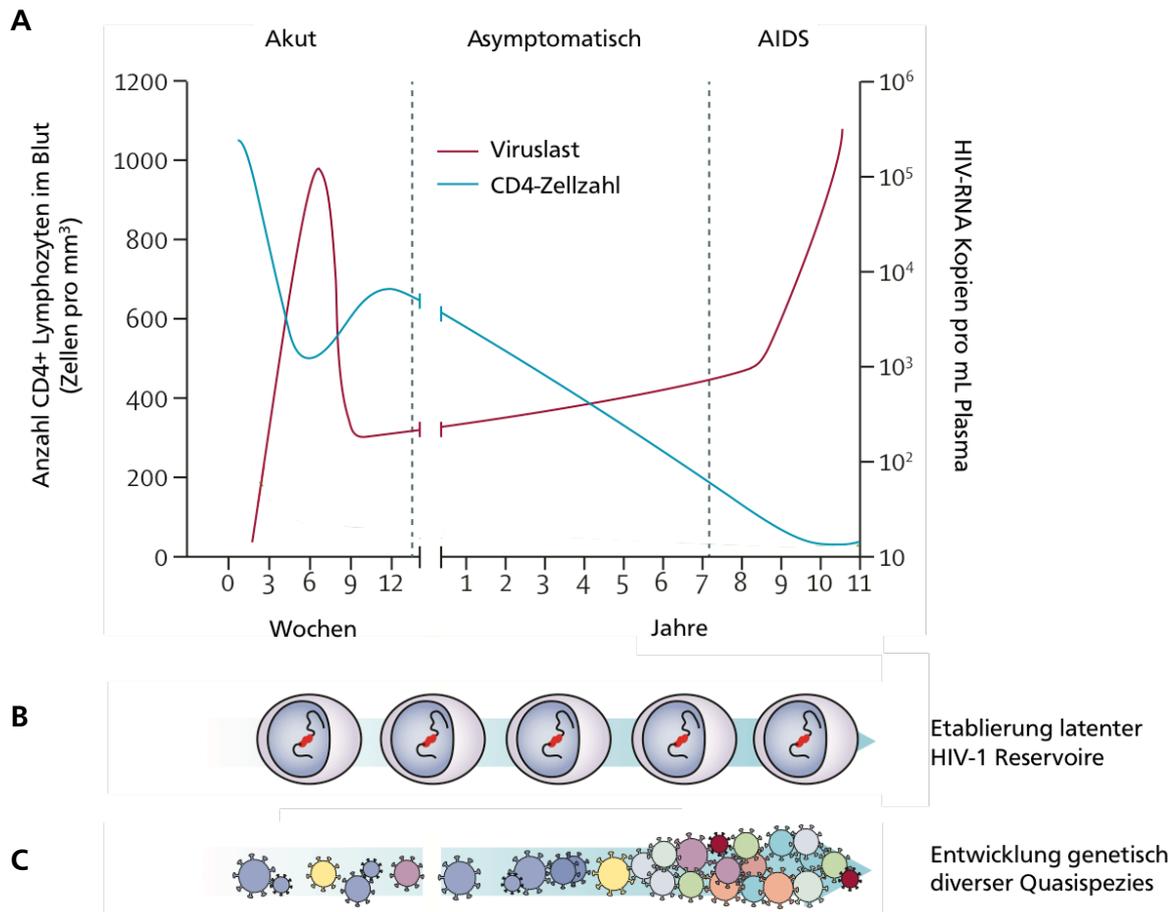


Abbildung 1.5 Natürlicher Verlauf einer unbehandelten HIV-1 Infektion. (A) Während der wenige Wochen andauernden akuten Phase nach einer HIV-Infektion ist ein massiver Anstieg der Virusreplikation und ein dramatischer Abfall der CD4-Zellzahl (blau) zu beobachten (Akut). Mit dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort fällt die Viruslast (rot) im Patienten deutlich ab und die Zahl an CD4+ Zellen erholt sich leicht (*Setpoint*). In der Folge ist ein kontinuierlicher Verlust an Immunzellen, einhergehend mit einer stetigen Zunahme an zirkulierenden Viruspartikeln, zu verzeichnen (Asymptomatisch). Fällt die CD4-Zellzahl unter einen Wert von 200 Zellen/ μ L Plasma ist das Immunsystem derart geschwächt, dass es vermehrt zum Auftreten von opportunistischen Infektionen und Tumoren kommt. Dieser Status wird als AIDS deklariert und endet in den meisten Fällen mit dem Tod des Patienten. Der Zeitraum von einer Infektion mit HIV-1 bis zum Ausbruch von AIDS kann ohne Therapie zwischen 2 bis 25 Jahre andauern. (B) Aufgrund der latenten Infektion langlebiger Zellen, z.B. T-Gedächtniszellen, ist HIV-1 in der Lage, lebenslang im Wirt zu überdauern. Die Ausbildung dieser viralen Reservoirs erfolgt innerhalb der ersten Tage nach der primären HIV-Infektion. (C) Bedingt durch die fehlende Korrekturleseaktivität der viruseigenen Reversen Transkriptase, generiert HIV-1 im Laufe einer Infektion eine Vielzahl genetisch diverser Virusvarianten (Quasispezies). Die Diversität wird zusätzlich angetrieben durch den von der adaptiven Immunantwort ausgeübten Selektionsdruck auf HIV-1. (Abbildung in Anlehnung an Maartens et al., 2014).

Latenz

Eine besondere Eigenschaft aller Retroviren ist die sogenannte *Retrovirale-Latenz*. Unter ihr versteht man die Integration der proviralen DNA ins Wirtszellgenom ohne Produktion neuer Viruspartikel (Pomerantz, 2002). In diesem transkriptionsinaktiven Zustand ist das Virus vor der antiviralen Immunantwort geschützt und kann im Wirt verborgen persistieren. Erst nach

Aktivierung dieser latent infizierten Zellen werden neue infektiöse Viruspartikel produziert und freigesetzt.

Durch die Etablierung verschiedener latenter-zellulärer und -anatomischer Reservoirs im Organismus ist HIV-1 in der Lage, sich dauerhaft im Wirt zu manifestieren (Chun et al., 2008; Finzi et al., 1999). Als primäres Reservoir dienen HIV-1 hauptsächlich ruhende CD4+ T-Lymphozyten (T-Gedächtniszellen) im Lymphgewebe. Mit einer mittleren Halbwertszeit von über 43 Monaten ist dieses latente Reservoir extrem stabil (Finzi et al., 1999). HIV persistiert außerdem auch im Genom anderer langlebiger CD4+ Zelltypen, wie Makrophagen und Monozyten (Ellery et al., 2007). Auch nicht-immunbasierte Zellen, wie Astrozyten im Gehirn, stellen ein wichtiges latentes Reservoir für HIV-1 dar (Gorry et al., 1998). Zudem konnten Barouch und Kollegen 2014 in einer Studie an Rhesus-Affen zeigen, dass die Etablierung der viralen Reservoirs innerhalb der ersten 3 Tage nach der initialen Infektion erfolgt (Abbildung 1.5B) (Whitney et al., 2014).

Variabilität

Ein weiteres fundamentales Merkmal der RNA-Viren ist ihre hohe genetische Variabilität. Die Variabilität ermöglicht es den Viren sich an ändernde zelluläre Tropismen anzupassen und der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Fraser et al., 2014; Perelson, 2002). Sie ist von essentieller Bedeutung für die Evolution und das Überleben der Viren und wird verursacht durch die fehlende Korrekturleseaktivität der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT). Diese enzymvermittelte Ungenauigkeit während der cDNA-Synthese führt zur Inkorporation zahlreicher spontaner Mutationen innerhalb des gesamten viralen Genoms (Lauring et al., 2013). Verglichen mit anderen RNA Viren ist die Mutationsrate der HIV-1 RT besonders hoch (Cuevas et al., 2015). Etwa alle 10000 Nukleotide erzeugt die RT eine Mutation. Bei einem Virusgenom von circa 10 kb entspricht das statistisch einer inkorporierten Mutation pro Replikation (Sanjuán et al., 2010). Laut Perelson et al. werden bei uneingeschränkter Virusreplikation zwischen 10^8 - 10^9 Viruspartikel pro Tag im Körper freigesetzt, was zu einem rasanten Anstieg an genetisch und phänotypisch unterschiedlichen Virusvarianten, sogenannten Quasispezies, innerhalb eines Patienten im Laufe einer HIV-Infektion führt (Abbildung 1.5C) (Perelson et al., 1996). Besonders drastisch ist die Zunahme an HIV-1 Quasispezies und rekombinanten zirkulierenden Formen (CRFs) mit dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort (Abschnitt 1.5.1). Aufgrund des massiven Selektionsdrucks, der durch die adaptive Immunabwehr auf das Virus ausgeübt wird, kommt es zu einer rapiden Selektion von Mutationen innerhalb des HIV-Genoms (Bernardin et al., 2005).

1.4 HIV-1 Therapie

In der Regel erhalten Patienten mit einer positiven HIV-1 Diagnose eine antiretrovirale Therapie, kurz ART. Das Ziel der antiretroviralen Therapie ist die Inhibition der Virusreplikation und somit die Kontrolle einer chronischen HIV-Infektion. Sie hilft den Betroffenen länger und gesünder zu leben. Dank des enormen Fortschritts in der Entwicklung verbesserter antiretroviraler Therapeutika, haben HIV-Patienten in Behandlung heutzutage

eine nahezu ähnliche Lebenserwartung wie der Durchschnitt der Bevölkerung. Zusätzlich minimiert eine ART auch das Risiko einer HIV-1 Transmission (Robbins et al., 2014). Die antiretrovirale Therapie setzt sich aus verschiedenen HIV-Medikamenten zusammen, die unterschiedliche Stadien des viralen Replikationszyklus angreifen und auf diesem Weg die Vermehrung von HIV-1 im Körper verringern. Je nach Angriffsstelle in der viralen Replikation werden die Medikamente in vier Substanzklassen eingeteilt: Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren, *Entry*-Inhibitoren und Integrase-Inhibitoren (Abbildung 1.6). Um ein möglichst breites Wirkspektrum zu erzielen, wird HIV-1 seit gut 20 Jahren mit einer Kombination aus drei Medikamenten behandelt, zusammengestellt aus zwei oder mehr Substanzklassen (Arts & Hazuda, 2012). Allerdings wirken die aktuellen HIV-Medikamente nur gegen replikationsaktive Viren und nicht gegen latent integrierte HI-Viren (Abschnitt 1.3.2, *Latenz*) (Datta et al., 2016).

Bedingt durch die fehlende Wirksamkeit der ART gegen die viralen Reservoirs, ist die HIV-Therapie mit einer täglichen und lebenslangen Einnahme der Medikamente verbunden. Aufgrund der langanhaltenden Behandlung besteht bei Patienten häufig das Risiko Nebenwirkungen zu entwickeln, welche durch Unverträglichkeiten der HIV-Medikamente selbst oder durch Interaktion mit anderen Medikamenten auftreten können. Neben leichten Nebenwirkungen wie Fieber, Muskelschmerzen oder Müdigkeit sind auch schwere Nebenwirkungen, wie z.B. Lipodystrophie, Nierenversagen, Leberschäden oder psychische Erkrankungen bekannt (AIDSinfo, 2019). Als Konsequenz solcher Nebenwirkungen ist für Patienten eine Umstellung, notfalls sogar Unterbrechung der Therapie unabdingbar. Die Behandlungspause führt allerdings auch zum Ausbleiben der suppressiven Wirkung auf die virale Replikation und in der Folge zu einem rapiden Anstieg der HIV-1 Virämie. Diese Feststellung wurde unter anderem in einer Arbeit aus dem Jahr 2016 von Calin et al. untermauert. Sie beobachteten eine massive Virusreplikation innerhalb von 2 bis 12 Wochen nach einer Therapieunterbrechung, in 9 von 10 HIV-positiven Patienten mit zuvor extrem niedrigen Virustitern im Blut (Calin et al., 2016). Die besondere Gefahr, die von einer erneuten unkontrollierten Vermehrung von HIV-1 ausgeht, ist aber vielmehr das erhöhte Risiko der Anreicherung von Virusmutanten, die resistent gegenüber den HIV-Medikamenten sind. Eine Resistenz bedeutet, dass ein Medikament seine Wirksamkeit gegenüber den HIV-1 Mutanten verliert. Dies kann entweder einzelne Medikamente oder ganze Substanzklassen (Kreuzresistenz) betreffen. Im schlimmsten Fall führt dies zu einem totalen Therapieversagen (AIDSinfo, 2019).

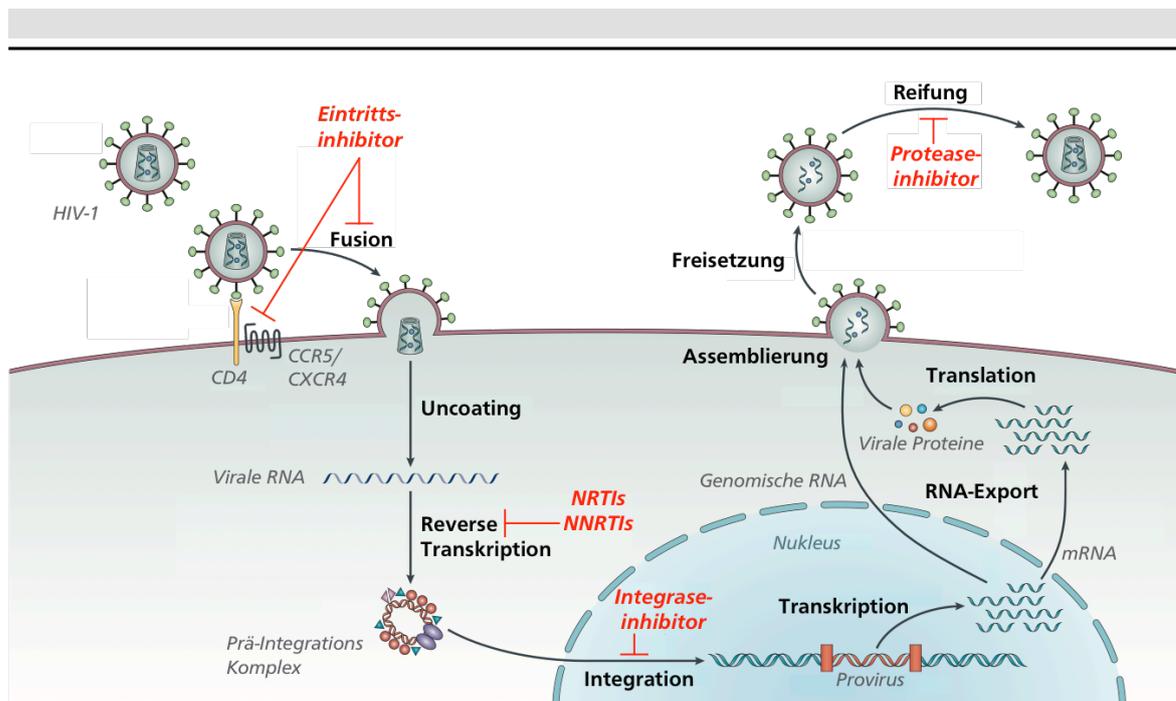


Abbildung 1.6 Ansatzpunkte der für die Behandlung einer HIV-1 Infektion zugelassenen Substanzklassen (rot). Eintrittsinhibitoren wirken auf drei unterschiedliche Arten. Sie können (I) die Anlagerung von HIV-1 über das Hüllprotein gp120 an den CD4-Rezeptor hemmen, (II) sie fungieren als Co-Rezeptorantagonisten und blockieren so die Bindung des Co-Rezeptors und (III) sie können die Fusion des Virus mit der Wirtszelle verhindern. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) sind Nukleosidanaloga (Triphosphatderivate). NRTIs führen nach dem Einbau in den DNA-Strang zur Destabilisierung der cDNA und in der Folge zum Abbruch der Elongation. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) hemmen durch direkte Bindung der viralen RT die Enzymaktivität. Integraseinhibitoren haben ein sehr breites Wirkspektrum. Sie können einerseits die Ausbildung des Prä-Integrationskomplexes hemmen, oder die Integration der viralen DNA ins Wirtszellgenom blockieren. Proteaseinhibitoren hemmen die Aktivität der viralen Protease, wodurch die Prozessierung des Gag-Pol-Polyproteins ausbleibt. Dies resultiert in der Produktion nicht-infektiöser HI-Viruspartikel (hivbuch). (Abbildung in Anlehnung an Barré-Sinoussi et al., 2013).

1.5 HIV-1 und das Immunsystem

1.5.1 Angeborene und adaptive Immunantwort

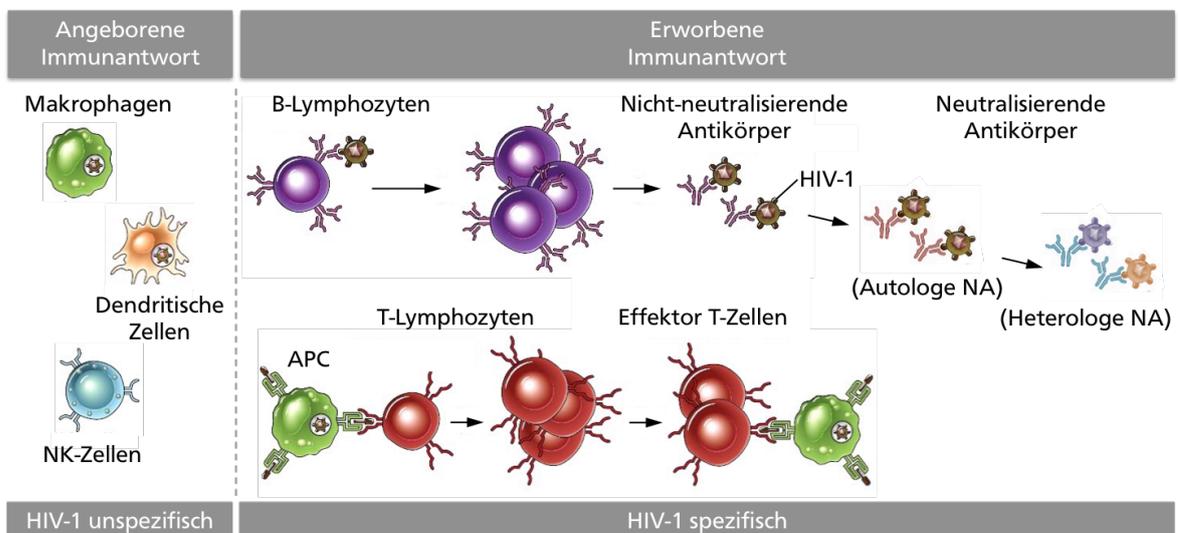
Der Mensch hat im Laufe seiner evolutionären Entwicklung verschiedene Mechanismen etabliert, um sich gegen Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren zu schützen. Die an der Abwehr beteiligten Komponenten werden unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst. Die menschliche Immunabwehr wird im Weiteren in zwei grundsätzliche Mechanismen unterteilt: in die angeborene Immunantwort, eine Art antigenunspezifischer Schutz vor eindringenden Pathogenen und die adaptive Immunantwort, welche die antigenspezifischen Verteidigungsmechanismen des Wirtes erfasst (Parkin & Cohen, 2001).

Im Falle einer HIV-1 Infektion bildet die angeborene Immunantwort die erste Verteidigungslinie gegen das Virus (Abbildung 1.7). Aufgrund der Infektion von CD4+ T-Zellen sowie der Erkennung von HIV-1 durch Makrophagen, Lymphozyten und dendritischen Zellen (engl. *Dendritic Cell*, DC) ist diese frühe Phase nach der Transmission gekennzeichnet durch eine massive Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Typ 1 Interferonen (INF) und Interleukinen (IL) (De Maria et al., 2003). Der Zytokinanstieg führt in der Folge zu einer progressiven Verstärkung der

antiviralen Immunaktivität, die bspw. in der Induktion weiterer angeborener Immuneffektoren wie den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) resultiert (Alter et al., 2007B). Aktivierte NK-Zellen sind in der Lage HIV-infizierte Zellen durch Zytolyse zu eliminieren und produzieren darüber hinaus ebenso immunstimulierende Zytokine und CC-Chemokine (Ward et al., 2007). Die Sezernierung der Chemokine CCL2, -3, -4 und -5 führt unter anderem zur Rekrutierung dendritischer Zellen. DCs zählen zu den sogenannten Antigenpräsentierenden Zellen (engl. *Antigen Presenting Cell*, APC) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der HIV-1 spezifischen adaptiven Immunantwort. Die DCs exprimieren auf der Zelloberfläche sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), mit denen sie HIV-1 erkennen und binden können. Anschließend internalisieren die Zellen das Virus, zersetzen es und präsentieren die prozessierten Antigenfragmente in Form von Peptid-HLA-Komplexen (engl. *Human Leukocyte Antigen*) auf der Zelloberfläche (Mildner & Jung, 2014). In der Folge migrieren die aktivierten DCs in die sekundären lymphatischen Organe und induzieren dort die HIV-1 spezifische adaptive CD4+ und CD8+ T-Zellantwort (Lehmann et al., 2010). Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind, neben immunstimulierenden Zytokinen, auch antivirale Restriktionsfaktoren. Restriktionsfaktoren vermitteln durch zell-intrinsische Effekte eine zelluläre Resistenz gegen produktive Infektionen von HIV-1. Die potentesten antiviralen Restriktionsfaktoren sind APOBEC3G (engl. *Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme, catalytic Polypeptide 3G*), SAMHD1 (engl. *Sam-Domain and HD Domain-Containing Protein 1*), Tetherin und TRIM5 α (engl. *Tripartite Motif-Containing Protein 5 Alpha*) (Abbildung 1.8) (Laguette et al., 2011; Neil et al., 2008; Sheehy et al., 2002; Stremlau et al., 2004).

Die zweite Verteidigungslinie des Wirtes gegen HIV-1 bildet die adaptive Immunantwort. Sie wird einerseits generiert durch die zytotoxische Aktivität virusspezifischer T-Lymphozyten (engl. *Cytotoxic T Lymphocytes*, CTLs) und andererseits durch die Produktion HIV-1 spezifischer neutralisierender Antikörper (Abbildung 1.7). Aufgrund der komplexen Aktivierungskaskaden der zellulären und humoralen Effektoren, setzt die adaptive Immunantwort erst etwa 20 – 30 Tage nach der HIV-1 Transmission ein (McMichael et al., 2010). Naive CD8+ T-Zellen werden nach Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit dem antigenpräsentierenden Peptid-HLA-Klasse-1-Komplex der DCs und Costimulation mit IL-12 in aktivierte HIV-1 spezifische CTLs differenziert. Die CTLs interagieren ihrerseits mit dem HLA-Klasse-1-Komplex auf der Oberfläche HIV-infizierter Zellen und eliminieren diese (Henry et al., 2008). DCs präsentieren das prozessierte Antigen zudem auch mittels des HLA-Klasse-2-Komplexes auf der Zelloberfläche, welcher durch den T-Zellrezeptor naiver CD4+ T-Helferzellen erkannt wird (Mildner and Jung, 2014). In Kombination mit der Ausschüttung stimulierender Zytokine werden die CD4+ T-Zellen aktiviert und übernehmen in der Folge vielerlei immunmodulatorische Aufgaben. Eine essentielle Bedeutung kommt aktivierten CD4+ T-Helferzellen bei der Induktion der HIV-1 spezifischen Antikörperantwort zu. Naive B-Lymphozyten sind ebenso wie DCs in der Lage HIV-1 zu erkennen, zu internalisieren und das prozessierte Antigen in Form des Peptid-HLA-Klasse-2-Komplexes auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die Interaktion des T-Zellrezeptors aktivierter T-Helferzellen mit dem antigenpräsentierenden Peptid-HLA-Klasse-2-Komplex der naiven B-Zellen und die Sekretion verschiedener Interleukine (u.a. IL-4 und IL-21) führt zur Expansion und Differenzierung der B-Lymphozyten in antikörperproduzierende Plasmazellen sowie zum Immunglobulin-Klassenwechsel (den Haan et al., 2014). Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass die ersten

detektierbaren HIV-1 spezifischen Antikörper nicht neutralisierend sind und kaum Einfluss auf die Virusreplikation haben. Die relativ ineffiziente initiale Antikörperantwort beruht vermutlich auf der Immundominanz denaturierter oder nicht funktioneller HIV-1 Hüllproteine (Crooks et al., 2007; Tobin et al., 2008). Etwa 12 Wochen nach der Transmission treten die ersten virusneutralisierenden Antikörper im Patienten auf, mit einer hohen Spezifität gegen wenige autologe HIV-1 Quasispezies (Burrer et al., 2005). Rund 20 % aller HIV-1 infizierten Patienten entwickeln ca. 20 – 30 Monate nach der HIV-1 Transmission sogenannte breit neutralisierende Antikörper (engl. *Broadly Neutralizing Antibodies*, bnAbs). BnAbs besitzen die Fähigkeit heterologe Virusvarianten zu neutralisieren (Stamatatos et al., 2009). Neben der Virusneutralisation sind für die antivirale Aktivität der adaptiven humoralen Immunantwort auch Fc-Rezeptor (FcR)-vermittelte Anti-HIV-1 Effektorfunktionen, wie ADCC (engl. *Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) von wichtiger Bedeutung (Aasa-Chapman et al., 2005). Die Entstehung, Struktur und Funktion von bnAbs wird im Abschnitt 1.6.1 detaillierter beschrieben. Patientenstudien haben gezeigt, dass der rapide Abfall der Viruslast während der akuten Infektion (Abschnitt 1.3.2) mit dem Einsetzen der HIV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort korreliert (Borrow et al., 1994). Ebenso ist auch die Geschwindigkeit der Infektionsprogression abhängig von der Effektivität der zellulären und humoralen adaptiven Immunantwort.



Immunantwort nach der HIV-1 Transmission (Zeit)

Abbildung 1.7 Schematische Übersicht zur angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen HIV-1. Die erste Verteidigungslinie nach einer HIV-1 Infektion bilden die Mechanismen der angeborenen Immunantwort (links). Zu den Effektoren zählen unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen. Die zweite endogene Verteidigungslinie wird durch die adaptive Immunantwort getragen (rechts). Im Unterschied zur angeborenen ist die erworbene Immunantwort HIV-1 spezifisch. Allerdings tritt die adaptive Immunantwort zeitlich verzögert zur initialen Virusinfektion auf. Infolge der notwendigen Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, nach Zellkontakt mit dem Pathogen selbst oder vermittelt durch antigenpräsentierende Zellen (APCs), kommt es zur Freisetzung HIV-1 spezifischer Antikörper und zytotoxischer T-Zellen (Effektor T-Zellen). Die ersten Plasmaantikörper sind ca. vier bis sechs Wochen nach der HIV-Transmission nachweisbar. Diese frühen Antikörper zeigen keine Neutralisationsaktivität (NA) gegen das Virus. Ungefähr 12 Wochen nach der Infektion treten Antikörper im Plasma auf, welche in der Lage sind wenige autologe Virusstämme zu neutralisieren (Autologe NA). Darüber hinaus entwickeln etwa 20 % aller Patienten mit einer HIV-Infektion nach ca. zwei bis drei Jahren Antikörper, die eine Neutralisationsaktivität gegen mehrere heterologe Virusstämme aufweisen (Heterologe NA). (Abbildung in Anlehnung von Abbas et al., 2015).

1.5.2 HIV-1 auf der (Immun)flucht

Nach einer Transmission und erfolgreichen Infektion mit HIV-1 ist der infizierte Wirt nicht mehr in der Lage, trotz der komplexen und effektiven Verteidigungsmechanismen, das Virus aus seinem Körper zu entfernen. Retroviren haben verschiedene Gegenmaßnahmen entwickelt, um der angeborenen und adaptiven Immunantwort des Wirtes zu entfliehen (Guha & Ayyavoo, 2013). Einige Strategien, die HIV-1 dabei helfen der Erkennung und der Kontrolle durch das menschliche Immunsystem auszuweichen, werden in diesem Abschnitt näher betrachtet. Ein bedeutender Faktor der Immunflucht von HIV-1 ist die geringe Immunogenität des Virus, welche unter anderem durch die Fähigkeit einer latenten Infektion von Zielzellen verursacht wird (Abschnitt 1.3.2, Latenz). Darüber hinaus vermitteln funktionelle Motive innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des viralen Hüllproteins die Internalisierung membranständiger HIV-*Spikes* durch Endozytose. Die daraus resultierende verringerte Anzahl an Hüllproteinen auf der Oberfläche infizierter Zellen und HIV-Viruspartikel ist ebenso assoziiert mit einer geringeren Immunogenität (Hollier & Dimmock, 2005).

Zusätzlich beeinflusst HIV-1 auch die NK-Zell-abhängige anti-HIV-1 Aktivität. Das virale Protein Nef (engl. *Negative Regulatory Factor*) führt in infizierten CD4+ T-Zellen zu einer verminderten Expression von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche und damit verbunden zu einer reduzierten Erkennung durch NK-Zellen (Iannello et al., 2008). Ebenso konnten De Maria et al. belegen, dass HIV-1 die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen selbst herabsetzt, bspw. durch die eine gestörte Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren und Produktion NK-Zell-aktivierender Zytokine (De Maria et al., 2003). Eine Weitere Taktik des HI-Virus, um im Wirt zu Bestehen, ist die Blockade der intrinsischen Restriktionsfaktoren. HIV-1 hat verschiedene akzessorische Proteine entwickelt, die eine antagonistische Wirkung auf die antiviralen Restriktionsfaktoren haben (Abbildung 1.8) (Lu et al., 2013).

Die wahrscheinlich wichtigste Strategie, die HIV-1 für die Flucht vor der Kontrolle durch das Wirtsimmunsystem, insbesondere der adaptiven Immunantwort nutzt, ist die rapide Mutation des viralen Genoms, verursacht durch die Ungenauigkeit der Reversen Transkriptase (Abschnitt 1.3.2, Variabilität). Experimente in SIV-infizierten Affen haben gezeigt, dass die fortschreitende sequentielle und konformationelle Veränderung immundominanter Epitope der viralen Proteine Env und Nef (Antigendrift) zu einer reduzierten CTL-spezifischen Antigenerkennung führt (Evans et al., 1999). Auch in HIV-1 infizierten Patienten wurde eine CD8+ T-Zell-getriebene Zunahme an Aminosäurevariationen im Virus beobachtet, verbunden mit einem Abfall der T-Zell Antwort (Barton et al., 2016). Die schnelle Selektion von Fluchtmutationen hat ebenso einen negativen Effekt auf die humorale Immunantwort. Aufgrund der hohen Rate an inkorporierten Mutationen im viralen Hüllprotein, verglichen mit der zeitintensiven Produktion HIV-1 spezifischer Antikörper, ist das Immunsystem nicht in der Lage zeitnah entsprechende Antikörper zu generieren (Lu et al., 2013).

Neben der raschen Mutation des Hüllproteins wird die antikörperspezifische Immunantwort noch zusätzlich durch die starke Glykosylierung des HIV-Env erschwert (Abschnitt 1.2.1). Einerseits führt die Beladung des HIV-*Spikes* mit Kohlenhydraten zur Maskierung potentiell kritischer Epitope und andererseits tarnt das Virus auf diese Weise körperfremde Strukturen als körpereigene (Reitter et al., 1998).

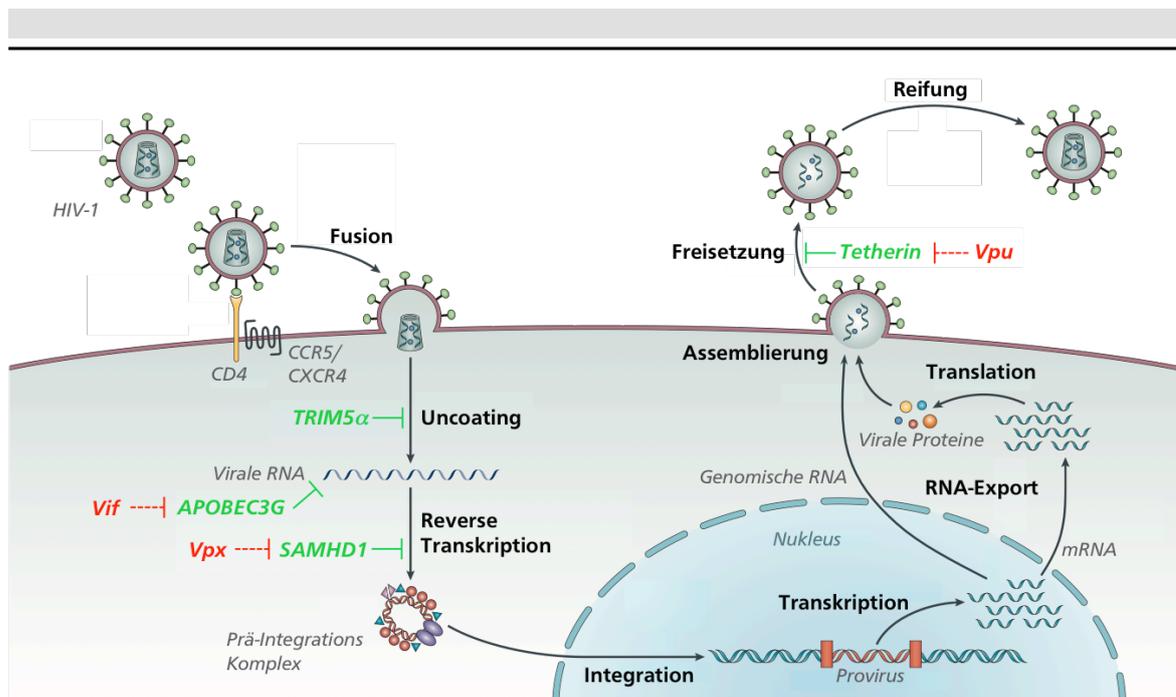


Abbildung 1.8 Darstellung der Ansatzpunkte zellulärer Restriktionsfaktoren und deren viraler Antagonisten. Zu den wichtigsten wirtseigenen Restriktionsfaktoren gegen HIV-1 gehören APOBEC3G, SAMHD1, Tetherin und TRIM5 α (grün). Eine APOBEC3G-vermittelte Substitution von dC- zu dU-Resten führt zur Destabilisierung der viralen RNA und hat zur Folge, dass sich das Virus nicht weiter replizieren kann. SAMHD1 hydrolysiert dNTPS im Zytoplasma, wodurch die Anzahl freier DNA-Nukleotide sinkt, was in einer reduzierten reversen Transkription der HIV-1 RNA resultiert. Der Restriktionsfaktor Tetherin wirkt hingegen an der Zellmembran. Tetherin blockiert die Freisetzung neuer Viruspartikel von der Plasmamembran infizierter Zellen. Das Protein TRIM5 α blockiert die HIV-Replikation, in dem es den Uncoating-Prozess des HIV-Kapsids im Zytoplasma inhibiert. Allerdings hat HIV-1 Strategien evolviert, die es dem Virus ermöglichen, der intrinsischen Immunantwort auszuweichen. So sind die viralen Proteine Vif, Vpx und Vpu (rot) in der Lage die Restriktionsfaktoren APOBEC3G, SAMHD1 und Tetherin entsprechend zu blockieren oder degradieren und dadurch deren antivirale Effekte zu unterbinden. Durch Mutationen in der Kapsidsequenz kann sich HIV-1 auch der Restriktion durch TRIM5 α entziehen. (Abbildung in Anlehnung von Barré-Sinoussi et al., 2013).

1.5.3 Natürliche Kontrolle von HIV-1

Trotz der vielfältigen Strategien, die das HI-Virus entwickelt hat, um sich im Wirt ungehindert replizieren zu können, gibt es HIV-1 positive Patienten, die scheinbar resistent gegenüber der typischen HIV-1 Pathogenese sind und über einen lang anhaltenden Zeitraum klinisch gesund bleiben. Aufgrund der ausbleibenden HIV-1 assoziierten Krankheits-manifestation werden diese infizierten Patienten als *long-term non-progressors* (LTNPs) bezeichnet (Lifson et al., 1991). LTNPs sind im Weiteren auch charakterisiert durch weitgehend stabile CD4-Zellzahlen und geringe bis mittlere Level an Virusreplikation im Plasma, in Abwesenheit einer antiretroviralen Therapie (Abschnitt 1.4). Anhand der VL werden die LTNP in zwei Subgruppen eingeteilt, die *elite controller* (EC) und die *viraemic controller* (VC) (Tabelle 1.1) (Pereyra et al., 2008). Für einige dieser EC ist bekannt, dass sie seit mehr als 30 Jahren mit einer kontrollierten HIV-1 Infektion leben. Die Fähigkeit der dauerhaften Kontrolle einer HIV-Infektion ist abhängig von verschiedenen genetischen und immunologischen Faktoren des Wirtes, welche in diesem Abschnitt etwas ausführlicher behandelt werden.

Genetische Faktoren, die mit einem nicht progressiven Infektionsverlauf in Verbindung stehen, sind unter anderem spezifische HLA-Klasse-1 Allele. Als solche *protektiven* HLA-Allele wurden HLA-B*57, HLA-B*27, HLA-B*13 und HLA-B*58:01 anhand genomweiter Assoziationsstudien (GAWs) identifiziert (Pereyra et al., 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass EC diese protektiven Allele auf der Zelloberfläche infizierter Zellen im Vergleich zu HIV-Progressoren über-exprimieren (Pereyra et al., 2008). Die Expression protektiver Allele ist assoziiert mit der Induktion der Thymopoese von CD8+ T-Zellklonen, mit einer verbesserten Kreuzreaktivität gegen verschiedene HIV-1 Epitopvarianten, was in der Folge zu einem erhöhten Selektionsdruck auf HIV-1 führt (Kosmrlj et al., 2010). Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht aufgeklärt, vermutlich ist aber die Art der Antigenpräsentation in der HLA-B Bindetasche die Ursache für den protektiven Effekt. Darüber hinaus ist bekannt, dass HLA-B*57 und HLA-B*27 konservierte Epitope des viralen Gag (engl. *Group-Specific Antigen*)-Proteins präsentieren. Sequenzänderungen in diesen Motiven sind verknüpft mit einer stark verschlechterten replikativen Fitness des Virus (Dahirel et al., 2011). HLA-Klasse-1 Allele haben auch einen modulierenden Einfluss auf Effektoren der angeborenen Immunantwort. Infizierte CD4-Zellen, die HLA-Bw4-80I exprimieren, werden besonders effizient von NK-Zellen eliminiert, die den aktivierenden *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR)3DS1 auf der Zelloberfläche präsentieren (Alter et al., 2007A). Ein weiterer genetischer Wirtsfaktor, der im Zusammenhang mit der Kontrolle einer HIV-1 Infektion steht, beruht auf einer 32-Basenpaar-Deletion im CCR5-Rezeptor (CCR5Δ32). Die Deletionsmutation im Allel des CCR5-Gens hat zur Folge, dass die Zellen ausschließlich funktionslose CCR5-Proteine synthetisieren, welche nicht an die Zelloberfläche transportiert werden. Für HI-Viren, die CD4+ T-Zellen mittels des CCR5-Co-Rezeptors infizieren (R5-trop), ist der Verlust der Co-Rezeptorinteraktion gleichbedeutend mit dem Abbruch der Fusion zwischen dem Viruspartikel und der Zellmembran (de Silva & Stumpf, 2004). Es ist bekannt, dass HIV-1 Patienten mit einer heterozygoten Ausprägung der CCR5Δ32-Mutation geringere Level an VL im Plasma haben und die Infektionsprogression im Vergleich zu HIV-infizierten CCR5-Wildtyp Patienten verlangsamt verläuft. Eine homozygote Expression der CCR5Δ32-Mutation führt sogar zur Resistenz des Menschen gegenüber R5-tropen HI-Viren (Marmor et al., 2001).

Neben genetischen Faktoren spielt auch eine starke adaptive Immunantwort des Wirtes eine maßgebliche Rolle bei der dauerhaften Kontrolle einer HIV-1 Infektion. Sáez-Cirion et al. konnten in *ex vivo*-Studien belegen, dass HIV-1 spezifische T-Zellen von EC die Virusreplikation effektiver blockieren können als T-Lymphozyten von HIV-Progressoren (Sáez-Cirion et al., 2007). Die verbesserte inhibitorische Immunaktivität der EC wird unter anderem durch CD8+ T-Zellen verursacht, welche gegen Epitope des viralen Gag-Proteins gerichtet sind. Zudem synthetisieren HIV-spezifische CD8-Zellen von EC größere Mengen an zytotoxischen Proteinen wie Perforin, Granulysin und Granzyme und vermitteln auf diese Weise eine größere Zytotoxizität (Chen et al., 2012). Zusätzlich führt eine verstärkte Proliferation und vermehrte IL-2 Sekretion der viruspezifischen CD8-Zellen von EC zu einer ansteigenden Stimulation multifunktionaler Effektorzellen (Betts et al., 2006). Ein weiterer Faktor der adaptiven Immunantwort, der einen Einfluss auf die beständige HIV-1 Kontrolle hat, sind breit neutralisierende Antikörper. Scheid und Kollegen haben in einer Kohorte von EC mit geringer VL festgestellt, dass hochaffine breit neutralisierende Antikörper (bnAbs,

engl. *broadly neutralizing antibodies*) gegen konservierte Regionen des viralen Hüllproteins für die Suppression der Virusreplikation mitverantwortlich sind (Scheid et al., 2009).

Darüber hinaus korreliert die Progressionsgeschwindigkeit der HIV-Infektion stark mit dem Ausmaß der HIV-1 abhängigen Aktivierung des Wirtsimmunsystems. EC zeigen im Vergleich zu HIV-Progressoren eine deutlich geringere Immunaktivierung. Die verminderte Immunantwort hat eine geringere Expression von Transkripten zur Folge, welche zur Erschöpfung und Seneszenz von T-Lymphozyten führen wie beispielsweise das Oberflächenprotein PD-1 (engl. *Programmed Cell Death Protein 1*) (Quigley et al., 2010). Allerdings haben die Patientenstudien auch eröffnet, dass es nicht den einen genetischen bzw. immunologischen Faktor gibt, der zu einer lang anhaltenden Kontrolle der HIV-Infektion führt, da auch HIV-Progressoren protektive HLA-Allele und bnAbs exprimieren oder Gag-spezifische CD8+ T-Zellen besitzen. Zusammenfassend ist eine effektive und dauerhafte Kontrolle einer HIV-1 Infektion vielmehr in einem Zusammenspiel aus mehreren Wirtsfaktoren begründet und zusätzlich auch abhängig von der genetischen viralen Fitness des HI-Virus (Walker & Yu, 2013).

Tabelle 1.1 Kennzeichen der zwei Subgruppen an HIV-1 *Long Term Non-Progressors* (LTNPs).

LTNP	Antiretrovirale Therapie	Viruslast	Anteil an HIV-1 positiven Patienten weltweit
<i>Elite controller</i> (EC)	Naiv	Nicht detektierbare VL	> 1 %
<i>Viraemic controller</i> (VC)	Naiv	> 2000 HIV-RNA-Kopien/ mL Plasma	~7 %

1.6 Breit neutralisierende HIV-1 Antikörper

1.6.1 Entstehungsprozess und Eigenschaften neutralisierender Antikörper

Auf der Oberfläche eines HIV-1 Viruspartikels bildet das Hüllprotein die einzige virale Proteinkomponente und stellt somit die alleinige Zielstruktur für neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 dar. Neutralisierende HIV-1 Antikörper sind in der Lage, durch Bindung an das Hüllprotein, die Zielzellen vor einer HIV-Infektion zu schützen. Die Inhibition der Infektion wird entweder durch die Blockade der Rezeptorbindestellen oder durch die Behinderung der Membranfusionsmechanismen zwischen Virus und Wirtszelle realisiert (Parren & Burton, 2001). Außerdem erkennen und binden neutralisierende Antikörper auch infizierte T-Zellen und können über Fc-Rezeptor vermittelte Prozesse die Zytolyse dieser Zellen induzieren (Burton, 2002). Jahrelange Forschungsarbeit und eine Vielzahl an Studien haben gezeigt, dass alle bisher identifizierten breit neutralisierenden HIV-Antikörper (bnAbs) ungewöhnliche Eigenschaften besitzen. BnAbs weisen eine sehr hohe Anzahl an somatischen Mutationen in den CDRs und den *framework regions* (engl. FWR) auf, haben außerordentlich lange und hydrophobe (und/oder geladene) *heavy chain complementary determining regions 3* (engl. HCDR3) und sind häufig selbst- oder polyreaktiv (Tabelle 1.2) (McElrath & Haynes, 2010). Nur etwa 20 % aller Betroffenen entwickeln im Laufe ihrer HIV-Infektion Antikörper, die neben den autologen auch heterologe Virusstämme neutralisieren können (Mikell et al., 2011). Ursachen für das unregelmäßige Auftreten von bnAbs sind unter anderem auf die

besonderen Fähigkeiten von HIV-1 zurückzuführen. Einerseits führt die rasante virale Mutationsgeschwindigkeit zu einer stetigen Aminosäuresequenz- und Konformationsänderung des Hüllproteins und somit zum Verlust von Antikörperepitopen. Andererseits hindert die extensive und variable Glykosylierung des HIV-Env die Antikörper an der Antigenerkennung. Darüber hinaus sind einige Epitope neutralisierender Antikörper nur transient während des Fusionsprozesses zwischen dem Viruspartikel und der Zellemembran zugänglich (Abschnitt 1.2.2) (Wei et al., 2003). Neben den viralen Faktoren spielen auch einige Wirtsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung breit neutralisierender Antikörper. So können beispielsweise Immuntoleranzmechanismen an verschiedenen Kontrollpunkten zur Eliminierung selbst- oder polyreaktiver neutralisierender Antikörper führen. Zudem gibt es auch Hinweise darauf, dass bei der Entwicklung von bnAbs bestimmte folliculäre T-Helferzellen eine begünstigende Rolle spielen (Locci et al., 2013).

Die bisher bekannten breit neutralisierenden HIV-1 Antikörper wurden aus dem Blut von chronisch infizierten HIV-Patienten isoliert. Studien belegen, dass die Entstehung solcher Antikörper zwischen 2-4 Jahren dauert (Corti & Lanzavecchia, 2013). Die lange Entwicklungszeit der bnAbs beruht unter anderem auf einem anhaltenden Selektionsprozess mit einem kontinuierlich mutierenden Virus. Das bedeutet konkret, die Immunflucht des HI-Virus vor der frühen humoralen Immunantwort führt zu einem Verlust der initialen Antikörperepitope und gleichzeitig zur Entstehung neuer Epitope (Antigendrift). Erst diese veränderten immunrelevanten Epitope der HIV-1 Fluchtmutanten sind ausschlaggebend für die Produktion breit neutralisierender Antikörper (Moore et al., 2012). In Folge der viralen Flucht reagiert das Immunsystem und passt die humorale Immunantwort an die neuen Herausforderungen an. Stammspezifische Antikörper evolvieren mittels *in vivo* Affinitätsreifung zu neutralisierenden bzw. breit neutralisierenden Antikörpern (Abbildung 1.9B). Während dieser zeitintensiven Prozesse erhalten die Antikörper massive genetische Modifikationen. Typischerweise akkumulieren Antikörper während des Affinitätsreifungsprozesses etwa 5-20 % an Sequenzmutationen in der leichten und schweren Kette, im Gegensatz dazu ist das Maß an integrierten Aminosäuresubstitutionen in der variablen Region HIV-1 neutralisierender Antikörper mit 15-44 % deutlich höher (Corti & Lanzavecchia, 2013). Eine weitere Ursache, welche eine verzögerte Freisetzung bnAbs zur Folge hat, ist die HIV-1 induzierte Lyse folliculärer B-Zellen. McMichael und Kollegen haben beschrieben, dass in der akuten Phase der HIV-Infektion etwa 50 % der Keimzentren verloren gehen, aufgrund der starken Apoptose folliculärer B-Zellen. Keimzentren sind für die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und somit auch für die Produktion hochaffiner HIV-1 Antikörper essentiell (McMichael et al., 2010).

Die intensive Erforschung HIV-1 spezifischer Antikörper hat zur Identifikation von fünf unterschiedlichen Zielregionen innerhalb des viralen Hüllproteins geführt, welche durch bnAbs erkannt werden: die quartäre V2/V3-Region, die CD4-Bindestelle, die gp120-gp41-Interphase, die MPER und das gp120-Glykanschild (Abbildung 1.9A) (Wibmer et al., 2015). Die V2/V3-Region am Apex des Hüllproteins ist aufgrund einer massiven Glykosylierung besonders gut vor der humoralen Immunantwort abgeschirmt. Um durch das dicht gepackte Schutzschild aus Kohlenhydraten durchstoßen zu können, besitzen V2/V3-spezifische bnAbs, wie z.B. die monoklonalen Antikörper (mAb) PG9 oder PGT121, außerordentlich lange HCDR3s (zwischen 26 und 39 Aminosäuren) (McLellan et al., 2011). Neben der Bindung von

kurzen meist kationischen Peptidepitopen wird die Antikörperinteraktion mit dem Hüllprotein durch Wechselwirkungen mit umliegenden Glykanen zusätzlich stabilisiert. Ebenfalls glykanabhängig sind Antikörper, die Epitope in der gp120-gp41-Interphase erkennen, wie der bnAb PGT151 (Huang et al., 2014). Ein ungewöhnlicher Antikörper, der keinen Peptidkontakt für die Neutralisation von HIV-1 benötigt, ist der mAb 2G12. 2G12 ist in der Lage, aufgrund eines besonders großen Paratops die terminalen Zucker von vier Glykanen der gp120-Untereinheit zu binden (Calarese et al., 2003). Charakteristisch für CD4-Bindestellen-spezifische bnAbs, beispielsweise den mAb b12, VRC01 oder 3BNC117, ist eine hohe Anzahl an somatischen Mutationen (Zhou et al., 2010). Neutralisierende Antikörper, welche an die MPER binden, interagieren oftmals über lange HCDR3-Schleifen zusätzlich mit der viralen Membran, weshalb MPER-spezifische bnAbs häufig selbst- oder polyreaktiv sind (Verkoczy et al., 2014). Aufgrund der hochkonservierten α -helikalen Proteinstruktur sind MPER-spezifische Antikörper wie der mAb 10E8 oder 4E10 besonders breit neutralisierend.

Zusammenfassend haben viele Studien gezeigt, dass Antikörper durch Bindung konservierter, für den Wirtszelleintritt essentieller Bereiche des viralen Hüllproteins in der Lage sind, heterologe HIV-Stämme zu neutralisieren. Die Generierung solcher bnAbs *in vivo* ist das Resultat eines langen Selektionsprozesses und ist von vielen Virus- und Wirtsfaktoren abhängig.

Tabelle 1.2 Eigenschaften einiger breit neutralisierender Antikörper gegen HIV-1. Tabelle übernommen von Corti und Lanzavecchia (Corti & Lanzavecchia, 2013). Weitere HIV-spezifische bnAbs und deren Eigenschaften können zudem über die Antikörperdatenbank *bnAber.org* gefunden werden.

Antikörper	Spezifität (Env Untereinheit)	HCDR3 Länge (As) ^a	SHM (%) ^b	Poly- reaktivität ^c	Neutralisations- breite (%) ^d	Referenz
2F5	MPER (gp41)	24	15,2	✓	~60-70	102
10E8	MPER (gp41)	22	22,1	✓	~98	103
2G12	gp120-Glykanschild	16	33,6	x	~25-30	102
b12	CD4-Bindestelle (gp120)	20	17,3	✓	~30-35	104
3BNC117	CD4-Bindestelle (gp120)	12	36,9	✓	~85-90	105
VRC01	CD4-Bindestelle (gp120)	14	38,8	x	~90-95	106
PG9	V2-Schleife (gp120)	30	15,4	x	~75-80	107
PGT121	V3-Schleife (gp120)	26	21,2	nb	~65-70	108
PGT151	gp120-gp41-Interphase	86	28	nb	~60	109

^aAnzahl der Aminosäuren (As) der HCDR3 gemäß dem internationalen *ImMunoGeneTics information system* (IMGT).

^bProzentualer Anteil somatischer Hypermutationen (SHM) in der Aminosäuresequenz, ermittelt anhand des Aminosäuresequenzvergleiches der originalen und Keimbahn Antikörper, mittels IMGT-Datenbank.

✓ = Ja, x = Nein, nb = Nicht bestimmt

^dDie angegebene Neutralisationsbreite ist definiert als prozentualer Anteil neutralisierter HIV-1 Isolate mit einer IC₅₀ >50 µg/mL.

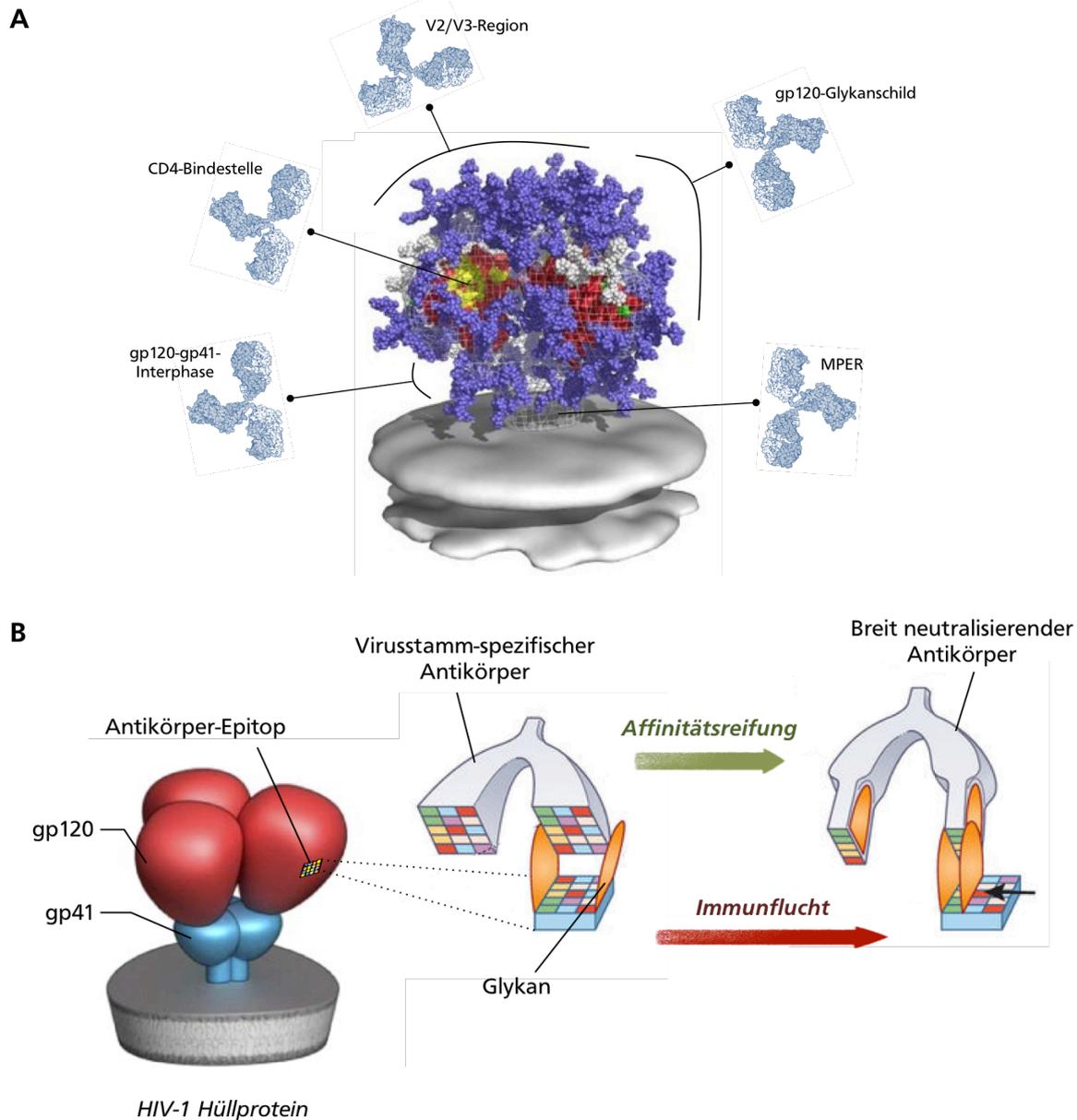


Abbildung 1.9 Schematische Darstellung bekannter Zielregionen HIV-1 Hüllprotein-spezifischer breit neutralisierender Antikörper (bnAbs) sowie eines potentiellen Entstehungsprozesses. (A) Zurzeit sind fünf Regionen innerhalb des viralen Hüllproteins bekannt, welche hauptsächlich durch breit neutralisierende Antikörper erkannt werden: die quartäre V2/V3-Region (Apex), die CD4-Bindestelle, die gp120-gp41-Interphase, die MPER und das gp120-Glykanschild. (Abbildung in Anlehnung an Burton et al., 2012). (B) Die Entwicklung von bnAbs nach einer HIV-Infektion kann mehrere Jahre andauern. Aufgrund der kontinuierlichen Flucht von HIV-1 vor der adaptiven Immunantwort durch die Inkorporation von Mutationen, insbesondere im Hüllprotein, kommt es zum Verlust initialer Antikörper-epitope und zur Entstehung neuer Epitope (roter Pfeil, Antigendrift). Beispielsweise durch die Verlagerung eines Glykans (verdeutlicht durch den schwarzen Pfeil). In der Folge passt das Immunsystem die humorale Immunantwort durch Affinitätsreifung an die geänderten Herausforderungen an. Während der zeitintensiven Modifikationsprozesse werden stammsspezifische zu (breit) neutralisierenden Antikörpern evolviert (grüner Pfeil) (Moore et al., 2012). (Abbildung in Anlehnung an Langedijk & Schuitemaker, 2012).

1.6.2 Neutralisation – eine Begriffserklärung

Die Neutralisation oder vielmehr die Neutralisationsaktivität (NA) beschreibt die Fähigkeit von Antikörpern ein Virus an der Infektion einer Zelle zu hindern. Im Falle von HIV-1 wird die Neutralisationsaktivität von Antikörpern mittels eines standardisierten *in vitro* Assays bestimmt (Abschnitt 3.1.11). Kurz zusammengefasst: mehrere Konzentrationen eines zu testenden Antikörpers werden mit verschiedenen HIV-1 Isolaten koinkubiert, anschließend wird mit Hilfe einer Reporterzelllinie die Virusinfektion bzw. –neutralisation detektiert. Um die NA verschiedener Antikörper besser vergleichen zu können, wird für jede Antikörper-Virus-Kombination die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) ermittelt. Die IC_{50} beschreibt die Antikörperkonzentration, bei der 50 % der Reporterzellen (TZM-bl-Zellen) nicht infiziert sind (Abbildung 1.10). Die NA wird im Folgenden in zwei Parameter unterteilt, die Neutralisationsbreite und die Neutralisationspotenz. Unter dem Begriff Neutralisationsbreite wird schlicht die Anzahl an unterschiedlichen Virusisolaten zusammengefasst, die der jeweilige Antikörper neutralisieren kann. Das bedeutet, je mehr Virusisolate ein Antikörper an der Infektion einer Zelle hindern kann, desto *breiter* ist seine Neutralisationsaktivität. Die Potenz beschreibt hingegen die Antikörperkonzentration, die benötigt wird, um ein Virusisolat zu neutralisieren. Je geringer also die IC_{50} eines Antikörpers für ein Virusisolat, desto *potenter* ist seine Neutralisationsaktivität.

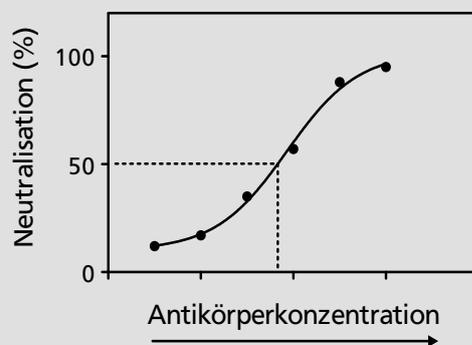


Abbildung 1.10 Darstellung einer konzentrationsabhängigen Neutralisationsaktivität. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) entspricht der Antikörperkonzentration bei der 50 % der TZM-bl-Reporterzellen nicht durch die Env-pseudotypisierten HI-Viren infiziert werden.

1.6.3 Antikörper und ihre Bedeutung in der HIV-1 Impfstoffentwicklung und Therapie

Neben der Verbesserung der konventionellen HIV-1 Therapie (ART), arbeiten seit vielen Jahren eine große Zahl an Wissenschaftlern parallel an der Erforschung alternativer HIV-Therapiestrategien. Solche alternativen Therapiekonzepte beinhalten beispielsweise die Brec1-vermittelte endonukleolytische Entfernung des Provirus aus infizierten T-Zellen oder die autologe Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, welche die CCR5 Δ 32-Mutation homozygot exprimieren und somit resistent gegenüber R5-tropen HI-Viren sind (Abschnitt

1.5.3) (Karpinski et al., 2016; Peterson et al., 2013). Da der Fokus dieser Arbeit auf HIV-1 neutralisierende Antikörper gerichtet ist, beschränke ich mich in diesem Abschnitt ausschließlich auf mögliche therapeutische und prophylaktische Anwendungsbereiche Antikörper-basierter Therapieansätze. Verglichen mit den Wirkstoffen der ART haben Antikörper einige bedeutende Vorteile, z.B. besitzen Antikörper eine deutlich höhere Spezifität und daher auch ein höheres Sicherheitsprofil. Zudem ist das bekannte Spektrum an antikörperinduzierten Nebenwirkungen geringer als bei klassischen antiretroviralen Wirkstoffen. Darüber hinaus zeichnen sich Antikörper auch durch eine bessere Pharmakokinetik aus (Chames et al., 2009; Schoofs et al., 2016).

Ein großer Schwerpunkt der HIV-1 Forschung liegt auf der Entwicklung einer effektiven Impfung, die in der Lage ist breit neutralisierende Antikörper zu induzieren (Burton et al., 2012). Die Bildung von Antikörpern wird generell durch eine aktive Immunisierung des Menschen mit Antigenstrukturen des infektiösen Pathogens ausgelöst. Dazu zählen unter anderem inaktivierte oder abgeschwächte Formen des Erregers sowie funktionelle Untereinheiten oder Peptidpitope viraler Oberflächenproteine, aber auch DNA und rekombinante Vektoren, die für verschiedene virale Gene kodieren (Abbildung 1.11) (Ringel, et al., 2018A). Antikörper-basierte Vakzine können entweder prophylaktisch oder therapeutisch wirksam sein. Eine funktionale prophylaktische Impfung kann nicht-infizierte Individuen vor einer Virusinfektion schützen und vermittelt zudem, aufgrund der aktiven Immunisierung, einen langanhaltenden Schutz gegenüber dem jeweiligen Erreger. Eine therapeutische Impfung kann hingegen bei infizierten Patienten zu einer gesteigerten Effektivität der antiviralen Therapie führen oder aber die Immunantwort des Betroffenen in dem Maße verbessern, dass eine dauerhafte Kontrolle der Virusreplikation ohne antivirale Therapie möglich ist (Graziani & Angel, 2015). Protektive Antikörper-basierte Vakzine konnten bereits erfolgreich gegen eine Vielzahl humaner Viren entwickelt werden, welche zu globalen Epidemien geführt haben, wie z.B. Influenza, Hepatitis A und B, Polio, Masern und Gelbfieber (Greenwood, 2014). Im Falle von HIV-1 wurden bisher vier unterschiedliche Impfkonzeppte mit großen Patientenkohorten auf ihre klinische Effektivität hin untersucht (Barouch, 2013A). Die Immunisierung der Patienten erfolgte jeweils mit unterschiedlichen viralen Antigenen. In einer ersten Studie wurde eine genetisch entwickelte gp120-Untereinheit des viralen Hüllproteins (AIDSVAX) als Antigen verwendet (Pitisuttithum et al., 2006). In einem zweiten Impfansatz wurden die Teilnehmer mit einem rekombinanten Adenovirus Serotyp 5 (Ad5)-Vektor immunisiert, der die HIV-Proteine Gag, Nef und Pol exprimiert (Buchbinder et al., 2008). Das dritte evaluierte Konzept (RV144) beruhte auf einer *prime-boost*-Strategie, wobei die Teilnehmer einmalig mit einem rekombinanten viralen Vektor und anschließend mehrfach mit den AIDSVAX-Env gp120 Proteinen immunisiert wurden (Rerks-Ngarm et al., 2009). Die bisher letzte Impfstudie (HVTN 505) basierte ebenfalls auf einer *prime-boost*-Strategie, allerdings erfolgte der wiederholte *boost* mit einem Ad5-Vektor, der die HIV-Gene *env*, *gag* und *pol* exprimierte (Hammer et al., 2013). Keines der evaluierten Konzepte brachte den durchschlagenden Erfolg. Die Induktion potenter bnAbs in Primaten oder Menschen durch Immunisierung mit verschiedenen HIV-Antigenen ist Forschern bis heute in klinischen sowie prä-klinischen Versuchsansätzen nicht gelungen. Allerdings zeigte die RV144-Studie einen um etwa 30 % erhöhten Schutz der Teilnehmer vor einer HIV-Infektion und die immunisierten Probanden wiesen zudem erhöhte Mengen an neutralisierenden Antikörpern auf (Haynes et al., 2012). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen

ist das Bestreben groß, weitere Impfstrategien zu erarbeiten, wie z.B. die Entwicklung neuer HIV-Antigene für die Immunisierung.

Neben dem Versuch bnAbs in Menschen durch aktive Immunisierung zu induzieren, gibt es auch Bemühungen, bereits identifizierte HIV-1 neutralisierende Antikörper therapeutisch zu nutzen. Antikörper-vermittelte Immuntherapien werden bereits sehr erfolgreich in der Krebstherapie und gegen verschiedene Infektionskrankheiten wie Milzbrand oder das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) eingesetzt (Graham & Ambrosino, 2015). Die Gabe der Antikörper erfolgt bei Patienten durch passive Immunisierung (Abbildung 1.11). Das mögliche Einsatzspektrum von bnAbs in der HIV-1 Therapie ist sehr vielfältig, z.B. können bnAbs durch begleitende Behandlung mit klassischen antiretroviralen Medikamenten die Effektivität der Therapie verbessern oder die ART-Regime vereinfachen. BnAbs haben zudem das Potential, die HIV-Replikation *in vivo* zu unterdrücken und erlauben dadurch strukturierte und periodische Therapiepausen. Es ist auch vorstellbar, dass bnAbs anstelle antiviraler Medikamente zur Behandlung einer HIV-Infektion genutzt werden, beispielsweise bei einem totalen Therapieversagen oder der Entwicklung einer ART-Intoleranz (Klein et al., 2013B). Im Bereich der HIV-Forschung wurde die therapeutische Wirksamkeit der potentesten bnAbs in einer Vielzahl an Studien mit Primaten und Menschen in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht und nachgewiesen. Unter anderem konnten zwei Forscherteams zeigen, dass ein passiver Transfer HIV-1 neutralisierender Antikörper in chronisch SHIV-infizierten Rhesusaffen (engl. *simian-human immunodeficiency virus*) zu einem rapiden Abfall der Viruslast führt und dass die Dauer der Virämiesuppression abhängig ist von der Höhe der Antikörpertiter im Plasma der Affen (Barouch et al., 2013B; Shingai et al., 2013). Ähnliche Beobachtungen haben Wissenschaftler in zwei klinischen Studien mit HIV-positiven Patienten gemacht. Die passive Immunisierung mit einem CD4-Bindestelle spezifischen Antikörper (3BNC117 oder VRC01) während einer Therapieunterbrechung, führte in allen Probanden zu einer Antikörpertiter-abhängigen Unterdrückung der HIV-Replikation (Lynch et al., 2015; Scheid et al., 2016). Allerdings haben die Studien auch offenbart, dass durch die Entwicklung von Fluchtmutationen die Virusreplikation erneut anstieg und die entstandenen Virusvarianten resistenter gegenüber der spezifischen Antikörperantwort geworden sind. Eine Strategie, um der viralen Immunflucht vorzugreifen, besteht in der Kombination und Immunisierung mit mehreren bnAbs. Klein et al. haben in HIV-1 infizierten humanisierten Mäusen die therapeutischen Effekte von Kombinationen aus drei bzw. fünf HIV-1 spezifischen Antikörpern untersucht. Während die Viren, der mit drei bnAbs behandelten Mäuse Resistenzmutationen ausgebildet haben, war HIV-1 nicht mehr in der Lage, durch Mutationen im Hüllprotein, der Antikörperantwort vermittelt durch die gleichzeitige Gabe von fünf Immunglobulinen zu entfliehen (Klein et al., 2012). Zusammenfassend konnten die zahlreichen Arbeiten das große therapeutische Potential breit neutralisierender Antikörper für die Therapie chronisch infizierter HIV-Patienten belegen. Dennoch ist die Identifikation weiterer bnAbs für die Etablierung einer erfolgreichen Antikörper-basierten HIV-Therapie von enormer Bedeutung. Nicht alle bisher identifizierten HIV-spezifischen Antikörper mit einer breiten und potenten *in vitro* Neutralisationsaktivität zeigen diese Fähigkeiten auch *in vivo*. Selbst die potentesten bnAbs sind nicht in der Lage alle Virusstämme *in vivo* zu neutralisieren (Barouch et al., 2013B). Ein weiterer Grund für den Bedarf zusätzlicher bnAbs ist auch die Erkenntnis, dass einige der wirksamsten HIV-Antikörper, wie z.B. die mAb 3BNC117 und VRC01, sehr ähnliche Epitope innerhalb des HIV-Hüllproteins erkennen und eine Kombination

dieser durch Ausbildung viraler Resistenzen schnell wirkungslos werden könnte (Bhiman & Lynch, 2017).

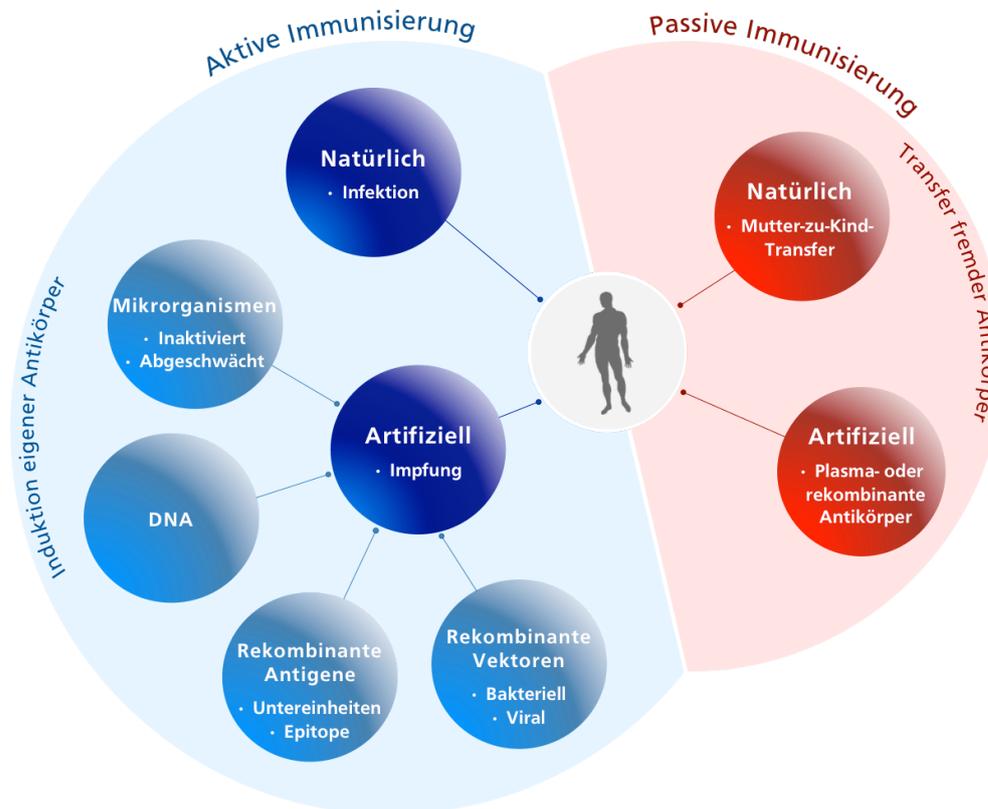


Abbildung 1.11 Grundlagen der Immunisierung. Eine aktive Immunisierung (blau) führt zur Induktion körpereigener Antikörper entweder nach einer natürlichen Infektion oder nach einer Impfung mit Antigenstrukturen, welche von dem jeweiligen Pathogen abgeleitet wurden. Die passive Immunisierung (rot) basiert auf dem Transfer körperfremder Antikörper gegen einen bestimmten Erreger. Dies kann auf natürlichem Weg während des Stillens erfolgen (Mutter-zu-Kind-Transfer) oder durch die Gabe von Plasma- oder synthetisch hergestellten Antikörpern. (Abbildung in Anlehnung an Ringel et al., 2018A).

1.7 Ziel der Arbeit

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass breit neutralisierende Antikörper durch Bindung konservierter und sterisch restringierter Epitope des viralen Hüllproteins Zielzellen vor einer Infektion schützen können (Shingai et al., 2013). Darüber hinaus konnte in ersten klinischen Studien die therapeutische Wirksamkeit zweier potenter bnAbs belegt werden (Lynch et al., 2015; Scheid et al., 2016). Somit stellen HIV-1 neutralisierende Antikörper interessante Kandidaten für die Entwicklung einer Antikörper-basierten HIV-Therapie oder Vakzine dar. Aus diesem Grund sollen in der hier vorliegenden Arbeit einerseits neue bnAbs von HIV-1 positiven Patienten isoliert und charakterisiert werden (Projekt 1) und andererseits das virale Epitop EC26-2A4 als Immunogen für die Induktion HIV-spezifischer Antikörper weiter evaluiert werden (Projekt 2).

Trotz großer Erfolge bei der Identifizierung breit neutralisierender Antikörper gegen HIV-1, bedarf es für die Entwicklung einer effektiven und sicheren Antikörper-basierten HIV-Therapie weiterer bnAbs, da für eine solche Therapie eine Kombination mehrerer breit neutralisierender Antikörper notwendig ist (Wibmer et al., 2015). In dieser Arbeit soll deshalb die Anwesenheit HIV-1 neutralisierender Antikörper im Blutplasma einer Kohorte von LTNP mittels eines standardisierten *in vitro*-Neutralisations-Assays untersucht werden. Ausgehend von Patienten mit HIV-neutralisierenden Plasma Antikörpern sollen anschließend, aus dem Antikörpergenrepertoire, rekombinante scFv-Phagenbibliotheken (engl. *Single Chain Fragment Variable*) generiert werden. ScFv-Fragmente bilden die kleinste antigenbindende Einheit klassischer Antikörper. Sie bestehen aus der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette eines parentalen Antikörpers und sind mittels eines flexiblen Peptid Linkers miteinander verbunden (Abbildung 1.12). Für die experimentelle Nutzung sind scFv-Fragmente im Phagenkontext aufgrund ihrer hohen Stabilität, schnellen und einfachen Produzier- und Modifizierbarkeit im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern besonders geeignet (Ahmad et al., 2012).

Als Zielstruktur für die Selektion Patienten-abgeleiteter scFv-Fragmente soll in der vorliegenden Arbeit natives HIV-1 Hüllprotein zum Einsatz kommen. Hierfür sollen, mittels des Flp/FRT-Systems, Zelllinien erstellt werden, welche verschiedene Subtypvarianten des HIV-1 Hüllproteins stabil auf der Zelloberfläche exprimieren (Abschnitt 1.1). Die erzeugten HIV-Env exprimierenden Zelllinien sollen im Anschluss quantitativ und qualitativ analysiert und unter Anwendung des Phagen-Displays für die Selektion Hüllprotein-spezifischer scFv-Fragmente genutzt werden. Die Verwendung nativer HIV-Hüllproteine in membrangebundener Form für die Identifikation HIV-1 neutralisierender Antikörper oder Antikörperfragmente ist bisher noch nicht publiziert worden. Die meisten der identifizierten bnAbs gegen HIV-1 wurden mit Hilfe einer löslichen Variante des viralen Hüllproteins isoliert. Lösliche HIV-Oberflächenproteine werden durch Deletion des zytoplasmatischen Teils (CT) sowie der Transmembrandomäne und eines Abschnitts der extrazellulären gp41-Untereinheit generiert. Um nun die trimere Struktur der verkürzten Glykoproteine aufrecht zu erhalten, werden die rekombinanten Env-Konstrukte durch das Einbringen mehrere Sequenzmutationen stabilisiert (Pugach et al., 2015; Sanders & Moore, 2017). Allerdings haben Chen et al. gezeigt, dass eine Kürzung des CT eine verringerte Env-Bindung trimer-spezifischer bnAbs zur Folge hat (Chen et al., 2015). Darüber hinaus führt die Insertion formgebender Mutationen zu einer Veränderung der ursprünglichen Aminosäuresequenz und möglicherweise dadurch zum Verlust potentieller Epitope für bnAbs. Ein weiterer Unterschied zwischen löslichen und membranständigen Hüllproteinen ist neben der Konformation auch die Orientierung der HIV-1 Glykoproteine. Das bedeutet, ein lösliches HIV-Env Trimer ist bei der Selektion von allen Seiten frei zugänglich für Antikörper, während in die Membran inkorporierte HIV-Spikes aufgrund ihrer starren Verankerung überwiegend die Proteinstrukturen exponieren, die auch bei einer natürlichen Infektion auf HI-Viruspartikeln für Antikörper zugänglich sind. Somit stellen membrangebundene HIV-1 Hüllproteine eine besonders native Zielstruktur für die Identifikation von bnAbs dar.

Im Anschluss an die Selektion sollen identifizierte Env-spezifische scFv-Fragmente durch Fusion an einen humanen IgG1-Fc (engl. *Immunoglobulin G1-Crystallisable Fragment*) in bivalente scFv-Fc Antikörper umformatiert werden. Unter Anwendung immunologischer

Methoden sollen zudem die Bindungseigenschaften und mögliche Fc-abhängige Effektorfunktionen der rekombinanten Antikörper untersucht werden. Außerdem soll die Analyse der Antikörper-vermittelten Neutralisation von HIV-1 Pseudoviren mit Hilfe des TZM-bl-Reporterzell Assays erfolgen.

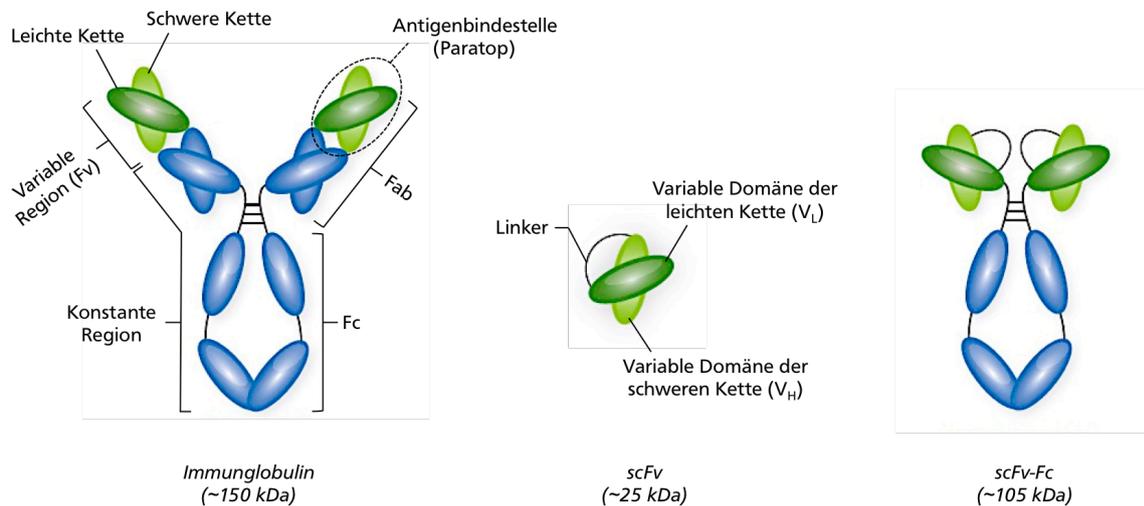


Abbildung 1.12 Antikörper und Antikörperfragmente. Struktur eines klassischen Immunglobulin G Antikörpers (links), eines *single chain variable fragments* (scFv, Mitte) und eines scFv-Fc Antikörpers (rechts). Die verschiedenen Domänen sowie das Molekulargewicht der Antikörper bzw. Antikörperfragmente sind in der Grafik gekennzeichnet. Verwendete Abkürzungen, Fab: antigenbindendes Fragment (engl. *antigen-binding fragment*), Fc: kristallisierbares Fragment (engl. *crystallisable fragment*). (Abbildung in Anlehnung an Rodrigo et al., 2015).

Ein weiteres Hauptaugenmerk der HIV-Forschung liegt auf der Entwicklung geeigneter Impfstoffkandidaten, welche in der Lage sind breit neutralisierende Antikörper zu induzieren. Obwohl die molekularen Zusammenhänge der Interaktion verschiedener besonders potenter bnAbs mit dem viralen Hüllprotein mittlerweile sehr genau bekannt sind, konnten bisher noch keine Antigene generiert werden, die zur Induktion jener bnAbs führen (Burton et al., 2012). In einer, in der Arbeitsgruppe Dietrich durchgeführten, vorangegangenen Doktorarbeit wurde ein neues lineares Epitop (EC26-2A4) innerhalb der hochkonservierten *membrane proximal external region* (MPER) der gp41-Untereinheit des HIV-Hüllproteins identifiziert (Abbildung 1.13) (Zhou M., 2013B). Die Selektion des EC26-2A4 Epitops erfolgte aus einer Phagenbibliothek unterschiedlicher HIV-Env-Fragmente durch IgG eines *Elite Controllers* (EC26) mit HIV-1 neutralisierenden Antikörpern im Plasma (Zhou M. et al., 2013A). Es konnte bereits gezeigt werden, dass EC26-2A4 gekoppelt an das Trägermolekül SOC (engl. *Sequential Oligopeptide Carrier*) Epitop-spezifische Antikörper in immunisierten Mäusen induzieren kann. Mehr noch, die induzierten Antikörper zeigten zudem auch Neutralisationsaktivität gegen ein HIV-1 Pseudovirusisolat (HIV-SF162.LS) (Zhou M. et al., 2012). Allerdings haben Studien zur Feinkartierung der minimalen Antikörpererkenntnissequenz EC26-2A4-spezifischer Antikörper eine Überlagerung mit dem Kernepitop eines weiteren bereits bekannten HIV-neutralisierenden Antikörpers (mAb 2F5) offenbart (Abbildung 1.13) (Muster et al., 1993; Zhou M. et al. 2013A). Problematisch im Bezug auf die

Impfstoffentwicklung ist die Kreuzreaktivität des mAb 2F5 mit Cardiolipin, einem Baustein zellulärer Membranen (Locci et al., 2013). Daher soll im Rahmen dieser Arbeit das EC26-2A4 Epitop dahingehend optimiert werden, dass eine Bindung des EC26-2A4 Peptids durch den mAb 2F5 oder andere polyreaktive Antikörper vermieden wird. Zusätzlich soll die Erkennung des Epitopes durch EC26-2A4-spezifische Antikörper aber keine Beeinträchtigung erfahren, mit dem Ziel das EC26-2A4 Peptid als Antigen für eine effektive Epitop-Vakzine gegen HIV-1 zu entwickeln. Epitop-Vakzine sind in der Regel aus rekombinant synthetisierten Antigenstrukturen des Pathogens zusammengestellt. Meistens handelt es sich um Peptide der viralen Oberflächenproteine, die konservierte und für die Infektiosität des Pathogens funktionell wichtige Domänen imitieren. Daher bieten Epitop-basierte Impfstrategien neben einer erhöhten Sicherheit vor allem den Vorteil, eine gezielte Epitop-spezifische humorale Immunantwort zu induzieren (He, 2006; Ringel et al., 2018A). Mit Hilfe von Peptid-Microarrays sollen geeignete EC26-2A4 Epitopvarianten identifiziert werden. Anschließend soll das modifizierte Epitop dahingehend überprüft werden, ob es in der Lage ist Epitop-spezifische, HIV-1 neutralisierende Antikörper zu induzieren. Hierfür sollen Immunisierungsstudien mit unterschiedlichen Adjuvantien und Trägermolekülen in Mäusen durchgeführt werden. Die gesammelten Seren der immunisierten Tiere sollen in der Folge für die Analyse der induzierten epitop-spezifischen Antikörpertiter mittels *Enzym-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) verwendet werden. Darüber hinaus soll ebenso die Neutralisationsaktivität der Mäuseseren gegen einen Satz aus verschiedenen HIV-Pseudoviren evaluiert werden. Im Umfang einer projektassoziierten medizinischen Doktorarbeit, angefertigt von Karsten Steinhoff, wurde zusätzlich die Anwesenheit Epitop-spezifischer Antikörper im Plasma HIV-1 positiver Patienten untersucht. Die ELISA-basierten Analysen wurden in zwei unterschiedlichen Patientenkohorten durchgeführt, einer Kohorte unter antiretroviraler Therapie (Frankfurter HIV-Kohortenstudie) und einer ART-naiven LTNP-Kohorte (ARNS CO15 ALT-Kohorte) (Steinhoff, in Bearbeitung). Die gesammelten Ergebnisse beider analysierter Kohorten sollen in dieser Arbeit mit verschiedenen klinisch relevanten Parametern korreliert werden. Außerdem sollen aus dem Patientenserum abgeleitete und aufgereinigte Epitop-spezifische Antikörper auf ihre Polyreaktivität mit Phospholipiden sowie auf ihre *in vitro*-Neutralisationsaktivität hin untersucht werden.

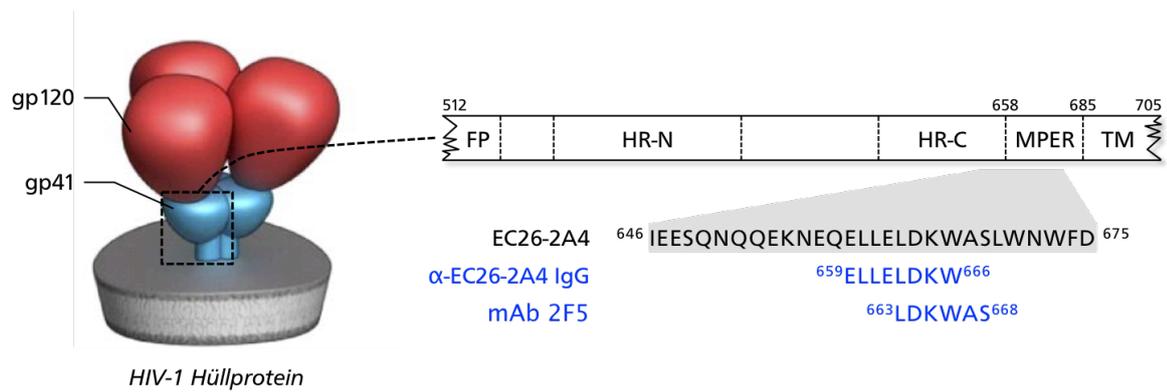


Abbildung 1.13 Gp41 MPER-Epitop EC26-2A4. Darstellung funktionaler Domänen der gp41-Untereinheit des HIV-Env sowie der Lokalisation, der Aminosäuresequenzen des EC26-2A4-Peptids (schwarz) und der minimalen Epitope für EC26-2A4-spezifische IgG und den mAb 2F5 (blau) innerhalb des gp41 (Zhou M. et al., 2012; Muster et al. 1993). Das Fusionspeptid (FP), die *heptad-repeat regions* N und C (HR-N & HR-C) und die *membrane-proximal external region* (MPER) spielen eine wesentliche Rolle bei der Fusion zwischen Virus- und Wirtszellmembran. Die Transmembrandomäne (TM) verankert das Hüllprotein in der Lipidmembran (Montero et al., 2008). Die Nummerierung des gp41 basiert auf der HIV-1 HXB2-Env Aminosäuresequenz (HIV Database). (Abbildung in Anlehnung an Tran et al., 2012).

2 MATERIAL

2.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Phagen

2.1.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α TM	F- ϕ 80lac Z Δ M15 Δ (lac ZYA-argF)U169 deo R rec A1 end A1 hsd R17(rk- , mk+) pho A supE44 thi -1 gyr A96 rel A1 λ - (Sambrook et al., 1989)	Source BioScience, Nottingham, United Kingdom
<i>Escherichia coli</i> TG1	F' [traD36 proAB+ lacIq lacZ M15]supE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-hsdSM)5, (rK-mK-)	Source BioScience, Nottingham, United Kingdom
XL1-Blue MRF' electroporation competent cells	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland

2.1.2 Zelllinien

HEK-293T

Bei den HEK-293T-Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenepithelzellen von ATCC (Manassas, USA), welche mit dem großen T-Antigen des Simian-Virus (SV40) transduziert wurden. Die Zellen wurden standardmäßig in DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % L-Glutamin kultiviert.

HeLa

HeLa-Zellen sind Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms von ATCC (Manassas, USA), dessen Kultivierung in „Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), High Glucose“ mit 10 % (v/v) FCS (PAN Biotec, Aidenbach, Deutschland) und 1 % (v/v) 200 mM L-Glutamin (ThermoFisher Scientific, Deutschland) erfolgt. In dieser Arbeit wurde neben dem Wildtyp (WT) auch eine modifizierte Zelllinie mit dem Name HeLa-HF1-3 verwendet. Diese ist mit einer FRT-Erkennungssequenz sowie mit einem Zeocin-Resistenzgen stabil transfiziert und wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Frau Beatrix Süß (TU Darmstadt) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung

der HeLa-HF1-3-Zellen erfolgte zusätzlich mit 150 µg/mL Zeocin™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) im Medium.

TZM-bl

TZM-bl-Zellen sind modifizierte HeLa-Zellen die große Mengen des humanen CD4-T-Zellrezeptors und des CCR5-Rezeptors stabil exprimieren. Zudem tragen die Zellen ein Gen kodierend für das Enzym Luciferase, unter der Kontrolle eines HIV-1 Promotors. TZM-bl-Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % L-Glutamin kultiviert.

2.1.3 Phagen

Helferphagen	Bezugsquelle
<i>M13 K07</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Hyperphage M13 K07ΔpIII</i>	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.2 Kulturmedien

Kulturmedium	Zusammensetzung/ Beschreibung	Bezugsquelle
Bakterienkultur		
2xYT- Flüssigmedium (pH 7,0)	1,6 % (w/v) Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg, Deutschland
	1 % (w/v) Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg, Deutschland
	0,5 % (w/v) NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT- Flüssigmedium-GA (pH 7,0)	2xYT-Medium	
	100 mM Glucose 100 µg/mL Ampicilin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT- Flüssigmedium- SAI (pH 7,0)	2xYT-Medium	
	0,4 M Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	100 µg/mL Ampicilin 0,1 mM IPTG	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT-Agar-AK	2xYT-Medium	
	1,5 % (w/v) Select Agar	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
	100 µg/mL Ampicilin 50 µg/mL Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT-Agar-GA	2xYT-Medium	
	1,5 % (w/v) Select Agar	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
	100 mM Glucose 100 µg/mL Ampicilin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2xYT-Agar-GAT	2xYT-Medium	
	1,5 % (w/v) Select Agar	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
	100 mM Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	100 µg/mL Ampicilin 50 µg/mL Tetracyclin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

LB-Flüssigmedium (pH 7,0)	1 % (w/v)	Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg, Deutschland
	0,5 % (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg, Deutschland
	0,5 % (w/v)	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar-A		LB-Medium	
	1,5 % (w/v)	Select Agar	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
	100 µg/mL	Ampicilin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SOC- Flüssigmedium (pH 7,0)	2 % (w/v)	Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg, Deutschland
	0,5 % (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt	BD, Heidelberg, Deutschland
	0,05 % (w/v)	NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	20 mM	Magnesium-Lösung	siehe 2.3 Puffer und Lösungen
	20 mM	Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkultur			
DMEM-Standard		<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	1 % (v/v)	200 mM L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
	10 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
DMEM- Hygromycin		DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	1 % (v/v)	200 mM L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
	10 % (v/v)	FCS	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
	320 µg/mL	Hygromycin B	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM-Puromycin		DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	1 % (v/v)	200 mM L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
	10 % (v/v)	FCS	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
	2 µg/mL	Puromycin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
DMEM-Zeocin		DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	1 % (v/v)	200 mM L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Deutschland
	10 % (v/v)	FCS	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
	150 µg/mL	Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium		DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	30 % (v/v)	FCS	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
	10 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einfriermedium- PBMC	90 % (v/v)	FCS	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
	10 % (v/v)	DMSO	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung/ Beschreibung	Bezugsquelle
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1 x SDS-Transferpuffer	25 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris 5 mM Na-Acetat 1 mM Na-EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2 x SDS-Probenauftragspuffer	1 M Tris (pH 6,7) 50 % (v/v) Glycerin 4,3 % (w/v) SDS 0,025 µg/mL Bromphenolblau 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
6 x DNA-Probenauftragspuffer		NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland
<i>Blocking Buffer</i> -BSA	PBS 2 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween-20	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Blocking Buffer</i> -Milch	PBS 5 % (w/v) Milchpulver 0,05 % (v/v) Tween-20	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Blocking Buffer</i> -Zellkultur	PBS 0,4 % (w/v) BSA 0,02 % (w/v) Na-Azid	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ELISA/ WB-Waschpuffer	PBS 0,05 % (v/v) Tween-20	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixierungspuffer	PBS 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Harvest Buffer</i>	10 % (v/v) Glycerin 5 % 1 M MES-Tris (pH 7,8) 0,1 % 1 M DTT 0,1 % (v/v) Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Luciferin-Lösung	10 mg Luciferin 36 mL 0,5 M KHPO ₄ (pH 7,8)* *Bestehend aus einem 1:1 Mix 1 M KH ₂ PO ₄ : 1 M K ₂ HPO ₄	Promega, Mannheim, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Luciferin-Puffer	6,25 mL 1 M MES-Tris 1,25 mL 1 M MgCl ₂ 120 mg ATP 42,5 mL VE-Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Magnesium-Lösung (2 M)	1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Phagen-Bindungspuffer	1 % (w/v)	PBS BSA	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Phagen-Display-Elutionspuffer (pH 2,2)	0,1 M	Glycin-HCl	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Phagen-Display-Neutralisationspuffer (pH 8,0)	2 M	Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Phagen-Display-Waschpuffer	1 % (w/v) 0,1 % (v/v)	PBS BSA Tween-20	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phagen-Elutionspuffer (Phagenfällung)	10 mM 20 mM 2 mM	Tris-HCl (pH 7,5) NaCl EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Ohne Calcium und Magnesium		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Polyethylenglykol (PEG)-Lösung	20 % (w/v) 2,5 M	PEG 6000 NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Protein A-Bindungspuffer (pH 7,4)	0,1 M 0,15 M	Na ₃ PO ₄ NaCl	Amresco, Solon, Ohio, USA Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Protein A-Elutionspuffer (pH 3,0)	0,1 M	Glycin-HCl	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Protein A-Neutralisationspuffer (pH 8)	2 M	Tris-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % (w/v) 0,1 % (w/v)	Trypsin EDTA	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
Agarose	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biotin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
CFDA SE	ThermoFisher Scientific, Deutschland
DAPI	ThermoFisher Scientific, Deutschland
DEAE-Dextran	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
<i>InstantBlue™ Coomassie Protein Stain</i>	Expediton AG, Heidelberg, Deutschland

Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>KPL SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate</i>	SeraCare, Milford, Massachusetts, USA
<i>Monophosphoryl Lipid A</i>	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Montanide ISA 720	Seppic, Köln, Deutschland
Mounting Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Pancoll	Pan™ Biotech, Aidenbach, Deutschland
<i>Pierce™ ECL Western Blotting Substrate</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>Pierce™ Protein A Agarose</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.5 Kommerzielle Kits

Kit-Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Anti-Cardiolipin (sCL) Assay Kit</i>	Bio-Rad, Feldkirchen Deutschland
<i>Anti-Phosphatidylserine (aPS) Assay Kit</i>	Bio-Rad, Feldkirchen Deutschland
<i>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>Mix-n-Stain™ CF™ 488A Antibody Labeling Kits</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>NucleoBond® PC 500 Kit</i>	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit</i>	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<i>Quantum™ Simply Cellular Kits</i>	Bangs Laboratories Inc., Fishers, Indian, USA
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<i>SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Kit</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland

2.6 DNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>Antarctic Phosphatase</i>	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland
<i>DNase I, Amplification Grade</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>DreamTaq™ DNA Polymerase</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>DreamTaq™ Green PCR Master Mix</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>Q5® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland
Restriktionsnukleasen NotI; XhoI; XmaI; NcoI; MluI; HindIII	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt/ Main, Deutschland
T4-DNA-Ligase	ThermoFisher Scientific, Deutschland

2.7 Größenstandards

DNA- & Proteinstandard	Bezugsquelle
<i>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</i> , beide	ThermoFisher Scientific, Deutschland
<i>GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder</i>	ThermoFisher Scientific, Deutschland
ProSieve QuadColor Protein Marker, 4,6 – 300 kDa	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

2.8 Plasmide

Plasmid-Kennung	Beschreibung	Bezugsquelle
SC422661, clone B (SVPB8)	HIV-1 <i>rev/ env</i> (Subtyp B)-Expressionskassette	NIH AIDS Reagent Program
pAncCgp160-opt	HIV-1 <i>rev/ env</i> (Subtyp C)-Expressionskassette	NIH AIDS Reagent Program
pM901	Eukaryotisches Expressionsplasmid, u.a. kodierend für <i>pac-wPRE</i>	AG Dietrich, GSH, Frankfurt, Deutschland
pM513	Eukaryotischer Expressionsvektor, u.a. kodierend für eine IRES	AG Dietrich, GSH, Frankfurt, Deutschland
pcDNA™5/FRT	Expressionsplasmid mit einer FRT-Erkennungssequenz und einem Startcodondefizienten <i>hpt</i> -Gen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pOG44	Eukaryotisches Expressionsplasmid, kodierend für die Rekombinase F1p	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pHAL30	Phagemid zur Generierung von Antikörperfragment::pIII-Bibliotheken	Michael Hust, Tu Braunschweig, Deutschland
pCMV2.5-IgG1-Fc-XP	Eukaryotischer Expressionsvektor mit einer optimierten humanen IgG1 Fc-Domäne	Michael Hust, TU Braunschweig, Deutschland
pJRFLsyngp140	Eukaryotisches Expressionsplasmid, kodierend für Codon-optimiertes HIV-1 JR-FL <i>env</i>	NIH, Bethesda, Maryland, USA

2.9 DNA-Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) bezogen und in einer Konzentration von 100 μ M in VE-Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Sequenzen der DNA-Primer, für die Generierung von humanen Antikörperfragmentbibliotheken, stammen aus der Arbeit von Thomas Schirrmann und Michael Hust ((Frenzel et al., 2014).

Oligonukleotid-Bezeichnung	DNA-Sequenz (5´ - 3´ Orientierung)
Herstellung Antikörper-Immunistoffbibliotheken	
Amplifikations-PCR#1 VH	
MHVH1_f	cag gtb cag ctg gtg cag tct gg
MHVH1/7_f	car rts cag ctg gtr car tct gg
MHVH2_f	cag rtc acc ttg aag gag tct gg
MHVH3_f1	sar gtg cag ctg gtg gag tct gg
MHVH3_f2	gag gtg cag ctg ktg gag wcy sg
MHVH4_f1	cag gtg car ctg cag gag tct gg
MHVH4_f2	cag stg cag ctr cag sag tss gg
MHVH5_f	gar gtg cag ctg gtg cag tct gg
MHVH6_f	cag gta cag ctg cag cag tca gg
MHIgGCH1_r	gac cga tgg gcc ctt ggt gga
Amplifikations-PCR#1 VL _{Kappa}	
MHVK1_f1	gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1_f2	gmc atc crg wtg acc cag tct cc
MHVK2_f	gat rtt gtg atg acy cag wct cc
MHVK3_f	gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4_f	gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHVK5_f	gaa acg aca ctc acg cag tct cc
MHVK6_f	gaw rtt gtg mtg acw cag tct cc
MHkappaCL_r	aca ctc tcc cct gtt gaa get ctt
Amplifikations-PCR#1 VL _{lambda}	
MHVL1_f1	cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1_f2	cag tct gtg ytg acg cag ccg cc
MHVL2_f	cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3_f1	tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3_f2	tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4_f1	ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4_f2	cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5_f	cag set gtg ctg act cag cc
MHVL6_f	aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8_f	cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10_f	cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHlambdaCL_r*	tga aca ttc tgt agg ggc cac tg
MHlambdaCL_r2*	tga aca ttc cgt agg ggc aac tg
* Die Revers-Primer MHlambdaCL_r und MHlambdaCL_r2 wurden gemeinsam in einem 1:1-Verhältnis im Rahmen der Amplifikations-PCR#1 VL _{lambda} verwendet.	
Amplifikations-PCR#2 VH	
MHVH1-NcoI_f	gtc ctc gca cc atg gcc cag gtb cag ctg gtg cag tct gg
MHVH1/7-NcoI_f	gtc ctc gca cc atg gcc car rts cag ctg gtr car tct gg
MHVH2-NcoI_f	gtc ctc gca cc atg gcc cag rtc acc ttg aag gag tct gg
MHVH3-NcoI_f1	gtc ctc gca cc atg gcc sar gtg cag ctg gtg gag tct gg

MHVH3-NcoI_f2	gtc ctc gca cc atg gcc gag gtg cag ctg ktg gag wcy sg
MHVH4-NcoI_f1	gtc ctc gca cc atg gcc cag gtg car ctg cag gag tgc gg
MHVH4-NcoI_f2	gtc ctc gca cc atg gcc cag stg cag ctr cag sag tss gg
MHVH5-NcoI_f	gtc ctc gca cc atg gcc gar gtg cag ctg gtg cag tct gg
MHVH6-NcoI_f	gtc ctc gca cc atg gcc cag gta cag ctg cag cag tca gg
MHIgGCH1scFv-HindIII_r	gtc ctc gca aag ctt gac cga tgg gcc ctt ggt gga
Amplifikations-PCR#2 VL_{kappa}	
MHVK1-MluI_f1	acc gcc tcc a cgc gta gac atc cag atg acc cag tct cc
MHVK1-MluI_f2	acc gcc tcc a cgc gta gmc atc crg wtg acc cag tct cc
MHVK2-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta gat rtt gtg atg acy cag wct cc
MHVK3-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta gaa atw gtg wtg acr cag tct cc
MHVK4-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta gac atc gtg atg acc cag tct cc
MHVK5-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta gaa acg aca ctc acg cag tct cc
MHVK6-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta gaw rtt gtg mtg acw cag tct cc
MHkappaCLscFv-NotI_r	acc gcc tcc gc ggc cgc gaa gac aga tgg tgc agc cac agt
Amplifikations-PCR#2 VL_{lambda}	
MHVL1-MluI_f1	acc gcc tcc a cgc gta cag tct gtg ctg act cag cca cc
MHVL1-MluI_f2	acc gcc tcc a cgc gta cag tct gtg ytg acg cag ccg cc
MHVL2-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta cag tct gcc ctg act cag cct
MHVL3-MluI_f1	acc gcc tcc a cgc gta tcc tat gwg ctg acw cag cca cc
MHVL3-MluI_f2	acc gcc tcc a cgc gta tct tct gag ctg act cag gac cc
MHVL4-MluI_f1	acc gcc tcc a cgc gta ctg cct gtg ctg act cag ccc
MHVL4-MluI_f2	acc gcc tcc a cgc gta cag cyt gtg ctg act caa tcr yc
MHVL5-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta cag sct gtg ctg act cag cc
MHVL6-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta aat ttt atg ctg act cag ccc ca
MHVL7/8-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta cag rct gtg gtg acy cag gag cc
MHVL9/10-MluI_f	acc gcc tcc a cgc gta cag scw gkg ctg act cag cca cc
MHlambdaCLscFv-NotI_r	acc gcc tcc gc ggc cgc aga gga sgg ygg gaa cag agt gac
Kolonie-PCR	
MHLacZ-Pro_f	ggc tgc tat gtt gtg tgg
MHgIII_r	c taa agt ttt gtc gtc ttt cc
Klonierung HIV-Env-Konstrukte	
PCR#1	
OR_AY-B_PCR1c-for	atg gca gga aga agc gga gac aac gac g
OR_AY-B_PCR1a_rev	tga caa tgg tga aca tcc ctg cct aac tc
OR_HIV-Env_C-opt_PCR1_fw	atg cgc gtg atg ggc atc c
OR_HIV-Env_C-opt_PCR1_rv	tta cag cag ggc ggc ctc g
OR_puro_fw_2.0	acc atg acc gag tac aag cc
OR_puro_rv_2.0	gtt cgc aat tct gca cag g
PCR#2	
OR_env_B-NotI_fw_2.0	aga gcg gcc gcc acc atg gca gga aga agc
OR_env_B-XmaI_rv_2.0	aat ccc ggg tca agt tat aac aaa gcc
OR_HIV-Env_C-opt_PCR2_fw	ata gcg gcc gcc acc atg cgc gtg atg gg
OR_HIV-Env_C-opt_PCR2_rv	aat ccc ggg tca gtt aca gca ggg
OR_puro_XhoI_fw_5er	atc agc tgc agc cac cat gac cga gta caa gcc
OR_puro_XhoI_rv_5er	gtt tac tgc agt gtt cgc aat tct gca cag g
Kolonie-PCR & Sequenzierung	
OR_seq_EFS1_#1	tat aag tgc agt agt cgc
OR_seq_CMV_#1	agt gaa ccg tca gat cgc
OR_seq_B_#1	ctc agt cat ta caca ggc
OR_seq_B_#2	cag act att att gtc tgg

OR_HIV-Env_C-opt_Seq#1_fw	aac ctg acc gac aac gc
OR_HIV-Env_C-opt_Seq#3_fw	ttc gac atc acc aac tgg c
OR_BGH-rev	tag aag gca cag tcg agg

Klonierung Antikörperfragment-Fc-Konstrukte

Kolonie-PCR & Sequenzierung

OR_NP_#8_seq_fw	aca gta gca ggc ttg agg
OR_pCMX_seq_rev	ggg tct tcg tgg ctc acg t

3 METHODEN

3.1 Bakterien- und Zellkulturtechnik

3.1.1 Bakterienkultur

Zur Amplifikation von *E.coli*-Zellen für die Plasmid-DNA-Isolierung wurden die Bakterien entweder in LB- oder 2xYT-Flüssigmedium angezogen. Dafür wurden einzelne Klone transformierter Bakterien von einer Selektivmedium-Agarplatte gepickt und in 5 mL Flüssigmedium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, inokuliert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (B. Braun Biotechnology Int., Melsungen, Deutschland) über Nacht.

Für die Anreicherung von Phagen, während des Phagen-Displays (Abschnitt 3.5.2.4), wurden TG1-Zellen aus einem Glycerolstock in 5mL 2xYT-Flüssigmedium ohne Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Ausgehend von der Übernachtskultur wurden die Bakterienzellen mit einer Extinktion kleiner 0,1 bei 600 nm (OD_{600}) in frischem 2xYT-Flüssigmedium inokuliert. Anschließend erfolgte die Anzucht der TG1-Zellen bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5, bevor die Bakteriensuspension für die Reinfektion mit den Phagen verwendet wurde.

3.1.2 Langzeitlagerung von Bakterien

Die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen erfolgte als Glycerolstocks. Hierfür wurde 1 mL Bakterienkultur mit 0,2 mL Glycerin gemischt und anschließend bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α

Für die Transformation wurden 25 μ L chemisch kompetenter *E.coli* DH5 α (Hergestellt von Patricia Schult-Dietrich, Technische Assistenz) auf Eis aufgetaut und mit 3 bis 5 μ L des Ligationsansatzes vermischt. Die Re-Transformation von Plasmid-DNA erfolgte mit 100 bis 200 ng DNA. Die Bakterien-DNA Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Danach wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ L LB-Medium aufgenommen und für

2 Stunden bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator (B. Braun Biotechnology Int., Melsungen, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienzellen bei 3000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgekippt und das Zellpellet im verbliebenen Mediumüberstand resuspendiert. Abschließend wurden die transformierten Zellen auf ampicillinhaltigen Selektivmediumplatten (100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Transformation elektrokompenter *E.coli* XL1-Blue MRF`

Die Herstellung von Bakterienbibliotheken mit einer großen Anzahl an Transformanden erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von *E.coli* XL1-Blue MRF` *Electroporation-Competent Cells* (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer sehr hohen Transformationseffizienz ($>1 \times 10^{10}$ Transformanden/µg). Vor der Elektroporation wurde der Ligationsansatz (Abschnitt 3.4.4) mittels Ethanol-fällung entsalzt und das DNA-Pellet anschließend in 35 µL VE-Wasser resuspendiert. Der komplette Ansatz wurde anschließend mit 25 µL auf Eis aufgetauter elektrokompenter *E.coli* XL1-Blue MRF` vorsichtig vermischt und in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette (ThermoFisher Scientific, Deutschland) überführt. Die Transformation der Zellen erfolgte in einem Elektroporator (*Easyject Optima*, Equibio Inc, Maidstone Kent, UK) bei einer elektrischen Feldstärke von 1,7 kV und einer Pulsdauer von etwa 4 – 5 Millisekunden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen zügig in 940 µL vorgewärmten SOC-Medium (37 °C) aufgenommen, in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für eine Stunde bei 400 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurde die Bakteriensuspension nach der Inkubation 10-fach seriell verdünnt (10^{-2} bis 10^{-6} -Verdünnung) und die Verdünnungen auf 2xYT-GAT-Agarplatten (100 mM Glucose; 100 µg/mL Ampicillin; 20 µg/mL Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die restlichen 990 µL wurden insgesamt auf vier 2xYT-GAT-Agarplatten mit einem Durchmesser von 15 cm aufgeteilt, ausgestrichen und ebenfalls bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1.5 Herstellung von 96 Well-Masterplatten

Für die Analyse und Langzeitlagerung der mittels Phagen-Display angereicherten und eluierten Antikörperfragmentphagen, wurden 96 Well-Masterplatten (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit einzelnen Bakterienklonen nach der jeweiligen finalen Selektionsrunde hergestellt. Je Well wurden hierfür 200 µL 2x YT-Medium, versetzt mit 100 µg/mL Ampicillin und 2 % (w/v) Glucose vorgelegt. Anschließend wurden von den Agarplatten mit angewachsenen Bakterienkolonien - nach der Infektion mit den eluierten Phagen - einzelne Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein einzelnes Well überführt. Danach erfolgte eine Inkubation der Platten bei 37 °C und 250 rpm über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden je Well 100 µL PBS mit 50 % (v/v) Glycerin zugegeben und mit der Bakterienkultur vorsichtig vermischt. Abschließend erfolgte die Lagerung der Masterplatten bei -80 °C. Insgesamt wurden pro 96 Well-Mikrotiterplatte 88 einzelne Bakterienklone selektioniert.

3.1.6 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank (*Nuair* NU-5510, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland) bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem Kohlenstoffdioxidgehalt (CO₂) von 5 % in 75 cm² Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Alle drei bis vier Tage wurden die konfluent gewachsenen Zellen subkultiviert. Nach Abnahme des verbrauchten Kulturmediums wurden die Zellen zunächst mit 5 mL PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gespült, um Medienrückstände zu entfernen. Das Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden erfolgte durch Zugabe von 3 mL einer 0,05 prozentigen Trypsin-EDTA-Lösung (ThermoFisher Scientific, Deutschland) und einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Nachfolgend wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt und das Trypsin durch Hinzufügen von 9 mL Kulturmedium inaktiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers (Casy Cell Counter, OLS, Bremen, Deutschland). Zur Aufrechterhaltung der Zelllinie wurde die gewünschte Zellzahl anschließend in neue 75 cm² Kulturflaschen ausgesät.

Im Unterschied dazu wurden die HIV-1 Env-exprimierenden Zelllinien nicht fortlaufend subkultiviert. Die stabil transfizierten HeLa-EnvB und -EnvC-Zellen wurden jeweils vier bis fünf Tage vor der experimentellen Untersuchung frisch aufgetaut.

3.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei etwa -196 °C. Für das Einfrieren wurden mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöste Zellen gezählt und die gewünschte Zellzahl anschließend bei 110 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in vorgekühltem Einfriermedium (DMEM mit 30 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid) vorsichtig resuspendiert. Je 2 x 10⁶ Zellen (1 x 10⁶ Zellen/mL) wurden in Kryoröhrchen (ThermoFisher Scientific, Deutschland) überführt und nachfolgend in einem Isopropanol-Behälter (Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container) kontrolliert mit einer durchschnittlichen Temperaturabnahme von 1 °C/min auf -80 °C herunter gekühlt. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff übertragen.

Zum Auftauen wurden die Kryo-konservierten Zellen aus dem flüssigen Stickstoff herausgeholt und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde anschließend in 20 mL vorgekühltes Kulturmedium überführt und bei 110 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige (Serva, Heidelberg, Deutschland) Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen in 5 mL vorgewärmtem Medium resuspendiert und in 75 cm² Kulturflaschen überführt. 24 h nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht angewachsene Zellen zu entfernen oder die Zellen unter Selektion zu setzen.

3.1.8 Transiente Transfektion von Säugerzelllinien

Die Methode diente dem Nachweis der HIV-1 Env-Expression auf der Zelloberfläche (Abschnitt 4.1.1) sowie der Produktion von Antikörperfragment-Fc-Konstrukten (Abschnitt 4.1.7). Das Einschleusen der Plasmid-DNA in die Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) realisiert. Die Aussaat von HEK-293T-Zellen erfolgte 24 h vor der transienten Transfektion in einer Zelldichte von 32000 Zellen/cm² in 9,6 cm² Petrischalen auf Deckgläschen (24 x 24 mm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) oder in 60,8 cm² Zellkulturpetrischalen mit einer Zelldichte von 66000 Zellen/cm². Die Plasmid-DNA und das PEI wurden vor der Zusammenführung in zwei getrennten Ansätzen in Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, Deutschland) gelöst (Tabelle 3.1). Der Transfektionsansatz wurde nach der Präparation für 10 Sekunden gevortext und anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gespült und in frischem Kulturmedium mit 5 % FCS (DMEM, 5 % FCS ohne L-Glutamin) aufgenommen (9,6 cm²: 1,8 mL Medium/ 60,8 cm²: 9 mL Medium). Im Anschluss erfolgte unter vorsichtigem Schwenken die tropfenweise Zugabe der Plasmid-DNA-Lösung. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium erneut abgenommen und gegen DMEM mit 5 % FCS und 1 % L-Glutamin gewechselt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % im Brutschrank für 48 h bzw. 72 h inkubiert. Negativkontrollen (Mock-Proben) enthielten keine Plasmid-DNA im Transfektionsansatz.

Tabelle 3.1 Verwendete Ansätze für die transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen.

Zellkulturformat	PEI-Ansatz	DNA-Ansatz
9,6 cm ²	9 µg PEI (1 mg/mL)	3 µg Plasmid-DNA
	100 µL Opti-MEM Medium	100 µL Opti-MEM Medium
60,8 cm ²	30 µg PEI (1 mg/mL)	10 µg Plasmid-DNA
	500 µL Opti-MEM Medium	500 µL Opti-MEM Medium

3.1.9 Stabile Transfektion humaner Zellen

Die stabile Transfektion wurde zur Herstellung von Zelllinien angewendet die konstitutiv HIV-1 Hüllproteine auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Transfektion von HeLa-HF1-3 Zellen mit einem Expressionsvektor erfolgte in dieser Arbeit mit dem *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* nach Angaben des Herstellers (ThermoFisher Scientific, Deutschland). Die Aussaat der HeLa-HF1-3 Zellen erfolgte hierfür mit einer Zelldichte von 42000 Zellen/cm² 24 h vor der Transfektion in 9,6 cm² Petrischalen. Die Plasmid-DNA und das Lipofectamine 2000 wurden vor der Zusammenführung in zwei getrennten Ansätzen in Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, Deutschland) gelöst (Tabelle 3.2). Der Transfektionsansatz wurde nach der Präparation für 10 sec gevortext und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zeozin-haltige Kulturmedium (DMEM; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin; 150 µg/mL Zeocin™) von den HeLa-Zellen abgenommen und nach dem Spülen

mit PBS durch 1,8 mL frischem Kulturmedium ohne Zeozin ersetzt. Nach der tropfenweisen Zugabe des Transfektionsansatzes erfolgte die Inkubation der HeLa-Zellen für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % im Brutschrank. Im Anschluss wurden die transfizierten Zellen vom Kulturgefäßboden abtrypsiniert und in eine 148 cm² Zellkulturschale mit 15 mL Hygromycin B-haltigem (320 µg/mL) Kulturmedium überführt. Danach erfolgte eine 14-tägige Selektion auf stabil transfizierte, teilungsfähige, Hygromycin B-resistente HeLa-Zellklone. Angewachsene Zellkolonien wurden in der Folge vorsichtig mit einer P1000 Mikropipette (Gilson®, Middleton, WI, USA) unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) vom Kulturschalenboden abgehoben und als Einzelkolonie in 48 Well-Platten überführt. Anschließend wurden die wachsenden monoklonalen Zellklone in 6 Well-Platten und im Weiteren in 75 cm² Zellkulturschalen angezogen und abschließend Kryo-konserviert.

Tabelle 3.2 Ansatz für die stabile Transfektion von HeLa-HF1-3 Zellen.

Lipofectamine 2000-Ansatz		DNA-Ansatz	
10 µL	<i>Lipofectamine 2000</i>	200 ng	HIV-1 Env Plasmid-DNA
90 µL	Opti-MEM Medium	1800 ng	pOG44-DNA
		auf 100 µL	Opti-MEM Medium

3.1.10 Zell-Zell-Fusionsassay

Für die Funktionsanalyse der membranassoziierten HIV-1 Hüllprotein-*Spikes*, wurden CD4- und CCR5-positive TZM-bl-Zellen in einer Zelldichte von 2500 Zellen/cm² in 9,6 cm² Petrischalen ausgesät. Am Tag nach der Aussaat erfolgte die Färbung der TZM-bl-Zellen mit dem Markierungsstoff CFDA SE (ThermoFisher Scientific, Deutschland). Hierfür wurden das Kulturmedium abgenommen und die Zellen für 15 min bei 37 °C mit 2 mL der CFDA SE-Lösung (5 µM CFDA SE in PBS) im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen erneut für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden HeLa-Wildtyp Zellen und unter Puromycin-Selektion kultivierte HeLa-Env Zellen abtrypsiniert, gezählt und in einer Zelldichte von 2500 Zellen/cm² zu den markierten TZM-bl-Zellen gegeben. Danach wurden beide Zelllinien für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % im Brutschrank kokultiviert. Die Untersuchung der Zell-Zell-Fusion erfolgte alle 30 min am Fluoreszenzmikroskop bei einer Emissions-Wellenlänge von 517 nm. Für die Aufnahmen der Zellfusion am Fluoreszenzmikroskop wurden zusätzlich Proben nach 90 min Kokultivierung mit Paraformaldehyd fixiert (Abschnitt 3.2.1) und anschließend mit DAPI gefärbt. Die Zellen wurden hierbei nach der Fixierung mit PBS gespült und in der Folge mit 2 mL einer DAPI-Lösung (1 µg/mL DAPI in PBS) für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch zweimaliges Spülen mit PBS wurde der DAPI-Überschuss entfernt.

3.1.11 *In vitro* TZM-bl Neutralisations-Assay

Die Bestimmung der *in vitro* Neutralisationsaktivität von Patienten- (Abschnitt 4.1.3) oder Mäuseseren (Abschnitt 4.2.2) sowie der identifizierten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte (Abschnitt 4.1.8) und der Patienten-abgeleiteten EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper (Abschnitt 4.2.3) erfolgte mittels des TZM-bl Neutralisations-Assays in Übereinstimmung mit einem standardisierten Protokoll (Abbildung 3.1) (Montefiori, 2004). TZM-bl-Zellen exprimieren große Mengen an CD4- und CCR5-Rezeptoren stabil auf der Zelloberfläche. Zudem besitzen TZM-bl-Zellen ein integriertes Luciferase-Reportergen, welches unter der regulatorischen Kontrolle des HIV-1 Tat-Proteins steht. Infolge einer HIV-Infektion und Integration wird Tat durch die infizierte Zelle exprimiert, was wiederum zur Induktion der Luciferasegen-Expression führt. Die Expressionslevel des Reportgens werden anhand der Luciferase-Aktivität mittels Chemilumineszenz ermittelt. Wobei die gemessene Luciferase-Aktivität proportional zur Infektionsrate des HI-Virus ist. Alle Env-pseudotypisierten HIV-1 Isolate sind in der Tabelle 3.3 aufgelistet.

Im Vorfeld der Untersuchung wurden die Patient- und Mäuseseren zur Inaktivierung der im Plasma enthaltenen Komponenten des Komplement-Systems für 45 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden die Seren 3-fach seriell verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 100 µL Kulturmedium in 96 Well-Zellkulturplatten (*Cellstar*®, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) in Duplikaten vorgelegt. Bei den Patientenseren wurde mit einer 1:10-Verdünnung gestartet, während die Mäuseseren initial 1:15 verdünnt wurden. Danach erfolgte die Zugabe der HIV-Pseudoviren in 50 µL Kulturmedium, wobei die zugegebene Virusmenge einem Chemilumineszenz-Signal von etwa 15000 RLU (relative Lumineszenz) entsprach (Tabelle 3.3). Die verdünnten Seren wurden mit den HI-Viren anschließend für 90 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je Well 1 x 10⁴ frisch abtrypsinierte TZM-bl-Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µL Kulturmedium mit 12,5 µg/mL DEAE-Dextran gelöst und der Serum-Virus-Suspension zugeführt. Gefolgt von einer 48 stündigen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend lysiert. Die Zellyse erfolgte mittels 110 µL *Harvest Buffer* je Well für 10 min bei RT, gefolgt von einer mindestens zweistündigen Inkubation der Zellen bei -80 °C. Für die Auswertung wurden 60 µL des aufgetauten und resuspendierten Zellysates in weiße 96 Well-Platen (Luminescence MicroLite 2+, ThermoFisher Scientific, Deutschland) überführt. Unmittelbar vor der Messung im Luminometer (LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) wurde je Well 50 µL eines Luciferin-Substrats, bestehend aus einer 1:1 Mischung einer Luciferin-Lösung und eines Luciferase-Puffers, zugegeben. Die Bestimmung des Chemilumineszenz-Signals eines Wells erfolgte anhand des Mittelwertes von 30 aufeinanderfolgenden Messzyklen. Als Kontrollen dienten Zellen, die ohne Serumzugabe mit (Viruskontrolle) und ohne HI-Virus (Zellkontrolle) inkubiert wurden. Die Neutralisationsaktivität der einzelnen Serumproben entsprach der ermittelten RLU in Relation zur RLU der Viruskontrolle nach Abzug der Hintergrundlumineszenz (Zellkontrolle) (Formel 3.1).

Die Bestimmung der *in vitro* Neutralisationsaktivität der identifizierten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte erfolgte mittels einer seriellen 2-fach Verdünnung in Duplikaten, ausgehend von einer Antikörperkonzentration von 25 µg/mL. Bei den Patienten-abgeleiteten EC26-

2A4ΔM-spezifischen Antikörpern wurde mit einer Konzentration von 20 µg/mL gestartet, die in der Folge 3-fach verdünnt wurde.

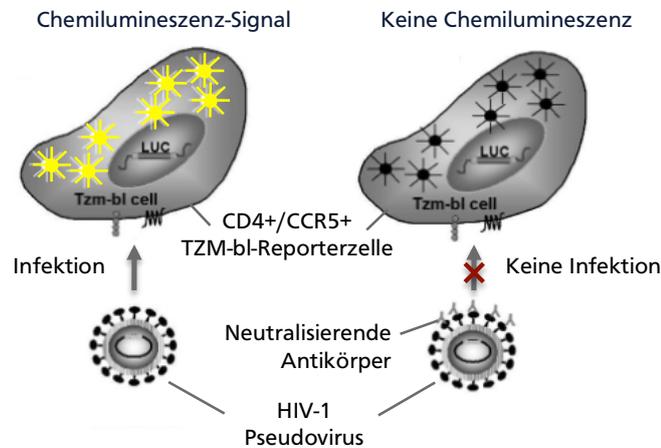


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Funktionsweise des *in vitro* Neutralisations-Assays. CD4- und CCR5-positive Tzm-bl-Reportorzellen werden zu Env-pseudotypisierten HIV-Virusisolaten gegeben, welche zuvor für 90 min mit (rechts) oder ohne (links) HIV-1 Env-spezifischen Antikörpern inkubiert wurden. Die Virusinfektion der Zellen führt in der Folge zu einer Tat-induzierten Luciferasegen-Expression. Die ermittelte Luciferase-Aktivität wird anschließend mittels Chemilumineszenz quantifiziert. Im Falle einer Antikörper-abhängigen Neutralisation der HI-Viren wird die Expression des Luciferasegens unterbunden und dadurch bedingt auch kein Chemilumineszenz-Signal gemessen (Ozaki et al., 2012). (Abbildung in Anlehnung an Ozaki et al., 2012).

Tabelle 3.3 Für die Bestimmung der Neutralisationsaktivität verwendete HIV-1 Pseudoviren. Die „eingesetzte Virusverdünnung“ ist hierbei abhängig von der jeweiligen hergestellten Pseudoviruscharge. Die Pseudoviren wurden alle GLP-konform produziert (Frauenhofer IBMT, Sankt Ingbert, Deutschland) und durch Hagen von Briesen für die experimentelle Nutzung zur Verfügung gestellt.

HIV-1 Pseudovirus	Subtyp	Tier	Accession Nr.	Eingesetzte Virusverdünnung
HIV-MS208.A1	A	1	DQ187010	1:25
HIV-389-F1_F6_20	A	2	HM215312	1:20
HIV-246-F3_C10_2	AC	2	HM215279	1:35
HIV-CNE8	AE	2	HM215427	1:85
HIV-CNE55	AE	2	HM215418	1:45
HIV-Bal.26	B	1	DQ318211	1:40
HIV-SF162.LS	B	1	EU123924	1:20
HIV-SS1196.1	B	1	AY835442	1:40
HIV-REJO4541.67	B	2	AY835449	1:125
HIV-THRO4156.18	B	2	AY835450	1:25
HIV-TRO.11	B	2	AY835445	1:80
HIV-X2278_C2_B6	B	2	FJ817366	1:30
HIV-BJOX002000.03.2	BC	2	HM215364	1:130
HIV-CH119.10	BC	2	EF117261	1:200

HIV-25710-2.43	C	2	EF117271	1:10
HIV-CE1176_A3	C	2	FJ444437	1:45
HIV-CE703010217_B6	C	2	FJ443575	1:115
HIV-pAncCgp160-opt	C	2	DQ401076	1:5
HIV-X1632_S2_B10	G	2	FJ817370	1:105
SVA-MLV	-	-	-	1:150

Formel 3.1 Gleichung zur Berechnung der Antikörper-abhängigen Neutralisationsaktivität. RLU = Relative Lumineszenz

$$\% \text{ Neutralisation} = \frac{(RLU_{\text{Viruskontrolle}} - RLU_{\text{Probe}})}{(RLU_{\text{Viruskontrolle}} - RLU_{\text{Zellkontrolle}})} \times 100$$

3.1.12 Bestimmung der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC)

Zur Untersuchung der ADCC-Aktivität selektionierter und reformatierter scFv-Fc- und VHH-Fc-Konstrukte wurden ADCC-Assays angewendet. Die experimentelle Durchführung und Auswertung der Messdaten erfolgte in Kooperation durch das Labor von Andrés Finzi an der Université de Montréal, Kanada. Für die Testung wurden gereinigte Antikörperfragment-Fc-Klone in einer Konzentration von 0,5 mg/mL gelöst in 200 µL PBS auf Eis nach Kanada übermittelt.

3.1.13 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Für die Isolation von PBMCs wurden die Blutproben der HIV-1 positiven Patienten in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), für 10 min bei 25 °C und 1500 rpm zentrifugiert (Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der plasmahaltige Überstand wurde abgenommen und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Das verbliebene Blut wurde mit 4 °C kaltem PBS auf 50 mL aufgefüllt und vermischt. Anschließend wurden 20 mL Pancoll (4 °C) in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die Blut-PBS-Lösung vorsichtig unter Bildung zweier Phasen auf das Pancoll (Pan™ Biotech, Aidenbach, Deutschland) gegeben. Die Trennung der PBMCs von den restlichen Blutzellen erfolgte durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 25 °C und 2000 rpm, mit ausgeschalteter Bremse. Im Anschluss wurde die PBMC-haltige Interphase (Abbildung 3.2, graue Phase) abgenommen und mit 50 mL 4 °C kaltem PBS aufgefüllt und erneut für 10 min bei 4 °C und 1600 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 5 mL 1-fach konzentrierten Erythrozyten Lysepuffer (PAN™ Biotech, Aidenbach, Deutschland) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal in 50 mL 4 °C kaltem PBS aufgenommen und für 10 min bei 4 °C und 1600 rpm zentrifugiert. Abschließend wurden je 1 x 10⁷ PBMCs in Einfriermedium (90 % (v/v) FCS; 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

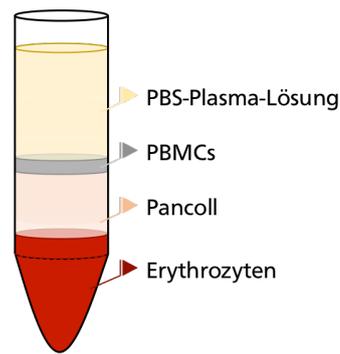


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Phasenbildung einzelner Blutbestandteile nach der Dichtegradientenzentrifugation.

3.2 Immunzytochemische Methoden

3.2.1 Fixierung von Zellen

Um den Zustand der Zellen nach der Transfektion (Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2) oder Kokultivierung mit TZM-bl-Reporterzellen (Abschnitt 4.1.2) sowie während des zellbasierten ELISA (Abschnitt 3.3.11) möglichst zu stabilisieren, wurden diese mit Paraformaldehyd fixiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei RT mit einer 3,7 (w/v) prozentigen Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen für 3 min bei RT mit PBS. Entweder wurden die Zellen direkt weiter prozessiert oder in PBS; 0,4 % (w/v) BSA; 0,02 % (w/v) Na-Azid bei 4 °C gelagert. Das BSA diente der Absättigung unspezifischer Antikörperbindestellen auf der Zelloberfläche.

3.2.2 Konfokale Mikroskopie

Zur Untersuchung der Expression viraler Hüllproteine auf der Oberfläche transient transfizierter HEK-293T-Zellen (Abschnitt 3.1.8) und stabil transfizierter HeLa-Zellen (Abschnitt 3.1.9) wurde ein Konfokalmikroskop der Firma Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Im Vorfeld der immunzytochemischen Analyse wurden die auf 24 x 24 mm Glasplättchen ausgesäten und fixierten Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend vorsichtig mit den Zellen nach unten auf einen 80 μ L Tropfen primärer Antikörperlösung auf Verschlussfolie (Parafilm® M, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) abgelegt und für eine Stunde bei RT abgedeckt inkubiert. Die HIV-Env-spezifischen Antikörper wurden in PBS mit 0,4 % (w/v) BSA gelöst (Tabelle 3.4). Vor der Behandlung mit dem Sekundärantikörper erfolgte ein Waschschritt, bei dem die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gespült wurden. Der speziesspezifische mit einem Fluorophor gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in PBS; 0,4 % (w/v) BSA verdünnt (Tabelle 3.4). Die Zellen wurden erneut Kopfüber auf einen 80 μ L Tropfen sekundärer Antikörperlösung auf Verschlussfolie abgelegt. Um ein Ausbleichen des Fluorophors zu verhindern, erfolgte die 45 minütige Inkubation bei RT und die anschließenden Färbeschritte im Dunkeln. Die transient transfizierten HEK-293T-

Zellen wurden parallel zur Sekundärantikörperfärbung mit dem *Lipophilic Tracer* DiR (ThermoFischer Scientific, Deutschland) in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubiert. Dieses Molekül diente dem Sichtbarmachen der Zellmembran unter dem Mikroskop. Im Gegensatz dazu wurde die Plasmamembran der stabil transfizierten HeLa-Zellen mit dem *CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden die Zellen nach der Färbung mit dem Sekundärantikörper für 15 min mit einer *CellMask™*-Lösung (2 μL *CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain* in 2 mL PBS) bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst zweimal für 5 min mit PBS gewaschen, anschließend kurz mit VE-Wasser gespült und feucht mit Mounting Medium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

Während der Analyse am konfokalen Fluoreszenzmikroskop lagen die Anregungswellenlängen des Lasers bei 488 nm (gelbgrün) und 633 nm (dunkelrot). Damit die Auswertung zwischen den verschiedenen Proben vergleichbar blieb, wurden die Laserintensität und die Einstellung des Photomultipliers innerhalb einer Untersuchung konstant gehalten. Die Analyse sowie die Bearbeitung der Bilddateien erfolgte am Computer mittels der Software *Fiji* (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA). Alle in der vorliegenden Arbeit eingebrachten Aufnahmen zeigen Überlagerungen der Maximumprojektion.

Tabelle 3.4 In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Färbeschritt	Antigen	Spezies	Verwendete Konzentration	Bezugsquelle
mAb 2G12	Primär	HIV-1 EnvB	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	NIH AIDS Reagent Program
mAb b12	Primär	HIV-1 EnvC	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	NIH AIDS Reagent Program
Alexa Fluor 488	Sekundär	Mensch IgG	Kanninchen	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Molecular Probes

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die qualitative und quantitative Analyse der membranassoziierten HIV-1 Env-*Spikes* erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die transfizierten Zellen (Abschnitt 3.1.8 und 3.1.9) abtrypsiniert, gezählt und in einer Anzahl von je 2×10^5 Zellen in 5 mL FACS-Röhrchen (Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Zur Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert (Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit einem antigenspezifischen Primärantikörper (Tabelle 3.5). Die Antikörper wurden jeweils in 100 μL FACS-Puffer (PBS; 5 % (v/v) FCS) gelöst und für eine Stunde bei 4 °C mit den Zellen zusammen inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit je 1 mL kaltem PBS gespült. Zur Abnahme der Lösungen zwischen den einzelnen Spül- und Färbeschritten wurden die Zellen jeweils für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die mit einem Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 3.5) wurden ebenfalls in 100 μL FACS-Puffer verdünnt und für 45 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Ab der Zugabe des Zweitantikörpers erfolgte die Färbung im Dunkeln, um ein

Ausbleichen des Fluorophors zu vermeiden. Nach der Inkubation wurden die gefärbten Zellen erneut zweimal mit je 1mL kaltem PBS gewaschen und abschließend in 200 μ L kaltem FACS-Puffer resuspendiert.

Die Analyse der Proben erfolgte an einem Durchflusszytometer des Typs FACSCalibur™ (BD, Heidelberg, Deutschland). Zuerst wurden hierbei die zu analysierenden Zellen anhand der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC-H) und des Zellvolumens (Vorwärtsstreulicht, FSC-H) definiert. Anschließend wurde von je 1 x 10⁴ Zellen der festgelegten Zellpopulation die Fluoreszenzintensität bestimmt (Tabelle 3.6). Die Flussrate des Gerätes wurde entsprechend so gewählt, dass zwischen 100 bis 200 Zellen pro Sekunde gemessen wurden. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels der Analyse-Software FlowJo am Computer.

Für die quantitative Bestimmung der membranständigen Env-Moleküle pro Zelle wurden Beads (*Quantum™ Simply Cellular microspheres*) bzw. HeLa-Env und HeLa-Wildtyp Zellen mit einem HIV-Hüllprotein spezifischen Antikörper gefärbt, welcher direkt mit einem Fluorophor konjugiert war. Die Kopplung des Fluorophors an den Primärantikörper erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels des *Mix-n-Stain™ CF™ 488A Antibody Labeling Kits* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die anschließende quantitative Untersuchung der Env-Spikes pro Zelle wurde unter Verwendung des *Quantum™ Simply Cellular Kits* (Bangs Laboratories Inc., Fishers, Indian, USA) ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 3.5 In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Färbeschritt	Antigen	Spezies	Verwendete Konzentration	Bezugsquelle
mAb 2G12	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	NIH AIDS Reagent Program
mAb b12	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb 3BNC117	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb VRC01	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb 17b	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb 697-30D	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb PGT121	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb 2F5	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
mAb 8E10	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 μ g/mL	
2G12-488A	Primär	HIV-1 EnvB	Mensch	3,34 μ g/mL	
b12-488A	Primär	HIV-1 EnvC	Mensch	3,34 μ g/mL	
α -human-PE	Sekundär	Mensch IgG	Maus	2 μ g/mL	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 3.6 Einstellungen des Durchflusszytometers für die Zell- und Bead-Analyse.

Detektor	Laser (nm)	Filter (nm)	HEK-293T-Zellen			HeLa-Zellen			Beads		
			PMT (Volt)	Amp Gain	Art	PMT (Volt)	Amp Gain	Art	PMT (Volt)	Amp Gain	Art
FSC-H	488		E00	1,3	Lin	E00	1,1	Lin	E00	5,08	Lin
SSC-H	488		445	1,2	Lin	430	1,2	Lin	440	1,2	Lin
FL1	488	530/30			Log	600		Log	600		Log
FL2	488	585/42	470		Log	470		Log			

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Protein A-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der reformatierten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte erfolgte mittels Protein A-Affinitätschromatografie. Dafür wurde der Zellkulturüberstand der transient transfizierten HEK-293T-Zellen (Abschnitt 3.1.8) drei Tage nach der Transfektion zunächst für 20 min bei 20 °C und 2000 rpm zentrifugiert um abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand mit Protein A-Bindungspuffer (Abschnitt 2.3) in einem 1:1 Verhältnis verdünnt. Im Vorfeld der Affinitätsreinigung der Antikörper wurde eine Chromatographiesäule (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) mit 2 mL *Pierce™ Protein A Agarose* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers beladen und mit Bindungspuffer äquilibriert. Nach Zugabe und Durchfluss der verdünnten Antikörperlösung folgte ein Waschschrift der Protein A-Agarose mit 15 mL Bindungspuffer. In der Folge wurden die scFv-/ VHH-Fc-Konstrukte mit 5 mL 0,1 M Glycin (pH 2,2) von der Säule eluiert und in 1 mL Fraktionen aufgenommen. Die einzelnen 1 mL Fraktionen wurden zügig mit 100 µL 1 M Tris (pH 9,0) neutralisiert. Im Anschluss wurden alle proteinhaltigen Fraktionen vereint und umgepuffert (Abschnitt 3.3.2). Die Protein A-Chromatographiesäulen wurden abschließend mit 12 mL 0,1 M Glycin (pH 2,2) regeneriert und in VE-Wasser mit 0,02 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

3.3.2 Ultrafiltration

Für den Pufferaustausch und die Aufkonzentration der mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte, wurden *Amicon® Ultra Centrifugal Filters* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit einem Cutoff von 10 kDa verwendet. Die mit PBS äquilibrierten Filtereinheiten wurden mit der gereinigten Antikörperelution beladen und bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Filtereinheiten zweimal mit PBS aufgefüllt und erneut bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte für die in PBS umgepufferten und aufkonzentrierten Proteinproben die Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 3.3.3). Die Filtereinheiten wurden in PBS mit 0,02 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels des *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) nach Herstellerangaben. Als Bezugswert für die Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Proteinmenge wurde ein BSA-Standard (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,025 mg/mL) verwendet. Die kolorimetrische Messung erfolgte jeweils mit 10 µL Proteinlösung in Duplikaten in 96 Well-Platten am Photometer (*SpectraMax 340*; Molecular Devices LLC, San Jose, Kalifornien, USA) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei dieser Methode nach deren Masse. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden einfach konzentrierte Gele mit einem 10 prozentigen Acrylamid/Bisacrylamid Anteil verwendet (Tabelle 3.7 und 3.8). Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen in einem Verhältnis von 1:5 mit fünffach konzentriertem Probenauftragspuffer (5x Probenauftragspuffer) versetzt und anschließend bei 95 °C für 5 min denaturiert. Für eine Western Blot-Analyse der scFv-Fragment bzw. VHH-Phagenbibliotheken wurden jeweils 1 µL der Phagensuspension je Spur aufgetragen. Für die Analyse der reformatierten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte, mittels Western Blot und Commassie-Färbung, jeweils 2 µg. Neben den zu analysierenden Proben wurde auch bei jedem Gel 10 µL eines Größenstandards (ProSieve QuadColor Protein Marker, 4,6 - 300 kDa, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) mit aufgetragen, um das aufgetrennte Molekulargewicht kontrollieren zu können. Alle Gele liefen für ca. 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 45 bis 60 mA in 1 x SDS-Laufpuffer.

Tabelle 3.7 Pipettierschema für das SDS-Sammelgel.

Zusammensetzung Sammelgel (5 %)	
3,4 mL	VE-Wasser
830 µL	Rotiphorese® NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30 % (29:1)
630 µL	1 M Tris-HCl pH 6,8
60 µL	10 % (w/v) SDS
120 µL	10 % (w/v) APS
12 µL	TEMED

Tabelle 3.8 Pipettierschema für das SDS-Trenngel.

Zusammensetzung Trenngel (10 %)	
4 mL	VE-Wasser
3,3 mL	Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30 % (29:1)
2,5 mL	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
100 μ L	10 % (w/v) SDS
200 μ L	10 % (w/v) APS
8 μ L	TEMED

3.3.5 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis der Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele mit *InstantBlue[™] Coomassie Protein Stain* (Expedeon AG, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Coomassie-Brilliantblau ist ein nicht polarer anionischer Farbstoff, welcher sich unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine anlagert. Die Gele wurden hierfür zunächst mit VE-Wasser gespült und anschließend mit dem Farbstoff für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte Entfärbung des ungebundenen Farbstoffs mit VE-Wasser über Nacht.

3.3.6 Western Blot

Für einen spezifischen Proteinnachweis wurden die Proteine nach deren Trennung auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) übertragen. Hierfür wurde das proteinhaltige SDS-Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf eine mit 1-fach konzentrierten Transferpuffer äquilibrierte Trägermembran gelegt. Anschließend wurden beide Lagen von zwei ebenfalls in 1-fach konzentrierten Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) sandwichartig eingerahmt. Der Transfer erfolgte mittels Elektrophorese, wobei das Gel auf Seite der Kathode und die Membran auf Seite der Anode orientiert war. Das *Blotting* wurde mit einer Semi-Dry-Apparatur (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA je Gel für 60 min durchgeführt.

3.3.7 Peptidarray

Die Generierung der Peptidarrays erfolgte mittels der Festphasen-Peptid-Synthese und wurde in Kooperation durch die Arbeitsgruppe von Joachim Koch durchgeführt. Die initialen Aminosäuren wurden über aktivierte PEG-Spacer C-Terminal an eine Nitrozellulosemembran gekoppelt. Unter Verwendung von Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppen erfolgte anschließend die automatisierte parallele Synthese der verschiedenen Peptidvarianten (MultiPep RS, Intavis Bioanalytical Instruments, Tübingen, Deutschland).

Im Vorfeld der Immunfärbung wurde die peptidtragende Nitrozellulosemembran zunächst in 10 mL 100 % Ethanol für 1 min inkubiert und anschließend durch schrittweise Zugabe von 1 ml VE-Wasser jede Minute, bis zu einem Ethanolgehalt von 0 % langsam rehydriert.

3.3.8 Immundetektion

Für die Immunfärbung wurden die Peptidfilter nach der Rehydratation (Abschnitt 3.3.7), sowie die Membranen nach dem Blotten (Abschnitt 3.3.6) für 45 min bis zu einer Stunde bei RT in PBS mit 5 % (w/v) Milchpulver und 0,05 % (v/v) Tween-20 inkubiert. Die Inkubation diente der Besetzung freier unspezifischer Antikörperbindestellen auf der Nitrozellulosemembran. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit Primärantikörpern, welche spezifisch mit dem gewünschten Peptid oder Protein interagieren (Tabelle 3.9). Die Antikörper wurden in PBS mit 2 % (w/v) Milchpulver und 0,05 % (v/v) Tween-20 verdünnt und für 1 Stunde bei RT, oder bei 4 °C über Nacht auf einem Schwenkmischer mit den Nitrozellulosemembranen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für 5 min mit Waschpuffer (PBS/ 0,1 % (v/v) Tween-20) gespült und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 45 bis 60 min bei RT auf einem Schwenkmischer inkubiert (Tabelle 3.9). Die mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Zweitantikörper wurden hierfür in PBS-T (PBS/ 0,05 % (v/v) Tween-20) verdünnt. Nachfolgend wurden die Membranen erneut mit Waschpuffer dreimal für 5 min bei RT gespült. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Behandlung der Membranen mit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) bei RT im Dunkeln. Das durch Substratoxidation induzierte HRP-vermittelte Chemilumineszenz-Signal wurde mittels eines Röntgenfilms (GE Healthcare Amersham™ Hyperfilm™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet. Der Film wurde hierbei in Abhängigkeit des zu detektierenden Proteins für unterschiedliche Zeiten auf der Membran exponiert und anschließend in einer Entwicklermaschine (Dürr Dental SE, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) entwickelt.

Tabelle 3.9 Für die Immundetektion verwendete Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Färbeschritt	Antigen	Spezies	Verwendete Konzentration/ Verdünnung	Bezugsquelle
α-g3p	Primär	pIII-Protein	Maus	1:3000	MoBiTec GmbH
mAb 2F5	Primär	HIV-1 Env	Mensch	2 µg/mL	NIH AIDS Reagent Program
EC26-2A4-IgG	Primär	HIV-1 Env	Mensch	2 µg/mL	
α-Maus-HRP	Sekundär	Maus-IgG	Ziege	1:3000	GE Healthcare
α-human-HRP	Sekundär	Mensch IgG	Maus	1:2000	Jackson ImmunoResearch

3.3.9 Produktion löslicher scFv- und VHH-pIII-Fragmente

Für die Untersuchung der HIV-Env Bindungsspezifität selektionierter Antikörperfragmentklone wurden diese als lösliche Variante erzeugt. Dafür wurden phagemidtragende Bakterienklone in 96 Well-Platten (*Greiner CELLSTAR®*, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wie unter Abschnitt 3.1.5 beschrieben inokuliert und nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C und 250 rpm im Plattenschüttler (*PST-60HL-4*, BioSan, Riga, Lettland) für 5 min bei 28 °C und 3000 rpm zentrifugiert und der Mediumüberstand abgekippt. Zur Induktion der Antikörperfragment-pIII-Expression wurden die Zellen anschließend in 250 µL 2xYT-Medium mit 1 mM IPTG, 400 mM Saccharose und 50 µg/mL Ampicillin resuspendiert und für 16 Stunden bei 28 °C und 250 rpm inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Bakterienzellen erneut für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert und das Medium verworfen. Die Isolation der Antikörperfragmente aus dem Periplasma erfolgte zunächst durch eine einstündige Inkubation des Zellpellets bei -20 °C. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 min bei RT aufgetaut und in 100 µL VE-Wasser resuspendiert, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation bei RT und 700 rpm. Danach wurden die Proben mit 100 µL 2-fach konzentrierten PBS versetzt und für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. 180 µL des scFv-/ VHH-pIII-haltigen Überstands wurde vorsichtig in eine neue 96 Well-Platte überführt und bei 4 °C bis zur Analyse mittels zellbasierten ELISA (Abschnitt 3.3.11) gelagert.

3.3.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Untersuchung der Antikörperreaktivität mit den MPER-Epitopen EC26-2A4 und EC26-2A4ΔM erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels ELISA. Für die Beschichtung der 96 Well-Mikrotiterplatten (*MICROLON 600® High Binding*, Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich) wurde EC26-2A4 gekoppelt an SOC und EC26-2A4ΔM fusioniert mit Biotin verwendet. Je Well wurden dafür entweder 100 ng des SOC₂-EC26-2A4-Peptids oder 10 ng des Biotin-EC26-2A4ΔM-Epitops in 50 µL PBS eingesetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Taumelmischer inkubiert. Als interne Assaykontrollen dienten SOC oder Biotin allein. Nach der Inkubation wurden die Wells dreimal mit 0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS (PBS-T) gewaschen und freie Bindungsstellen in der Folge mit 300 µL 5 % (w/v) Milchpulver, gelöst in PBS, für eine Stunde bei RT abgeblockt. Im Falle von Biotin-EC26-2A4ΔM wurden die Wells vor Zugabe des Peptids mit 200 ng proWell Streptavidin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschichtet und nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C mit 300 µL 2 % (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS für eine Stunde bei RT geblockt.

Die gesammelten Seren der immunisierten Mäuse wurden für die Bestimmung der Epitop-spezifischen Antikörpertiter seriell von 1:100 bis 1:312,500 in PBS 5-fach verdünnt und anschließend in einem Gesamtvolumen von 100 µL für eine Stunde bei RT mit den immobilisierten HIV-Epitopen inkubiert (Abschnitt 4.2.2). Die Patienten-abgeleiteten Epitop-spezifischen Antikörper (Abschnitt 4.2.3.2) sowie der EC26-2A4-IgG und der mAb 2F5 (Abschnitt 4.2.1) wurden jeweils in einer Konzentration von 1 µg/mL in 100 µL PBS eingesetzt und ebenfalls bei RT für eine Stunde mit den Peptiden inkubiert. Im Anschluss wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen mit PBS-T im *Microplate Washer*

(BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) entfernt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit einem speziesspezifischen HRP-konjugierten Zweitantikörper (Tabelle 3.10) in 100 μL PBS. In der Folge wurden die Wells erneut gewaschen und gebundene Antikörper durch Zugabe von 60 μL *KPL SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate* (SeraCare, Milford, Massachusetts, USA) nachgewiesen. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 bis 10 min Inkubation bei RT mit 60 μL 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm (Hintergrundabsorption) am Photometer (*SpectraMax 340*; Molecular Devices LLC, San Jose, Kalifornien, USA).

Für die Untersuchung der Reaktivität des EC26-2A4-IgG und des mAb 2F5 mit den MPER-Peptiden wurden die Wells mit einer gleichen Anzahl an Epitopbindestellen beschichtet. Dafür wurden 25 ng des Biotin-EC26-2A4 Δ M-Peptids (4 ng Biotin allein) und 73 ng des SOC₂-EC26-2A4-Epitops (13 ng SOC₂ allein) in 50 μL PBS pro Well vorgelegt.

Tabelle 3.10 Für die ELISA-Experimente verwendete Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Färbeschritt	Antigen	Spezies	Verwendete Konzentration/Verdünnung	Bezugsquelle
mAb 2F5	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	POLYMUN Scientific
EC26-2A4-IgG	Primär	HIV-1 Env	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
α -human-HRP	Sekundär	Mensch IgG	Maus	1:5000	Jackson ImmunoResearch
α -Maus-HRP	Sekundär	Maus-IgG	Ziege	1:3000	GE Healthcare

3.3.11 Zellbasierter ELISA

Die Analyse der Plasmareaktivität der rekrutierten LTNPs (Abschnitt 4.1.3), die Identifikation HIV-Env-spezifischer Antikörperfragmente (Abschnitt 4.1.5) sowie die Charakterisierung der Bindungseigenschaften selektionierter scFv-Fc- und VHH-Fc-Konstrukte (Abschnitt 4.1.9) wurde unter Verwendung des zellbasierten ELISA im 96 Well-Format (*Cellstar®*, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden je Well 4×10^4 HeLa-Env (HIV-EnvB oder HIV-EnvC) oder HeLa-Wildtyp Zellen in 200 μL Kulturmedium ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank weiter kultiviert. Die Kultivierung der HIV-Env exprimierenden Zellen erfolgte nach wie vor im Selektivmedium mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 150 μL 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert (Abschnitt 3.2.1) und anschließend für eine Stunde bei RT mit 300 μL 5 % (w/v) Milchpulver in PBS (Blockpuffer) auf einem Taumelmischer, zum Abblocken freier Bindungsstellen, inkubiert.

Für den Nachweis der EnvB-Erkennung durch die Patientenantikörper, wurden die Plasmaproben 1:100 in Blockpuffer verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 100 μL für eine Stunde bei RT mit den HeLa-Zellen inkubiert. Die generierten scFv-Fc-/ VHH-Fc-Konstrukte wurden ausgehend von einer Antikörperkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis zu 0,1 ng/mL seriell in Blockpuffer verdünnt und ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 100 μL

für eine Stunde bei RT mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal für 3 min mit 200 μL PBS-T (PBS/ 0,05 % (v/v) Tween-20) vorsichtig gespült. Im Anschluss erfolgte eine 45 min Inkubation bei RT mit einem humanspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, gelöst in 100 μL PBS (Tabelle 3.11). Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörpermoleküle erneut durch dreimaliges Waschen für 3 min mit 200 μL PBS-T entfernt. Die quantitative Detektion gebundener Antikörper erfolgte wie unter 3.3.10 beschrieben mittels *KPL SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate* (SeraCare, Milford, Massachusetts, USA) am Photometer.

Für die Identifikation HIV-Env-spezifischer Antikörperfragmente nach der Selektion, wurden 70 μL des scFv-pIII- bzw. VHH-pIII-haltigen Überstands (Abschnitt 3.3.9) auf die HeLa-Zellen gegeben und für eine Stunde bei RT auf einem Taumelmischer inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein pIII-spezifischer Antikörper gelöst in 100 μL PBS eingesetzt, welcher in der Folge durch einen speziesspezifischen HRP-konjugierten Tertiärantikörper ebenso in 100 μL PBS nachgewiesen wurde. Beide Antikörper wurden für 45 min bei RT mit den Zellen inkubiert. Zusätzlich zu den Überständen selektionierter Klone wurden als interne Assaykontrollen Überstände von Bakterien verwendet, die mit Wildtyp-Helferphagen infiziert wurden.

Tabelle 3.11 Für den zellbasierten ELISA verwendete Antikörper.

Antikörperbezeichnung	Färbeschritt	Antigen	Spezies	Verwendete Konzentration/ Verdünnung	Bezugsquelle
mAb 2G12	Primär	HIV-1 EnvB	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	NIH AIDS Reagent Program
mAb b12	Primär	HIV-1 EnvC	Mensch	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	NIH AIDS Reagent Program
α -g3p	Primär	pIII-Protein	Maus	1:3000	MoBiTec GmbH
α -Maus-HRP	Sekundär	Maus-IgG	Ziege	1:3000	GE Healthcare
α -human-HRP	Sekundär	Mensch IgG	Maus	1:5000	Jackson ImmunoResearch

3.3.12 Autoreaktivitäts ELISA

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der Patienten-abgeleiteten EC26-2A4 Δ M-spezifischen Antikörper mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin wurde das *Anti-Cardiolipin (sCL)* und das *Anti-Phosphatidylserine (aPS) Assay Kit* (beides Bio-Rad, Feldkirchen Deutschland) nach Anleitung des Herstellers angewendet. In beiden Assays wurden die Patientenantikörper sowie die monoklonalen HIV-1 Env-spezifischen Antikörper 2F5 und 4E10 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gegen das jeweilige Antigen eingesetzt.

3.4 Nukleinsäuretechniken

3.4.1 Klonierung der HIV-Env- und Antikörperfragment-Fc-Konstrukte

Die Herstellung der pcDNA™5/FRT-Env-Konstrukte wurde anhand von drei aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten durchgeführt. Zu Beginn wurde das DNA-Fragment kodierend für die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) aus einem Plasmid (pM513) mittels der Restriktionsnukleasen NotI (5´) und XhoI (3´) entfernt und anschließend über dieselben Schnittstellen in den pcDNA™5/FRT-Vektor eingefügt (Abschnitt 3.4.2). In einem weiteren Klonierungsschritt erfolgte die Integration des Puromycin-Resistenzgens (*pac*) sowie des posttranskriptionell regulatorischen Elements *wPRE*. Diese wurden mittels einer zweistufigen PCR-Strategie für die Klonierung vorbereitet (Abschnitt 3.4.5). Die erste PCR diente der Amplifikation der Genkombination, ausgehend von dem Plasmid pM901. Im Zuge der zweiten PCR wurde die spezifische Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI am 5´- und 3´-Ende des Fragments angefügt. Die *pac-wPRE*-Klonierung in den pcDNA™5/FRT-Vektor erfolgte im Anschluss über die gleiche Endonuklease in 3´-Orientierung zur integrierten IRES. In einem letzten Klonierungsschritt wurden die HIV-1 *env*-Gene in das Plasmid eingebracht. Hierfür wurden die für das Hüllprotein kodierenden DNA-Bereiche ebenfalls mittels PCR aus einer vom NIH bezogenen Plasmid-Vorlage amplifiziert (HIV-EnvB: SC422661, clone B (SVPB8); HIV-EnvC: pAncCgp160-opt) und in einer zweiten PCR-Runde mit den Erkennungssequenzen der Endonukleasen NotI (5´) und XmaI (3´) versehen. Anschließend erfolgte über dieselben Schnittstellen die Integration der *env*-Gene in 5´-Orientierung zur IRES in den pcDNA™5/FRT-Vektor.

Für die Generierung der Antikörperfragment-Fc-Konstrukte wurden die selektierten scFv- und VHH-Klone unter Verwendung der Restriktionsnukleasen NcoI (5´) und NotI (3´) enzymatisch aus dem pHAL30-Vektor entfernt und in den pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Vektor überführt (Abschnitt 3.4.2). Die Restriktion des pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Vektors erfolgte ebenfalls mit den Endonukleasen NcoI und NotI.

Die Integration der DNA-Inserts in die jeweiligen linearisierten und dephosphorylierten DNA-Vektoren erfolgte in alle Ansätzen durch eine Inkubation mit der T4-DNA-Ligase (Abschnitt 3.4.3 und 3.3.4). Zudem wurden die DNA-Fragmente nach der Behandlung mit DNA-modifizierenden Enzymen oder nach der Auftrennung mittels präparativer Agarose-Gele vor der weiteren Verwendung aufgereinigt (Abschnitt 3.4.7). In beiden Klonierungsansätzen erfolgte die Anreicherung der generierten Expressionsplasmide durch Transformation chemokompetenter *E.coli* DH5 α (Abschnitt 3.1.3). Die Transformationskontrolle erfolgte anschließend mittels Kolonie-PCR (Abschnitt 3.4.6). Für die Bestimmung der Sequenzkonformität wurden die selektierten Plasmidklone abschließend einer Sequenzanalyse unterzogen (Abschnitt 3.4.10).

3.4.2 Restriktion von DNA

Für die Klonierung wurden PCR-Fragmente bzw. Plasmid-DNA mittels Restriktionsnukleasen des Typ II spezifisch verdaut. Die enzymatische Restriktion erfolgte mit 4 bis 20 U Enzym je μ g DNA für 1 bis 3 Stunden bei 37 °C. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug

20 bis 100 μL (Tabelle 3.12 und 3.13). Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma *New England BioLabs® GmbH* (NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland) bezogen und mit den empfohlenen Reaktionspuffern eingesetzt. Nach der Restriktion wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese separiert (Abschnitt 3.4.7).

Tabelle 3.12 Restriktionsansatz für die Klonierung von HIV-Env- bzw. Antikörperfragment-Fc-Konstrukten.

Restriktionsansatz HIV-Env/ Antikörperfragment-Fc	
1 μg	DNA
2 μL	10 x <i>CutSmart® Buffer</i>
4 U	Je Restriktionsenzym*
auf 20 μL	VE-Wasser
* Alle Restriktionsenzyme wurden wenn möglich als High-Fidelity (HF)-Variante verwendet.	

Tabelle 3.13 Restriktionsansätze für die Konstruktion von scFv-Immunbibliotheken.

Restriktionsansätze scFv-Bibliothek			
Restriktion#1		Restriktion#2	
5 $\mu\text{g}/$ 2 μg	Plasmid-DNA/ Insert-DNA	5 $\mu\text{g}/$ 2 μg	Plasmid-DNA/ Insert-DNA
10 μL	10 x <i>NEB Buffer 3</i>	10 μL	10 x <i>NEB Buffer 2</i>
1 μL	<i>BSA</i> (100 x)	1 μL	<i>BSA</i> (100 x)
30 U	<i>MluI</i>	30 U	<i>NcoI</i>
30 U	<i>NotI</i>	100 U	<i>HindIII</i>
auf 100 μL	VE-Wasser	auf 100 μL	VE-Wasser

3.4.3 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Um die Religation eines linearisierten DNA-Plasmids mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die DNA-Enden mittels *Antarctic Phosphatase* (NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland) dephosphoryliert. Für die Abspaltung der Phosphatgruppen wurden 1 μL der Phosphatase im entsprechenden Volumen *10x Antarctic Phosphatase Puffer* aufgenommen und mit dem DNA-Ansatz nach abgeschlossener Restriktion versetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37 °C für 15 min. Anschließend wurde erneut 1 μL *Antarctic Phosphatase* zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und dieser für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Phosphatase-Behandlung wurden die Proben mittels *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt (Abschnitt 3.4.8).

3.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase (ThermoFisher Scientific, Deutschland). Das linearisierte Plasmid und das entsprechende DNA-Insert (Tabelle 3.14) wurden enzymkatalysiert, unter Ausbildung neuer

Phosphodiesterbindungen, an beiden Enden miteinander verknüpft. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei 12 °C durchgeführt und anschließend für 10 min bei 65 °C terminiert. Nach der Ligation wurden die Proben mittels *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt (Abschnitt 3.4.8).

Tabelle 3.14 Reaktionsansätze für die DNA-Ligation.

Ligationsansatz HIV-Env/ Antikörperfragment-Fc		Ligationsansätze scFv-Bibliothek		
50 ng	Plasmid-DNA	<i>Ligation#1</i>	<i>Ligation#2</i>	
*	DNA-Insert	1000 ng	1000 ng	Plasmid-DNA
2 µL	10 x <i>T4-Ligase Buffer</i>	270 ng	250 ng	DNA-Insert
1 U	<i>T4-DNA-Ligase</i>	10 µL	10 µL	10 x <i>T4-Ligase Buffer</i>
auf 20 µL	VE-Wasser	5 U	5 U	<i>T4-DNA-Ligase</i>
*	Das DNA-Insert wurde jeweils in einem molaren Verhältnis von 3:1 zur Plasmid-DNA eingesetzt	auf 100 µL	auf 100 µL	VE-Wasser

3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung oder analytische Untersuchung wurde die PCR-Technik angewendet. Die Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Abschnitts erfolgte mittels des *DreamTaq™ DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) oder der *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 50 µL (Tabelle 3.15). Für die PCR wurden sequenzspezifische *forward* und *reverse* Primer generiert. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_M) der Primer erfolgte entsprechend der Formel 3.2 (Wu et al., 1991). Die für die Reaktion gewählte *Annealing*-Temperatur (Tabelle 3.16) lag mindestens 2 °C unterhalb der errechneten T_M .

Formel 3.2 Definition der *Annealing*-Temperatur (T_M) der Primer.

$$T_M = \left[\left(\frac{G/C_{\text{Gehalt}}}{2} + \frac{A/T_{\text{Gehalt}}}{1} \right) \times 1,46 \right] + 22 \text{ °C}$$

Tabelle 3.15 Ansätze für die Polymerase-Kettenreaktion.

PCR-Ansatz HIV-Env		PCR-Ansätze scFv-Bibliothek		
50 ng	DNA	<i>PCR#1</i>	<i>PCR#2</i>	
je 0,5 µM	<i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer	~260 ng	100 ng	DNA
10 µL	5 x <i>Q5® Reaction Buffer</i>	je 0,2 µM	je 0,4 µM	<i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer
10 µL	5 x <i>Q5® High GC Enhancer</i>	5 µL	5 µL	5 x <i>Reaction Buffer</i>
200 µM	dNTP-Mix	200 µM	200 µM	dNTP-Mix
1 U	<i>Q5® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	5 U	5 U	<i>DreamTaq™ DNA Polymerase</i>
auf 50 µL	VE-Wasser	auf 50 µL	auf 50 µL	VE-Wasser

Tabelle 3.16 Protokolle für die Polymerase-Kettenreaktion.

PCR-Protokoll HIV-Env			PCR-Protokoll scFv-Bibliothek		
Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	2 min	1	94 °C	1 min	1
98 °C	10 sec		94 °C	1 min	
T _M - 2 °C	30 sec	28	55 °C/ 57 °C	1 min	30
72 °C	30 sec/kb DNA		72 °C	2 min	
72 °C	2 min	1	72 °C	10 min	1
4 °C	∞		4 °C	∞	

3.4.6 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR)

Die Kolonie-PCR diente in der vorliegenden Arbeit dem Nachweis der erfolgreichen Insertion von DNA-Fragmenten in ein DNA-Plasmid. Dafür wurden einzelne Bakterienkolonien, welche zuvor mit dem entsprechenden Vektor wie unter 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben transformiert wurden, mit einer sterilen Pipettenspitze von der Selektivplatte gepickt und in 10 μ L VE-Wasser eingetaucht. Nach kurzem Rühren wurden die an der Pipettenspitze verbliebenen Bakterienklone auf einer frischen Selektivplatte (Kolonie-Masterplatte) an einer definierten Stelle ausgestrichen. Die Kolonie-Masterplatte wurde im Vorfeld mit einem Raster markiert, so dass eine eindeutige Zuordnung einzelner selektionierter Bakterienklone dauerhaft gegeben war. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10 μ L *DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)* (ThermoFisher Scientific, Deutschland), versetzt mit 0,5 μ M eines *forward* und eines *reverse* Primers (Tabelle 3.17). Neben der osmotischen Lyse in VE-Wasser wurden die Bakterien zusätzlich durch eine fünfminütige initiale Inkubation bei 95 °C aufgeschlossen (Tabelle 3.18). Nach der PCR-Amplifikation erfolgte die Auftrennung der DNA-Amplicons unter Verwendung der Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.4.7). Hierfür wurden 10 μ L des PCR-Ansatzes auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Kolonie-Masterplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.17 Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR.

PCR-Ansatz	
Bakterienkolonie	DNA
je 0,5 μ M	<i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer
10 μ L	<i>DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2x)</i>
10 μ L	VE-Wasser

Tabelle 3.18 Protokoll für die Kolonie-PCR.

PCR-Protokoll		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	30 sec	
T _M - 2 °C	30 sec	30
72 °C	30 sec/kb DNA	
72 °C	10 min	1
4 °C	∞	

3.4.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Abhängig von der erwarteten DNA-Fragmentlänge wurden Gele mit 1 bis 2 % (w/v) Agarose in 1-fach konzentrierten TAE-Puffer (Abschnitt 2.3) gegossen. Zusätzlich wurden die Gele während der Präparation mit 0,25 µg/mL Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Der in Nukleinsäurestränge interkalierende Fluoreszenzfarbstoff diente dem Sichtbarmachen der DNA-Fragmente im Gel nach der Auftrennung. Die Gele liefen bei einer konstanten Spannung von 10 bis 12 V/cm in 1-fach konzentrierten TAE-Puffer. Die Proben wurden vor der Auftragung zusätzlich mit 1/6 Volumen 6x DNA-Ladepuffer (ThermoFisher Scientific, Deutschland) versetzt. Parallel zu den Proben wurde ebenso 0,5 µg eines Größenstandards (*GeneRuler™* 1 kb DNA Ladder oder *GeneRuler™* 100 bp DNA Ladder, beide ThermoFisher Scientific, Deutschland) mit aufgetragen. Nach der Auftrennung erfolgte die Visualisierung der DNA-Fragmente mittels UV-Transilluminator (254 nm) (*Gel Doc XR+ System*, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland). Im Falle von präparativen Agarose-Gelen wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell knapp aus der Gelmatrix herausgeschnitten und anschließend aufgereinigt (Abschnitt 3.4.8).

3.4.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen oder nach der Behandlung mit DNA-modifizierenden Enzymen erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Die DNA wurden abschließend in VE-Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.9 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration sowie der Reinheit der Nukleinsäuren wurden die Proben am NanoDrop-1000 (NanoDrop™, Wilmington, Delaware, USA) bei einer Absorption von 260 nm photometrisch vermessen. Hierbei diente das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) als Indikator für die Reinheit. DNA-Proben

mit einem A260/A280-Wert von annähernd 1,8 und RNA-Proben mit einem A260/A280-Wert von etwa 2,0 wurden als rein deklariert.

3.4.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA wurde von *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 100 ng PCR-Produkt oder 400 ng Plasmid-DNA mit 5 μ M DNA-Primer (Tabelle 2.9) in einem Gesamtvolumen von 10 μ L vermischt und eingeschickt. Die Auswertung der DNA-Sequenzierung erfolgte mittels der Analysesoftware *DNASTAR Lasergene* (DNASTAR).

3.4.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 5 mL Bakterienkultur wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 500 mL Bakterienkultur erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem *NucleoBond® PC 500 Kit* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland).

3.4.12 RNA-Isolation aus PBMCs

Die Isolation der totalen RNA aus den aufgereinigten PBMCs erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Insgesamt wurden zwischen 4×10^7 bis 5×10^7 isolierter PBMCs pro Patient für die RNA-Isolation verwendet. Je Reaktionsansatz wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Elution der totalen RNA erfolgte in 50 μ L RNase-freiem Wasser. Verbliebene DNA-Moleküle wurden im Anschluss mittels DNase I-Verdau eliminiert. Hierfür wurden zunächst alle Ansätze isolierter RNA vereint und mit 25 U *DNase I, Amplification Grade* und 1/10-Volumen des *10x DNase I Reaction Buffers* (beide ThermoFisher Scientific, Deutschland) vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der DNase I durch Zugabe von 2 mM EDTA und einer weiteren Inkubation bei 65 °C für 10 min.

3.4.13 cDNA (engl. *complementary DNA*)-Synthese aus isolierter RNA

Für die Synthese von cDNA, ausgehend von isolierter Patienten-RNA (Abschnitt 3.4.12) wurde das *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Kit* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) nach Herstelleranweisung angewendet. Je Ansatz wurden rund 5 μ g totaler RNA in einem Gesamtvolumen von 100 μ L eingesetzt (Tabelle 3.19). Insgesamt erfolgte die cDNA-Synthese mit der gesamten isolierten RNA Menge jedes Patienten. Als Primer für die cDNA-Erststrangsynthese wurden die im Kit enthaltenen *Random Hexamers* in einer Konzentration von 150 ng/ μ L verwendet. Nach dem 5-minütigen Inaktivierungsschritt bei 85 °C wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.19 Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese.

cDNA-Reaktionsansatz		
RNA/Primer-Mix	~5 µg	Totale RNA
	5 µL	Random Primers
	0,5 mM	dNTP-Mix
	Gesamtvolumen 60 µL	
cDNA-Synthese-Mix	1000 U	<i>Superscript™ III RT</i>
	200 U	<i>RNaseOUT™</i>
	20 µL	<i>5 x RT Buffer</i>
	10 mM	DTT
	5 mM	MgCl ₂
	Gesamtvolumen 40 µL	

3.5 Phagen-Display

Die Methode des Phagen-Displays wurde erstmals 1985 durch George P. Smith beschrieben. Smith ist es gelungen vor über 30 Jahren Peptide an das pIII-Protein von filamentösen Phagen zu koppeln (Smith, 1985). Seitdem hat sich die Methode zu einer der verbreitetsten Technologien für die Selektion von Peptiden, Proteinen oder Antikörpern gegen spezifische Antigene etabliert. Durch die Verknüpfung vom Genotyp mit dem Phänotyp innerhalb eines Bakteriophagen ermöglicht das Phagen-Display eine schnelle und einfache Selektion sowie Identifikation von hochaffinen antigenspezifischen Molekülen. Das bedeutet, die genetische Information des auf der Phagenoberfläche präsentierten Peptids oder Proteins befindet sich auf einem Phagemid kodiert, innerhalb desselben Phagenpartikels (Hammers & Stanley, 2014). Darüber hinaus erlaubt die Methode zusätzlich den Einsatz von Bibliotheken mit einer Diversität von bis zu 10^{11} verschiedener Peptid- oder Proteinvarianten (Sblattero & Bradbury, 2000).

Solche Bibliotheken können einerseits synthetisch generiert werden, oder aber von natürlicher Herkunft sein und bspw. aus dem Antikörperrepertoire von Tieren oder Menschen erzeugt werden. Antikörper oder Antikörperfragment (z.B. Fabs, scFvs)-Bibliotheken natürlichen Ursprungs können wiederum von nativen oder immunisierten Spendern abstammen. Native Bibliotheken sind in der Regel größer und besitzen eine höhere Diversität, während Immunbibliotheken aufgrund des vorherigen Kontakts des Spenders mit einem Antigen – z.B. durch Immunisierung oder natürliche Infektion – meist etwas kleiner sind, aber dafür deutlich affinere Antikörpermoleküle aufweisen (Frenzel et al., 2014; Smith & Petrenko, 1997).

Im Kontext von HIV-1 konnten bereits verschiedene breit neutralisierende Antikörper mittels der Phagen-Display-Technologie aus dem Antikörperrepertoire HIV-1 positiver Patienten identifiziert werden. Beispielsweise wurden auf diese Weise der CD4-Bindestellen spezifische Antikörper b12, der Glykan-abhängige Antikörper 2G12 und der MPER-spezifische Antikörper 2F5 aus Patienten-abgeleiteten Immunbibliotheken selektioniert (Buchacher et al., 1994; Burton et al., 1991). Alle drei Immunglobuline sind in der Lage eine Vielzahl heterologer HIV-Stämme zu neutralisieren (Abschnitt 1.6.1) (Corti & Lanzavecchia, 2013).

Für die Generierung solcher Phagenbibliotheken wird die DNA, kodierend für das Peptid oder Protein in ein Phagemid eines filamentösen Bakteriophagen kloniert. Bakteriophagen sind Viren, deren Wirtsspektrum sich auf Bakterien beschränkt. Die bekanntesten Vertreter sind die Phagen f1, fd und M13. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Phagen M13 handelt es sich um einen nicht-lytischen Phagen, welcher seine DNA über den Fertilitäts-Faktor (F-Pilus) von gramnegativen Bakterien in die Zelle einschleusen kann (Makowski, 1994). Der M13 Phage besitzt ein ca. 6,4 kb großes einzelsträngiges DNA-Genom (Phagemid), welches für 11 Gene kodiert (Abbildung 3.3). Dieses ist von ca. 2700 Kopien helikal angeordneter Moleküle des *Major Coat* Proteins pVIII röhrenförmig umhüllt. Zudem befinden sich an den apikalen Enden drei bis fünf Kopien der *Minor Coat* Proteine pIII und pVI bzw. fünf Kopien des pVII und pIX Proteins. Infolge einer pIII-vermittelten Injektion des bakteriellen Wirtes mit dem Phagen genom werden neue Phagenpartikel produziert und freigesetzt (Hess et al., 2012). Hierbei kommt es allerdings nicht zu einer Zellyse der Bakterien, sondern lediglich zu einem um etwa 50 % verminderten Zellwachstum (Barbas et al., 1991).

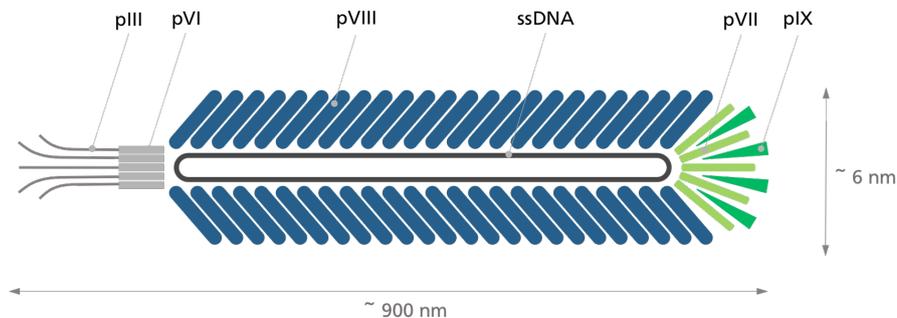


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung eines Bakteriophagen M13. Das einzelsträngige, zirkuläre Phagen genom (ssDNA, schwarz) ist umhüllt von etwa 2700 Kopien des *Major Coat* Proteins pVIII (blau) und von jeweils bis zu fünf Kopien der *Minor Coat* Proteine pIII, pVI (grau) sowie pVII und pIX (grün). Ein Phagenpartikel hat annähernd eine Länge von 900 nm und einen Durchmesser von ca. 6 nm. (Abbildung in Anlehnung an Huang J.X. et al., 2012A).

3.5.1 Herstellung von Phagenbibliotheken

3.5.1.1 Konstruktion rekombinanter scFv-Immunistoffbibliotheken

Die Generierung der scFv-Phagenbibliotheken für die Selektion HIV-Env-spezifischer Antikörperklone mittels Phagen-Display erfolgte nach dem Protokoll von Michael Hust (Frenzel et al., 2014). Hierfür wurden die Antikörpergene ausgehend von der cDNA in zwei PCR-Runden amplifiziert (Abschnitt 3.4.5). Die cDNA wurde im Vorfeld von der extrahierten RNA (Abschnitt 3.4.12) aus den isolierten PBMCs der HIV-1 positiven Patienten (Abschnitt 3.1.13) wie unter 3.4.13 synthetisiert. Im Zuge der ersten PCR wurden zunächst die Gene der schweren (V_H) und leichten Kette ($V_L\lambda$ & $V_L\kappa$) des Antikörperrepertoires vervielfacht (Antikörpergen-PCR #1), während die zweite PCR dazu diente spezifischen Nuklease-Erkennungssequenzen an die DNA-Fragmente anzufügen (Antikörpergen-PCR #2). Die Amplicons wurden nach der ersten und zweiten Amplifikationsreaktion jeweils mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % (w/v) Agarose) aufgetrennt und anschließend

aufgereinigt (Abschnitt 3.4.7 und 3.4.8). Danach erfolgte der erste Klonierungsschritt. Für diesen wurden 5 μg des Phagemids (pHAL30) und 2 μg der amplifizierten DNA-Fragmente kodierend für die leichte Kette ($V_L\lambda$ & $V_L\kappa$) anhand der Restriktionsnukleasen MluI und NotI (beide NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland) enzymatisch verdaut (Abschnitt 3.4.2). Das DNA-Insert wurde in der Folge mit dem linearisierten und dephosphorylierten Plasmid unter Verwendung der T4-DNA-Ligase ligiert (Abschnitt 3.4.4) und anschließend durch Elektroporation in elektrokompetente *E.coli* XL1-Blue MRF` eingebracht (Abschnitt 3.1.4). Die transformierten Bakterien wurden auf Selektivmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Bakterientiter erfolgte parallel durch Erstellung einer seriellen 10-fach Verdünnungsreihe (Abschnitt 3.1.4). Am nächsten Tag wurden die angewachsenen Bakterienkolonien einer Subbibliothek mit einem Drigalskispatel (neoLab, Heidelberg, Deutschland) und 5 mL 2xYT-Kulturmedium je Agarplatte abgeschwemmt und vereint. 5 mL der Bakteriensuspension wurde in der Folge für die Plasmidpräparation verwendet (Abschnitt 3.4.11). Anschließend wurden im zweiten Klonierungsschritt 2 μg der DNA-Fragmente kodierend für die schwere Kette (V_H) und 5 μg der isolierten Plasmid-DNA (pHAL30- V_L) durch die Endonukleasen NcoI und HindIII (beide NEB, Frankfurt/ Main, Deutschland) spezifisch restringiert (Abschnitt 3.4.2). Nach der Ligation (Abschnitt 3.4.4) wurden erneut elektrokompetente *E.coli* XL1-Blue MRF` mit den generierten Vektorkonstrukten durch Elektroporation transformiert. Die Bakterienklone wurden wiederholt auf vier ampicillinhaltige Selektivmediumplatten mit einem Durchmesser von 15 cm ausgestrichen und die Bakterientiter mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Angewachsene Bakterienkolonien einer Subbibliothek; mit einer Insertionshäufigkeit von über 90 %; wurden am Folgetag mit einem Drigalskispatel und 5 mL 2xYT-Kulturmedium je Agarplatte abgeschwemmt und vereint. Die Bakteriensuspension wurde anschließend als Glycerinkultur (Abschnitt 3.1.2) in 1 mL Fraktionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Kontrolle einer erfolgreichen Intergration der DNA-Inserts in das Plasmid erfolgte nach der ersten und zweiten Klonierung mit Hilfe der Kolonie-PCR (Abschnitt 3.4.6).

3.5.1.2 Produktion löslicher Antikörperfragment-präsentierender Phagen

Ausgehend von den generierten Antikörpergenbibliotheken (Abschnitt 3.5.1.1), wurden für die *in vitro* Selektion scFv- und VHH-präsentierende Phagenpartikel erzeugt. Hierfür wurde 1 mL einer hergestellten Subbibliothek in 400 mL 2xYT-Selektivmedium (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin; 100 mM Glucose) inokuliert und anschließend bis zu einer OD_{600} von rund 0,5 bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Danach wurden 25 mL der Bakterienkultur mit dem Helferphagen *Hyperphage M13 K07ApIII* (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland), entsprechend einer MOI (engl. *Multiplicity of Infection*) von 1:20 infiziert und zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C und 250 rpm. Zur Induktion der Expression der Antikörperfragment-pIII-Fusionsproteine wurde die Glucose aus dem Kulturmedium entfernt. Dafür wurden die Bakterienzellen für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 400 mL 2xYT-Selektivmedium (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin) aufgenommen und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien erneut durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C pelletiert (*Anvanti® J-26XP*, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Der

klare phagenhaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 1/5-Volumen Polyethylenglycol (PEG)-Lösung (20 % (w/v) PEG 6000; 2,5 M NaCl) versetzt. Die Fällung der Phagen erfolgte für eine Stunde bei 4 °C und leichtem Schwenken auf einem Rotationsschüttler (Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland), sowie einer anschließenden Zentrifugation für eine Stunde bei 10000 x g und 4 °C. Danach wurden das Phagenpräzipitat in 10 mL Phagen-Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM NaCl; 2 mM EDTA) resuspendiert und erneut mit 1/5-Volumen PEG-Lösung vermischt. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation der Phagen für 30 min bei 4 °C und 10000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Phagenpellet in 1 mL Phagen-Elutionspuffer gelöst. Die verpackten Antikörperphagenbibliotheken wurden bei 4 °C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Titerbestimmung (Abschnitt 3.5.1.3) und Qualitätskontrolle (Abschnitt 3.3.6) der produzierten Phagenpartikel.

3.5.1.3 Phagentitration

Zur Bestimmung der erhaltenen Phagentiter wurden die löslichen Phagenpartikel zehnfach seriell in PBS verdünnt. Anschließend wurden 10 µL der jeweiligen Verdünnungsstufe mit 50 µL *E.coli* TG1-Kultur, mit einer OD₆₀₀ von rund 0,5 versetzt und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von jeder Bakterien-Phagen-Suspension wurde im Anschluss ein 10 µL Tropfen auf eine mit einem Raster markierte 2xYT-Selektivmediumplatte (100 µg/mL Ampicillin/ 100 mM Glucose) vorsichtig an eine definierte Stelle pipettiert. Für die Titerbestimmung wurden die Phagen nach der Produktion der Antikörperfragment-Phagenbibliotheken von 10⁷ bis 10¹² verdünnt, während nach der Elution gebundener Phagenklone infolge jeder Positivselektion eine Verdünnung von 10¹ bis 10⁶ erfolgte. Als Kontrollen dienten hierbei *E.coli* TG1-Zellen, die mit PBS ohne Phagen infiziert wurden. Je Verdünnungsstufe und Kontrollprobe wurden die 10 µL Tropfen in Duplikaten auf die Agarplatten aufgebracht. Die Platten wurden danach über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die angewachsenen Bakterienkolonien der verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt und die erhaltenen Phagentiter (cfu/mL) errechnet.

3.5.2 Biopanning

3.5.2.1 Negativselektion

Die Negativselektion diente der Abreicherung von Phagen, die unspezifisch mit Oberflächenmolekülen der für die Selektion verwendeten HeLa-Zellen interagieren. Hierfür wurden 1 x 10⁷ HeLa-Wildtyp (HeLa-WT)-Zellen wie unter 3.1 abtrypsinisiert, gezählt und in einem 2 mL Reagiergefäß (Sartstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit 1 mL Bindepuffer (PBS; 1 % (w/v) BSA) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 x 10¹⁰ bzw 1 x 10¹¹ antikörperpräsentierenden Phagen und eine Inkubation für 45 min bei RT auf einem Rotator (Labinco BV, DG Breda, Niederlande). Alle Reagiergefäße wurden vor der Verwendung für eine Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS behandelt, um eine unspezifische Bindung der Phagen mit der Gefäßoberfläche zu unterbinden. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit ungebundenen Phagen wurde in der

Folge mit 1×10^7 frischen HeLa-WT-Zellen erneut für 45 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte zusätzlich eine dritte Inkubation der Phagen mit HeLa-WT-Zellen.

3.5.2.2 Positivselektion

Das Ziel der Positivselektion lag auf der Anreicherung HIV-1 Env-spezifischer Phagen aus den generierten Antikörperbibliotheken. Dafür wurde der phagenhaltige Überstand von der Negativselektion mit 3×10^6 (adhärent) bzw. 1×10^7 (Suspension) Env-exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EnvB oder HeLa-EnvC) inkubiert. Die Selektionsparameter, wie Inkubationszeit, Temperatur und Anzahl der Waschzyklen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mehrfach angepasst (Abschnitt 4.1.5). Ungebundene Phagen wurden im Anschluss an die Inkubation durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C entfernt. Zusätzlich wurden die Zellen mehrfach mit Waschpuffer (PBS; 1 % (w/v) BSA; 0,1 % (v/v) Tween-20) gespült. Im Falle der Selektion mit HeLa-Env-Zellen in Suspension wurde das Zellpellet zuerst in 50 mL 4 °C kaltem Waschpuffer vorsichtig resuspendiert und für 5 min auf Eis bei gelegentlichen invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Alle weiteren Waschzyklen erfolgten in einem Volumen von 1 mL Waschpuffer bei gleichen Bedingungen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die HeLa-Zellen für 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Bei einer Selektion auf adhärenen HeLa-Zellen wurde der Überstand nach der Positivselektion vorsichtig von den Zellen abgenommen und durch 2 mL kalten Waschpuffer ersetzt. Je Waschzyklus wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert.

3.5.2.3 Elution gebundener Phagen und Reinfektion von *E.coli* TG1

Für die Elution gebundener Phagen - nach der Positivselektion - wurden die pelletierten oder adhärenen HeLa-Env-Zellen in 1 mL 0,1 M Glycin pH 2,2 für 15 min bei RT inkubiert. Vor der Neutralisation des phagenhaltigen Überstandes mit 100 μ L 2 M Tris pH 8,0 erfolgte eine zehnmütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 18000 x g und 4 °C (5417R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zudem wurden ab dem *Biopanning* #4 die Zellen zusätzlich durch drei aufeinanderfolgende *Freeze-Thaw*-Zyklen aufgeschlossen, um mögliche internalisierte Phagen zurück zu gewinnen. Dafür wurden die Zellpellets in 300 μ L VE-Wasser aufgenommen und für 3 min auf Trockeneis weggefroren und anschließend zügig bei 42 °C wieder aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension für 20 Sekunden kräftig auf einem Vibrationsmischer (*Vortex-Genie*[™] 2, Bender und Hohbein, Zürich, Schweiz) gemixt.

In der Folge wurden die eluierten Phagen mit 10 mL einer *E.coli* TG1-Kultur, bei einer OD₆₀₀ von rund 0,5 bis 0,7 inokuliert und für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der reinfizierten Bakterien für 10 min bei 3500 rpm. Das Bakterienpellet wurde danach in 400 μ L 2xYT-Kulturmedium resuspendiert und auf zwei 2xYT-Selektivmediumplatten (100 μ g/mL Ampicillin; 100 mM Glucose) mit einem Durchmesser von 15 cm ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die

Bestimmung der Phagentiter erfolgte wie unter 3.5.1.3 beschrieben. Angewachsene Bakterienkolonien wurden am Folgetag mit einem Drigalskispatel und 5 mL 2xYT-Kulturmedium je Agarplatte abgeschwemmt und vereint. Die Bakteriensuspension wurde anschließend als Glycerinkultur (Abschnitt 3.1.2) in 1 mL Fraktionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.5.2.4 Produktion löslicher Phagenpartikel im Rahmen des Phagen-Displays

Ausgehend von den angereicherten phagemidtragenden Bakterienklonen der vorangegangenen Positivselektion wurden die reinfizierten Bakterien in 30 mL 2xYT-Selektivmedium (100 µg/mL Ampicillin; 100 mM Glucose) bei einer OD₆₀₀ von unter 0,1 inokuliert und anschließend bis zu einer OD₆₀₀ von rund 0,5 bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Danach wurde die Bakterienkultur mit dem Helferphagen *M13 K07* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend einer MOI (engl. *Multiplicity of Infection*) von 1:20 infiziert und zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C und 250 rpm. Die Induktion der Antikörperfragment-pIII-Proteinexpression erfolgte durch Entfernung der Glucose aus dem Kulturmedium. Dafür wurden die Bakterienzellen für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert (*Rotonta 460R*, Hettich GmbH und Co KG, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand verworfen und die Zellen in 20 mL 2xYT-Selektivmedium (100 µg/mL Ampicillin; 50 µg/mL Kanamycin) resuspendiert und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien erneut durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4600 rpm pelletiert. Der klare phagenhaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 1/5-Volumen Polyethylenglycol (PEG)-Lösung (20 % (w/v) PEG 6000; 2,5 M NaCl) versetzt. Die Fällung der Phagen erfolgte für zwei Stunden auf Eis und leichtem Schwenken auf einem Rotationsschüttler (Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) sowie einer anschließenden Zentrifugation für eine Stunde bei 4600 rpm und 4 °C. Danach wurden das Phagenpräzipitat in 1 mL Phagen-Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 20 mM NaCl; 2 mM EDTA) resuspendiert und erneut für 5 min bei 4 °C und 14000 x g (*5417R*, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C gelagert. Im Anschluss erfolgte, wie im Abschnitt 3.5.1.3 beschrieben, die Titerbestimmung der produzierten Phagenpartikel.

3.6 Tierversuchsstudien - Prime-Boost-Immunisierung von NMRI-Mäusen

Die Induktion spezifischer Antikörper gegen das MPER-Epitop EC26-2A4ΔM wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen von Immunisierungsstudien in NMRI-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) *in vivo* untersucht. Dafür wurde sechs Wochen alten Tieren zunächst 50 µg eines Codon-optimierten HIV-1 JR-FL *env* DNA Konstrukts (pJRFLsyngp140, NIH, Bethesda, Maryland, USA) gelöst in 100 µL PBS intramuskulär injiziert. Vier Wochen nach der ersten Injektion wurde den Mäusen das HIV-Peptid, N-terminal gekoppelt an ein Trägermolekül (KLH oder SOC₂) in Kombination mit dem Adjuvans *Monophosphoryl Lipid A* (MPL, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) oder Montanide ISA 720 (Seppic, Köln,

Deutschland) wie in Tabelle 3.20 aufgeführt, intradermal appliziert. Je Peptid-Adjuvans-Kombination wurden Gruppen bestehend aus fünf Tieren immunisiert. Die Immunisierung mit dem HIV-Epitop (Peptid-Boost) erfolgte insgesamt dreimal alle vier Wochen (Abbildung 4.23A). Alle Lösungen wurden vor der Injektion durch einen 0,2 μm Membranfilter (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sterilfiltriert. Für die Behandlung wurden die Tiere zuerst mit Isofluran (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) betäubt (Luftanteil 3,5 %) und anschließend für die Dauer der Injektion bei einer konstanten Isoflurandosis von 1,7 % unter Narkose gehalten. Die Blutentnahme der Tiere erfolgte einmal unmittelbar vor Injektion des DNA-Plasmids durch Punktion der *Vena facialis* und zwei Wochen nach der letzten Boostinjektion durch Punktion des Herzens. Im Vorfeld der finalen Blutentnahme wurden die Mäuse mit einer Isoflurandosis >5 % narkotisiert und nach der Herzpunktion durch Überstreckung der Halswirbelsäule getötet. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuchstierarbeiten erfolgten in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Richtlinien.

Die gesammelten Blutproben wurden anschließend zur Gerinnung über Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zusätzlich ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1500 rpm. Danach wurde das Serum von dem koagulierten Blut abgenommen und die im Serum enthaltenen Bestandteile des Komplement-Systems durch Inkubation bei 56 °C für 45 min inaktiviert. Die Lagerung der Mausseren erfolgte bis zur weiteren Analyse bei -80 °C.

Tabelle 3.20 Peptid-Boost-Ansätze für die Immunisierung von NMRI-Mäusen.

Peptid/ Adjuvans-Kombination	Bezugsquelle des Peptidkonstrukts	Peptid	Adjuvans	Injiziertes Volumen
SOC ₂ -EC26-2A4/ MPL	Maria Sacarellos	50 μg (1 mg/mL)	10 μg (1 mg/mL)	60 μL
SOC ₂ -EC26-2A4/ Montanide ISA 720	Maria Sacarellos	50 μg (1 mg/mL)	110 μL gebrauchsfertig	160 μL
KLH-EC26-2A4/ MPL	<i>Peptide & Elephants</i> , Potsdam, Deutschland	50 μg (1 mg/mL)	10 μg (1 mg/mL)	60 μL
KLH-EC26-2A4 Δ M/ MPL	<i>Peptide & Elephants</i> , Potsdam, Deutschland	50 μg (1 mg/mL)	10 μg (1 mg/mL)	60 μL
Kontrollgruppe SOC/ MPL	Maria Sacarellos		10 μg (1 mg/mL)	60 μL
Kontrollgruppe SOC/ Montanide ISA 720	Maria Sacarellos		110 μL gebrauchsfertig	160 μL
Kontrollgruppe KLH/ MPL	<i>Peptide & Elephants</i> , Potsdam, Deutschland		10 μg (1 mg/mL)	60 μL



4 ERGEBNISSE

4.1 PROJEKT #1 / Identifikation und Charakterisierung HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente mittels Phagen-Display Technologie

4.1.1 Generierung membranassoziierter nativer HIV-Hüllproteine als Zielstruktur für die Selektion neutralisierender Antikörperfragmente

Die Phagen-Display-Technologie ist eine seit langem etablierte und im besonderen Maße geeignete Methode, um gezielt hochaffine antigenspezifische Antikörperfragmente, wie z.B. scFv-Fragmente, aus einer Bibliothek von bis zu 10^{10} unterschiedlichen Antikörperfragmentvarianten zu identifizieren (Abschnitt 3.5) (Bazan et al., 2012). Neben der Qualität der scFv-präsentierenden Phagenbibliothek spielen auch die verwendeten Zielstrukturen bei der Selektion funktionaler Antikörperfragmente eine bedeutende Rolle. Im Falle von HIV-1 stellt das HIV-Hüllprotein (Env) ein potentiell Zielantigen dar, da die in einem Trimer assoziierten Env Moleküle die einzige virale Komponente auf der Oberfläche eines Viruspartikels abbilden (Chojnacki et al., 2017). Es ist zudem bekannt, dass bereits identifizierte breit neutralisierende HIV-1 Antikörper (Ab, engl. *Antibody*) an bevorzugt konformationelle Epitope innerhalb des Hüllproteins binden (Wibmer et al., 2015). Deshalb ist es notwendig, eine möglichst native Konformation des trimeren Glykoprotein-Komplexes als Zielstruktur für die Selektion neutralisierender Antikörper (nAb)-Fragmente zu verwenden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit humane Zelllinien generiert, welche native und funktionale HIV-Hüllproteine für die Selektion solcher nAb-Fragmente auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Präsentation der Zielmoleküle in membranassoziierter Form hat darüber hinaus den Effekt, dass überwiegend Proteinstrukturen exponiert werden, die auch bei einer natürlichen Infektion auf HI-Viruspartikeln für Antikörper zugänglich sind, so dass die selektionierten scFv-Fragmente potentiell auch das Virus neutralisieren können.

Für die Selektion Patienten-abgeleiteter HIV-1 nAb-Fragmente mittels Phagen-Display wurden zwei Hüllproteine unterschiedlicher HIV-Subtypen verwendet, ein HIV-Env des in Europa und USA dominierenden Subtyps B (EnvB) und ein Hüllprotein des Subtyps C (EnvC), der weltweit die meisten HIV-Infektionen ausmacht (Abschnitt 1.1). Beide Hüllproteinklone wurden in Form von Plasmid-DNA im Rahmen des *AIDS Reagent Program* vom NIH (engl. *National Institutes of Health*, Bethesda, USA) bezogen (Tabelle 4.1). Die DNA-Sequenz des

envB-Klons stammt von einem Patienten mit einer frühen HIV-1 Subtyp B-Infektion, während die Gensequenz des *envC*-Klons auf Basis einer phylogenetischen Datenbankenanalyse rekonstruiert wurde und die wahrscheinlichste Ursprungssequenz der Subtyp C-Viren widerspiegelt.

Zunächst wurden beide *env*-Klone darauf hin untersucht, ob die synthetisierten viralen Hüllproteine an der Oberfläche transient transfizierter Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden HEK-293T-Zellen wie unter 3.1.8 beschrieben ausgesät und mit 3 µg Plasmid-DNA kodierend für das *envB*- oder *envC*-Gen transfiziert. Als Negativkontrolle dienten HEK-293T-Zellen, bei denen keine DNA im Transfektionsansatz enthalten war (Mock). Der Nachweis der Env-Oberflächenexpression erfolgte 48 h nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Für die FACS-Auswertung wurden die Zellen nach der Inkubation bei 37 °C abtrypsiniert und anschließend mit dem HIV-1 Hüllprotein-spezifischen Antikörper 2G12 oder b12 gefärbt (Abschnitt 3.2.3). Das Ergebnis der Analyse ist in der Abbildung 4.1A dargestellt. Hier ist zu sehen, dass 48 h nach der Transfektion für beide *env*-Klone HIV-Hüllproteine an der Zelloberfläche von HEK-293T-Zellen nachgewiesen werden konnten, die Klone also funktionell waren. Der Anteil Env-exprimierender Zellen fällt bei den mit *envB* transfizierten Zellen (22,3 % PE-positive Zellen) etwa um die Hälfte geringer aus, als bei HEK-293T-Zellen, die mit dem *envC*-Plasmid transfiziert wurden (43,8 % PE-positive Zellen).

Darüber hinaus konnte die Beobachtung der Integration des HIV-Hüllproteins in die Plasmamembran transfizierter HEK-293T-Zellen auch anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bestätigt werden. Für die Analyse der Proben am Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen zunächst mit Paraformaldehyd fixiert (Abschnitt 3.2.1) und danach immunzytochemisch gegen HIV-1 Env gefärbt; die Zellmembran wurde mit DiR´ sichtbar gemacht (Abschnitt 3.2.2). Von den mit *envB*- bzw. *envC*-transfizierten HEK-293T-Zellen sind in Abbildung 4.1B exemplarisch Immunfluoreszenzaufnahmen Env-positiver Zellen 48 h nach der Transfektion dargestellt.

Tabelle 4.1 Übersicht der für die Generierung membranständiger HIV-Hüllproteine verwendeten HIV-1 *env*-Klone

Klon-Bezeichnung	Plasmid-Kennung	HIV-1 Subtyp	Referenz
HIV-EnvB	SC422661, clone B (SVPB8)	B	(Li et al., 2005)
HIV-EnvC	pAncCgp160-opt	C	(André et al., 1998; Gaschen et al., 2002; Kothe et al., 2006)

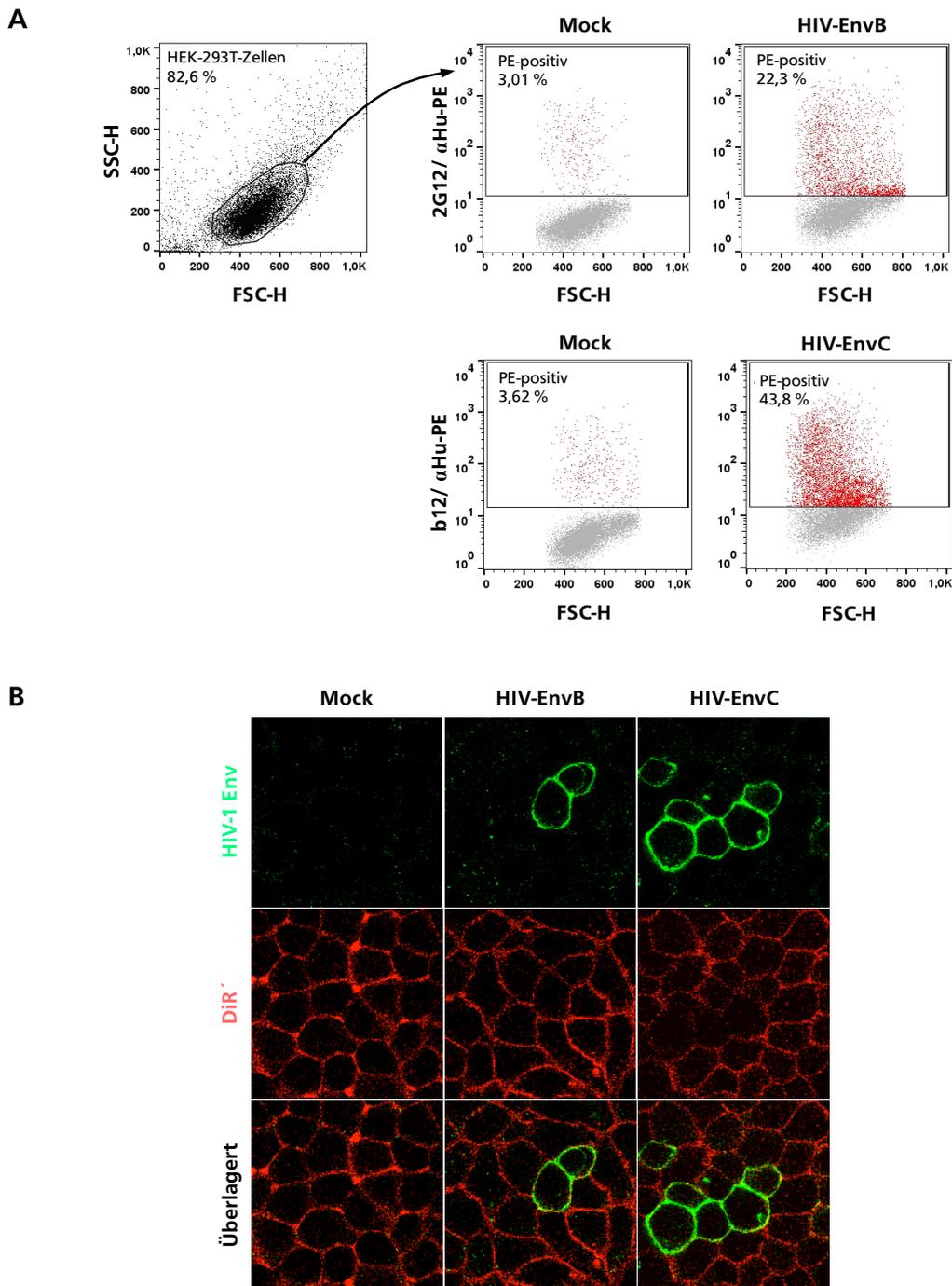


Abbildung 4.1 Analyse der Env-Oberflächenexpression des HIV-1 Subtyp B (HIV-EnvB) und Subtyp C (HIV-EnvC) Klons nach transienter Transfektion von HEK-293T-Zellen. (A) 1×10^4 HEK-293T-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion im Durchflusszytometer ausgewertet. Der Nachweis der Env-Oberflächenexpression erfolgte unter Verwendung des Hüllprotein-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb) 2G12 (HIV-EnvB) oder b12 (HIV-EnvC) und einem PE-konjugierten anti-human Fc-Zweitantikörper. Die zu analysierende HEK-293T-Zellpopulation wurde hierbei mittels Vorwärts- (FSC-H) und Seitwärtsstreuung (SSC-H) definiert. Der Anteil PE-positiver Zellen dieser Zellpopulation ist rot im Dot Plot (α Hu-PE vs. FSC-H) dargestellt. Die Festlegung des Bereiches (Gate) „PE-positiv“ wurde anhand ungefärbter transfizierter Zellen vorgenommen. Als Kontrolle für eine HIV-Env-spezifische Antikörperinteraktion dienten HEK-293T-Zellen ohne DNA im Transfektionsansatz (Mock). (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen von HEK-293T-Zellen 48 h nach der transienten Transfektion. Die mit HIV-1 *envB*- bzw. *envC*-transfizierten Zellen zeigen vereinzelt eine deutliche Kolo-kalisation von membranständigen HIV-1 Hüllproteinen (HIV-1 Env, grün) mit der Zellmembran (DiR', rot).

Im Weiteren wurden unter Verwendung der beiden HIV-1 *env*-Klone Zelllinien generiert, welche das *envB*- bzw. *envC*-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors stabil ins Zellgenom integriert haben. Ziel war dabei, das HIV-Hüllprotein (I) in einer hohen Molekülzahl in der Plasmamembran zu integrieren und (II) auf der Oberfläche jeder Zelle zu präsentieren.

Die stabile Integration der HIV-Hüllproteingene ins Genom humaner Zellen erfolgte unter Verwendung des *Flp-InTM Systems* der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Hierfür wurde zunächst das *envB*- bzw. *envC*-Gen, unter Kontrolle eines humanen CMV (Cytomegalievirus) oder EFS (engl. *Elongation Factor-1 α Short*) Promotors, in einen pcDNATM5/FRT-Expressionsvektor kloniert (Abschnitt 3.4.1). Sowohl der CMV- als auch der EFS-Promotor sind beides konstitutiv aktive Promotoren. Für den CMV-Promotor ist bekannt, dass dieser eine sehr starke Genexpressionsaktivität besitzt. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Expressionsrate des CMV-Promotors beträchtlich zwischen verschiedenen Zelltypen variiert (Qin et al., 2010). Aus diesem Grund wurde zusätzlich der EFS-Promotor verwendet. Die EFS-vermittelte Genexpression ist im Unterschied zum CMV-Promotor zwar deutlich geringer, aber dafür wesentlich stabiler und weniger anfällig für transkriptionelles Gen-*Silencing* (Holehonnur, et al. 2015, Hoffmann et al., 2017).

Strangabwärts des *env*-Gens wurde außerdem ein Puromycin-Resistenzgen (*pac*, engl. *Puromycin-N-Acetyltransferase Gene*) in den Vektor eingebracht (Abschnitt 3.4.1). Beide Gene wurden mittels einer IRES (engl. *Internal Ribosomal Entry Site*), welche zwischen dem 3'-Ende des *env*- und dem 5'-Ende des *pac*-Gens kloniert wurde, miteinander verknüpft (Abbildung 4.2A). Das Puromycin-Resistenzgen wird allgemein als Selektionsmarker für Säugerzellen genutzt, da Puromycin eine toxische Wirkung auf die Protein-Biosynthese und dadurch auch auf das Zellwachstum hat. Puromycin inhibiert an Ribosomen die Inkorporation der Aminoacyl-tRNA in den C-Terminus synthetisierter Polypeptide, was in einer vorzeitigen Termination der Translation resultiert (Iwamoto et al., 2014). Die Co-Expression beider Gene durch denselben Promotor soll in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich dazu dienen, dass die Promotoraktivität in den transfizierten Zellen aufgrund der Anwesenheit von Puromycin im Nährmedium aufrechterhalten bleibt.

Neben der *env/pac*-Expressionskassette beinhaltet der pcDNATM5/FRT-Vektor auch eine Erkennungssequenz für die Rekombinase Flippase (Flp), eine sogenannte FRT-Sequenz (engl. *Flp Recombination Target Site*), verknüpft mit einem Startcodon-defizienten Hygromycin-Resistenzgen (*hpt*, engl. *Hygromycin Phosphotransferase*) (Anhang A1). Durch die Co-Transfektion einer genetisch modifizierten Expressionszelllinie, welche ebenfalls die FRT-Sequenz im Genom trägt, mit dem pcDNATM5/FRT-Vektor und einem zweiten Plasmid (pOG44), das für die Rekombinase Flp kodiert, wird die Expressionskassette stabil ins Genom der Zielzelllinie integriert. Im Zuge der Flp-vermittelten Rekombination wird auch das Hygromycin-Resistenzgen mit ins Zellgenom übertragen, wodurch dieses das fehlende Startcodon erhält und die transfizierte Zelle nach einer erfolgreichen Integration des *hpt*-Genlokus resistent gegenüber Hygromycin B wird.

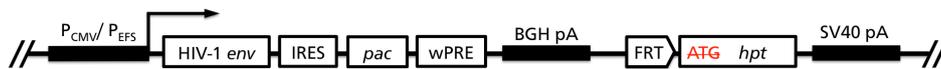
Als Expressionszelllinie wurde im Rahmen dieser Arbeit eine FRT-Sequenz-tragende HeLa-Zelllinie verwendet (HeLa-HF1-3). Die stabile Transfektion der Zellen mit den für das HIV-Hüllprotein und die Rekombinase Flp kodierenden Plasmiden erfolgte, wie im Abschnitt

3.1.9 beschrieben, mittels Lipofektion. Zusätzlich zu den Env-Konstrukten wurde auch ein pcDNATM5/FRT-Vektor mit einem *gfp*-Genlokus generiert. Dieser beinhaltet anstelle der *env/pac*-Expressionskassette die genetische Information für das *Green Fluorescent Protein* (GFP) und fungierte als Kontrollplasmid für die stabile Integration des *gfp*-Gens ins HeLa-Zellgenom (Abbildung 4.2A). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 14 d mit 320 µg/mL Hygromycin B im Nährmedium behandelt. Während der zweiwöchigen Selektion haben teilungsfähige Hygromycin-resistente HeLa-Zellklone Zellkolonien ausgebildet. Insgesamt wurden für den EnvB-Expressionsvektor mit dem CMV-Promotor fünf Kolonien gezählt und mit dem EFS-Promotor vier Kolonien. Die Transfektion der HeLa-Zellen mit dem EnvC-Expressionsvektor unter Kontrolle des CMV-Promotors führte zur Ausbildung von sieben Hygromycin B-resistenten Zellkolonien und mit dem EFS-Promotor zu vier Kolonien (Tabelle 4.2). In der Abbildung 4.2B sind exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen unterschiedlicher Zeitpunkte nach der stabilen Transfektion mit dem pcDNATM5/FRT-GFP-Plasmid gezeigt. Die gebildeten Zellkolonien wurden im Anschluss vereinzelt und unter Hygromycin B-Selektion weitere 10 d expandiert. Abschließend wurden die HeLa-Zellen für die Langzeitlagerung und die weitere experimentelle Verwendung kryokonserviert (Abschnitt 3.1.7).

Tabelle 4.2 Anzahl ausgebildeter Hygromycin B-resistenter Zellkolonien je Promotor-Konstrukt.

Klon-Bezeichnung	P _{CMV}	P _{EFS}
HIV-EnvB	5	4
HIV-EnvC	7	4

A pcDNATM5/FRT-Env



pcDNATM5/FRT-GFP



B

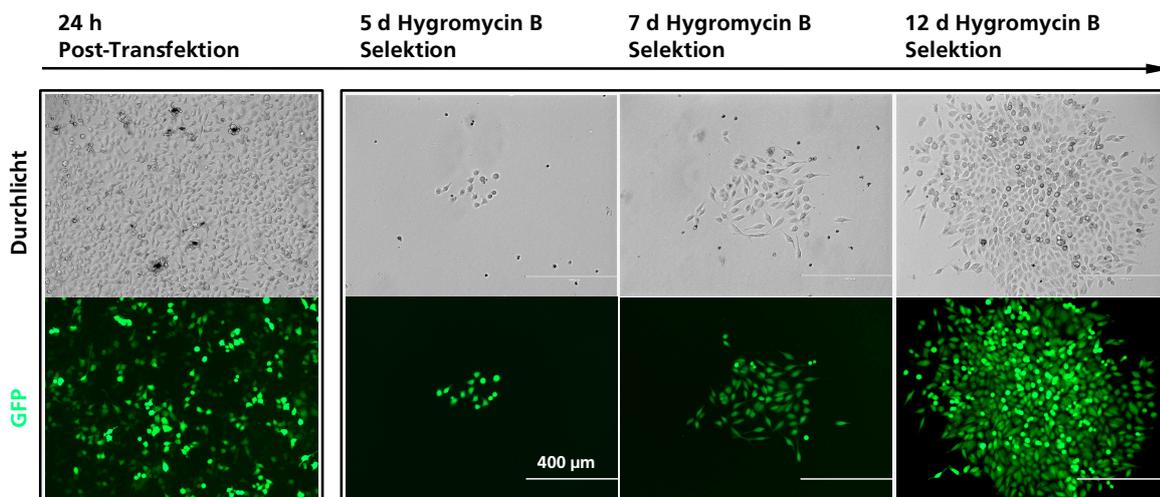


Abbildung 4.2 Stabile Integration des HIV-1 *env*- und *gfp*-Gens ins Genom von HeLa-HF1-3 Zellen mittels *Flp-In*TM System. (A) Schematische Darstellung der Expressionskassetten für das Env- (pcDNATM5/FRT-Env) und das GFP-Plasmidkonstrukt (pcDNATM5/FRT-GFP) inklusive der Lokalisation der spezifischen Rekombinase *Flippase*-Sequenz (FRT) sowie des Startcodon-defizienten Hygromycin-Resistenzgens (*ATG hpt*). Im Unterschied zum GFP-Plasmid besitzt der Env-Expressionsvektor zusätzlich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und das Puromycin-Resistenzgen (*pac*). Außerdem wurde die Env-Expressionskassette sowohl unter Kontrolle eines CMV- als auch eines EFS-Promotors kloniert. (B) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-HF1-3 Zellen über einen Zeitraum von 24 h nach der stabilen Transfektion mit dem pcDNATM5/FRT-GFP-Plasmid sowie 5 – 12 d nach dem Beginn der Hygromycin B-Selektion (10-fache Vergrößerung). Die Aufnahmen belegen eindeutig die Ausbildung einer GFP-positiven Zellkolonie (GFP, grün) über den Selektionszeitraum hinweg. Abkürzungen: h, Stunden; d, Tage.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vom NIH bezogenen HIV-1 env-Klone des Subtyps B und C nach transients Transfektion von HEK-293T-Zellen nachweislich zur Produktion membranassoziierter HIV-Hüllproteine geführt haben. Des Weiteren wurden beide env-Gene für die Herstellung von pcDNATM5/FRT-Env-Expressionsplasmiden verwendet. Die generierten Vektor-Konstrukte konnten zudem mit Hilfe des Flp-InTM Systems der Firma Invitrogen stabil ins Genom von HeLa-HF1-3-Zellen integriert werden.

4.1.2 Charakterisierung der HIV-1 Env exprimierenden Zelllinien

Im Anschluss an die stabile Transfektion von HeLa-Zellen mit dem HIV-1 Hüllprotein, wurden die generierten Zelllinien hinsichtlich der Env-Oberflächenexpression qualitativ und quantitativ untersucht. Zunächst erfolgte die Analyse der CMV bzw. EFS-Promotor-vermittelten Expressionsaktivität. Hierfür wurde je ein Aliquot eines selektionierten HeLa-EnvB und HeLa-EnvC-Zellklons aufgetaut und wie im Abschnitt 3.1.6 beschrieben für 3 Tage mit 2 µg/mL Puromycin im Nährmedium selektioniert. Anschließend wurden die adhärenenten Puromycin-resistenten HeLa-Zellen vom Zellkulturflaschenboden abtrypsiniert und mit einem Env-spezifischen Antikörper gefärbt. Der Nachweis des viralen Hüllproteins auf der Zelloberfläche erfolgte mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie. Hierbei wurde einerseits der Anteil Env-exprimierender Zellen ermittelt (% PE-positive Zellen) und andererseits die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der markierten Zellpopulationen bestimmt. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Menge an gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern pro Partikel und ist abhängig von der Anzahl vorhandener Antikörperbindestellen. Das bedeutet, die Intensität des gemessenen Phycoerythrin (PE)-Signals korreliert mit der Menge gebundener Env-spezifischer Antikörper und liefert darüber einen Hinweis auf die Anzahl membranassoziierter HIV-*Spikes* pro HeLa-Zelle. Die in Abbildung 4.3A dargestellten Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen eine deutlich stärkere CMV-Promotor-induzierte Proteinexpression beider HIV-Env-Subtypen, im Vergleich zu den EFS-Promotor-induzierten Env-Expressionsmengen. Es konnte beobachtet werden, dass der Anteil EnvB- bzw. EnvC-positiver HeLa-Zellen, die das Hüllprotein unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren (EnvB 98,2 %, EnvC 97,0 %), etwa um das 4,8- bzw. 3-fache größer ist als bei den Zellpopulationen, die das HIV-Env unter EFS-Promotorregulation synthetisieren (EnvB 20,2 %, EnvC 32,2 %). Zudem wurde auch festgestellt, dass die Anzahl der in die Membran inkorporierten Hüllproteinmoleküle pro HeLa-Zelle unter CMV-Promotorkontrolle ebenfalls wesentlich größer ist. Die relative MFI der markierten EnvB- bzw. EnvC-Zellpopulationen ist unter Regulation des CMV-Promotors um mehr als das 29- bzw. 8-fache stärker als unter EFS-Promotor-vermittelter Env-Expression (Abbildung 4.3B).

Aufgrund der Erkenntnisse, dass die CMV-Promotor-induzierte Expressionsaktivität zu einer stärkeren Hüllproteinpräsentation auf der Zelloberfläche geführt hat, wurden für die weitere Charakterisierung der membranassozierten HIV-Hüllproteine und die anschließende Selektion von Env-spezifischen HIV-1 neutralisierenden Antikörperfragmenten HeLa-Zellklone verwendet, die das virale Hüllprotein unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren.

Die Env-Oberflächenexpression wurde neben der FACS-Analyse erneut auch mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Hierfür wurden die frisch aufgetauten HeLa-Zellklone nach 3 Tagen Puromycin-Selektion mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit einem Env-spezifischen Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Die Plasmamembran wurde mit CellMask™ sichtbar gemacht. Von beiden stabil transfizierten HeLa-Zellklonen (EnvB und EnvC) sowie von Wildtyp HeLa-HF1-3 Zellen (WT) sind in der Abbildung 4.3C exemplarisch Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt. Sowohl die HeLa-EnvB als auch die HeLa-EnvC-Zellen weisen eine klare Kollokalisierung des HIV-Hüllproteins mit der zellulären Plasmamembran auf.

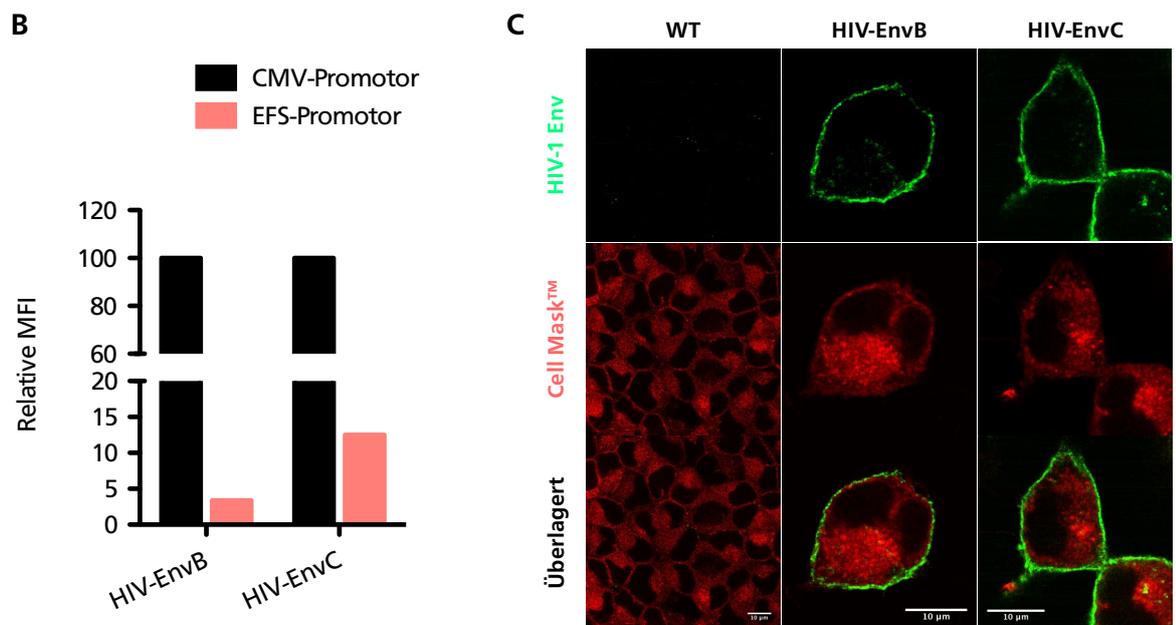
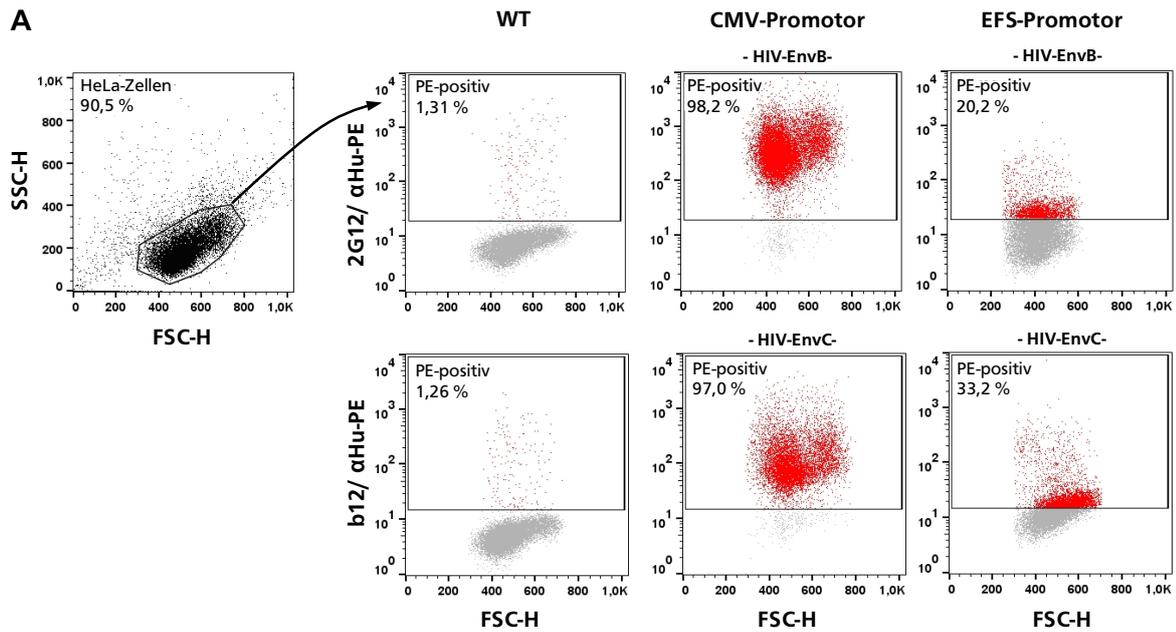


Abbildung 4.3 Analyse der CMV- und EFS-Promotor-abhängigen Env-Oberflächenexpression der HIV-1 Subtyp B (HIV-EnvB) und C (HIV-EnvC) Klone nach stabiler Transfektion von HeLa-HF1-3 Zellen. (A) 1×10^4 HeLa-HF1-3 Zellen (HeLa-Zellen), stabil transfiziert mit HIV-1 EnvB oder EnvC, wurden 72 h nach der Selektion mit Puromycin im Durchflusszytometer untersucht. Der Nachweis der Env-Oberflächenexpression erfolgte unter Verwendung des Hüllprotein-spezifischen Antikörpers 2G12 (HIV-EnvB) oder b12 (HIV-EnvC) und einem PE-konjugierten anti-human Fc-Zweitantikörper. Die zu analysierende HeLa-Zellpopulation wurde hierbei mittels Vorwärts- (FSC-H) und Seitwärtsstreulicht (SSC-H) definiert. Der %-Anteil PE-positiver Zellen dieser Zellpopulation ist jeweils rot im Dot Plot (α Hu-PE vs. FSC-H) dargestellt. Das Gate „PE-positiv“ wurde anhand ungefärbter Zellen gesetzt. Als Kontrolle für eine HIV-Env-spezifische Antikörperinteraktion dienten untransfizierte Wildtyp HeLa-Zellen (WT) ohne Puromycin-Selektion. (B) Vergleich der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) PE-positiver Env-exprimierender HeLa-Zellen unter der Kontrolle des CMV- (schwarz) bzw. EFS-Promotors (rot) 72 h nach der Puromycin-Selektion. Die ermittelten MFI-Werte wurden vor der Auftragung jeweils Env-Subtypen-abhängig auf den CMV-Promotor normiert. (C) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen stabil transfizierter HeLa-Zellen 72 h nach Puromycin-Selektion. Sowohl die mit HIV-1 *envB*- als auch mit *envC*-transfizierten Zellen zeigen eine klare Kolokalisation von membranassoziierten HIV-1 Hüllproteinen (HIV-1 Env, grün) mit der Zellmembran (Cell Mask™, rot). Als Kontrolle fungierten erneut Wildtyp HeLa-Zellen (WT) ohne Puromycin-Behandlung.

In einem weiteren Experiment erfolgte die quantitative Analyse der zellulären Hüllproteinexpression. Die Anzahl an HIV-*Spikes* pro Zelle wurde mit Hilfe des *Quantum™ Simply Cellular®* Kits (QSC, Bangs Laboratories, Inc. Fishers, IN, USA) untersucht. Das QSC Kit besteht aus vier unterschiedlichen *Bead* (engl. Perle)-Populationen, die steigende, aber definierte Bindungskapazitäten für humane Antikörper (ABK) besitzen. Nach Färbung der *Beads* mit einem fluoreszenzmarkierten Env-spezifischen Antikörper und Bestimmung der MFI jeder *Bead*-Population mittels Durchflusszytometrie, konnte anhand der MFIs und den bekannten ABK eine Standardkurve erstellt werden. Die zu analysierenden Zellen wurden ebenfalls mit dem gleichen direkt fluoreszenzmarkierten Env-spezifischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer bei gleichen Geräteeinstellungen untersucht. Die erhaltenen MFIs der gefärbten Zellen wurden anschließend dazu genutzt, um unter Verwendung der Standardkurve die Bindungskapazität der Env-spezifischen Antikörper an die HeLa-Zellen zu bestimmen. Die errechnete ABK stellt somit ein direktes Maß für die Anzahl der an der Zelloberfläche präsentierten HIV-*Spikes* einer Zelle dar.

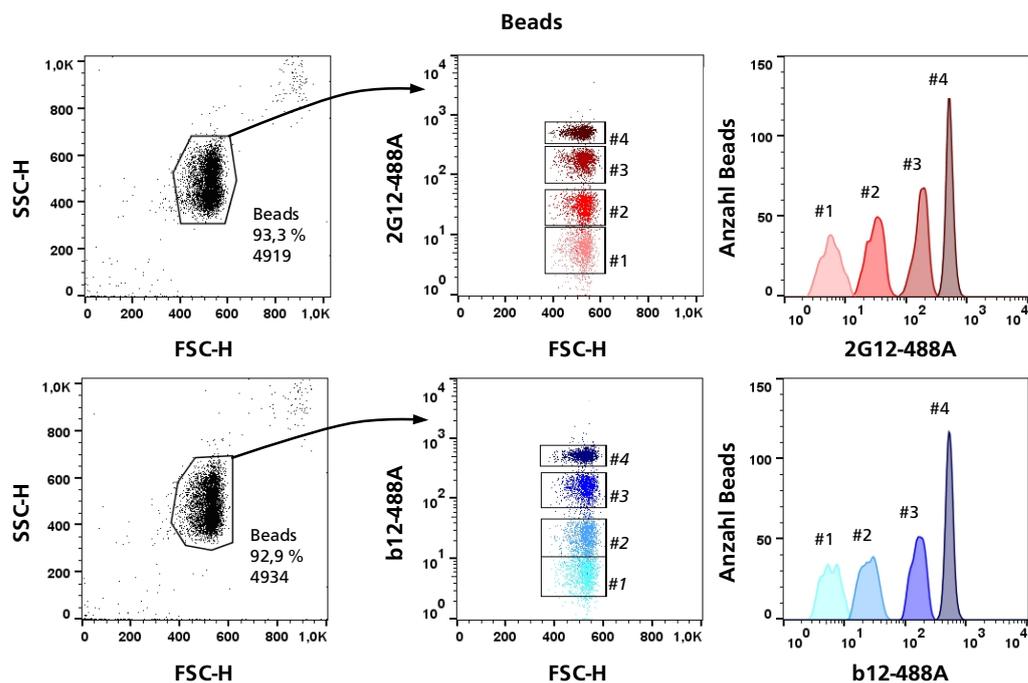
Im Vorfeld der quantitativen Bestimmung der Hüllproteinexpression wurden die Env-spezifischen Antikörper 2G12 (EnvB) und b12 (EnvC) mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF[®]488A konjugiert (Abschnitt 3.2.3). Env-exprimierende HeLa-Zellklone wurden frisch aufgetaut und für drei Tage unter Puromycin-Selektion expandiert. Im Anschluss daran erfolgte parallel die Färbung der *Beads* und der Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper 2G12-488A oder b12-488A. Die Ergebnisse der FACS-Analyse der vier *Bead*-Populationen und der markierten Zellpopulationen sind in den Abbildungen 4.4A (*Beads*), 4.4B (EnvB, 2G12-488A) und 4.4C (EnvC, b12-488A) dargestellt. Anhand der bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten konnte mittels Regressionsanalyse für die HeLa-EnvB-Zelllinie eine Bindungskapazität von ca. 76.000 Env-spezifischen Antikörpern pro Zelle nachgewiesen werden (Tabelle 4.3). Die EnvC-exprimierenden HeLa-Zellen zeigten hingegen eine etwas geringere ABK von rund 33.000 gebundenen Antikörpern an der Oberfläche einer HeLa-Zelle (Tabelle 4.3). Als Nachweis für eine Hüllprotein-spezifische Antikörperbindung wurden zusätzlich HeLa-WT-Zellen bei der Untersuchung verwendet (Abbildung 4.4B und 4.4C). Für diese konnten jeweils Bindungskapazitäten von ~350 (2G12-488A) bzw. ~170 (b12-488A) Antikörpern pro Zelle ermittelt werden (Tabelle 4.3), was der Hintergrundfärbung entspricht.

Bei einer direkten Beziehung zwischen der errechneten ABK und der Anzahl exprimierter HIV-Env Moleküle, führen die gewonnen Erkenntnisse zu der Annahme, dass die generierten HeLa-Zellklone über 10^4 HIV-*Spikes* auf der Oberfläche einer HeLa-Zelle darstellen.

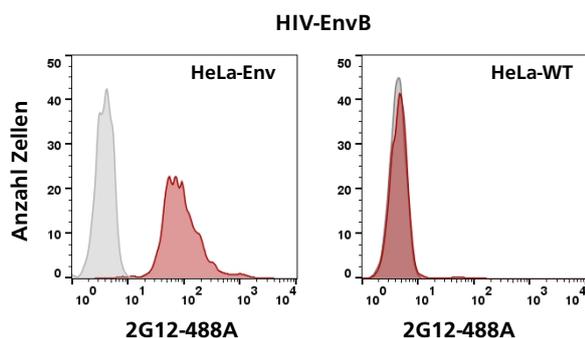
Tabelle 4.3 Bestimmung der Bindungskapazitäten HIV-1 Env-spezifischer Antikörper mit den generierten HeLa-Env Zelllinien. Dargestellt ist der Mittelwert der erhaltenen MFIs von drei unabhängig durchgeführten Messungen.

Klon Bezeichnung	Zelllinie	MFI _{korrigiert} (STABW)	ABK-Wert
HIV-EnvB	HeLa-Env	152 (7,8)	75974
	HeLa-WT	0,43 (0,37)	348
HIV-EnvC	HeLa-Env	58,6 (5,4)	32562
	HeLa-WT	0,25 (0,26)	169

A



B



C

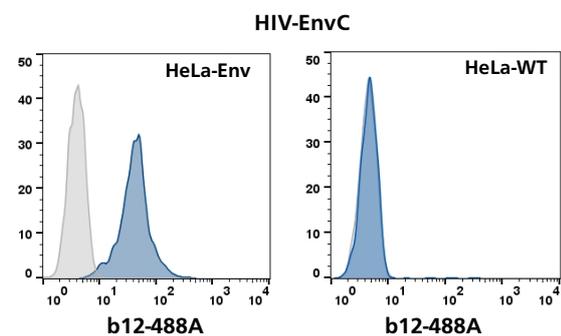


Abbildung 4.4 Quantitative Analyse der Anzahl exprimierter HIV-1 Hüllprotein-Spikes auf der Zelloberfläche generierter Env-Zelllinien. Die Bestimmung der Env-Molekülzahl pro Zelle erfolgte mit Hilfe des *Quantum™ Simply Cellular®* Kits im Durchflusszytometer. (A) 4 Bead-Populationen (#1 - #4) mit unterschiedlichen aber definierten Antikörper-Bindungs-kapazitäten (ABK) wurden mit einem CF[®]488A-konjugierten Env-spezifischen Antikörper 2G12-488A (rot) oder b12-488A (blau) gefärbt. Die Dot Plots und Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten von 1000 Beads jeder Population. Anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) erfolgte die Erstellung der Regressionsgeraden. Zudem wurde die Env-Oberflächenexpression für je 500 HeLa-EnvB-Zellen, inkubiert mit 2G12-488A (B) bzw. HeLa-EnvC-Zellen, gefärbt mit b12-488A (C) anhand der Fluoreszenzintensität ermittelt. Als Negativkontrolle dienen jeweils untransfizierte Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT). Die MFI ungefärbter Zellen (grau) wurde für die Bestimmung der zellulären ABK von der MFI gefärbter Zellen subtrahiert.

Um eine native Konformation der HIV-Hüllproteine auf der Zelloberfläche nachweisen zu können, wurde einerseits die Funktionalität und andererseits die Integrität der membranassoziierten Env-Konstrukte untersucht. Das virale Hüllprotein ist der molekulare Schlüssel für den Eintritt eines Viruspartikels in eine Wirtszelle (Agrawal et al., 2011). Dafür interagiert das HIV-Env mit verschiedenen Rezeptoren (CD4 und CXCR4/CCR5) auf der Oberfläche der Zielzelle und unterzieht sich während des Fusionsprozesses massiven Konformationsänderungen (Abschnitt 1.2.2). In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der in die Zellmembran integrierten HIV-Env mittels eines Zell-Zell-Fusions-Assays untersucht (Abschnitt 3.1.10).

Hierfür wurden zunächst TZM-bl-Zellen in einer Zelldichte von 2500 Zellen/cm² in Zellkulturschalen mit einem Raster (2 x 2 mm) ausgesät. TZM-bl-Zellen sind modifizierte HeLa-Zellen, welche den humanen CD4- und CCR5-Rezeptor in großen Mengen stabil auf der Zelloberfläche exprimieren. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA SE markiert und für weitere 45 min bei 37° C inkubiert. Nachfolgend an die Inkubation wurden die TZM-bl-Zellen mit Env-exprimierenden HeLa-Zellen kokultiviert. Die Aussaat der HeLa-Zellen erfolgte ebenfalls in einer Zelldichte von 2500 Zellen/cm². Direkt im Anschluss daran wurde alle 30 min über einen Messzeitraum von 2 h die Zell-Zell-Fusion der HeLa-Zellen mit den TZM-bl-Zellen analysiert. Die quantitative Auswertung der Synzytienbildung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wobei jeweils die Anzahl einzelner CFDA SE-positiver TZM-bl-Zellen in drei Rasterfeldern je Messzeitpunkt und Probe ausgezählt wurde. Das Ergebnis der Analyse ist in der Abbildung 4.5A graphisch dargestellt. Aus diesem geht hervor, dass 2 h nach der Kokultivierung von TZM-bl-Zellen mit Env-exprimierenden HeLa-Zellen nahezu keine einzelnen CFDA SE-positiven TZM-bl-Zellen mehr detektiert werden konnten. Bereits 60 min nach der Kokultivierung ist der Anteil einzelner CFDA SE-positiver TZM-bl-Zellen um 70 % in der EnvB-Probe und um 57 % in der EnvC-Probe abgefallen. Im Vergleich dazu konnte in der Kontrollprobe mit HeLa-WT-Zellen über den gesamten Messzeitraum keine signifikante Änderung der Zellzahl einzelner CFDA SE-positiver TZM-bl-Zellen beobachtet werden.

Darüber hinaus sind in der Abbildung 4.5B exemplarisch Fluoreszenzaufnahmen von TZM-bl-Zellen zusammen mit HeLa-EnvB, -EnvC oder -WT-Zellen 90 min nach der Kokultivierung dargestellt. Für die qualitative Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben zuvor fixiert, permeabilisiert und die DNA mittels DAPI sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzaufnahmen belegen eindeutig, dass die Abnahme des Anteils einzelner CFDA SE-positiver TZM-bl-Zellen in den Proben mit HeLa-EnvB- und HeLa-EnvC-Zellen auf die Ausbildung von Synzytien zurückzuführen ist. Somit beruht die extensive Fusion beider Zelllinien auf der Interaktion funktioneller viraler Hüllproteine mit dem CD4- und CCR5-Rezeptor. Diese Beobachtungen zeigen, dass die auf der Zelloberfläche exprimierten HIV-*Spikes* funktionell sind und legen somit die Vermutung nahe, dass sie auch eine native Konformation besitzen.

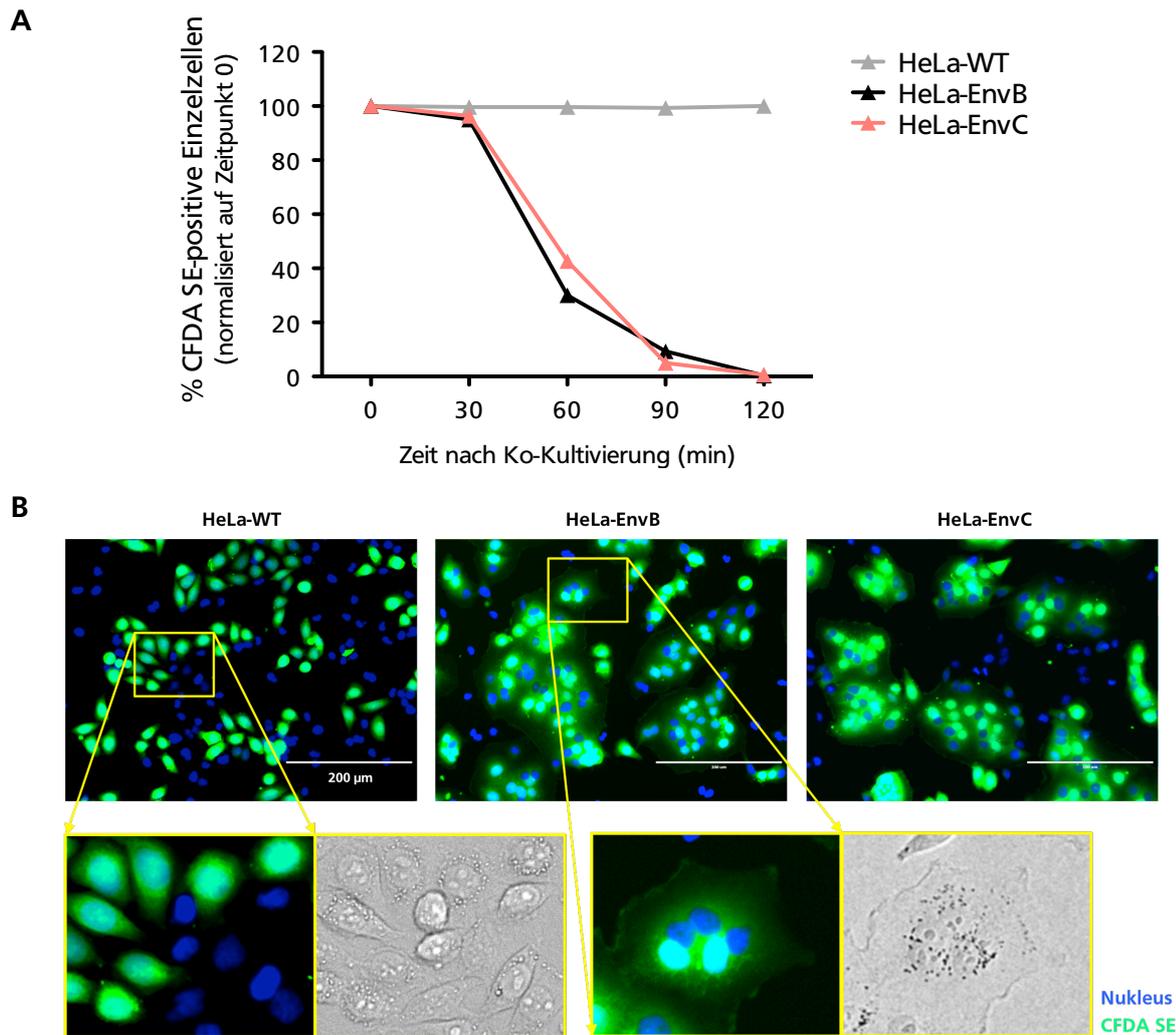


Abbildung 4.5 Nachweis der Fusiogenität funktionaler membranassoziierter HIV-1 Hüllproteine. (A) Anteil an einzelnen CD4+ und CCR5-positiven, CFDA SE-markierten TZM-bl-Reporterzellen über einen Zeitraum von 0 bis 120 min nach der Kokultivierung mit HIV-Env exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EnvB, schwarz & HeLa-EnvC, rot) oder Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT, grau). Pro Messzeitpunkt (Dreiecke) wurde je Zelllinienkombination die Anzahl an grünen TZM-bl-Zellen innerhalb einer Fläche von 12 mm² ausgezählt. Der prozentuale Anteil an einzelnen CFDA SE-positiven TZM-bl-Zellen wurde vor der Auftragung gegen die Reporterzellzahl zum Zeitpunkt 0 normiert. (B) Zeigt exemplarische fluorezenzmikroskopische Aufnahmen von CFDA SE-markierten TZM-bl-Zellen 90 min nach der Kokultivierung mit HeLa-EnvB, -EnvC und -WT-Zellen (20- & 40-fache Vergrößerung). Die Inkubation von TZM-bl-Zellen mit HIV-Env exprimierenden Zellen offenbart eindeutig die Ausbildung anatomischer Synzytien zwischen den Zelllinien. Eine Kokultivierung von Reporterzellen mit HeLa-WT-Zellen führt hingegen zu keiner Synzytienbildung. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

Zusätzlich zur Funktionsanalyse der HIV-Hüllproteine wurde deren Konformation auch anhand der Epitopintegrität für verschiedene gut charakterisierte HIV-1 Env-spezifische Antikörper untersucht. Hierfür wurden monoklonale Antikörper (mAb, engl. *Monoclonal Antibody*) verwendet, die unterschiedliche konformationelle Regionen des Hüllproteins erkennen, wie die CD4-Bindestelle (CD4bs) (3BNC117, b12, VRC01) bzw. CD4-induzierte Epitope (17b), die V2-Region (697-30D), die V3-Schleife (PGT121), die gp120-Glykanhülle (2G12) oder die MPER (2F5, 10E8) (Abbildung 4.6) (Abschnitt 1.6). Für die meisten dieser Antikörper wurde beschrieben, dass sie an konformationelle diskontinuierliche Epitope

innerhalb der Env-Struktur binden. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass die mAb 697-30D und 17b Epitope erkennen, welche in der geschlossenen nativen Env-Konformation, also vor Kontakt mit dem CD4-Rezeptor, im Inneren verborgen liegen und somit unzugänglich für die Antikörper sind (Powell et al., 2017; Wyatt et al., 1995). Erst durch die Interaktion mit dem CD4-Wirtszellrezeptor erfährt das virale Hüllprotein eine öffnende Strukturänderung, wodurch die Epitope nach außen exponiert werden. Somit liefert die Charakterisierung der Epitopintegrität einerseits Hinweise auf eine native Faltung und andererseits Informationen über die Zugänglichkeit verschiedener antigenen Determinanten innerhalb der membranassoziierten HIV-Spikes.

Die Analyse der Antigenintegrität der viralen Hüllproteine erfolgte mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie. Es konnte beobachtet werden, dass beide Env-Konstrukte durch alle CD4bs-spezifischen Antikörper 3BNC117, b12 und VRC01 sowie den mAb PGT121 (V3-Loop) gebunden werden. Die mAb 2G12 und 2F5 zeigten hingegen ausschließlich eine Reaktion mit dem EnvB. Für die mAb 697-30D, 17b und 10E8 konnte keine Reaktivität mit den Hüllproteinvarianten nachgewiesen werden. Die Intensität der Proteininteraktion variierte hierbei zwischen den Antikörpern und den Env-Konstrukten sehr deutlich. Die stärkste Bindung an das EnvB wurde durch die mAb 2G12 und PGT121 beobachtet, verglichen mit HeLa-WT-Zellen wiesen sie eine um das 37-fach (2G12) bzw. 20-fach (PGT121) höhere MFI auf. Der mAb b12 reagierte besonders stark mit dem HIV-EnvC und zeigte eine rund 18-fach stärkere MFI als die HeLa-WT-Zellen. Im Unterschied dazu war die Reaktivität des mAb b12 mit dem Subtyp B-Env relativ schwach, die ermittelte MFI der Env-exprimierenden Zellen war nur um das 3-fache höher als bei HeLa-WT-Zellen. Eine ähnlich schwache Interaktion wurde auch für den MPER-Antikörper 2F5 an das EnvB beobachtet. Dieser zeigte im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen eine etwa 2-fach höhere MFI. Abschließend konnten die Ergebnisse belegen, dass beide membranassoziierten HIV-Hüllproteinvarianten jeweils durch verschiedene Env-spezifische Antikörper gebunden wurden, die konformationelle Epitope in unterschiedlichen Regionen des HIV-Env erkennen.

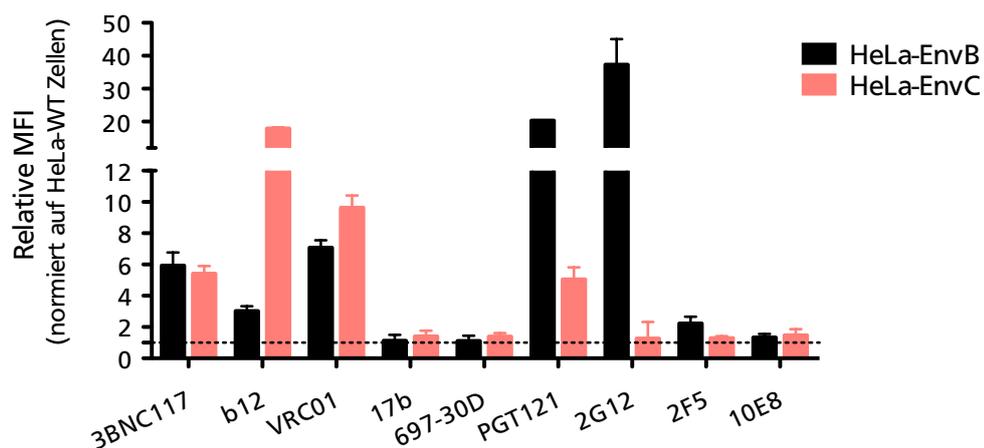


Abbildung 4.6 Charakterisierung der Antigenintegrität von an der Zelloberfläche exprimierten HIV-1 Hüllproteinen. Dargestellt ist die relative Reaktivität verschiedener HIV-1 Env-spezifischer Antikörper mit der HIV-EnvB (schwarz) und HIV-EnvC exprimierenden HeLa-Zelllinie (rot). Die Bindung Hüllprotein-spezifischer Antikörper wurde mit Hilfe eines PE-konjugierten Zweitantikörpers im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Antikörperinteraktion mit den HeLa-Env Zellen wurde vor der Auftragung gegen die MFI der Antikörper mit Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT) normiert (gestrichelte Linie). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen.

In einem letzten Experiment zur Charakterisierung der generierten HIV-1 Env-exprimierenden HeLa-Zellklone, wurde die Stabilität der Hüllproteine analysiert. Aufgrund der relativ schwachen und nicht-kovalenten Natur der gp120-gp41 Interaktion, kommt es bei einer natürlichen Infektion häufig zum Verlust der gp120-Untereinheit von der Virus- bzw. Zelloberfläche (Zhu et al., 2003). Da für die Selektion Hüllprotein-spezifischer Antikörperfragmente mittels Phagen-Display eine Vielzahl stringenter Waschschriffe vonnöten ist, wurde die Env-Stabilität durch intensives „Waschen“ überprüft. Hierfür wurden abtrypsinierte Env-tragende HeLa-Zellen auf drei unterschiedliche Arten mit einem gp120-Env-spezifischen Antikörper gefärbt. Eine Probe wurde wie unter 3.2.2 beschrieben „normal“ gefärbt. Eine zweite Probe wurde vor und eine dritte Probe nach der Inkubation mit dem Primärantikörper 15-mal gewaschen. Je Waschschriff wurden die Zellen durch 5-maliges auf- und abpipettieren resuspendiert und danach wieder abzentrifugiert. Im Anschluss an die Färbung erfolgte die quantitative Auswertung der Proben am Durchflusszytometer. Die in der Abbildung 4.7 dargestellten Resultate der FACS-Analyse zeigen die ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten der HeLa-EnvB bzw. -EnvC-Zellen in Abhängigkeit ihrer Färbemethode. Die MFI ist ein direkter Indikator für die Menge der an der Zelloberfläche exprimierten Hüllproteine und wurde deshalb als Vergleichsgröße verwendet, um den Einfluss der Waschprozedur auf die Env-Expression zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass EnvC Zellen, die vor und nach der Erstantikörperfärbung 15-mal gewaschen wurden, im Vergleich zu normal gefärbten EnvC-Zellen eine etwa 10 % geringere MFI aufweisen. Eine ähnliche Differenz wurde auch bei EnvB-Zellen beobachtet, die nach der Färbung mit dem gp120-Antikörper intensiv gewaschen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten EnvB-Zellen, die vor der Antikörperfärbung 15-mal gewaschen wurden, im Vergleich zu normal gefärbten EnvB-Zellen sogar eine um etwa 20 % erhöhte MFI. Insgesamt kann anhand dieser Beobachtungen angenommen werden, dass die auf der Oberfläche exprimierten HIV-Hüllproteine durch die intensive Waschprozedur nicht signifikant geschädigt werden.

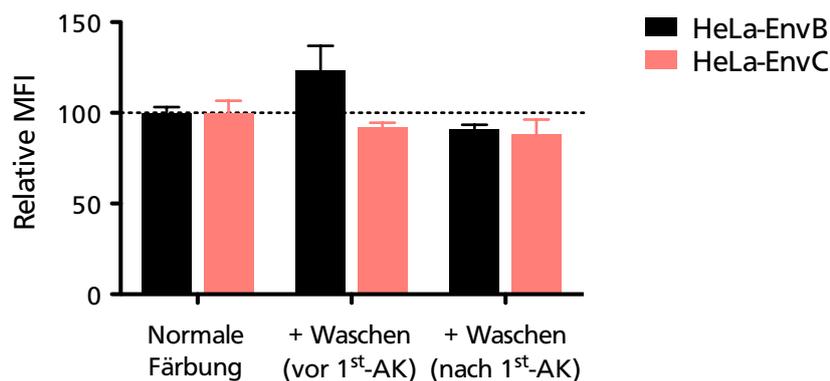


Abbildung 4.7 Untersuchung des Einflusses stringenter Waschyklen auf die HIV-Hüllproteinestabilität. Gezeigt ist die relative Bindungskapazität von HIV-Env-spezifischen Antikörpern an HeLa-EnvB (schwarz) und HeLa-EnvC-Zellen (rot) in Abhängigkeit ihrer Färbeprozedur. Die Bindung der Hüllprotein-spezifischen Antikörper 2G12 (HIV-EnvB) und b12 (HIV-EnvC) wurde mit Hilfe eines PE-konjugierten Zweitantikörpers im Durchflusszytometer nachgewiesen. HeLa-Env Zellen wurden entweder nach einem Standardprotokoll gefärbt (Normale Färbung) oder 15-mal durch 5-faches Resuspendieren vor (+ Waschen vor 1st-AK) oder nach (+ Waschen nach 1st-AK) der Färbung mit den Env-spezifischen Antikörpern gewaschen. Die erhaltene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Antikörperreaktivität mit den Zellen wurde vor der Auftragung gegen die MFI „normal gefärbter“ Zellen normiert (gestrichelte Linie). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass HeLa-Zellen, die stabil mit einem envB- oder envC-Gen transfiziert wurden, unter der Kontrolle eines CMV-Promotors deutlich messbare Mengen an viralen Hüllproteinen auf der Zelloberfläche darstellen. Zudem weisen die Daten darauf hin, dass die exprimierten Hüllproteine eine funktionelle und physiologisch relevante Konformation besitzen, wie sie auch auf der Partikeloberfläche von primären HI-Viren vorkommt. Darüber hinaus konnte auch nachgewiesen werden, dass die membranassoziierten HIV-Spikes eine hinreichende Stabilität für die Selektion von Antikörperfragmenten mittels der Phagen-Display-Technologie bieten.

4.1.3 Analyse der Patientenserum HIV-positiver Long-Term Non-Progressors (LTNPs)

Für die *in vitro* Selektion HIV-1 Hüllprotein-spezifischer Antikörperfragmente wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit scFv-Immunistheken aus dem Antikörperrepertoire von HIV-Patienten hergestellt. Insgesamt konnten sieben ART-naive LTNPs für die Studie rekrutiert werden (Tabelle 4.4). Alle Patienten sind mit einem HI-Virus des Subtyps B infiziert. Die Infektionsdauer der Betroffenen umspannte zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Zeitraum von mindestens 4 (A3) bis zu 27 Jahren (MH04).

Ausgehend von dieser Patientenkohorte wurde zunächst die Anwesenheit HIV-neutralisierender Antikörper im Serum der HIV-Patienten untersucht. Die Bestimmung der Neutralisationsaktivität der Patientenserum erfolgte mit Hilfe eines standardisierten *in vitro* Neutralisations-Assays (Abschnitt 3.1.11). Hierbei wurde jeweils die mittlere inhibitorische Plasmaverdünnung (ID_{50}) ermittelt. Die ID_{50} entspricht der reziproken Serumverdünnung bei der 50 % der HIV-Pseudoviren neutralisiert werden. Um neben der Neutralisationspotenz auch die Neutralisationsbreite der Patientenantikörper zu untersuchen (Abschnitt 1.6.2), wurden die Patientenserum gegen insgesamt fünf verschiedene HIV-Pseudoviren getestet, vier Subtyp B (HIV-Bal26, HIV-SF162.LS, HIV-REJO4541.67, HIV-THRO4156.18) und ein Subtyp A-Virus (HIV-MS208.A1) (Tabelle 4.5). Die Virusisolate HIV-REJO4541.67 und HIV-THRO4156.18 sind bezüglich ihrer Neutralisationssensitivität als Tier 2 eingestuft, alle anderen gehören zu Gruppe der Tier 1-Viren (Abschnitt 3.1.11). Als Kontrolle für eine HIV-1 Env-spezifische Antikörper-basierte Neutralisation wurde zudem ein pseudotypisiertes Murines Leukämievirus (MLV) verwendet und ein Mix von Seren aus 12 HIV-negativen Spendern (Negativ-Serum). Die Pseudoviren wurden zunächst mit verschiedenen Verdünnungen (von 1:10 bis 1:12150) der hitzeinaktivierten Patientenserum 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte für 48 h die Zugabe einer Reporterzelllinie (TZM-bl-Zellen), welche für das Luciferase-Gen kodiert. Die Virus-vermittelte Expression des Luciferase-Reportergens wurde in der Folge in Form von Chemilumineszenz am Luminometer quantifiziert. Abbildung 4.8 zeigt die ermittelten Neutralisationskurven aller Patientenserum gegen die getesteten Pseudoviren. Aus diesen geht hervor, dass die Seren der Patienten A2, E1, EC09, EC26 und MH04 die größte Neutralisationsbreite aufwiesen und vier der fünf HIV-Pseudoviren neutralisieren konnten. Die Plasmaproben der Patienten A1 und A3 zeigten indessen nur gegen zwei pseudotypisierte HI-Viren eine Neutralisationsaktivität. Interessant war zudem die Beobachtung, dass keines der getesteten Seren das HI-Virusisolat des Subtyps

A neutralisieren konnte. Gleiches wurde ebenso bei der MLV-Kontrolle festgestellt, auch hier zeigten die Patientenserum keine Neutralisationsaktivität. Darüber hinaus konnte auch für das Negativ-Serum keine Neutralisationsaktivität gegenüber den HIV-Pseudovirusisolaten nachgewiesen werden. Diese Daten belegen eindeutig, dass die Neutralisation der Pseudoviren durch HIV-spezifische Antikörper vermittelt wurde und sie legen zudem nahe, dass einige der HIV-Patienten kreuzneutralisierende Antikörper besitzen, die möglicherweise konservierte Epitope verschiedener HI-Virusisolate erkennen.

Tabelle 4.4 Übersicht verschiedener klinischer Parameter der rekrutierten HIV-1 positiven Patienten ohne antiretrovirale Therapie. VC - *Viremic Controller*, EC – *Elite Controller* (Abschnitt 1.5.3).

Patienten ID	Klinischer Status	Infektionsjahr	HIV-1 Subtyp	CD4-Zellzahl (CD4-Zellen/ μ L)	Viruslast (HIV-1 RNA/mL)
A1	VC	2008	B	595	288
A2	VC	2006	B	515	398
A3	VC	2010	B	1513	182
E1	VC	2008	B	1200	325
EC09	EC	1994	B	992	<50
EC26	EC	1994	B	304	<50
MH04	VC	1987	B	558	238

Tabelle 4.5 Zusammenfassung der ermittelten *in vitro* Plasma-Neutralisationsaktivität (ID_{50}) der 7 LTNP's gegen 5 unterschiedliche HIV-Pseudovirusisolate. Das x signalisiert hierbei, dass bei keiner Plasmaverdünnung eine 50-prozentige Neutralisation des HIV-Klons erreicht wurde.

HIV-1 Pseudovirus	Subtyp	Tier	A1	A2	A3	E1	EC09	EC26	MH04
HIV-MS208.A1	A	1	x	x	x	x	x	x	x
HIV-Bal26	B	1	x	380	98	1013	962	913	1175
HIV-SF162.LS	B	1	111	3850	344	6212	11360	>12150	3300
HIV-REJO4541.67	B	2	10	56	x	165	>2430	664	628
HIV-THRO4156.18	B	2	x	143	x	212	110	157	86
MLV	(Negativkontrolle)		x	x	x	x	x	x	x
Anzahl neutralisierter HI-Viren			2/5	4/5	2/5	4/5	4/5	4/5	4/5

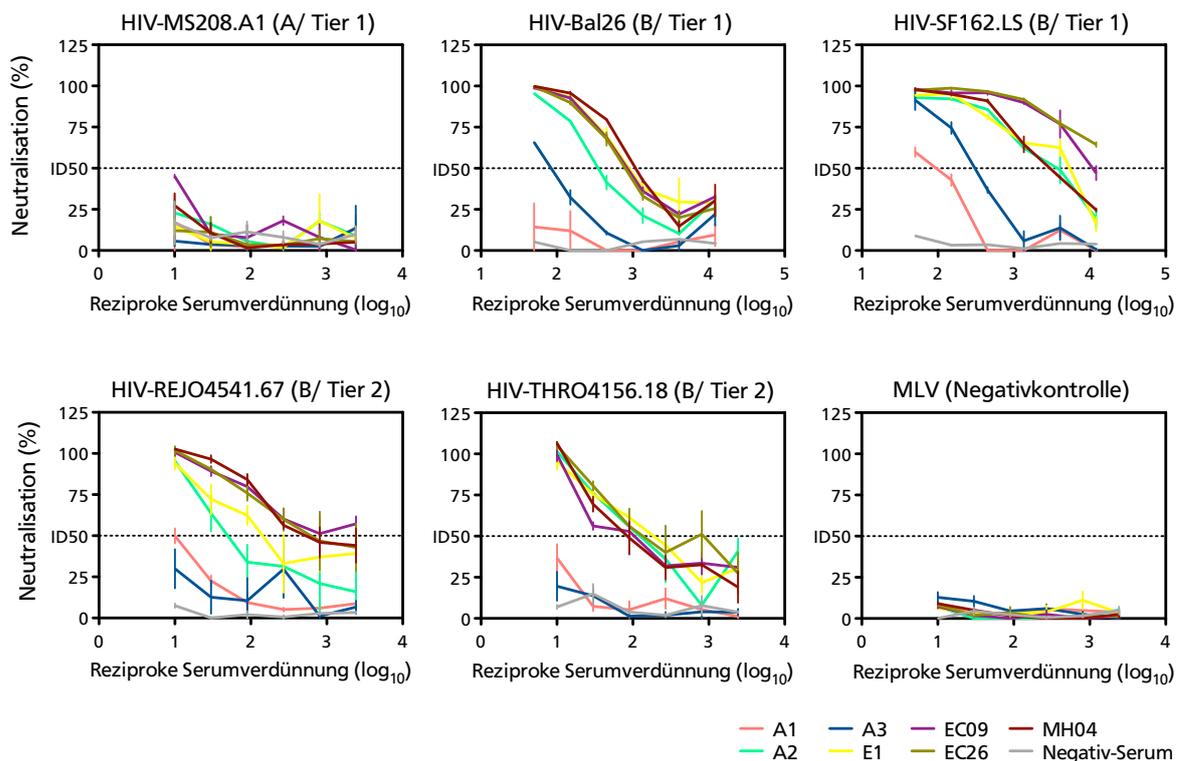


Abbildung 4.8 Bestimmung der *in vitro* Plasma-Neutralisationsaktivität der rekrutierten LTNP. Anteil neutralisierter Tier 1 (HIV-Bal26, HIV-MS208.A1, HIV-SF162.LS) und Tier 2 (HIV-REJO4541.67, HIV-THRO4156.18) HIV-Pseudoviren zweier unterschiedlicher genetischer Subtypen (HIV-Subtyp A & B) in Abhängigkeit verschiedener Plasma-Verdünnungen (1:10 bis 1:12150) der sieben HIV-positiven Patienten, ermittelt in standardisierten TZM-bl-Reporterzellassays. Die gestrichelte Linie signalisiert eine halbmaximale Virusneutralisation (ID_{50}). Als Negativkontrollen für eine HIV-spezifische Antikörper-vermittelte Neutralisationsaktivität wurde einerseits Plasma gepoolt von 12 HIV-negativen Spendern (Negativ-Serum) und ein HIV-fremdes Pseudovirus (MLV, Murines Leukämievirus) verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen von Triplikaten einer Messung.

In einem weiteren Experiment wurde die Reaktivität der Patientenantikörper mit dem membranassoziierten EnvB-Konstrukt (Abschnitt 4.1.1) mit dem Ziel untersucht, Patienten zu identifizieren, welche Hüllprotein-spezifische Antikörper besitzen, die in der Lage sind das Env-Isolat während der *in vitro* Selektion zu binden. Aufgrund der Erkenntnisse, dass alle Patienten mit einem HI-Virus des Subtyps B infiziert sind (Tabelle 4.4) und die Serumantikörper ausschließlich HIV-Pseudoviren des Subtyps B neutralisieren konnten (Tabelle 4.5), wurde für die Analyse der Antigenerkennung mittels zellbasiertem ELISA nur das EnvB verwendet (Abschnitt 3.3.11). Hierfür wurden zunächst HeLa-EnvB und HeLa-WT-Zellen konfluent in 96 Well-Kulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C weiter angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Patientenseren (1:100-Verdünnung) inkubiert. Der Nachweis gebundener Env-spezifischer Plasmaantikörper erfolgte durch einen HRP (engl. *Horseradish Peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper. Im Anschluss daran wurden die Proben kolorimetrisch am Spektrometer ausgewertet. Es konnte beobachtet werden, dass die Seren der fünf Patienten A1, E1, EC09, EC26 und MH04 mit dem viralen

EnvB reagierte, während die Plasmaproben der Patienten A2 und A3 keinen Unterschied in der Absorption zwischen den Wildtyp- und den EnvB-Zellen zeigten (Abbildung 4.9). Die heterogene Reaktivität der Patientenserum, die mit dem EnvB-Konstrukt reagierte, ist vermutlich auf die unterschiedlichen Antikörpertiter im Plasma zurückzuführen.

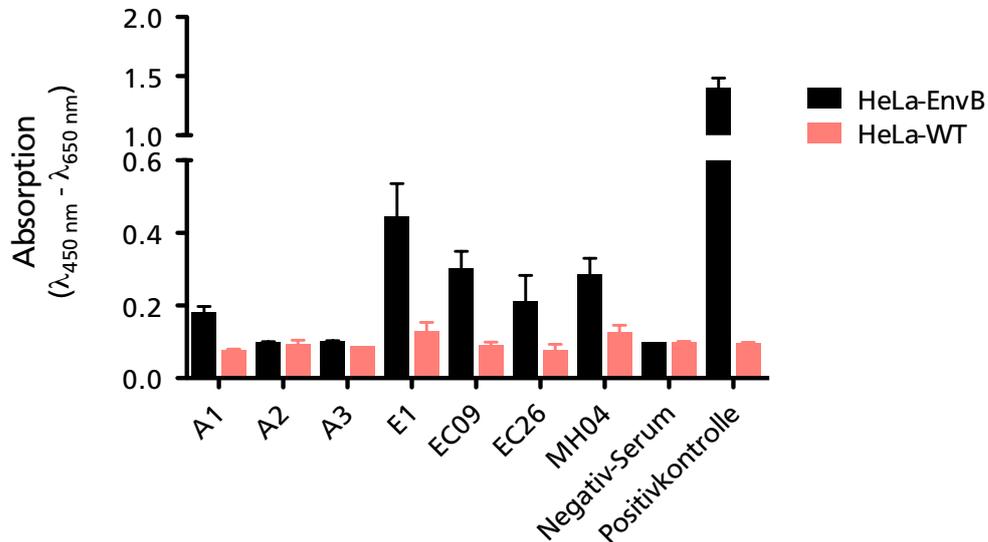


Abbildung 4.9 Nachweis der Erkennung des HIV-EnvB Klon durch Antikörper in den LTNP-Plasmaproben. Dargestellt ist die Reaktivität der Plasmaproben der sieben HIV-positiven Patienten mit HIV-EnvB exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EnvB, schwarz) und Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT, rot). Die Bindung Hüllprotein-spezifischer Plasmaantikörper wurde mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers im zellbasierten ELISA nachgewiesen. Als Kontrollen für eine HIV-Env-spezifische Antikörperinteraktion wurde einerseits Plasma gepoolt von 12 HIV-negativen Spendern (Negativ-Serum) und der mAb 2G12 (Positivkontrolle) verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen von Triplikaten einer Messung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die LTNPs E1, EC09, EC26 und MH04 Plasmaantikörper besitzen, die Subtyp B-spezifisch verschiedene HIV-Pseudovirusisolate neutralisieren können. Darüber hinaus zeigten die Patientenserum auch eine Reaktivität mit dem membranassoziierten EnvB-Konstrukt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde ausgehend von den B-Lymphozyten dieser Patienten scFv-Immunistibliotheken hergestellt.

4.1.4 Konstruktion humaner Antikörpergenbibliotheken

Für die Herstellung Patienten-abgeleiteter scFv-Phagenbibliotheken wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus den Patientenblutproben isoliert. Die Abtrennung der PBMCs von den Erythrozyten und dem Blutplasma erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation und dem hydrophilen Polysaccharid Pancoll (Abschnitt 3.1.13). Insgesamt konnten mit Hilfe dieses Trennverfahrens 4×10^7 PBMCs aus den Blutproben der Patienten E1 und EC26 isoliert werden und 5×10^7 PBMCs bei den Patienten EC09 und MH04. Aus den aufgereinigten Immunzellen wurde im Anschluss die Gesamt-RNA isoliert und wie unter 3.4.12 erläutert in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Ausbeute der cDNA-Synthese ist in der Tabelle 4.6 aufgeführt.

In der Folge wurde die gewonnene cDNA als Vorlage benutzt, um die variablen Antikörpergenabschnitte der Patienten (I) zu amplifizieren und (II) für die Klonierung in einen Phagen-Display Vektor mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen zu versehen (Abbildung 4.10A). Die Vervielfältigung und Modifikation der Antikörpergene erfolgte in zwei Schritten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Abschnitt 3.4.5). Der erste Schritt diente hierbei der Amplifikation der Gene, welche für die variablen Domänen der schweren Kette (VH) und der beiden Isotypen der leichten Kette Lambda (VL λ) und Kappa (VL κ) kodieren. Um möglichst das gesamte Antikörperrepertoire der Patienten abzudecken wurde ein Pool bestehend aus 27 degenerierten Vorwärtsprimern verwendet, von denen 9 die genetische Diversität der VH-, 11 der VL λ - und 7 der VL κ -Subfamilien abbildeten (Hust et al., 2011). Pro Patient wurden insgesamt 23 μ g der isolierten cDNA in die erste Antikörpergen-PCR eingesetzt. Je Primerkombination wurden zudem drei PCR-Ansätze präpariert, sodass etwa 260 ng cDNA als Matrize in jeder Probe vorgelegen hat. Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.4.7) separiert und die DNA-Fragmente entsprechend der erwarteten Basenpaargrößen (Bp) (VH \sim 380 Bp, VL λ/κ \sim 650 Bp) aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (Abschnitt 3.4.7 und 3.4.8) (Abbildung 4.10B). Die somit erhaltenen DNA-Fragmente der VH-, VL λ - und VL κ -Gene wurden separat vereint und als DNA-Template für die zweite Antikörpergen-PCR verwendet. Während der zweiten Antikörpergen-PCR wurden an die 5'- und 3'-Enden der Amplikons Primer-vermittelte Erkennungssequenzen für die Restriktionsnukleasen NcoI und HindIII (VH) sowie MluI und NotI (VL λ/κ) angefügt. Die Separation der PCR-Produkte erfolgte erneut mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. VH-, VL λ - und VL κ -DNA-Fragmente mit einer erwarteten Basenpaargröße von rund 400 Bp (Abbildung 4.10C) wurden aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten, aufgereinigt und separat zusammengeführt. Insgesamt wurden je Patient in drei Ansätzen 81 Erst- und 81 Zweit-PCR Reaktionen durchgeführt. Die zusätzlichen Banden in den Agarose-Gelen in Abbildung 4.10B und C entsprechen DNA-Produkten, welche während der Polymerase-Kettenreaktion vermutlich durch unspezifische Template-Primer-Interaktionen entstanden sind.

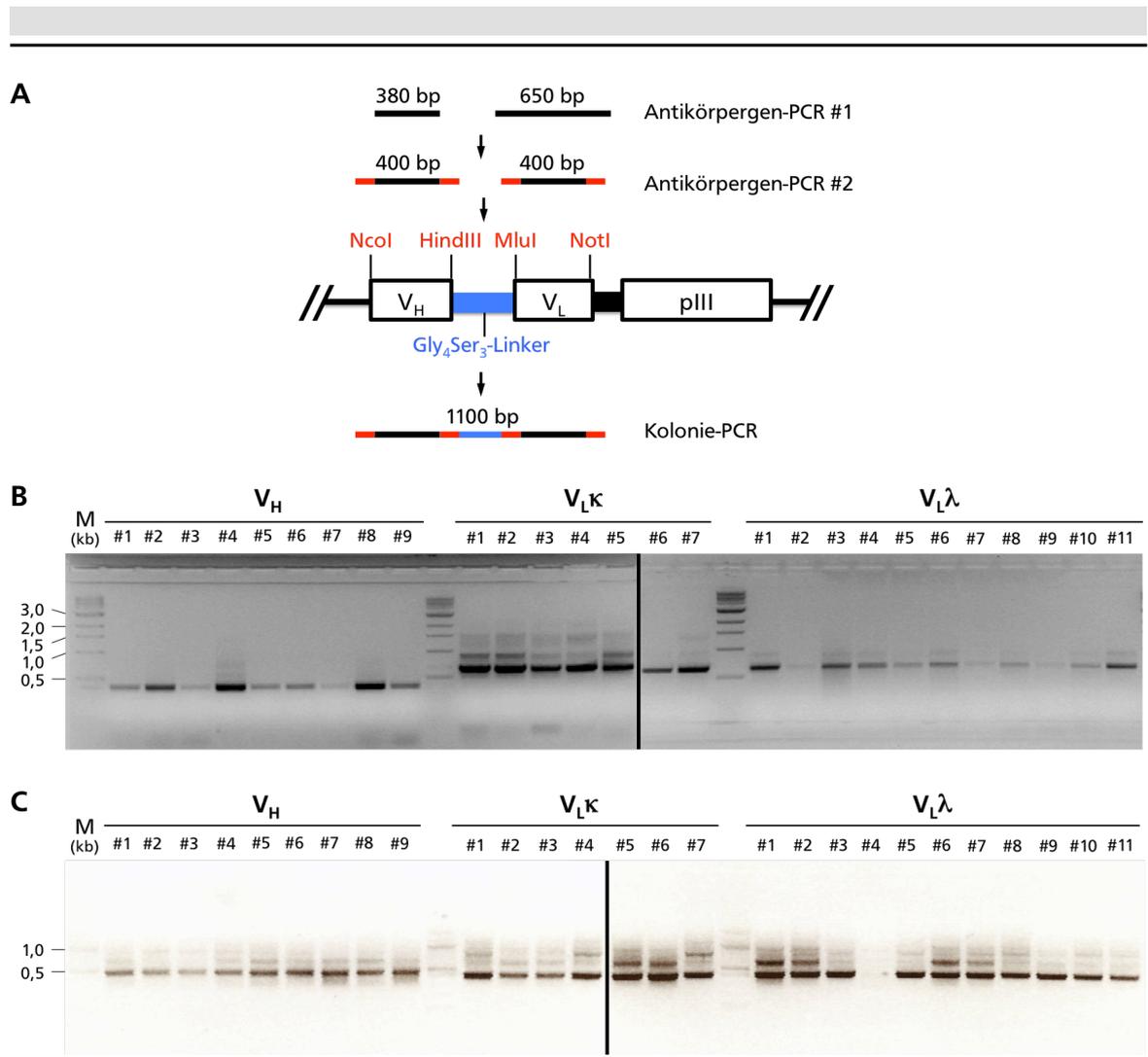


Abbildung 4.10 Übersicht der Amplifikations- und Klonierungsstrategie der Antikörpergene der variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H), sowie die Orientierung der Antikörperfragmente und des Phagenhüllproteins (pIII) innerhalb der Expressionskassette des Phagemid pHAL30. Zuerst wurden die V_H - und V_L -Gene aus dem Antikörperrepertoire Patienten-abgeleiteter synthetisierter cDNA mittels PCR amplifiziert (Antikörpergen-PCR #1). Anschließend wurden die Erkennungssequenzen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme NcoI, HindIII, MluI und NotI (rot) erneut durch PCR an die Amplicons angefügt (Antikörpergen-PCR #2). Die Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Die Anzahl Basenpaare (bp) entspricht den erwarteten DNA-Fragmentgrößen. (B) & (C) Exemplarisch gezeigt sind die präparativen Gele nach der Antikörpergen-PCR #1 (B) und -PCR #2 (C) des Patienten EC09. Die Proben V_H #1 - #9, $V_Lκ$ #1 - #7 und $V_Lλ$ #1 - #11 entsprechen den Kombinationen der 27 degenerierten Vorwärtsprimer. Die Proben wurden jeweils in ein 1,5-prozentiges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid (EtBr). Als Längenstandard (M) wurden 0,5 μ g des Thermo Scientific™ O'GeneRuler Ready-to-use 1 kb eingesetzt.

Die aufgereinigten DNA-Fragmente der V_H - und V_L -Antikörpergene der vier Patienten wurden in der Folge in zwei Klonierungsschritten in den Phagemidvektor pHAL30 kloniert (Anhang A2) (Kügler et al., 2015). Phagemide sind Hybride aus einem Plasmid und einem Phagen, die neben einem Replikationsursprung für die doppelsträngige Plasmid-Amplifikation in bakteriellen Wirtszellen (colE1) noch einen weiteren Replikationsursprung (M13 ori) besitzen, der nach Infektion der Bakterien mit einem Helferphagen zur einzelsträngigen Replikation der Plasmid-DNA führt (Famulok & Faulhammer, 1994). Darüber hinaus besitzt

der pHAL30 auch eine Expressionskassette für scFv-Fragmente (Abbildung 4.10A). Diese beinhaltet unter anderem Schnittstellen für die Restriktionsnukleasen NcoI/ HindIII sowie MluI/ NotI, welche durch einen flexiblen Glycin-Serin-Linker (Gly₄Ser)₃ miteinander verbunden sind. Zusätzlich ist die Expressionskassette so konzipiert, dass die erzeugten scFv-Fragmente als Fusionsproteine mit dem Phagenhüllprotein pIII exprimiert werden. Hierbei wird das 3'-Ende des Antikörpergensatzes (VH und VL) an das 5'-Ende des pIII-Proteins ligiert.

Zuerst wurden die mit MluI und NotI restringierten Antikörpergene der leichten Kette mit dem linearisierten pHAL30 Vektor wie unter 3.4.4 beschrieben ligiert. Die Ligation der leichten Ketten VL λ und VL κ erfolgte jeweils getrennt voneinander. Für jeden Isotyp wurden pro Patient sechs Ligationsansätze präpariert. Die generierten Plasmidkonstrukte wurden im Anschluss mittels Elektroporation in den *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm XL1-Blue MRF' eingebracht und vervielfältigt (Abschnitt 3.1.4). Nach der Präparation der Plasmide wurden diese, parallel mit den Genen der schweren Kette, enzymatisch mit NcoI und HindIII geschnitten. Die Ligation der VH-Gene mit dem linearisierten Plasmid erfolgte erneut für VL λ und VL κ separat. Je Isotyp wurden bei dem zweiten Klonierungsschritt 12 Ligationsreaktionen durchgeführt. Die generierten Plasmide wurden wieder in elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' eingebracht und amplifiziert. Insgesamt wurden somit pro Patient 24 scFv-Fragment-Subbibliotheken hergestellt (12x VH-VL λ und 12x VH-VL κ).

Vor der weiteren Verwendung der Immunbibliotheken sollten diese zunächst auf deren Qualität hin untersucht werden. Hierfür wurden von jeder Subbibliothek randomisiert 32 Bakterienklone gepickt und mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit beider Antikörpergene (VH und VL) überprüft (Abschnitt 3.4.6). Die Auswertung erfolgte erneut unter Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese. Bei einer vollständigen Integration eines VH- und VL-Gens sollte ein DNA-Fragment mit einer Größe von etwa 1100 Bp erhalten werden (Abbildung 4.11A). Kleinere Amplikons deuten daraufhin, dass entweder nur eines der beiden Antikörpergene (VH oder VL) in der Expressionskassette enthalten ist (~750 Bp) oder der Vektor gar kein Insert besitzt (~350 Bp). Jede Subbibliothek, die den kompletten Antikörpergensatz mit einer Insertionshäufigkeit von mindestens 90 % im Vektor integriert hat, wurde für die Herstellung einer großen scFv-Fragment-Immunbibliothek genutzt. Für den Patienten E1 konnten insgesamt 20 positive Subbibliotheken identifiziert werden, für den Patienten EC09 waren es 24, von dem Patienten EC26 wurden 20 der 24 Subbibliotheken weiter verwendet und bei dem Patienten MH04 waren es 16. Nach der Vereinigung der ausgewählten Subbibliotheken wurde die Größe der Patientenbibliotheken anhand der Anzahl transformierter Bakterien bestimmt. Die Zusammenführung erfolgte nach wie vor für jeden Patienten, sowie für VL λ und VL κ separat. Die ermittelten Bakterientiter variierten hierbei zwischen $2,1 \times 10^8$ (MH04 VL κ) und $3,2 \times 10^9$ Transformanden (E1 VL κ) (Tabelle 4.6).

Um in der Folge die Antikörperphagenbanken zu erzeugen, wurden die korrespondierenden Bakterienbibliotheken wie unter 3.5.1.2 beschrieben mit dem Helferphagen M13 KO7 Δ pIII (Hyperphage) infiziert. M13 KO7 Δ pIII-Phagen besitzen einen unvollständigen Replikationsursprung und sind daher verpackungsdefizient, zudem tragen sie auch eine Deletionsmutation im pIII-Protein (Hyperphage, 2017). Somit führt die Infektion mit einem Helferphagen zur Replikation einzelsträngiger Phagemid-DNA und zur Verpackung dieser in neue Phagenpartikel. Darüber hinaus werden Phagen produziert, die das scFv-Fragment

fusioniert mit dem pIII-Protein auf der Phagenoberfläche präsentieren. Die Verpackung der scFv::pIII-Fusionsproteine in die Hülle der produzierten rekombinanten Phagen wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Western Blot-Analyse kontrolliert (Abschnitt 3.3.6). Für das Fusionsprotein wurde hierbei eine Bande bei ca. 100 kDa erwartet, welche bei allen acht generierten Phagen-Bibliotheken eindeutig detektiert werden konnte (Abbildung 4.11B). Ebenso wurde eine Doppelbande leicht unterhalb von 100 kDa beobachtet und eine weitere Proteinbande bei ca. 55 kDa. Das Antikörpersignal auf der Höhe von 55 kDa wird durch Wildtyp pIII-Protein (pIII) in der Probe verursacht, während die Doppelbande auf scFv::pIII-Fusionsproteine hindeutet, die nur ein Antikörpergen (V_H oder V_L) in der Expressionskassette tragen. Es fällt auf, dass sich die Signalstärke dieser zusätzlichen Proteinkonstrukte in den Phagen-Bibliotheken stark zwischen den vier Patienten unterscheidet. Möglicherweise kann diese Beobachtung auf einen unzureichenden Restriktionsverdau bei den Patienten EC26 und MH04 zurückgeführt werden, wodurch ein größerer Anteil an Klonen erzeugt wurde, die nur eines der beiden Antikörpergene in den pHAL30 integriert haben oder bei denen der Expressionsvektor gar kein Insert trägt. Dennoch wurde festgestellt, dass alle generierten Phagen-Bibliotheken in der Lage sind das scFv::pIII-Fusionsprotein auf der Phagenoberfläche zu präsentieren. Die ermittelten Phagentiter der Bibliotheken variierten zwischen $1,21 \times 10^{11}$ (EC09 V_Lλ) und $1,06 \times 10^{13}$ pfu/mL (MH04 V_Lλ) (Tabelle 4.6).

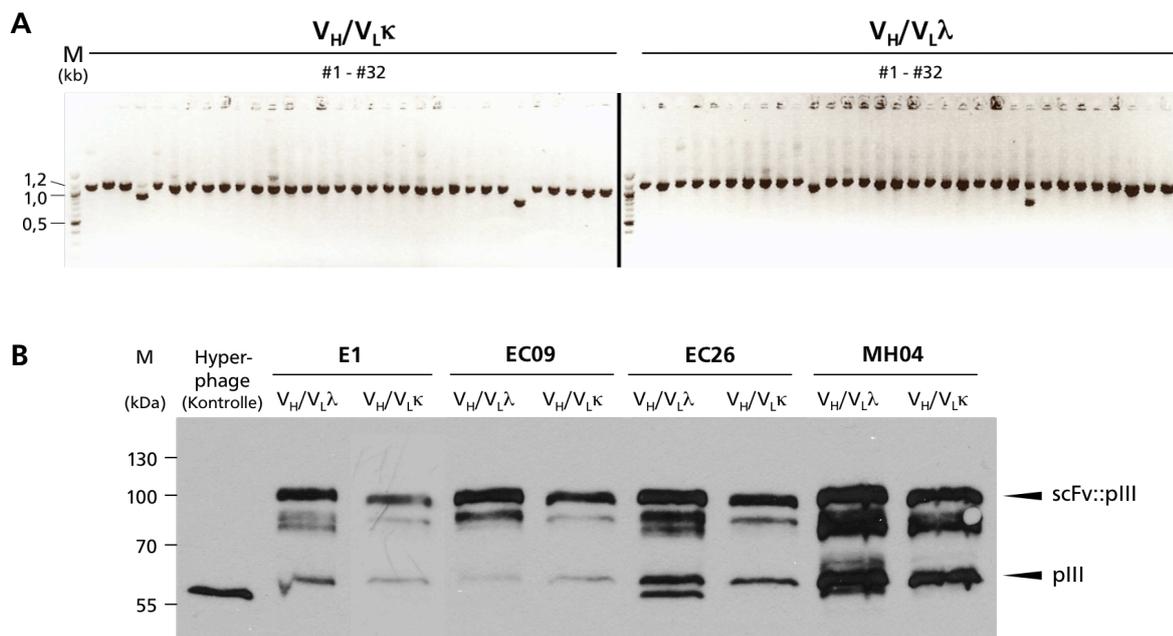


Abbildung 4.11 Qualitätskontrolle der generierten scFv-Phagenbibliotheken. (A) Zeigt das Kontrollgel der Kolonie-PCR von 32 randomisiert ausgewählten V_H/V_LK und V_H/V_Lλ Klonen einer Subbibliothek des Patienten EC09 nach der Transformation von elektrokompenten *E. coli* XL1-Blue MRF⁺. Die Proben wurden in ein 1,5-prozentiges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit EtBr. Als Längenstandard (M) wurden 0,5 µg des *Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ Ready-to-use 100bp* eingesetzt. (B) Nachweis der Expression von scFv::pIII-Fusionsproteinen aller konstruierten V_H/V_LK und V_H/V_Lλ-Phagenbibliotheken mittels Western Blot-Analyse. 1 µL jeder Phagenbibliothek wurde in ein 10-prozentiges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente Wildtyp pIII-Protein (Hyperphage). Die Proteine wurden mittels eines Anti-pIII Antikörpers und eines HRPgekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Als Größenstandard (M) wurden 5 µL des *ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 4.6 kDa – 300 kDa* eingesetzt.

Tabelle 4.6 Zusammenfassung der Anzahl isolierter Blutzellen, der cDNA-Ausbeuten sowie der Bakterien- und Phagentiter der einzelnen HIV-positiven Patienten im Zuge der Generation von scFv-Immunistibliotheken.

	E1		EC09		EC26		MH04	
# isolierter PBMCs	4 x 10 ⁷		5 x 10 ⁷		4 x 10 ⁷		5 x 10 ⁷	
cDNA-Ausbeute	23 µg		30 µg		24 µg		31 µg	
	V _H /V _L λ	V _H /V _L κ	V _H /V _L λ	V _H /V _L κ	V _H /V _L λ	V _H /V _L κ	V _H /V _L λ	V _H /V _L κ
Transformanden (x 10 ⁹)	2,0	3,2	2,0	1,7	1,2	1,7	0,41	0,21
Phagentiter (pfu/mL x 10 ¹²)	0,45	0,61	0,12	0,31	2,35	1,02	10,6	7,3

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ausgehend von Immunzellen HIV-positiver Patienten scFv-Fragment-Phagenbibliotheken hergestellt werden konnten. Die Antikörperfragmente, fusioniert an das pIII-Phagenhüllprotein werden zudem auf der Oberfläche rekombinanter Phagen dargestellt. Deshalb sollen die generierten Phagenbibliotheken der vier Patienten für die Selektion HIV-1 Env-spezifischer Antikörperfragmente verwendet werden.

4.1.5 Selektion HIV-1 Env-spezifischer scFv-Fragmente mittels Phagen-Display

Die Selektion HIV-1 Env-spezifischer scFv-Fragmente erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie (Abschnitt 3.5). Hierbei wurden für jeden Phagen-Display-Versuchsansatz (*Biopanning*) die VL λ und VL κ scFv-Immunistheken je Patient separat hergestellt und im Vorfeld der ersten Selektionsrunde zu gleichen Anteilen miteinander vereint (Abbildung 4.12).

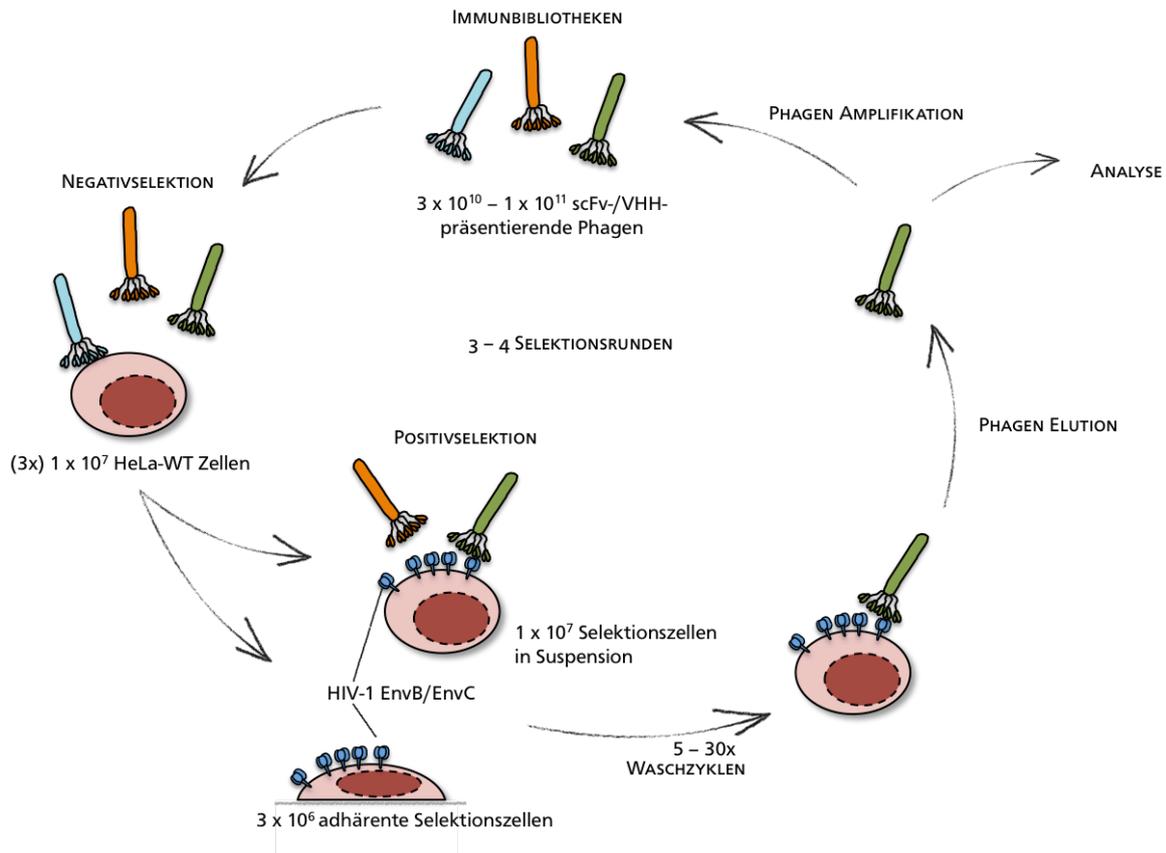


Abbildung 4.12 Schematische Darstellung der Phagen-Display-Strategie zur Selektion HIV-Env-spezifischer scFv-/VHH-Fragmente. Zu Beginn jeder Selektionsrunde wurden die eingesetzten Phagen der generierten Antikörperfragment-Immunistheken mit HeLa-WT-Zellen für 45 min bei RT oder 4 °C inkubiert. Dies diente der Eliminierung von Phagen die unspezifisch an Oberflächenstrukturen der HeLa-Zellen binden (Negativselektion). Die Negativselektion wurde während jeder Selektionsrunde insgesamt dreimal wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Positivselektion. Hierfür wurde der Überstand mit den übrig gebliebenen Phagen zusammen mit HeLa-EnvB oder – EnvC-Zellen (adhärent oder in Suspension), welche das virale Hüllprotein stabil auf der Zelloberfläche exprimieren, inkubiert. Die membranassoziierte HIV-1 Env-Expression der modifizierten HeLa-Zelllinien wurde stets vor jeder Positivselektion mittels Immunfärbung im Durchflusszytometer kontrolliert. Gebundene Phagen wurden in der Folge nach stringenten Waschzyklen mit 0,1 M Glycin pH 2,2 eluiert. Die anschließende Amplifikation und Titerbestimmung der selektierten Phagen erfolgte durch Reinfektion von *E. coli* TG-1-Zellen mit dem Phageneluat. Für weitere Selektionsrunden wurden die Phagemid-tragenden Bakterienkolonien mit dem Helferphagen M13K07 infiziert, um neue scFv-Fragment präsentierende Phagen zu generieren. Je *Biopanning* wurden 3 bis 4 Selektionsrunden durchgeführt und zwischen 176 und 352 zufällig ausgewählter Bakterienklone für die Analyse der monoklonalen Antikörperfragmente verwendet.

In einer ersten Versuchsreihe wurden pro Selektionsansatz (*Biopanning* #1, #2, #3) 1×10^{11} Phagen eingesetzt. Nach der Negativselektion wurden die Phagenüberstände mit 1×10^7 antigenpräsentierenden HeLa-Zellen für 30 min bei RT inkubiert, wobei die Selektionszellen als Suspensionskultur vorlagen. Die Positivselektion im *Biopanning* #1 erfolgte hierbei ausschließlich gegen das virale Hüllprotein des Subtyps B und im *Biopanning* #2 gegen das Env des Subtyps C, während im *Biopanning* #3 zweimal gegen HIV-EnvB und zweimal gegen HIV-EnvC selektioniert wurde. Insgesamt wurden je *Biopanning* vier Selektionsrunden durchgeführt. Nach jeder Positivselektion wurden die Zellen wie unter 3.5.2.2 beschrieben fünfmal mit kaltem Waschpuffer gespült, um ungebundene Phagen aus dem Überstand zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Elution gebundener Phagen mit 0,1 M Glycin (pH 2,2) sowie die Bestimmung der Anzahl eluierter Phagenklone als Kontrolle für einen erfolgreichen Anreicherungsprozess (Abschnitt 3.5.1.3). Hierbei entsprach die Menge gewachsener *E. coli* TG-1-Kolonien, welche zuvor mit den eluierten Phagen reinfiziert wurden, der Anzahl selektionierter Phagen.

Die Ergebnisse zeigen für die *Biopannings* #1 und #2, bei denen jeweils gegen ein Subtyp des HIV-Hüllproteins selektioniert wurde, über vier Selektionsrunden eine deutliche Anreicherung an eluierten Phagen. So konnte für das *Biopanning* #1 eine Zunahme an eluierten Phagenklonen von der ersten bis zur vierten Selektionsrunde um das 36-fache und für das *Biopanning* #2 um mehr als das 44-fache bestimmt werden. Im Gegensatz dazu weist der Versuchsansatz #3, bei dem beide HIV-Env-Subtypen sequentiell als Antigene für die Selektion spezifischer Phagen verwendet wurden, keine Anreicherung über den Selektionsprozess auf. Die Amplifikation eluierter Antikörperphagen über alle Selektionsrunden ist in der Abbildung 4.13 graphisch dargestellt. Zudem kann bei allen drei *Biopannings* ein Abfall des Phagentiters nach der zweiten Selektionsrunde beobachtet werden. Dieser Rückgang ist wahrscheinlich auf den Wechsel des Helferphagen zurückzuführen. Während für die initiale Herstellung der Antikörperphagenbibliotheken der Helferphage M13 K07 Δ pIII verwendet wurde, welcher das scFv-Fragment oligovalent auf der Phagenoberfläche präsentiert, erfolgte ab der zweiten Selektionsrunde die Verpackung neuer Phagenpartikel ausschließlich mittels des Helferphagen M13K07. Der M13K07-Phage exprimiert das scFv::pIII-Fusionsprotein monovalent auf der Phagenoberfläche. Dies hat zur Folge, dass aufgrund einer geringeren Avidität gegenüber dem Antigen die Anreicherung HIV-1 Env-spezifischer Phagen in der zweiten Selektionsrunde, im Vergleich zur ersten, erschwert ist (Rondot et al., 2001).

Im Anschluss an die vierte Selektionsrunde erfolgte die Analyse der Bindungsspezifität selektionierter scFv-Fragmente mittels zellbasiertem ELISA (Abschnitt 3.3.11). Hierfür wurden pro *Biopanning* zufällig 352 monoklonale *E. coli* TG-1-Klone gepickt und für die Herstellung von 96 Well-Stammpplatten verwendet (Abschnitt 3.1.5). Nach der Produktion löslicher scFv::pIII-Fusionsproteine im 96 Well-Plattenformat wurden die Antikörperfragmente mit adhärenen HeLa-EnvB bzw. -EnvC-Zellen inkubiert (Abschnitt 3.3.9). Der Nachweis gebundener scFv::pIII-Fusionsproteine erfolgte durch einen pIII-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Als Kontrolle für eine HIV-hüllproteinspezifische Antigenerkennung wurden die selektionierten Antikörperfragmente ebenso mit HeLa-WT-Zellen inkubiert. Die ermittelten Reaktivitäten selektionierter Env-spezifischer Antikörperfragmentklone sind in der Abbildung 4.18 zusammengefasst. Alle Klone die eine mindestens 2-fach stärkere Reaktivität

mit der jeweiligen Env-exprimierenden Zelllinie im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zeigten, wurden bei der Analyse der zufällig ausgewählten Bakterienklone als Hüllprotein-spezifisch deklariert. Die Ergebnisse der Analyse offenbarten, dass in keinem der durchgeführten *Biopannings* #1, #2 und #3 ein HIV-Env-spezifischer Antikörperklon selektiert werden konnte (Abbildung 4.13). Zudem wurde auch beobachtet, dass bei allen drei Versuchsansätzen eine Vielzahl an Phagenklonen angereichert wurde, welche unspezifisch mit den HeLa-Zellen wechselwirkten und keine Reaktivität im zellbasierten ELISA zeigten. Für das *Biopanning* #2 wurde zudem ein Anteil von 18 % falsch-positiver Binder ausgemacht (64 Klone), beim *Biopanning* #3 waren es 27 % (94 Klone) und beim *Biopanning* #1 wiesen sogar 34 % der analysierten Klone ein falsch-positives Signal im ELISA auf (121 Klone) (Abbildung 4.13).

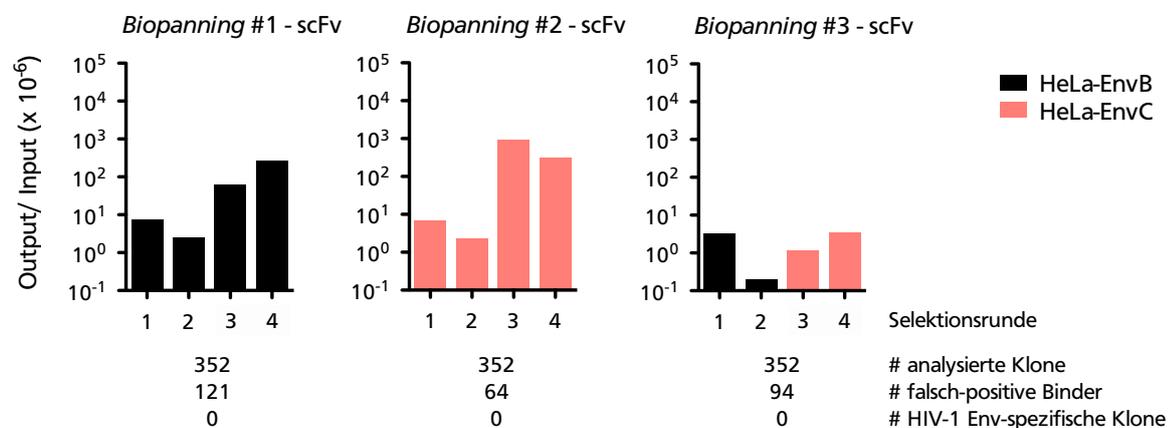


Abbildung 4.13 Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #1 - #3. Gezeigt ist das Verhältnis zurückgewonnener Phagen gegen die Anzahl eingesetzter Phagen nach jeder von insgesamt vier subtraktiven Selektionsrunden. Je Selektionsrunde und -ansatz (*Biopanning* #1 - #3) wurden 1×10^{11} Phagenpartikel der im Vorfeld vereinten scFv-Fragment-Bibliotheken aller vier LTNP's gegen 1×10^7 HeLa-EnvB (schwarz) oder HeLa-EnvC (rot) exprimierende Zellen in Suspension selektiert. Die Positivselektion erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an jede Positivselektion folgten 5 Waschzyklen. Die Anzahl eluierter Phagen wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Aufgrund des hohen Anteils falsch-positiver und unspezifischer Klone wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Stringenz des Selektionsprozesses erhöht. Durch eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl an Waschzyklen nach jeder Positivselektion (3/5/7/10), sollte die Anreicherung von Klonen, die mit irrelevanten Antigenen der HeLa-Zellen interagieren, reduziert werden. Darüber hinaus wurden die Env-exprimierenden HeLa-Zellen nach der Elution zusätzlich wie unter 3.5.2.3 beschrieben lysiert, um möglicherweise antigenspezifische internalisierte Phagen zurückzugewinnen. Ausgehend von 1×10^{11} Phagenpartikeln, wurden die Phagenüberstände nach der Negativselektion erneut mit 1×10^7 Env-exprimierenden HeLa-Zellen in Suspension für 30 min bei RT inkubiert. Bedingt durch die fehlende Phagen-Amplifikation über den gesamten Selektionsprozess im *Biopanning* #3 wurde in diesem Versuchsansatz ausschließlich gegen das HIV-1 EnvB (*Biopanning* #4) oder das HIV-1 EnvC (*Biopanning* #5) separat selektiert.

Für beide *Biopannings* konnte nach vier Selektionsrunden, wie in Abbildung 4.14 sichtbar, eine eindeutige Anreicherung eluierter Phagen nachgewiesen werden. Die Anzahl angereicherter Antikörperphagen stieg beim *Biopanning* #4 von Selektionsrunde eins bis vier um das 250-fache und beim *Biopanning* #5 um mehr als das 1000-fache. Im Anschluss an die vierte Positivselektion erfolgte die Analyse der Bindungsspezifität von 352 zufällig gepickten Bakterienklonen wiederholt mittels zellbasiertem ELISA. Hierbei fiel besonders auf, dass der Anteil falsch-positiver Klone bei den *Biopannings* #4 (25 %) und #5 (7 %) im Vergleich zu den *Biopannings* #1 und #2 um 28 % bzw. 62 % geringer war. Es konnten zudem im *Biopanning* #4 zwei scFv-Klone identifiziert werden, die eine spezifische Bindung an das virale Hüllprotein des Subtyps B zeigten (Abbildung 4.18). Im Gegensatz dazu wurde im *Biopanning* #5 kein antigenspezifischer Klon selektioniert.

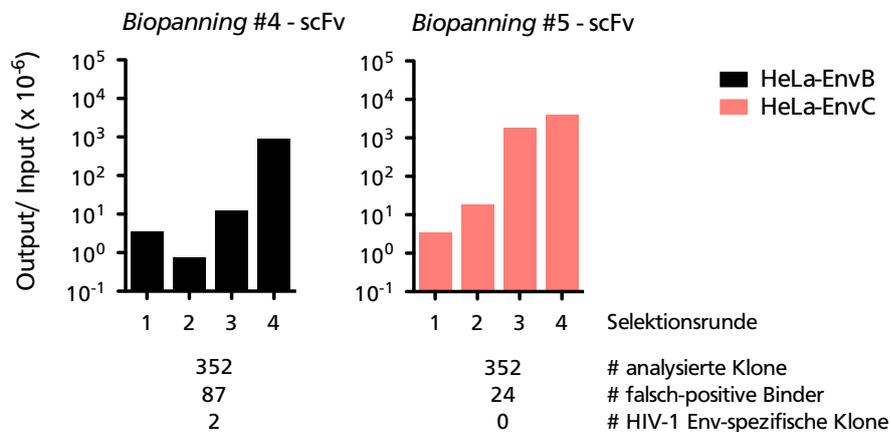
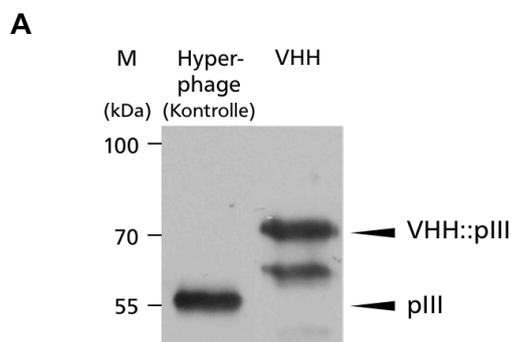


Abbildung 4.14 Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #4 und #5. Gezeigt ist das Verhältnis zurückgewonnener Phagen gegen die Anzahl eingesetzter Phagen nach jeder von insgesamt vier subtraktiven Selektionsrunden. Je Selektionsrunde und -ansatz (*Biopanning* #4 & #5) wurden 1×10^{11} Phagenpartikel der im Vorfeld vereinten scFv-Fragment-Bibliotheken aller vier LTNP's gegen 1×10^7 HeLa-EnvB (schwarz) oder HeLa-EnvC (rot) exprimierende Zellen in Suspension selektioniert. Die Positivselektion (PS) erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der 1. PS wurden die HeLa-Env Zellen 3-mal gewaschen, nach der 2. PS 5-mal, nach der 3. PS 7-mal und nach der 4. PS 10-mal. Die Anzahl eluierter Phagen wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Als Konsequenz aus der geringen Selektionsausbeute HIV-Env-spezifischer scFv-Fragmente sollte in einer dritten Versuchsreihe die Funktionalität der zellbasierten Selektionsstrategie bestätigt werden. Hierfür wurde zusätzlich zu den HIV-patientenabgeleiteten Immunbibliotheken eine VHH (*variable domain of the heavy chain of the hcAb*)-Phagenbibliothek verwendet (Koch, 2017A). Der Einsatz dieser Immunbibliothek beruhte darauf, dass die Generierung der VHHs aus dem Antikörperrepertoire von Dromedaren erfolgte, welche zuvor mit einer löslichen Variante des genetisch identischen EnvC-Klons immunisiert wurden, der auch in der vorliegenden Arbeit als Antigen genutzt wurde. Darüber hinaus konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Selektion der VHH-Phagenbibliothek gegen das autologe Immunogen zur Identifikation HIV-1 neutralisierender VHHs geführt hat (Koch et al., 2017B). Die Herstellung der VHH-Phagenbank erfolgte ebenfalls unter Verwendung des

Helferphagen M13 K07ΔpIII (Abschnitt 3.5.1.2). Hierbei wurde ein Phagentiter von 4×10^{12} pfu/mL bestimmt. Die Integration der VHH::pIII-Fusionsproteine in die Phagenoberfläche wurde zudem mit Hilfe der Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abschnitt 3.3.6). Wie das Ergebnis in Abbildung 4.15A zeigt, konnten zwei Proteinbanden detektiert werden. Eine erwartete Bande bei etwa 70 kDa, die dem VHH::pIII-Fusionsprotein entspricht und eine weitere bei ca. 55 kDa, welche durch Wildtyp pIII in der Probe hervorgerufen wird.

Gestartet wurde erneut mit 1×10^{11} Phagen pro Antikörperfragment-Bibliothek. Die Positivselektion der scFv-Phagenbank erfolgte jeweils separat gegen 1×10^7 HIV-EnvB- (*Biopanning* #6) oder HIV-EnvC-Zellen (*Biopanning* #7), während die VHH-tragenden Phagen ausschließlich gegen das autologe Antigen, das HIV-Hüllprotein des Subtyps C selektioniert wurden (*Biopanning* #8). Zudem wurde die Positivselektion in diesem Versuchsansatz für 4 h bei 4 °C durchgeführt, mit dem Ziel den Anteil selektionierter Klone, die eine unspezifische Wechselwirkung mit den HeLa-Zellen zeigten, weiter zu reduzieren. Aufgrund der starken Anreicherung eluierter Phagen in allen drei *Biopannings* erfolgte die Bestimmung der Bindungsspezifität bereits nach drei Selektionsrunden (Abbildung 4.15B). Je Versuchsansatz wurden hierfür 176 *E. coli* TG-1-Klone gepickt. Dabei konnte für das *Biopanning* #8 mit der VHH-Phagenbank 13 positive Klone selektioniert werden, welche alle eine antigenspezifische Interaktion zeigten (Abbildung 4.18). Ebenso wurde für das *Biopanning* #6 festgestellt, dass 9 von 72 positiven Klonen eine Env-spezifische Bindung aufwiesen (Abbildung 4.18). Die Selektion der scFv-Phagenbibliothek gegen das HIV-EnvC führte hingegen zu keiner Anreicherung hüllproteinspezifischer Phagen (Abbildung 4.15B). Darüber hinaus wurde auch beobachtet, dass die Temperaturänderung während der Positivselektion von RT auf 4 °C einen leicht positiven Einfluss auf die Bindungsspezifität hatte. So war der Anteil unspezifischer Phagenklone beim *Biopanning* #6 um 21 % und beim *Biopanning* #7 um 17 % geringer als bei den vorherigen *Biopannings* #4 und #5. Zudem konnte anhand des Selektionsergebnisses der etablierten VHH-Phagenbibliothek mit dem autologen Antigen gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Anreicherung HIV-1 Env-spezifischer Antikörperphagen mit der gewählten Strategie möglich ist.



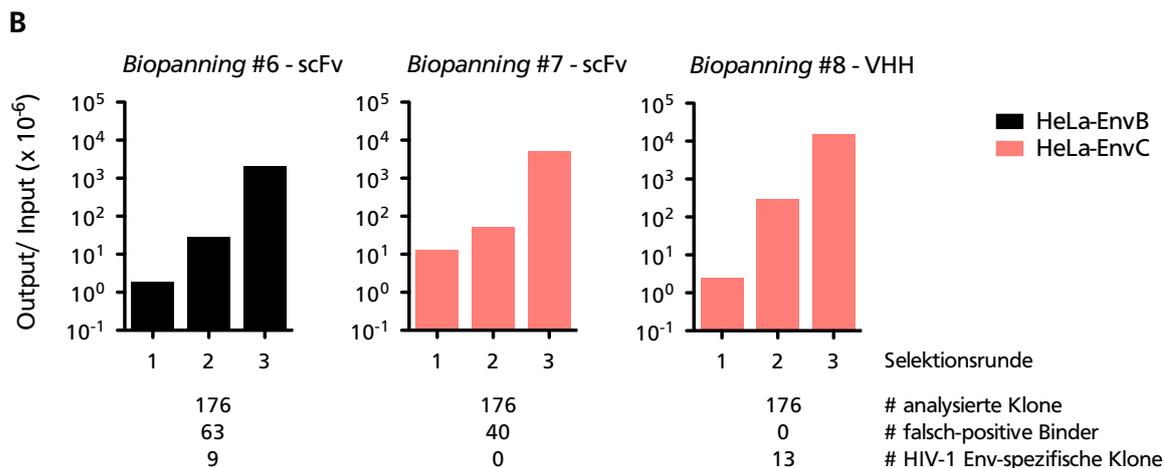


Abbildung 4.15 Qualitätskontrolle der VHH-Phagenbibliothek und Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #6 - #8. (A) Nachweis der Expression von VHH::pIII-Fusionsproteinen der VHH-Immunistrautheek mittels Western Blot-Analyse. 1 μL der Phagenbank wurde in ein 10-prozentiges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente Wildtyp pIII-Protein (Hyperphage). Die Proteine wurden mittels eines Anti-pIII Antikörpers und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Als Größenstandard (M) wurden 5 μL des *ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 4.6 kDa – 300 kDa* eingesetzt. (B) Gezeigt ist das Verhältnis zurückgewonnener Phagen gegen die Anzahl eingesetzter Phagen nach jeder von insgesamt drei subtraktiven Selektionsrunden. Je Selektionsrunde wurden 1×10^{11} Phagenpartikel der im Vorfeld vereinten scFv-Fragment-Bibliotheken aller vier LTNP (Biopanning #6 & #7) oder der VHH-Phagenbank (Biopanning #8) gegen 1×10^7 HeLa-EnvB (schwarz) oder HeLa-EnvC (rot) exprimierende Zellen in Suspension selektioniert. Die Positivselektion (PS) erfolgte für 4 h bei 4 °C. Nach der 1. PS wurden die HeLa-Env Zellen 3-mal, nach der 2. PS 5-mal und nach der 3. PS 7-mal gewaschen. Die Anzahl eluierter Phagen wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Im Rahmen einer vierten Versuchsreihe wurde die Stringenz des Selektionsprozesses wiederholt gesteigert, um die Bindungsspezifität selektionierter Phagen weiter zu verbessern. Dies erfolgte erneut durch eine drastische Erhöhung der Anzahl an Waschzyklen am Ende jeder Selektionsrunde (10/20/30). Hierfür wurden 1×10^{11} scFv-Phagen nach der Negativselektion mit 1×10^7 HIV-EnvB (Biopanning #9) oder EnvC (Biopanning #10) exprimierenden HeLa-Zellen für 4 h bei 4 °C inkubiert. Die Analyse der Bindungseigenschaften von jeweils 176 monoklonalen Bakterienklonen erfolgte bei beiden Biopannings in Abhängigkeit von der Anreicherung eluierter Phagen im Anschluss an die dritte Selektionsrunde (Abbildung 4.16). Dabei zeigte sich, dass die zusätzliche Intensivierung der Waschzyklen zu einer deutlichen Zunahme in der Selektion HIV-1 Env-spezifischer Antikörperphagen führte. So wurden für das Biopanning #9 20 antigenspezifische Klone identifiziert. Ähnlich markant ist das Ergebnis beim Biopanning #10 ausgefallen. Bei diesem zeigten 19 Klone eine spezifische Bindung an die HeLa-EnvC-Zellen (Abbildung 4.18). Neben dem starken Anstieg selektionierter antigenspezifischer Phagenklone, konnte ebenso eine deutliche Reduktion an falsch-positiven Antikörperphagen in beiden Versuchansätzen beobachtet werden. Der Anteil falsch-positiver Klone betrug beim Biopanning #9 nach drei Selektionsrunden etwa 5 % und beim Biopanning #10 weniger als 1 % (Abbildung 4.16). Im Vergleich zu den Biopannings #6 und #7, bedeutet das einen Rückgang von 87 % bzw. 97 %.

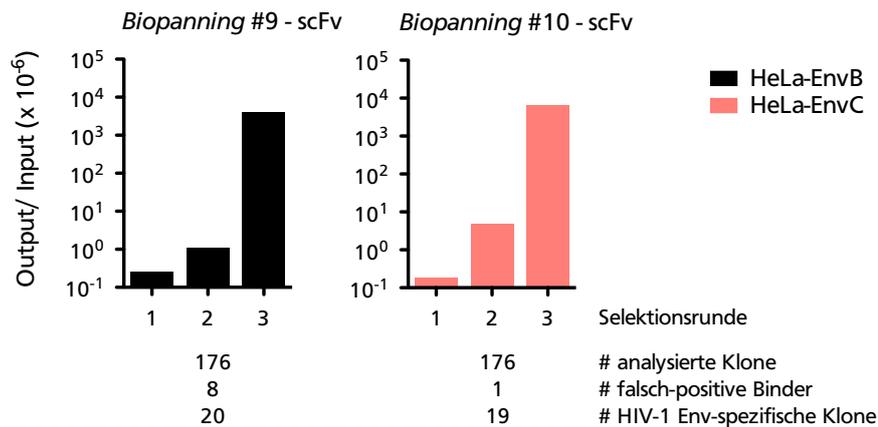


Abbildung 4.16 Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #9 und #10. Gezeigt ist das Verhältnis zurückgewonnener Phagen im Verhältnis zu der Anzahl eingesetzter Phagen nach jeder von insgesamt drei subtraktiven Selektionsrunden. Je Selektionsrunde und -ansatz (*Biopanning* #9 & #10) wurden 1×10^{11} Phagenpartikel der im Vorfeld vereinten scFv-Fragment-Bibliotheken aller vier LTNP's gegen 1×10^7 HeLa-EnvB (schwarz) oder HeLa-EnvC (rot) exprimierende Zellen in Suspension selektioniert. Die Positivselektion (PS) erfolgte für 4 h bei 4 °C. Nach der 1. PS wurden die HeLa-Env Zellen 10-mal, nach der 2. PS 20-mal und nach der 3. PS 30-mal gewaschen. Die Anzahl eluierter Phagen wurde mittels einer Verdünnungsreihe im Plaque assay bestimmt.

Abschließend sollte in einem fünften Phagen-Display-Versuchsansatz überprüft werden, ob eine nativere Zellmorphologie der antigenpräsentierenden Zelllinien die Anreicherung HIV-1 hüllproteinspezifischer scFv-Phagen beeinflusst. Daher erfolgte in diesem Versuchsansatz die Positivselektion unter Verwendung adhärenter HeLa-Zellen. Je *Biopanning* wurden hierbei 3×10^{10} scFv-Phagen (#11 EnvB; #12 EnvC) oder VHH-Phagenpartikel (#13 EnvC) eingesetzt. Nach der Negativselektion mit HeLa-WT-Zellen in Suspension, wurden die Phagenüberstände mit 3×10^6 adhärenter HeLa-EnvB bzw. EnvC-Zellen für 4 h bei 4 °C inkubiert (Abschnitt 3.5.2.2). Im Anschluss an jede Positivselektion folgten 5 Waschzyklen. Aufgrund sich ablösender Zellen war ein intensiveres Spülen nicht möglich. Am Ende der vierten Selektionsrunde wurden je *Biopanning* 264 Bakterienklone für die Bestimmung der Bindungsspezifität mittels zellbasiertem ELISA ausgewählt. Hierbei fällt auf, dass die Anreicherung von Antikörperphagen zwischen den Versuchsansätzen stark variierte (Abbildung 4.17). Während für das *Biopanning* #12 von der ersten bis zur vierten Selektionsrunde die eluierten Phagen um das 99-fache zunahm, konnte im *Biopanning* #13 eine Anreicherung um mehr als das 2000-fache beobachtet werden. Das *Biopanning* #11 zeigte hingegen gar keinen Anstieg in der Zahl eluierter Phagen im Laufe des Selektionsprozesses. Darüber hinaus wurde ebenso festgestellt, dass in keinem der durchgeführten *Biopannings* ein HIV-Env-spezifischer Antikörperklon selektioniert werden konnte (Abbildung 4.18). Somit legt dieses Ergebnis die Vermutung nahe, dass die Selektionseffizienz durch eine Präsentation des Antigens auf der Oberfläche adhärenter HeLa-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen in Suspension nicht erhöht ist.

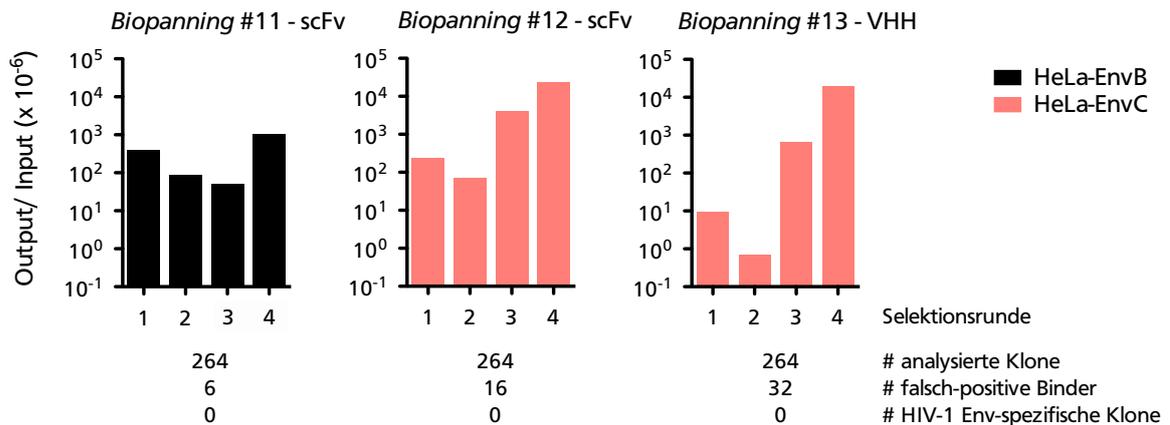


Abbildung 4.17 Analyse der Anreicherung selektionierter Phagen gegen HIV-Env exprimierende HeLa-Zellen der Selektionsansätze #11 - #13. Gezeigt ist das Verhältnis zurückgewonnener Phagen im Verhältnis zu der Anzahl eingesetzter Phagen nach jeder von insgesamt vier subtraktiven Selektionsrunden. Je Selektionsrunde wurden 3×10^{10} Phagenpartikel der im Vorfeld vereinten scFv-Fragment-Bibliotheken aller vier LTNPs (*Biopanning* #11 & #12) oder der VHH-Phagenbank (*Biopanning* #13) gegen 3×10^6 adhärenente HeLa-EnvB (schwarz) oder HeLa-EnvC (rot) exprimierende Zellen selektioniert. Die Positivselektion (PS) erfolgte für 4 h bei 4 °C. Im Anschluss an jede Positivselektion folgten 5 Waschzyklen. Die Anzahl eluierter Phagen wurde mittels einer Verdünnungsreihe im Plaque-Assay bestimmt.

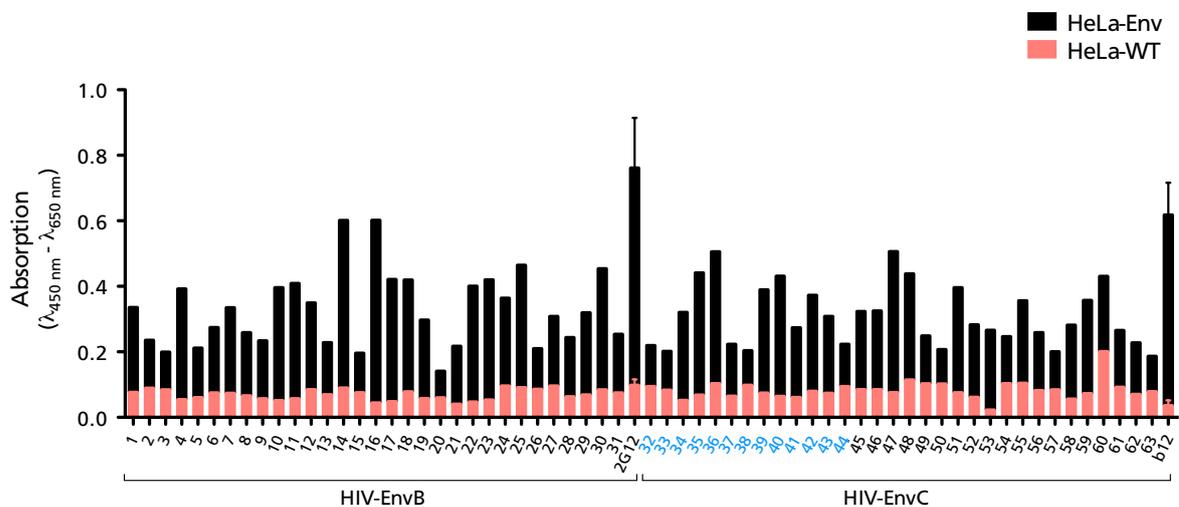


Abbildung 4.18 Nachweis der HIV-1 Env-Spezifität selektionierter Antikörperfragmentphagen. Dargestellt ist die Reaktivität der 63 selektionierten Hüllprotein-spezifischen scFv- (schwarz) und VHH-Klone (blau) mit HIV-Env exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-Env, schwarz) und Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT, rot). Der Nachweis einer Env-spezifischen Bindung, durch die selektionierten scFv-/ VHH-pIII-Klone (Primärantikörper), erfolgte mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers im zellbasierten ELISA. Die Klone 1 & 2 entstammen dem *Biopanning* #4, die Klone 3 - 11 dem *Biopanning* #6, die Klone 12 - 31 dem *Biopanning* #9, die Klone 32 - 44 dem *Biopanning* #8 und die Klone 45 - 63 wurden im *Biopanning* #10 selektioniert. Alle randomisiert ausgewählten Antikörperklone, die eine mindestens doppelt so starke Reaktivität mit der entsprechenden Env-Zelllinie im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zeigten, wurden als Hüllprotein-spezifisch deklariert. Die Env-Expression auf den HeLa-Zellen wurde anhand der mAb 2G12 (HIV-EnvB) und b12 (HIV-EnvC) kontrolliert. Die Fehlerbalken der Kontrollen (2G12 und b12) entsprechen den Standardabweichungen von Duplikaten aus fünf unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ausgehend von einer scFv- und einer VHH-Immunistothek in 13 Phagen-Display-Versuchsansätzen insgesamt 3432 Bakterienklone bezüglich ihrer HIV-1 Env-Spezifität analysiert wurden. Für 63 dieser Antikörperklone konnte eine antigenspezifische Reaktivität mittels zellbasiertem ELISA nachgewiesen werden (Abbildung 4.18). Etwa 80 % der positiven Klone (50 Klone) wurden hierbei aus der Patienten-abgeleiteten scFv-Phagen-Bibliothek selektioniert, wovon 31 Klone eine HIV-1 EnvB- und 19 Klone eine HIV-1 EnvC-Spezifität aufzeigten. Interessant ist zudem, dass 96 % der positiven scFv-Phagen (48 Klone) bei 4 °C selektioniert wurden. Aus der VHH-Phagenbank konnten ebenfalls 13 HIV-EnvC spezifische Klone bei 4 °C selektioniert werden.

4.1.6 Sequenzanalyse der HIV-1 Env-spezifischen Antikörperfragmentklone

Zur Bestimmung der Aminosäureabfolge der selektionierten Antikörperfragmente wurden alle 63 HIV-Hüllprotein-spezifischen Antikörperklone im Anschluss an die Selektion sequenziert (Abschnitt 3.4.10). Bei dem anschließenden Sequenzabgleich konnten für die scFv-Klone drei unterschiedliche Sequenzen identifiziert werden. Zwei der Klone (scFv#1 und scFv#2) stammten aus dem Pool HIV-EnvB spezifischer Antikörperphagen, während der dritte Klon (scFv#3) gegen das virale Hüllprotein des Subtyps C selektioniert wurde (Tabelle 4.7). Die Sequenzen der Klone scFv#1 und scFv#3 sind hierbei insgesamt je 19-mal aufgetreten. Die Sequenz des Klons scFv#2 wurde einmal ermittelt. Für die selektionierten VHH-Klone konnten zwei unterschiedliche Sequenzen ausgemacht werden, wobei der Klon VHH#1 fünfmal bei der Sequenzanalyse auftauchte und der Klon VHH#2 sechsmal (Tabelle 4.7). Die Länge der HCDR3-Domäne der fünf Klone variierte hierbei zwischen 6 (scFv#2) und 19 Aminosäuren (VHH#2; Tabelle 4.7). Bei genauerer Betrachtung fällt außerdem auf, dass alle Klone mit identischen Aminosäuresequenzen jeweils aus demselben Selektionsansatz stammten. Für die 13 übrigen Klone konnten entweder aufgrund wiederholter Sequenzabbrüche keine Aminosäuresequenzen bestimmt werden oder die Ergebnisse der Sequenzierung offenbarten die Integration unvollständiger Antikörpergene in den Phagemid-Vektor.

Tabelle 4.7 Übersicht der selektionierten HIV-1 Env-spezifischen Antikörperfragmente. Gezeigt ist der Selektionsansatz (*Biopanning* #) und die Häufigkeit der selektionierten Klone. Zudem sind ebenfalls die Aminosäuresequenzen und Längen (AS) der komplementaritätsbestimmenden Regionen 1, 2 und 3 (CDR1 – 3) der schweren (V_H) und leichten (V_L) Antikörperkette dargestellt.

Antikörperklon (<i>Biopanning</i> #/ Häufigkeit)			CDR1 (AS)	CDR2 (AS)	CDR3 (AS)
scFv#1	(#9/ 19)	V_H	SGYDFSTSW (9)	IYPEDSETAYSPSFQGH (17)	MVGTYQSDRSGGTDAFD (17)
		$V_{L\kappa}$	GSSSNIGSNY (10)	RNNQRPSGVPDR (12)	WDDSLHV (7)
scFv#2	(#6/ 1)	V_H	FSSYA (5)	ISTRGRITQYADSVKGR (17)	RALRFD (6)
		$V_{L\lambda}$	ASQSISSY (8)	TASRLQSGVPSR (12)	TLRFPA (6)
scFv#3	(#10/ 19)	V_H	SGGTFIDYA (9)	IIPRVGTPNYAQKFQGR (17)	DGDDSDH (7)
		$V_{L\kappa}$	GSSSNIGAGYD (11)	GNSNRPSGVPDR (12)	YDSSLSGV (8)
VHH#1	(#8/ 5)		GFTFSNYA (7)	INSGGQST (8)	AARRDSGNY (9)
VHH#2	(#8/ 6)		GFTTTSYSTC (11)	INAKGSTL (8)	AADVYRGGYCSAYAGRFSY (19)

4.1.7 Kopplung der scFv- und VHH-Fragmente an eine humane IgG1 Fc-Domäne

Vor der weiteren Charakterisierung der Bindungs- und Neutralisationseigenschaften der selektionierten Antikörperfragmente wurden die scFv- und VHH-Klone mit dem kristallisierbaren Fragment (Fc) eines humanen Immunglobulin G Subtyp 1 (IgG1) fusioniert (Abbildung 4.19A). Das Ziel der Reformatierung bestand vorrangig darin, die Anzahl antigenbindender Einheiten pro Antikörpermolekül zu erhöhen. Durch die gesteigerte Avidität des Antikörperkonstrukts gegenüber dem HIV-1 Hüllprotein sollte eine Verstärkung der HIV-Neutralisationsaktivität der selektionierten Klone erreicht werden. Unter therapeutischen Aspekten führt die Kopplung der Antikörperfragmente mit einer IgG Fc-Domäne zudem zu einer erheblichen Erhöhung des Molekulargewichts und somit auch zu einer verlängerten Serumhalbwertszeit des Antikörpers (Ryman & Meibohm, 2017). Darüber hinaus ist der Fc-Teil des humanen IgG1 selbst immunregulatorisch aktiv, wie bspw. bei der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder der komplementabhängigen Toxizität (CDC) und bietet dadurch neben der Neutralisation noch einen zusätzlichen potentiellen therapeutischen Effekt (Vidarsson et al., 2014).

Die Dimerisierung der Antikörperfragmente erfolgte in dieser Arbeit unter Verwendung eines pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Expressionsvektors, welcher strangabwärts zur MCS (engl. *Multiple Cloning Site*) für die *hinge*-Region und das Fc-Fragment eines humanen IgG1 kodiert. Hierfür wurden die Gene der Antikörperklone zunächst mittels der Restriktionsenzyme NcoI und NotI von dem Phagemid pHAL30 in den pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Vektor umklontiert (Abschnitt 3.4.1). Im Anschluss daran erfolgte die *in vitro* Produktion der generierten scFv- bzw. VHH-Fc-Konstrukte in HEK-293T-Zellen. Die HEK-293T-Zellen wurden wie unter 3.1.8 beschrieben 24 h nach der Aussaat transient mit 10 μ g Plasmid-DNA kodierend für einen Antikörperklon transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen und abgelöste Zellen durch Zentrifugation entfernt. Die monoklonalen Antikörperkonstrukte wurden in der Folge mit Hilfe von Protein A aus den Zellüberständen weiter chromatographisch aufgereinigt (Abschnitt 3.3.1). Durchschnittlich konnten hierbei

Ausbeuten von etwa 0,6 mg Protein pro 100 mL Zellkulturüberstand gewonnen werden. Der Nachweis produzierter scFv- und VHH-Fc-Antikörper erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen mit anschließender Comassie-Färbung und Western Blot-Analyse (Abschnitt 3.3.5 und 3.3.6). Beide Ergebnisse sind in der Abbildung 4.19B dargestellt. Hierbei wurde festgestellt, dass die erhaltenen Proteinbanden aller fünf Antikörperklone etwa auf Höhe der erwarteten Molekülgrößen detektiert werden konnten, welche anhand der theoretischen Molekülmassen für die dimeren Formen der Fc-Konstrukte ermittelt wurden. Die Berechnung der molekularen Massen mithilfe des *ExpASy Compute pI/Mw Tools* ergab für den Klon scFv#1-Fc 114 kDa, für den scFv#2-Fc 107 kDa, für den scFv#3-Fc 111 kDa, für das VHH#1-Fc-Konstrukt 79 kDa und für das VHH#2-Fc-Konstrukt 83 kDa. Die leichte Verschiebung des Laufverhaltens aller Proteinbanden in Richtung höherer Molekülmassen ist wahrscheinlich auf eine Glykosylierung des Fc-Fragments zurückzuführen. Unter Verwendung des *NetNGlyc 1.0* und *NetOGlyc 4.0 Servers* wurden sowohl potentielle N- als auch O-Glykosylierungsstellen innerhalb der humanen Fc-Domäne vorhergesagt (Steentoft et al., 2013). Das Resultat der Western Blot-Analyse bestätigt zudem, dass es sich bei den erhaltenen Proteinsignalen um die fusionierten scFv- bzw. VHH-Fc-Antikörper handelt. Darüber hinaus konnte aufgrund der Detektion von jeweils nur einer Proteinbande in alle fünf Proben ebenso belegt werden, dass einerseits die Proteinaufreinigung effizient funktioniert hat und andererseits die Antikörperkonstrukte keine Degradation aufwiesen.

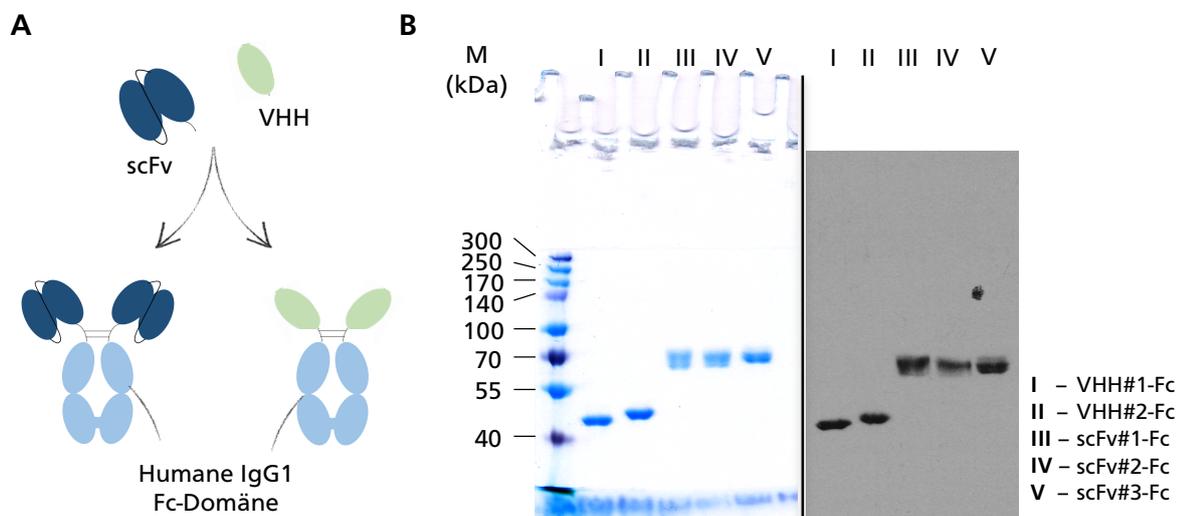


Abbildung 4.19 Qualitätskontrolle der HIV-1 spezifischen Antikörperfragmente, reformatiert an eine Fc-Domäne eines humanen IgG1. (A) Schematische Darstellung der generierten scFv- und VHH-Fc-Konstrukte durch die Umklonierung der Antikörperfragmente in den pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Vektor und Expression in HEK-293T-Zellen (B) Nachweis der exprimierten Fc-Fusionsproteine der fünf selektionierten, Env-spezifischen Antikörperfragmente mittels SDS-PAGE (I – V). 2 µg jedes Fc-Konstrukts wurden nach der Protein A-Aufreinigung in ein 10-prozentiges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden einerseits unspezifisch durch die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau R250 sichtbar gemacht (links) und spezifisch mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Western Blot-Analyse nachgewiesen (rechts). Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Als Größenstandard (M) wurden 5 µL des *ProSieve™ QuadColor™ protein marker*, 4.6 kDa – 300 kDa eingesetzt.

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass alle fünf selektionierten scFv- und VHH-Fragmente für die weitere Charakterisierung erfolgreich mit der Fc-Domäne eines humanen Immunglobulin G1 fusioniert und in HEK-293T-Zellen produziert werden konnten.

4.1.8 Bestimmung der *in vitro* Neutralisationsaktivität der selektionierten Antikörperklone

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Identifikation HIV-1 breit neutralisierender Antikörper und Antikörperfragmente gerichtet ist, wurde als nächstes untersucht, ob die selektionierten und reformatierten Antikörperfragmentklone HIV-1 Pseudoviren neutralisieren können (Abschnitt 1.6.2). Zu diesem Zweck wurden in einer ersten Neutralisationsstudie Virusisolate eingesetzt, die entweder das für die Selektion verwendete HIV-Hüllprotein des Subtyps C (HIV-pAncCgp160-opt) oder neutralisationssensitive Env-Varianten des Subtyps B (HIV-Bal26, HIV-SF162.LS, HIV-SS1196.1, alle Tier 1) auf der Partikeloberfläche präsentierten. Die Bestimmung der Neutralisationsaktivität der Antikörperkonstrukte erfolgte mit Hilfe eines *in vitro* Neutralisations-Assays (Abschnitt 3.1.11). Hierbei wurde jeweils die mittlere inhibitorische Antikörperkonzentration (IC_{50}), bei der 50 % der HIV-Pseudoviren neutralisiert werden, ermittelt. Die Antikörperkonstrukte wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 90 min bei 37 °C mit den Virusisolaten inkubiert und nachfolgend für 48 h bei 37 °C mit TZM-bl-Reporterzellen kokultiviert. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Virus-vermittelten Luciferase-Expression mittels eines Luminometers. Die erhaltenen IC_{50} -Werte der scFv- und VHH-Fc-Klone für jedes getestete pseudotypisierte HI-Virusisolat sind in der Tabelle 4.8 dargestellt. Hierbei wurde beobachtet, dass die drei Antikörperkonstrukte scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc verschiedene HIV-1 Pseudoviren neutralisieren konnten. Der Klon scFv#1-Fc, welcher gegen die HIV-EnvB-Zellen selektioniert wurde, war in der Lage alle Tier 1 Virusisolate des Subtyps B (HIV-Bal26, HIV-SF162.LS, HIV-SS1196.1) mit einer IC_{50} von 0,67 – 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu neutralisieren, zeigte aber keine Neutralisationsaktivität gegenüber dem Subtyp C-Pseudovirus ($IC_{50} > 25 \mu\text{g}/\text{mL}$). Im Gegensatz dazu konnten die Antikörperfragmentklone scFv#3-Fc und VHH#2-Fc, die auf HIV-EnvC exprimierenden Zellen angereichert wurden, das HIV-pAncCgp160-opt-Isolat (Subtyp C) neutralisieren, wobei das VHH#2-Fc mit einer IC_{50} von unter 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Vergleich zum scFv#3-Fc (IC_{50} 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) die deutlich stärkere Neutralisationsaktivität der beiden Klone aufzeigte. Zudem war das VHH#2-Fc ebenso in der Lage, das Pseudovirus HIV-SF162.LS (Subtyp B) mit einer niedrigen IC_{50} von unter 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu neutralisieren. Der Klon scFv#3-Fc zeigte auch Neutralisationsaktivität gegen ein Subtyp B-Virusisolat (HIV-SS1196.1), allerdings mit einer wesentlich höheren IC_{50} (IC_{50} 13,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Für die Antikörperkonstrukte scFv#2-Fc und VHH#1-Fc konnte hingegen keine Neutralisationsaktivität gegen die Tier 1 Subtyp B-Pseudoviren oder das HIV-pAncCgp160-opt-Isolat (Subtyp C) nachgewiesen werden. Beide Klone zeigten bei sehr hohen Antikörperkonzentrationen von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keine Inhibition der Virusinfektion. Insgesamt waren drei der fünf selektionierten Antikörperkonstrukte (scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc) in der Lage 50 – 75 % der getesteten pseudotypisierten HIV-1 Viren zu neutralisieren. Der Klon VHH#2-Fc zeigte hierbei die

stärkste Neutralisationspotenz, während für den Klon scFv#1-Fc die größte Neutralisationsbreite ausgemacht werden konnte, wobei drei der vier getesteten Virusisolate vom HIV-1 Subtyp B stammten und nur eines vom Subtyp C (Abschnitt 1.6.2). Darüber hinaus wurde auch festgestellt, dass die selektionierten Antikörperklone scFv#2-Fc und VHH#1-Fc keine Neutralisationsaktivität gegen die HI-Viren aufwiesen.

Tabelle 4.8 Charakterisierung der *in vitro* Neutralisationsaktivität der fünf selektionierten Antikörperfragmente gegen Tier1 bzw. autologe HIV-1 Pseudoviren. Aufgeführt sind die IC₅₀-Werte (µg/mL) für jedes scFv-/ VHH-Fc-Konstrukt gegen das jeweilige Pseudovirusisolat, ermittelt in standardisierten TZM-bl-Reporterzellassays. Die IC₅₀-Werte sind farbkodiert dargestellt: < 0,2 µg/mL (rot), 0,2 – 2 µg/mL (orange), 2 -25 µg/mL (gelb), >25 µg/mL (farblos). Je HI-Virusklon und Antikörperfragment wurden zwei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt.

HIV-1 Pseudovirus	Subtyp	Tier	scFv#1-Fc	scFv#2-Fc	scFv#3-Fc	VHH#1-Fc	VHH#2-Fc
HIV-Bal.26	B	1	1,8	>25	>25	>25	>25
HIV-SF162.LS	B	1	0,67	>25	>25	>25	<0,2
HIV-SS1196.1	B	1	1,3	>25	13,1	>25	>25
HIV-pAncCgp160-opt	C	2	>25	>25	1,9	>25	<0,2
Anzahl neutralisierter HI-Viren			3/4	0/4	2/4	0/4	2/4

Neutralisationspotenz (IC₅₀) >25 µg/mL 25 – 2 µg/mL 2 – 0,2 µg/mL <0,2 µg/mL

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Analyse hinsichtlich der Neutralisationsaktivität der selektionierten Antikörperklone, folgte eine weitere Neutralisationsstudie mit einem größeren HIV-1 Pseudovirus-Panel. Dieses Panel besteht aus 12 unterschiedlichen HIV-1 Env-Referenzstämmen die alle epidemiologisch relevanten Subtypen und zirkulierenden rekombinanten Formen (CRF) des HI-Virus repräsentieren (Tabelle 4.9). Das Referenzpanel wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit aus insgesamt 219 Env-pseudotypisierten Viren erstellt, welche global aus verschiedensten geografischen Regionen zusammengetragen wurden (deCamp et al., 2014). Anhand der Untersuchung mit den neutralisationsresistenteren Tier 2 HIV-Pseudoviren sollte eine signifikantere Aussage über die Neutralisationsaktivität der Antikörperklone gewonnen werden. Die Klone scFv#2-Fc und VHH#1-Fc wurden aufgrund der Erkenntnisse aus dem ersten Neutralisationsansatz (Tabelle 4.8) nicht weiter für die nachfolgende Analyse berücksichtigt. Die Bestimmung der Neutralisationsaktivität der Antikörperklone scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc erfolgte wiederholt mittels des *in vitro* TZM-bl-Reporterzell-Assays unter den gleichen Bedingungen wie zuvor in der ersten Neutralisationsstudie beschrieben. Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 4.9 zu entnehmen ist, konnten alle drei Klone zwischen vier und sieben HIV-1 Pseudoviren neutralisieren. Die stärkste Neutralisationsbreite zeigte hierbei der Klon VHH#2-Fc. VHH#2-Fc war in der Lage, insgesamt sieben HIV-1 Viren von sechs unterschiedlichen Subtypen (A, AE, B, BC, C und G) an der Infektion der TZM-bl-Zellen zu hindern. Darüber hinaus neutralisierte das VHH#2-Fc-Konstrukt die Pseudoviren HIV-25710-2.43, HIV-CE1176_A3 (beide Subtyp C) und HIV-X1632_S2_B10 (Subtyp G) mit der niedrigsten IC₅₀ (IC₅₀ < 0,2 µg/mL) aller Antikörperkonstrukte. Die Virusstämme HIV-CNE55 (Subtyp AE, IC₅₀ 2,15 µg/mL) und HIV-X2278_C2_B6 (Subtyp B, IC₅₀ 3,28 µg/mL) wurden zudem nur durch das VHH#2-Fc neutralisiert. Der Klon scFv#1-Fc konnte

6 Tier 2 Pseudoviren der Subtypen A, AC, B, BC und G neutralisieren (IC₅₀ 1,61 – 12,39 µg/mL). Die niedrigste IC₅₀ mit 1,61 µg/mL wurde bei dem Virusisolat HIV-TRO.11 (Subtyp B) bestimmt, welches interessanterweise ausschließlich vom scFv#1-Fc neutralisiert werden konnte. Das scFv#3-Fc-Konstrukt hat insgesamt vier der 12 Pseudoviren des Referenz-Panels neutralisiert (IC₅₀ 7,84 – 11,86 µg/mL). Die beste Neutralisationsaktivität zeigte der Klon gegen die Subtyp C-Virusisolate HIV-25710-2.43 und HIV-CE1176_A3 (IC₅₀ 9,89 µg/mL und 7,84 µg/mL). Überraschend war zudem die Beobachtung, dass der Klon scFv#3-Fc als einziger in der Lage war, HIV-CNE8 (Subtyp AE) an der Infektion der Reporterzellen zu hindern. Insgesamt konnten 11 Pseudoviren des HIV-1 Referenz-Panels von einem oder mehreren Antikörperklonen neutralisiert werden, das HIV-BJOX002000.03.2-Isolat (Subtyp BC) sogar von allen drei Klonen. Interessanterweise wurde der HI-Virusstamm CE703010217_B6 (Subtyp C) durch keines der Konstrukte neutralisiert.

Tabelle 4.9 Charakterisierung der *in vitro* Neutralisationsaktivität der Klone scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc gegen Referenzviren (12 HIV-1-Pseudoviren) der Gruppe Tier 2. Aufgeführt sind die IC₅₀-Werte (µg/mL) für jedes scFv-/ VHH-Fc-Konstrukt gegen das jeweilige Pseudovirus, ermittelt in standardisierten TZM-bl-Reporterzell-assays. Die IC₅₀-Werte sind farblich dargestellt: < 0,2 µg/mL (rot), 0,2 – 2 µg/mL (orange), 2 – 25 µg/mL (gelb), >25 µg/mL (farblos). Als Kontrollen für eine HIV-spezifische Antikörper-vermittelte Neutralisationsaktivität wurde ein HIV-fremdes Pseudovirus (MLV, Murines Leukämievirus) verwendet. Je HI-Virusklon und Antikörperfragment wurden zwei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt.

HIV-1 Pseudovirus	Subtyp	Tier	scFv#1-Fc	scFv#3-Fc	VHH#2-Fc
HIV-389-F1_F6_20	A	2	9,92	>25	0,73
HIV-246-F3_C10_2	AC	2	9,3	>25	>25
HIV-CNE8	AE	2	>25	11,86	>25
HIV-CNE55	AE	2	>25	>25	2,15
HIV-TRO.11	B	2	1,61	>25	>25
HIV-X2278_C2_B6	B	2	>25	>25	3,28
HIV-BJOX002000.03.2	BC	2	6,74	11,79	2,0
HIV-CH119.10	BC	2	12,39	>25	>25
HIV-25710-2.43	C	2	>25	9,89	<0,2
HIV-CE1176_A3	C	2	>25	7,84	<0,2
HIV-CE703010217_B6	C	2	>25	>25	>25
HIV-X1632_S2_B10	G	2	7,03	>25	<0,2
MLV	(Negativkontrolle)		>25	>25	>25
Anzahl neutralisierter HI-Viren			6/12	4/12	7/12

Neutralisationspotenz (IC₅₀) >25 µg/mL 25 – 2 µg/mL 2 – 0,2 µg/mL <0,2 µg/mL

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für drei der fünf selektionierten Antikörperklone eine Neutralisationsaktivität gegen verschiedene HIV-1 Pseudoviren nachgewiesen werden konnte. Die stärkste Neutralisationsaktivität zeigte der Klon VHH#2-Fc. Dieser war in der Lage 56 % (9/16 neutralisierte HI-Viren) der getesteten

Env-pseudotypisierten HI-Viren zu neutralisieren. Zudem konnte ebenso beobachtet werden, dass die IC_{50} des VHH#2-Fc im Mittel um das 6 – 8-fache niedriger war als bei den Klonen scFv#1-Fc und scFv#3-Fc. Dennoch wurde auch für das Antikörperkonstrukt scFv#1-Fc eine Neutralisationsbreite von 56 % (9/16 neutralisierte HI-Viren) nachgewiesen. Der Klon scFv#3-Fc hat insgesamt sechs von 16 HI-Virusisolaten (38 %) neutralisiert. Darüber hinaus hat sich auch gezeigt, dass die niedrigsten IC_{50} -Werte der drei Klone jeweils bei den HIV-1 Subtypen ermittelt wurden, welche auch für die Selektion des entsprechenden Klons verwendet wurden. Die unterschiedlichen Resultate der Neutralisationsaktivität bezüglich der Breite und Potenz lassen sich möglicherweise auf unterschiedliche Epitope zurückführen, welche durch die Antikörperfragmente auf den viralen HIV-Hüllproteinen erkannt werden.

4.1.9 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der HIV-1 neutralisierenden Antikörperfragmente

Im Anschluss an die Neutralisationsstudien wurden die drei scFv-/ VHH-Fc-Konstrukte hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht. Die Analyse der HIV-1 Env-Spezifität und -Affinität der Antikörperklone erfolgte mit Hilfe des zellbasierten ELISA (Abschnitt 3.3.11). Für den Nachweis der spezifischen Bindung des HIV-Hüllproteins wurden die isolierten Antikörperklone jeweils mit dem für die Selektion verwendeten HIV-Env-Subtyp inkubiert. Als Kontrolle für eine spezifische Antigenerkennung dienten bei der Überprüfung HeLa-Wildtypzellen ohne virale Hüllproteine auf der Zelloberfläche. Die HIV-1 Env-Expression und -Integrität der HeLa-Env-Zelllinien wurde mittels der mAb 2G12 (HIV-1 Subtyp B) und b12 (HIV-1 Subtyp C) kontrolliert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte anschließend durch kolorimetrische Messung der HRP-vermittelten Farbreaktion am Spektrometer (Abschnitt 3.3.11). Bei allen drei Antikörperkonstrukten konnte hierbei eine starke Interaktion mit den Env-exprimierenden HeLa-Zellen ($A_{450nm - 650nm}$ von ~ 1 bis 2,1 AU) beobachtet werden, während die Proben mit den HeLa-WT-Zellen keine Signale aufwiesen (0,04 bis 0,07 AU) (Abbildung 4.20A). Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse einer konzentrationsabhängigen Analyse der Antikörperbindung in Abbildung 4.20B, dass die erhaltenen Dissoziations-konstanten (K_d) der scFv-/ VHH-Antikörper im niedrig nanomolaren Bereich lagen, wobei der Klon VHH#2-Fc (K_d 0,8 nM) im Vergleich mit dem scFv#3-Fc-Konstrukt (K_d 1,7 nM) eine deutlich stärkere Bindungsaffinität mit dem HIV-EnvC offenbarte. Auch für den Klon scFv#1-Fc (K_d 1,1 nM) konnte eine Affinität mit dem Hüllprotein des Subtyps B im einstellig nanomolaren Bereich ermittelt werden. Die Untersuchung ergab zudem für das VHH#2-Fc-Konstrukt eine maximale Absorption (B_{max}) von 2,9 AU, welche damit etwa 1,6-mal höher lag als bei dem EnvC-spezifischen Klon scFv#3-Fc (B_{max} 1,8 AU). Der gemessene B_{max} -Wert des scFv#1-Fc betrug 1,7 AU. Der B_{max} -Wert entspricht der maximalen ermittelten Absorption und ist ein Maß für die Anzahl gebundener Antikörper an die HIV-Antigene. Allerdings ist der B_{max} -Wert abhängig von der Anzahl exprimierter HIV-1 Hüllproteine auf der Zelloberfläche und von der Anzahl potentiell zugänglicher Epitope der Antikörper pro HIV-Spike.

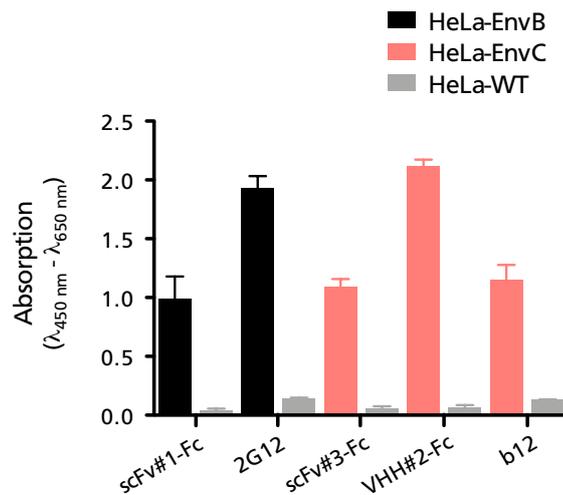
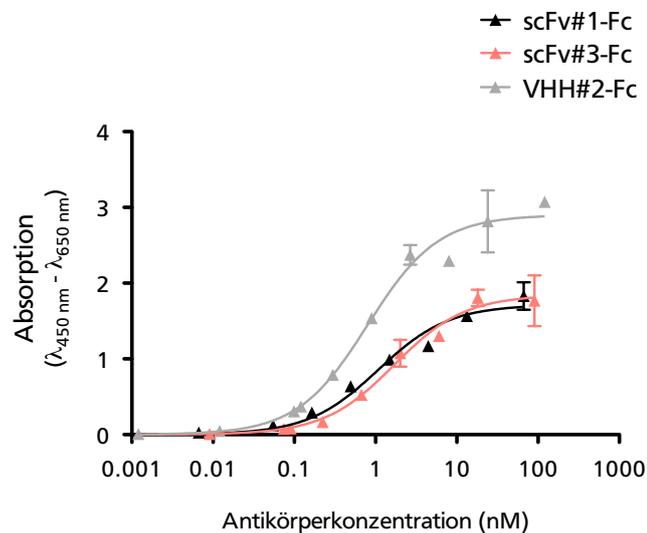
A**B**

Abbildung 4.20 Nachweis der Hüllprotein-spezifischen Bindung der selektierten HIV-1 neutralisierenden Antikörper-Fc-Konstrukte. (A) Dargestellt ist die Reaktivität der Klone scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc mit HIV-Env exprimierenden HeLa-Zellen (HeLa-EnvB, schwarz bzw. HeLa-EnvC, rot) und Wildtyp HeLa-Zellen (HeLa-WT, grau). Für die Bestimmung der Env-spezifischen Interaktion wurde jeweils eine Antikörperkonzentration von 0,1 µg/mL eingesetzt. Die Kontrolle der Env-Expression auf den HeLa-Zellen erfolgte anhand der mAb 2G12 (HIV-EnvB) und b12 (HIV-EnvC). (B) Analyse der konzentrationsabhängigen Antikörperbindung (0,001 nM bis 120 nM) der jeweils für die Selektion verwendeten HIV-1 Env-Zelllinie durch die Klone scFv#1-Fc (schwarz, HIV-EnvB), scFv#3-Fc (rot, HIV-EnvC) und VHH#2-Fc (grau, HIV-EnvC). Die Bindung Hüllprotein-spezifischer Antikörperfragmente wurde in beiden Assays mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers im zellbasierten ELISA nachgewiesen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen in Triplikaten.

Zusammengefasst zeigen alle Antikörperkonstrukte hochspezifische Wechselwirkungen mit dem HIV-Hüllprotein. Die stärkste Affinität mit dem HIV-Env konnte hierbei für den VHH#2-Fc-Antikörper festgestellt werden. Die Ergebnisse liefern ebenso einen Hinweis darauf, dass der Klon VHH#2-Fc möglicherweise in der Lage ist, zeitgleich mit mehreren Antikörpermolekülen an einen einzelnen HIV-Spike zu binden.

4.1.10 Messung der potentiellen ADCC-Aktivität der selektionierten scFv-/ VHH-Fc-Antikörperkonstrukte

Aufgrund der Reformatierung der Antikörperfragmente mit der immunregulatorisch aktiven Fc-Domäne eines humanen IgG1, welche unter anderem durch die Interaktion mit Fc γ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen zur Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) führt, sollten die drei Antikörperkonstrukte auch auf die Fähigkeit hin untersucht werden, ADCC zu induzieren (Vidarsson et al, 2014).

Die Analyse der ADCC-Aktivität der Antikörperkonstrukte wurde im Rahmen einer Kollaboration im Labor von Andrés Finzi (McGill University, Montreal, Kanada) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine CD4+ Zielzelllinie (CEM.NKr-CCR5-sLTR-Luc-Zellen) mit einem modifiziertem HIV-1 Isolat infiziert (HIV-1 NL4.3 ADA GFP-N⁻ U⁻). Das Virus kodiert neben den Genen für akzessorische Virusproteine und das Hüllprotein auch für das *gfp*-Reporter-gen (Veillette et al., 2014). Eine Integration des Virus ins Zielzellgenom hat somit eine Expression des Reportergens zur Folge. 48 h nach der Infektion wurde anhand der GFP-Expression die Infektionsrate mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie bestimmt. Um die Bindung der selektionierten Klone an das HIV-1 Isolat nachzuweisen wurden die Zellen zusätzlich mit den Antikörperkonstrukten (5 μ g/mL) inkubiert. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in der Abbildung 4.21A und B grafisch dargestellt. Im Mittel konnte hierbei ein Anteil von etwa 5 % GFP-positiver (GFP+) Zellen in der Gesamtzellpopulation gemessen werden (Abbildung 4.21A). Ebenso wurde festgestellt, dass infizierte Zellen (GFP+) durch alle scFv-/ VHH-Antikörper in geringem Maße erkannt wurden, während die Kontrollzellen ohne Virusinfektion (Mock) keine Interaktion mit den Antikörperkonstrukten aufwiesen (Abbildung 4.21B). Für die Bestimmung der potentiellen ADCC-Aktivität der Antikörperklone wurden die infizierten Zielzellen (Target) mit Effektorzellen (PBMCs) in einem Verhältnis von 10/1 (Effektor/Target) gemischt und für 5 min vorinkubiert. PBMCs setzen sich aus verschiedenen Zellsubtypen zusammen wie zum Beispiel Lymphozyten oder Monozyten und spielen eine essentielle Rolle in der Immunabwehr von Pathogenen. Unter anderem eliminieren natürliche Killerzellen (NK-Zellen) humanpathogene Viren durch ADCC.

Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe der Antikörperklone (5 μ g/mL) für 6 h bei 37 °C. Neben den scFv-/ VHH-Antikörpern wurde zusätzlich der mAb A32 als Positivkontrolle für die ADCC-Analyse verwendet. Der A32-Antikörper ist ein nicht-neutralisierender HIV-1 Antikörper (nnAbs), welcher ein konserviertes CD4-induziertes (CD4i) Epitop auf der Oberfläche der inneren Domäne der gp120-Untereinheit des viralen Hüllproteins erkennt (Wyatt et al., 1995). Zudem konnte bereits in Vorarbeiten eine A32-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität nachgewiesen werden (Veillette et al., 2014). Die Auswertung der ADCC-Aktivität der Antikörper erfolgte erneut mittels Durchflusszytometrie und wurde anhand der Formel 4.1 errechnet. Interessanterweise konnte für das scFv#1-Fc-Konstrukt festgestellt werden, dass rund 6 % der infizierten Zellen durch ADCC eliminiert wurden (Abbildung 4.21C). Allerdings war der Anteil lysierter Zellen durch A32-vermittelte Zytotoxizität mit rund 11 % signifikant höher. Die geringe ADCC-Aktivität, vermittelt durch den scFv#1-Fc, ist möglicherweise auf die schwache Bindung des Antikörperklons an das HIV-Env Isolat zurückzuführen (Abbildung 4.21A). Für die beiden Antikörperklone VHH#2-Fc und scFv#3-Fc wurde hingegen keine ADCC-Aktivität beobachtet.

Formel 4.1 Gleichung zur Berechnung des prozentualen Anteils eliminerter HIV-infizierter Zellen durch ADCC.

$$\%ADCC = \frac{(relative\ Anzahl\ GFP^+\ Zielzellen + Effektorzellen) - (relative\ Anzahl\ GFP^+\ Zielzellen + Effektorzellen + Antikörper)}{(relative\ Anzahl\ GFP^+\ Zielzellen)} \times 100$$

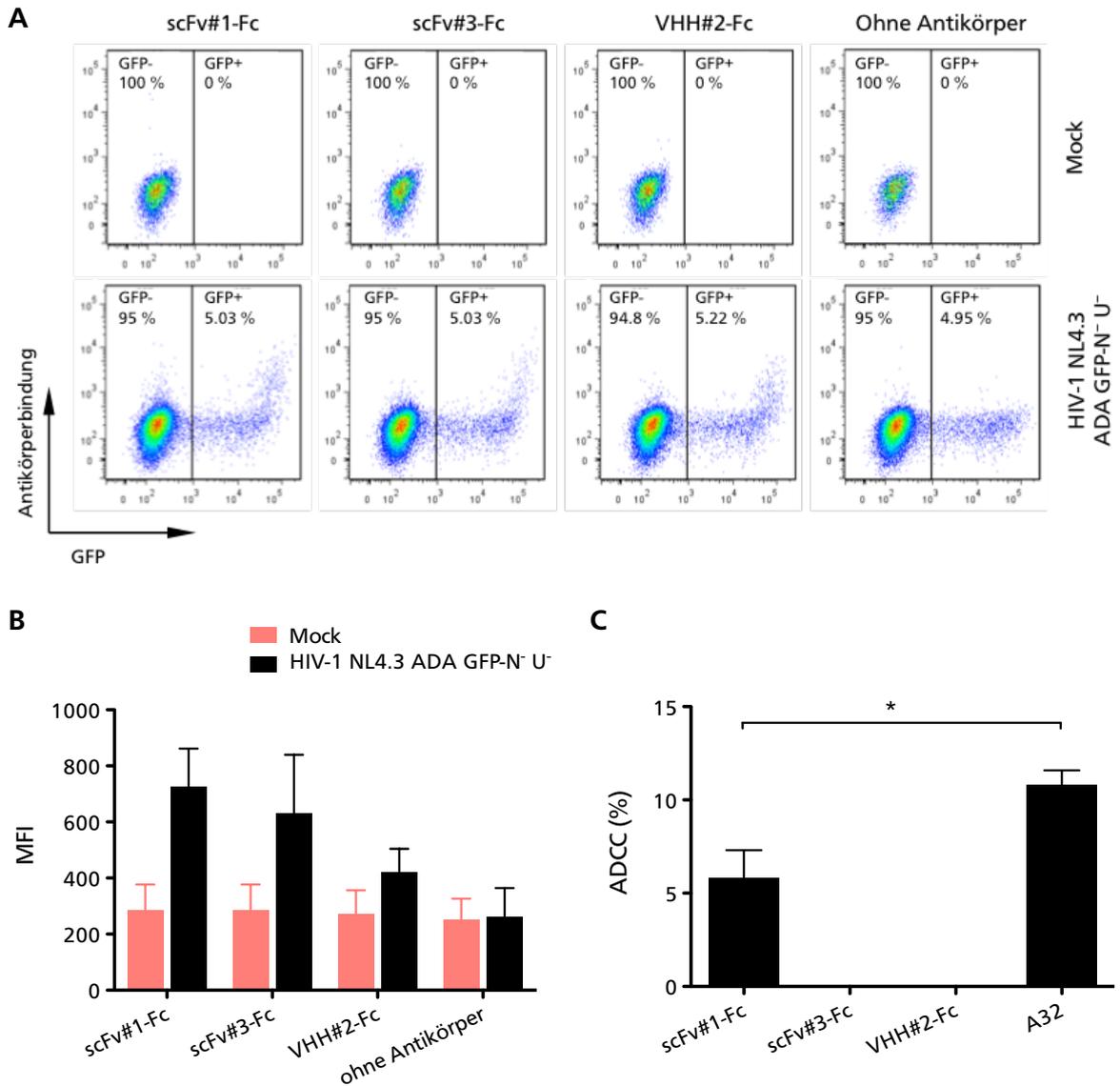


Abbildung 4.21 Analyse der Antikörperperfragment-Fc vermittelten ADCC-Aktivität. (A & B) CD4⁺ Zielzellen (CEM.NKr-CCR5-sLTR-Luc-Zellen) wurden mit dem Virusisolat HIV-1 NL4.3 ADA GFP-N⁻ U⁻ infiziert (HIV-1 NL4.3 ADA GFP-N⁻ U⁻, schwarz) oder blieben ohne Virusinfektion (Mock, rot). 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mit den selektionierten Antikörperfragmenten (5 µg/mL) gefärbt. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch einen *Alexa Fluor 647*-konjugierten Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometer. Die Dot Plots in (A) zeigen den Anteil HIV-1 infizierter (GFP⁺) zu uninfizierten Zielzellen (GFP⁻). In der Abbildung (B) ist die Reaktivität der drei Antikörperklone mit den HIV-1 NL4.3 ADA GFP-N⁻ U⁻-positiven sowie Mock-Zellen in Form der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Ungefärbte Zellen dienen als Negativkontrolle (ohne Antikörper). (C) Infizierte CEM.NKr-CCR5-sLTR-Luc-Zellen wurden 48 h nach der HIV-Infektion mit den Antikörperfragmenten (5 µg/mL) und PBMCs inkubiert. Die scFv- bzw. VHH-Fc-vermittelte ADCC-Aktivität wurde anhand der Anzahl eliminerter Zielzellen im Durchflusszytometer bestimmt. Als Referenz fungierte der bekannte ADCC-vermittelnde Antikörper A32. Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen aus Triplikaten.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass für eines der selektierten Antikörperkonstrukte (scFv#1-Fc) in einem in vitro ADCC-Assay Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität nachweisbar war. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörperfragment identifiziert werden, welches HIV-1 Neutralisationsaktivität zeigt und durch die Fusionierung mit einer IgG1 Fc-Domäne zusätzlich ADCC induzieren kann.

4.2 PROJEKT #2 / Optimierung des EC26-2A4-Epitops in der gp41-MPER des HIV-1 Hüllproteins

4.2.1 Modifikation des EC26-2A4-Kernepitops für eine differenzielle Bindung durch HIV-1 neutralisierende Antikörper

Die Induktion neutralisierender Antikörper (nAb) ist eines der Hauptziele in der Entwicklung funktionaler HIV-1 Vakzine, welche protektiv vor einer Virusinfektion schützen können oder bei infizierten Patienten therapeutisch wirksam sind (Mascola & Montefiori, 2010). Als potentielle Impfstoffkandidaten, die in der Lage sind nAb zu induzieren, dienen unter anderem kleine Peptidmimetika konservierter und funktionell wichtiger Epitope innerhalb der viralen Hüllproteinstruktur (Zhou M. et al., 2012).

Ein solches Epitop (EC26-2A4) wurde im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation in der AG Dietrich von Mingkui Zhou als Zielepitop für Antikörper im Plasma eines HIV-1 *Elite Controllers* (EC26) identifiziert und charakterisiert (Zhou M., 2013B). Das 29 Aminosäure (AS) lange EC26-2A4 Peptid ist in der MPER der gp41-Untereinheit des HIV-1 Env lokalisiert (Abbildung 1.13). Es konnte gezeigt werden, dass aus dem Plasma des Spenderpatienten (EC26) abgeleitete Epitop-spezifische Antikörper (EC26-2A4-IgG) Neutralisationsaktivität gegen verschiedene Tier 1 Env-pseudotypisierte HIV-1 Viren aufwiesen. Darüber hinaus wurde ebenso in einer Impfstudie mit dem gp41-Epitop die Induktion HIV-1 nAbs in Mäusen nachgewiesen. Im Zuge der Charakterisierung des EC26-2A4 Peptids wurde zudem eine partielle Überlappung des Kernepitops, welches durch EC26-2A4-IgG erkannt wird, mit dem Kernepitop des mAb 2F5 festgestellt (Zhou M. et al., 2012; Zhou M. et al., 2013A). Das EC26-2A4 Kernepitop (⁶⁵⁹ELLELDKW⁶⁶⁶) ist im Vergleich zum 2F5 Kernepitop (⁶⁶²ELDKWA⁶⁷⁶) leicht N-terminal versetzt (Abbildung 4.22A). Bei dem mAb 2F5 handelt es sich um einen breit neutralisierenden Antikörper der ersten Generation mit einer beschriebenen Neutralisationsbreite von ~48 % transmittierter HI-Viren unterschiedlicher HIV-1 Stämme (Mehandru et al., 2004). Impfstudien mit dem 2F5 Epitop führten bisher allerdings nicht zur Induktion solcher bnAbs *in vivo* (Muster et al., 1993; Zwick et al., 2001). Darüber hinaus ist für den mAb 2F5 auch eine Polyreaktivität mit verschiedenen Autoantigenen bekannt, was eine mögliche Ursache für den fehlenden Erfolg der bisherigen Impfansätze sein könnte (Haynes et al., 2005A; Haynes et al., 2005B). Zhou et al. konnten belegen, dass Patienten-abgeleitete EC26-2A4-IgG im Gegensatz zum mAb 2F5 keine Reaktivität mit dem Phospholipid Cardiolipin zeigten und nur eine geringe Reaktivität mit Phosphatidylserin aufwiesen (Zhou M. et al., 2013A).

Um in Impfstudien mit dem EC26-2A4 Epitop die Induktion autoreaktiver Antikörper zu vermeiden, sollte im Rahmen dieser Arbeit das EC26-2A4 Peptid dahingehend modifiziert werden, dass eine Erkennung des Epitops durch den autoreaktiven mAb 2F5 oder 2F5-ähnliche Antikörper nicht möglich ist, die Bindung EC26-2A4-spezifischer Antikörper aber nicht beeinträchtigt wird. Hierfür wurden mit Hilfe eines Alaninscans zunächst die Aminosäuren innerhalb des EC26-2A4 Kernepitops bestimmt, welche für die Bindung des EC26-2A4-IgG essentiell sind (Abschnitt 3.3.7). Nach der Rehydratisierung und dem Blocken der Cellulose-Membran wurden die darauf synthetisierten Peptidvarianten mit dem

EC26-2A4-IgG oder dem mAb 2F5 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Detektion gebundener Epitop-spezifischer Antikörper erfolgte im Anschluss durch einen HRP-konjugierten Zweitantikörper. In der Abbildung 4.22B ist das Ergebnis der Peptidfilter-Analyse dargestellt. Anhand der Intensität der Antikörperreaktivität mit den Epitop-Varianten konnte beobachtet werden, dass die Aminosäuren L⁶⁶⁰ (Leucin), L⁶⁶³, D⁶⁶⁴ (Asparaginsäure) und K⁶⁶⁵ (Lysin) ausschlaggebend für die Bindung des EC26-2A4-IgG sind, da ein Austausch dieser Aminosäuren mit einem Alanin zu einem kompletten Verlust der Reaktivität mit dem Antikörper führte. Eine geschwächte Reaktivität mit dem EC26-2A4-IgG wurde bei der Abwesenheit der Aminosäuren E⁶⁵⁹ (Glutaminsäure) und W⁶⁶⁶ (Tryptophan) in der Peptidsequenz festgestellt, während für die Aminosäuren L⁶⁶¹ und E⁶⁶² keine Bedeutung für die Reaktivität mit den Patienten-abgeleiteten Epitop-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Die Substitution dieser beiden AS mit einem Alanin hatte keine Änderung der Antikörpererkennung zur Folge. Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung, dass die Aminosäuren D⁶⁶⁴, K⁶⁶⁵ und W⁶⁶⁶ für die Reaktivität mit dem mAb 2F5 absolut essentiell sind und der Austausch gegen ein Alanin in einem totalen Verlust der Reaktivität mit dem EC26-2A4 Epitop resultierte. Somit ist das Tryptophan (W⁶⁶⁶) substanziiell für die Bindung durch den mAb 2F5, aber nicht für eine Bindung durch den EC26-2A4-IgG.

Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde in einer weiteren Peptidarray-Analyse das Tryptophan (W⁶⁶⁶) gegen alle 19 verbleibenden natürlichen Aminosäuren substituiert, um Epitop-Varianten mit differenziellen Reaktivitäten mit den Antikörpern EC26-2A4-IgG und 2F5 zu identifizieren. Insgesamt konnte hierbei für alle Peptidkonstrukte eine Bindung durch den EC26-2A4-IgG detektiert werden (Abbildung 4.22C). Fünf Varianten zeigten sogar eine starke Reaktivität mit den Patienten-abgeleiteten Epitop-spezifischen Antikörpern (F⁶⁶⁶, G⁶⁶⁶, M⁶⁶⁶, Q⁶⁶⁶ und S⁶⁶⁶), wobei das Peptid ELLELDKF auch durch den mAb 2F5 gebunden wurde. Die stärkste Reaktivität wurde in zwei unabhängig durchgeführten Peptidfilter-Analysen für die Epitop-Variante ELLELDKM (EC26-2A4ΔM, Abbildung 4.22A) bestimmt. Die Intensität der Antikörperreaktivität dieses Peptids war in beiden Untersuchungen vergleichbar mit der Reaktivität des Wildtyp-Epitops mit dem EC26-2A4-IgG. Darüber hinaus zeigte das EC26-2A4ΔM keine Interaktion mit dem mAb 2F5. Um die Ergebnisse der Peptidfilter-Analyse auch quantitativ zu bestätigen, wurden die beiden löslichen Epitope EC26-2A4 und EC26-2A4ΔM zusätzlich in einem ELISA auf ihre Reaktivität mit den EC26-2A4-IgG und dem mAb 2F5 hin überprüft (Abbildung 4.22D). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Bindungseigenschaften durch die Antikörper wurden pro Peptidvariante jeweils gleiche Molekülanzahlen eingesetzt (Abschnitt 3.3.10). Auch bei dieser Untersuchung konnte eine ähnlich starke Reaktivität beider Epitope mit dem EC26-2A4-IgG nachgewiesen werden (EC26-2A4 1,6 AU, EC26-2A4ΔM 1,4 AU). Zudem wurde ebenso bestätigt, dass eine Bindung des EC26-2A4ΔM Peptids (~0,1 AU) durch den mAb 2F5 im Gegensatz zum Wildtyp-Epitop (1,8 AU) nicht mehr möglich ist.

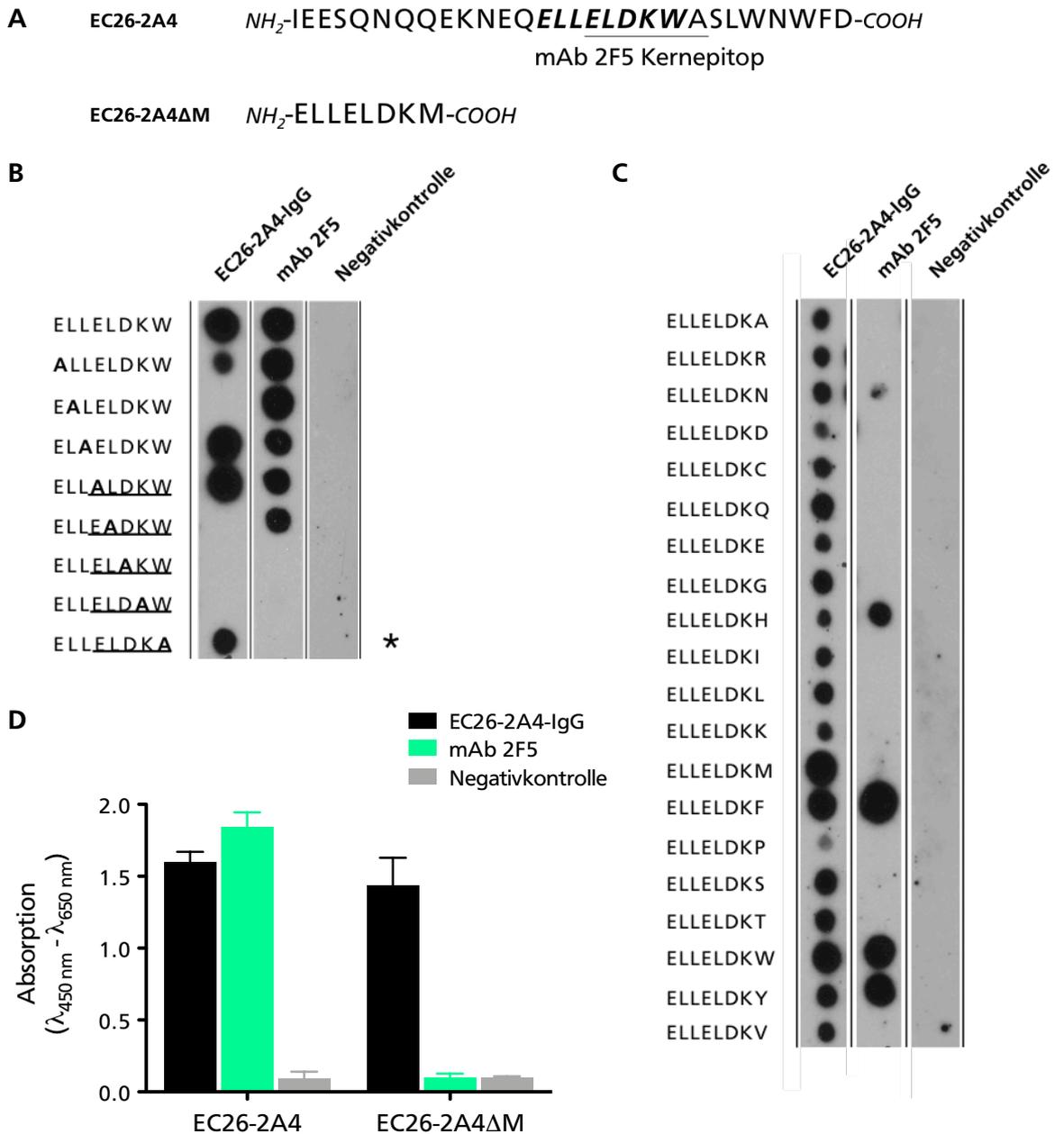


Abbildung 4.22 Modifikation des EC26-2A4 Epitops für eine differenzielle Reaktivität mit dem EC26-2A4-spezifischen Patienten-abgeleiteten Antikörper und dem polyreaktiven mAb 2F5. (A) Schematische Darstellung der Sequenzen des ursprünglichen EC26-2A4 Epitops und des optimierten Peptids (EC26-2A4ΔM) sowie die partiell überlappenden Sequenzen des EC26-2A4 (fett und kursiv) und 2F5 Kernepitops (unterstrichen). (B) Alaninscan durch das EC26-2A4 Kernepitop zur Bestimmung der Aminosäuren, die für eine Reaktivität mit dem Epitop-spezifischen Antikörper (EC26-2A4-IgG) und dem mAb 2F5 essentiell sind. Die Überlagerung beider Kernepitope ist durch den Unterstrich symbolisiert. Das Sternchen zeigt die Aminosäure, welche anschließend durch alle anderen natürlichen Aminosäuren substituiert wurde. (C) Untersuchung der Bindung Tryptophan-substituierter (W^{666}) Peptidvarianten durch den EC26-2A4-IgG und den mAb 2F5, unter Verwendung von Peptidfilter-Analysen, zur Identifikation von Epitopen, die durch den Patienten-abgeleiteten Antikörper (EC26-2A4-IgG), aber nicht durch den mAb 2F5 erkannt werden. (D) Dargestellt ist die Reaktivität des EC26-2A4-IgG (schwarz) und des mAb 2F5 (grün) mit dem ursprünglichen (EC26-2A4) und dem optimierten gp41-Epitop (EC26-2A4ΔM) in löslicher Form, mittels ELISA. Beide Peptide wurden für die Untersuchung in einer äquivalenten Molekülanzahl auf der Oberfläche von 96 Well-Mikrotiterplatten immobilisiert (Abschnitt 3.3.10). Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen von Triplikaten einer Messung. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte in allen Assays mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Als Kontrolle für ein Env-Antikörper spezifisches Signal wurden die Peptide nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Negativkontrolle).

4.2.2 Bestimmung der Immunogenität der modifizierten Epitop-Variante EC26-2A4ΔM

Im Anschluss sollte das neu generierte Peptid auf die Fähigkeit untersucht werden, HIV-1 nAb *in vivo* zu induzieren. Die Analyse der Immunogenität des EC26-2A4ΔM-Antigens erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand von Prime-Boost-Immunisierungen von NMRI Mäusen (Abschnitt 3.6). NMRI Mäuse sind mit einem mittleren Körpergewicht von etwa 40 – 45 g verglichen mit anderen Mausstämmen deutlich größer und besitzen somit auch ein größeres Blutvolumen. Zudem verfügen sie über ein intaktes und kaum beanspruchtes Immunsystem und stellen daher ein geeignetes Tiermodell für die Testung von Impfstoffkandidaten dar (*Charles River Laboratories, Inc.*). Den sechs Wochen alten Tieren wurde hierbei zunächst 50 µg eines DNA-Plasmids (pJRFLsyngp140), welches für ein Codon-optimiertes HIV-1 JR-FL *env*-Gen kodiert, als „prime“ intramuskulär injiziert (Abbildung 4.23A). Dadurch werden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, was in der Folge zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort auf das im zweiten Schritt („Boost“) applizierte Immunogen führt (Woodberry et al., 2003). Als Booster kamen sowohl das EC26-2A4- als auch das EC26-2A4ΔM-Peptid, gekoppelt an ein Trägermolekül in Kombination mit einem Adjuvans, zum Einsatz. Die Immunisierung der Mäuse mit 50 µg des Peptids erfolgte hierbei wie in Abschnitt 3.6 beschrieben alle vier Wochen intradermal. Insgesamt erhielten die Tiere 3 Impfungen mit dem jeweiligen HIV-1 Epitop. Für den Nachweis Epitop-induzierter HIV-1 Antikörper wurde den Mäusen zunächst unmittelbar vor der Injektion der DNA Blut durch Punktion der *Vena facialis* entnommen (Pre-Immuns Serum) sowie zwei Wochen nach dem 3. Peptid-Boost durch finale Punktion des Herzens (Immuns Serum). Das vom Gesamtblut isolierte Serum wurde für 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

Vor der Untersuchung einer potentiellen Immunogenität, vermittelt durch das EC26-2A4ΔM-Peptid, wurde zunächst die Impfstrategie optimiert, um möglichst hohe Titer Epitop-spezifischer Antikörper zu induzieren. Hierfür wurde in einem ersten Prime-Boost-Regime das Wildtyp-Peptid konjugiert an den *Sequential Oligopeptide Carrier* (SOC) mit zwei unterschiedlichen Adjuvantien getestet. SOC_n setzt sich aus repetitiven synthetischen Peptidsequenzen (Lys-Aib-Gly) zusammen, welche eine 3₁₀-helikale Konformation ausbilden. Strukturanalysen haben gezeigt, dass an SOC_n gekoppelte Peptide ihre originale aktive Konformation beibehalten und sich nicht gegenseitig behindern (Sakarellos-Daitsiotis et al., 1999). Zudem konnte eine Impfstudie mit dem SOC₄-EC26-2A4-Konjugat bereits die Induktion HIV-1 nAbs in Mäusen belegen (Zhou M. et al., 2012). Die Immunisierung der Mäuse mit dem gp41-Epitop erfolgte in Kombination mit den Impfstoffzusätzen MPL (Monophosphoryl Lipid A) oder Montanide ISA 720. Beide Adjuvantien sind neben der Anwendung in Tierversuchen auch für eine Applikation im Menschen zugelassen und führen nachweislich zu einer starken Immunstimulation (Aucouturier et al., 2002; Evans et al., 2003). Je Impfansatz wurden 5 Mäuse mit dem SOC₂-EC26-2A4-Konjugat und einem Adjuvans oder mit dem jeweiligen Adjuvans allein (Kontrollgruppe) immunisiert. Im Anschluss an die Behandlung der Tiere wurden die Seren auf die Anwesenheit Epitop-spezifischer Antikörper mit Hilfe eines ELISA untersucht (Abschnitt 3.3.10). Hierfür wurden mehrere Verdünnungen der Pre- und Immunsereen (1:100 – 1:312500) mit dem immobilisierten SOC₂-EC26-2A4 Peptid inkubiert und gebundene Serumantikörper durch einen HRP-konjugierten Zweitantikörper detektiert. In der Abbildung 4.23B sind die

ermittelten Reaktivitäten der Immunseren mit dem Epitop, abzüglich der Reaktivitäten der Pre-Immunseren graphisch dargestellt. Als Antikörpertiter wurde in der Folge die höchste Verdünnung bestimmt, bei der eine Reaktivität des Serums mit dem EC26-2A4 Peptid oberhalb des Grenzwertes von 0,2 AU ermittelt werden konnte. Der Grenzwert orientierte sich hierbei an der Reaktivität der Seren aus der Kontrollgruppe mit dem Epitop. Dieser wurde definiert als die zweifache Absorption (λ 450 nm – λ 650 nm) der Kontrollseren.

Die Ergebnisse dieser Impfstudie zeigten, dass alle fünf Tiere, die mit dem Wildtyp-Epitop und MPL immunisiert wurden, hohe Titer EC26-2A4-spezifischer Antikörper entwickelt haben. Im Gegensatz dazu konnte aus der Gruppe mit Montanide ISA 720 und dem gp41-Peptid behandelten Mäusen nur für ein Tier deutliche Mengen Epitop-spezifischer Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Die restlichen vier Mäuse dieser Gruppe wiesen hingegen keine messbaren Titer an Serumantikörpern gegen das HIV-Epitop auf. Im Mittel (M) wurde für die mit MPL immunisierten Tiere ein Antikörpertiter von 1:1870 bestimmt, welcher im Vergleich zu den mit Montanide ISA 720 behandelten Tieren (M 1:198) um mehr als das 9-fache größer war. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde für die weiteren Immunisierungsansätze ausschließlich MPL als Imp fzusatz verwendet.

In einem zweiten Prime-Boost-Regime wurde ein möglicher Effekt des Trägermoleküls auf die Induktion Epitop-spezifischer Antikörper genauer untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die Konjugation des Wildtyp-Epitops zusätzlich an KLH (engl.: *Keyhole Limpet Hemocyanin*). KLH ist ein Proteinkomplex aus der Hämolymphe des Mollusken *Megathura crenulata* (Harris & Markl, 1999). Verschiedene klinische Studien, in denen KLH als Antigen eingesetzt wurde, konnten bereits die immunstimulierende Wirkung von KLH belegen. Darüber hinaus wurde ebenso gezeigt, dass KLH von den Studienteilnehmern sehr gut toleriert wird (Swaminathan et al., 2014; Valdez et al., 2000). Die Analyse der Induktion Epitop-spezifischer Antikörper erfolgte erneut mittels ELISA (Abbildung 4.23B). Anhand der starken Reaktivität der Immunseren aller fünf Tiere mit dem EC26-2A4 Peptid konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung der Mäuse mit dem KLH-konjugierten gp41-Epitop zu einer massiven Entwicklung EC26-2A4-spezifischer Antikörper innerhalb von 10 Wochen geführt hat. Der bestimmte mittlere Antikörpertiter (1:22500) war im Unterschied zu den mit SOC₂-EC26-2A4 behandelten Tieren sogar um das 12-fache höher. Bedingt durch diese Erkenntnisse wurde entschieden, das KLH-konjugierte EC26-2A4 Δ M Peptid für die Untersuchung der Epitop-vermittelten Immunogenität zu verwenden. Die Ergebnisse in Abbildung 4.23B lassen ebenfalls erkennen, dass für fünf von fünf Mäusen, die mit dem KLH-EC26-2A4 Δ M-Konjugat immunisiert wurden, eine deutliche Epitop-spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden konnte. Verglichen mit dem Wildtyp-Epitop war der durch das EC26-2A4 Δ M-Epitop induzierte mittlere Antikörpertiter mit 1:16100 etwas niedriger. Allerdings zeigten 2 der 5 Tiere ähnliche Mengen Epitop-spezifischer Antikörper wie die Mäuse, welche mit dem Wildtyp-Peptid geimpft wurden.

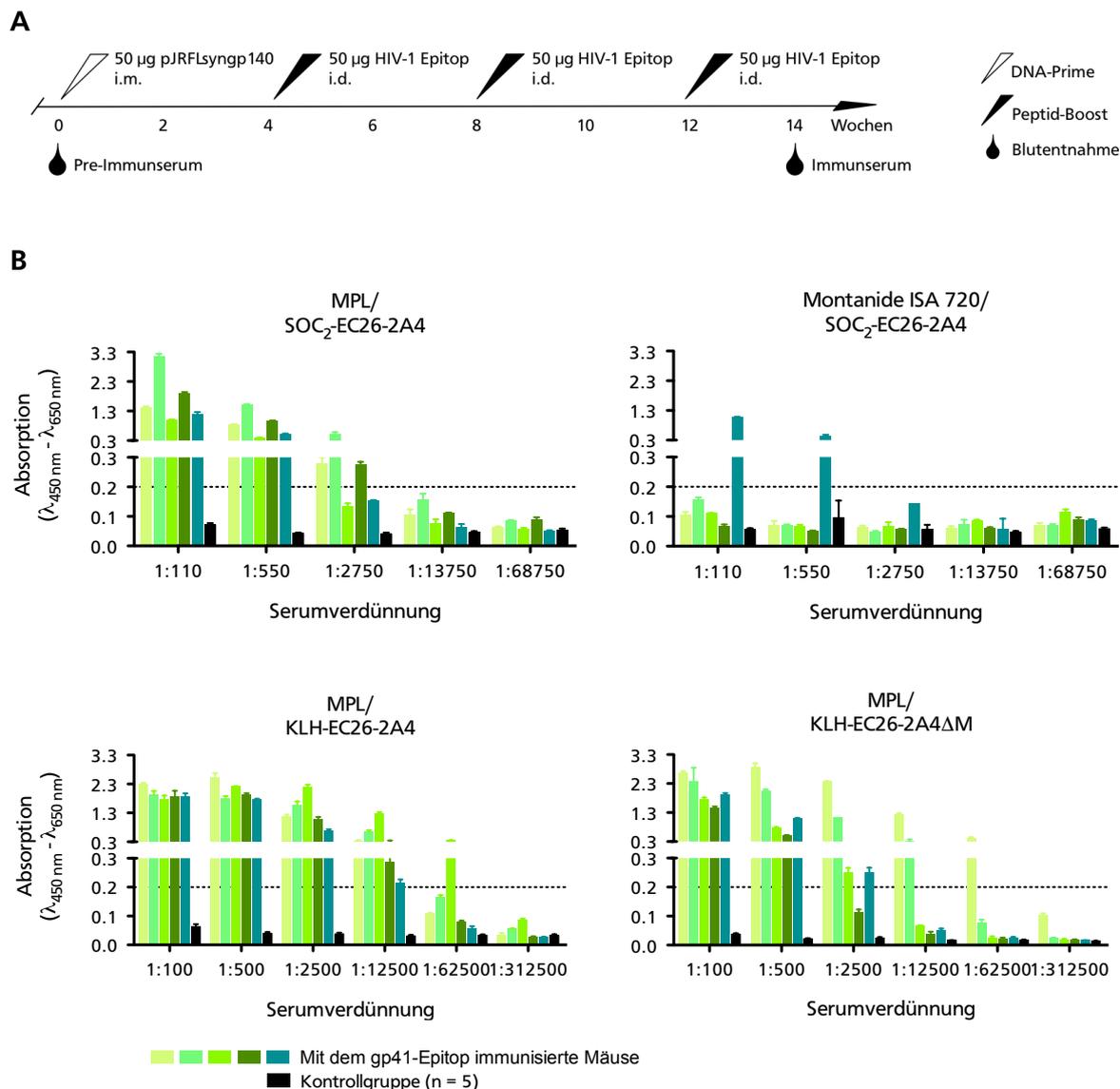


Abbildung 4.23 Analyse der Induktion HIV-1 Epitop-spezifischer Antikörper in immunisierten Mäusen. (A) Schematische Darstellung der Prime-Boost-Impfstrategie in NMRI-Mäusen. Sechs Wochen alte Tiere wurden mit einem Codon-optimierten HIV-*env* kodierenden DNA-Plasmid intramuskulär (i.m.) vorimmunisiert (DNA-Prime). Anschließend wurden die Mäuse dreimal alle vier Wochen mit dem EC26-2A4 oder EC26-2A4ΔM Epitop intradermal (i.d.) immunisiert (Peptid-Boost). Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Vorimmunisierung durch Punktion der *Vena facialis* (Pre-Immuneserum) und zwei Wochen nach dem letzten Peptid-Boost durch finale Punktion des Herzens (Immuneserum). (B) Nachweis der Induktion Epitop-spezifischer Antikörper in den Mäuseseren nach der Immunisierung mit dem EC26-2A4 oder EC26-2A4ΔM Peptid mittels ELISA. Dargestellt ist die Reaktivität der einzelnen Mausseren mit dem ursprünglichen oder optimierten gp41-Epitop in Abhängigkeit der Serumverdünnung (grün). Vor der Auftragung wurden die Reaktivitäten der Pre-Immuneseren von den Immuneseren abgezogen. Die HIV-Env Peptide wurden gekoppelt an ein Trägermolekül (SOC oder KLH) und in Kombination mit einem Adjuvans (MPL oder Montanide ISA 720) in die Mäuse injiziert. Als Kontrolle für die Induktion Epitop-spezifischer Antikörper wurden jeweils fünf Mäuse ausschließlich mit dem Trägermolekül allein und Adjuvans immunisiert (schwarz). Die Reaktivitäten der fünf Kontrolltiere mit den HIV-Epitopen ist zusammengefasst dargestellt. Die Epitop-spezifischen Antikörper wurden mittels eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen von Triplikaten einer Messung.

Die Seren der Tiere, die mit den an KLH konjugierten Epitopen immunisiert wurden, sollten anschließend hinsichtlich ihrer Neutralisationsaktivität gegen verschiedene Env-pseudotypisierte HI-Viren getestet werden. Die Analyse der Neutralisationsaktivität erfolgte hierbei gegen vier Pseudoviren, drei Tier 1-Viren (HIV-Bal26, HIV-SF162.LS, HIV-SS1196) und ein Tier 2 Virus (HIV-REJO), alle entstammten dem Subtyp B. Aufgrund des limitierten Volumens der Mausseren war eine Testung gegen eine größere Anzahl HIV-1 Isolate in dieser Studie nicht möglich. Mit Hilfe des in Abschnitt 3.1.11 beschriebenen *in vitro* Neutralisations-Assays wurde für jede Maus die reziproke Serumverdünnung bestimmt, bei der 50 % des jeweiligen HIV-1 Env-Pseudovirus neutralisiert wurden (ID_{50}). Zusätzlich wurden als Nachweis für eine Epitop-spezifische Antikörper-vermittelte Neutralisation auch die Seren der Mäuse verwendet, welche ausschließlich das unkonjugierte KLH appliziert bekommen haben (Kontrollgruppe). Vor Zugabe der TZM-bl-Reporterzellen erfolgte zunächst die Inkubation der Pseudoviren mit verschiedenen Verdünnungen der hitzeinaktivierten Immunseren (1:15 – 1:405) für 90 min bei 37 °C. Die Virus-vermittelte Expression des Luciferase-Reportergens wurde anschließend in Form von Chemilumineszenz am Luminometer quantifiziert. Abbildung 4.24 zeigt die ermittelten ID_{50} -Werte aller Tiere gegen die getesteten Pseudovirus-Isolate.

Aus diesen geht hervor, dass die Seren der mit dem EC26-2A4- bzw. EC26-2A4 Δ M-Epitop immunisierten Mäuse alle drei heterologen Tier 1 HIV-Pseudovirus-Stämme neutralisieren konnten. Zudem zeigten bis auf zwei Tiere (beide gegen HIV-SS196) alle eine Neutralisationsaktivität gegen die Tier 1 Virusisolate. Für die Immunseren der mit dem KLH-EC26-2A4 Konjugat behandelten Mäuse konnte zudem eine leicht bessere Neutralisationsaktivität gegen die Virusstämme HIV-Bal26 (gemittelte ID_{50} EC26-2A4: 28, EC26-2A4 Δ M: 24) und HIV-SS1196 (gemittelte ID_{50} EC26-2A4: 31, EC26-2A4 Δ M: 26) beobachtet werden. Dieser schwache Unterschied in der Potenz ist vermutlich auf die ungleichen Mengen Epitop-spezifischer Antikörper in den Mausseren zurückzuführen, die in Folge der Immunisierung induziert wurden (Abbildung 4.24). Interessanterweise zeigten die Seren der Mäuse, welche mit dem EC26-2A4 Δ M Peptid behandelt wurden, trotz eines geringeren Epitop-spezifischen Antikörpertiters sogar eine bessere Neutralisationspotenz gegenüber dem HIV-SF162.LS (gemittelte ID_{50} 50), als die mit dem Wildtyp-Epitop immunisierten Tiere (gemittelte ID_{50} 38). Dagegen konnte das Tier 2 HIV-REJO Pseudovirus nicht durch die Immunseren neutralisiert werden. Lediglich eine mit dem EC26-2A4-Epitop behandelte Maus hat eine schwache Neutralisation des Pseudovirus gezeigt. Alle anderen immunisierten Tiere waren nicht in der Lage das Tier 2 Virusisolat in der kleinsten Serumverdünnung an der Infektion der TZM-bl-Reportzellen zu hindern.

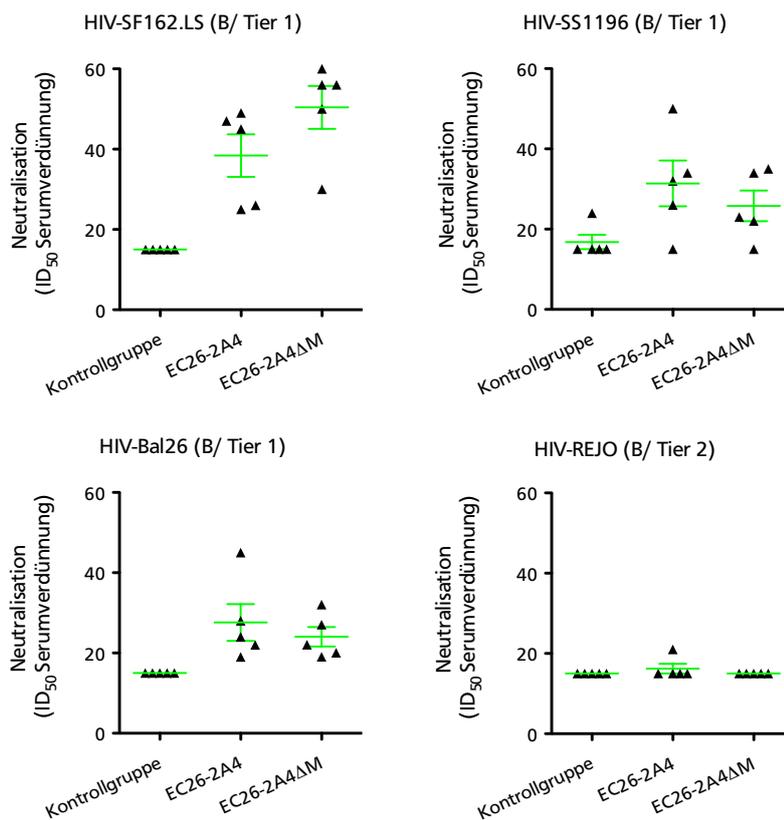


Abbildung 4.24 Nachweis der Serumneutralisationsaktivität immunisierter Mäuse. Die Tiere, immunisiert mit einer Epitopvariante (EC26-2A4 bzw. EC26-2A4ΔM) oder dem Trägermolekül KLH allein (Kontrollgruppe) wurden gegen HIV-1 Pseudoviren des Subtyps B: HIV-Bal26, HIV-SF162.LS und HIV-SS1196 (alle Tier 1) sowie HIV-REJO (Tier 2) getestet. Gezeigt ist die reziproke Serumverdünnung für jede Maus, bei der 50 % des entsprechenden Virusisolates in standardisierten TZM-bl-Reporterzellassays neutralisiert wurden (ID₅₀). Die Balken (grün) stellen den Mittelwert sowie die relativen Standardabweichungen von Triplikaten einer Messung dar.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass ein Prime-Boost-Impfansatz mit dem modifizierten an KLH konjugierten gp41-Epitop in Kombination mit dem Adjuvans MPL zur Entwicklung EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper in Mäusen geführt hat. Für alle immunisierten Tiere wurden hierbei hohe Level Epitop-spezifischer Antikörper im Serum detektiert. Darüber hinaus zeigten die Immunseren ebenfalls eine Neutralisationsaktivität gegen drei heterologe Tier 1 Pseudovirus-Stämme des Subtyps B. Es wurde ebenso festgestellt, dass die Seren der mit dem EC26-2A4ΔM Peptid behandelten Tiere vergleichbare Neutralisationseigenschaften hinsichtlich ihrer Breite und Potenz aufwiesen, wie die Seren der Mäuse, welche mit dem Wildtyp-Epitop immunisiert wurden und somit die eingeführten Mutationen die Induktion neutralisierender Antikörper nicht beeinträchtigten.

4.2.3 Evaluation der klinischen Relevanz EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper

4.2.3.1 Analyse der Seroprävalenz Epitop-spezifischer Antikörper in Plasmaproben HIV-positiver Patienten

Parallel zur Charakterisierung des MPER-Epitops wurde in einer assoziierten medizinischen Dissertation von Karsten Steinhoff (in Vorbereitung) unter meiner experimentellen Anleitung die Anwesenheit solcher EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper in einer HIV-positiven Patientenkohorte untersucht (Steinhoff, in Bearbeitung). Hierfür wurde in 979 Plasmaproben der Frankfurter HIV-Kohortenstudie (Wolf et al., 2014), gesammelt über einen Zeitraum von 18 Jahren, die Plasmareaktivität mit dem EC26-2A4ΔM-Epitop mittels ELISA bestimmt (Tabelle 4.10). Anschließend sollten die Ergebnisse dieser Analyse mit HIV-1 relevanten klinischen Parametern korreliert werden mit dem Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper und dem klinischen Status der Patienten zu evaluieren. Insgesamt zeigten 83 Patienten der Kohorte eine Reaktivität mit dem gp41-Epitop. Bei der Auswertung der Messdaten wurde beobachtet, dass Patienten mit EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern im Plasma (EC26-2A4ΔM-positiv) durchschnittlich einen signifikant höheren CD4-Nadir (Median [m] 172 CD4-Zellen/ μ L) aufwiesen als Patienten ohne solche Antikörper (EC26-2A4ΔM-negativ, m 124 CD4-Zellen/ μ L) (Abbildung 4.25A). Allerdings konnte bei der Korrelation der Viruslast und der CD4-Zellzahl mit den EC26-2A4ΔM-positiven und -negativen Patienten kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden (Abbildung 4.25A). Dieser Effekt ist möglicherweise dadurch begründet, dass alle Patienten der Frankfurter HIV-Kohortenstudie unter antiretroviraler Therapie (ART) stehen und ein potentieller Einfluss nAbs durch die HIV-Medikamente überlagert wird (Ringel et al., 2018B).

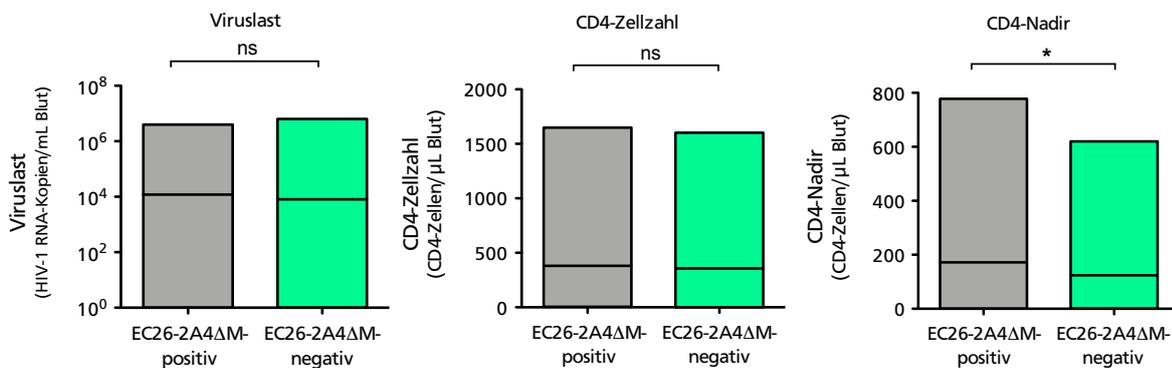
Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Patrice Debré (Sorbonne Universités Paris, Frankreich) das Vorhandensein EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper in Plasmaproben einer weiteren HIV-Patientenkohorte evaluiert. Die ARNS CO15 ALT-Kohorte beinhaltet Plasmaproben von HIV-infizierten Patienten, die mindestens seit 8 Jahren HIV-seropositiv sind, aber keine Symptome zeigen (Grabar et al., 2009). Im Gegensatz zur Frankfurter HIV-Kohortenstudie (ART-positiv) stehen die Patienten der ARNS CO15 ALT-Kohorte nicht unter ART (ART-naiv). Bei den Betroffenen handelt es sich um sogenannte *long-term non-progressors* (LTNPs) (Abschnitt 1.5.3). Von 71 getesteten Plasmaproben der LTNPs zeigten 19 eine Reaktivität mit dem EC26-2A4ΔM-Peptid. Das entspricht einem Anteil von etwa 27 %. Verglichen mit dem Anteil EC26-2A4ΔM-positiver Patienten der ART-positiven Kohorte (8,5 %) war dieser um das 3-fache größer. Darüber hinaus wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit Epitop-spezifischer Antikörper im Plasma und einer verringerten Viruslast festgestellt (Abbildung 4.25B). Die Anzahl detektierter Kopien viraler RNA pro Milliliter Blut betrug bei EC26-2A4ΔM-positiven Patienten im Mittel 501, während EC26-2A4ΔM-negative Patienten durchschnittlich etwa 40-mal mehr HIV-1 RNA-Kopien im Blut aufwiesen (m 21271 HIV-1 RNA-Kopien/mL) (Abbildung 4.25B). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch bei der Anzahl proviraler DNA-Moleküle in den PBMCs der LTNPs gemacht werden. Für EC26-2A4ΔM-positive Patienten wurden im Mittel rund dreifach geringere Mengen an HIV-1 Provirus-Kopien diagnostiziert (m 81 HIV-1 DNA-Kopien/ 10^6 PBMCs) als in der Patientengruppe ohne die Epitop-spezifischen Antikörper (m 416 HIV-1 DNA-Kopien/ 10^6 PBMCs, Abbildung 4.25B). Die relativ schwache Signifikanz

der Ergebnisse, die klinischen Parameter Viruslast und provirale DNA betreffend, ist möglicherweise auf die geringe Patientenanzahl in der ARNS CO15 ALT-Kohorte zurückzuführen. Keinen signifikanten Unterschied zwischen den EC26-2A4ΔM-positiven und -negativen LTNP gab es hingegen bei der CD4-Zellzahl (Abbildung 4.25B).

Tabelle 4.10 Übersicht der zwei evaluierten HIV-1 Patientenkohorten bezüglich der Anzahl EC26-2A4ΔM-seropositiver Patienten.

Patientenkohorte	Herkunft	Zeitraum der Probenentnahme	Antiretrovirale Therapie	# getestete Patienten	# EC26-2A4ΔM-Antikörper positiv
Frankfurter HIV-Kohortenstudie	Deutschland	1996 - 2013	ART-positiv	979	83 (8,5 %)
ARNS CO15 ALT-Kohorte	Frankreich	1995 - 2002	ART-naiv	71	19 (26,8 %)

A Frankfurter HIV-Kohortenstudie



B ARNS CO15 ALT-Kohorte

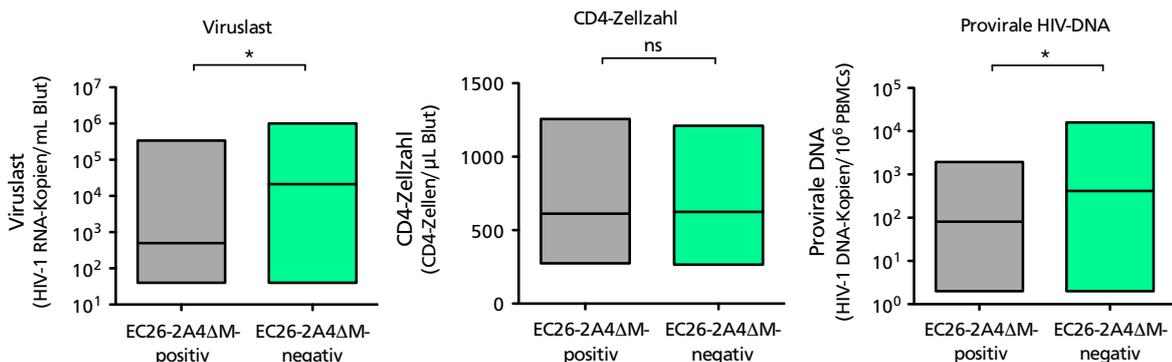


Abbildung 4.25 Korrelation HIV-1 relevanter klinischer Parameter in Abhängigkeit der Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper im Patientenplasma. (A) Analyse der Viruslast, der CD4-Zellzahl und dem CD4-Nadir zwischen EC26-2A4ΔM-positiven (grau) und -negativen (grün) Patienten der mit antiretroviralen Medikamenten therapierten Frankfurter HIV-Kohortenstudie (n = 979). (B) Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Viruslast, der CD4-Zellzahl sowie der Menge proviraler HIV-DNA und dem Auftreten von EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern im Plasma der ARNS CO15 ALT-Kohorte ohne ART (n = 71). Der Nachweis Epitop-spezifischer Antikörper erfolgte mittels ELISA. Immobilisiertes, biotinyliertes EC26-2A4ΔM-Peptid wurde mit hitzeinaktiviertem Patientenplasma in Duplikaten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe eines HRP-konjugierten Sekundärintikörpers detektiert. Die Balken innerhalb der Boxen repräsentieren den Median. Die statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten t-Tests evaluiert (* P<0,05). Abkürzungen: ns, nicht signifikant.

4.2.3.2 Charakterisierung Patienten-abgeleiteter EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper

Ausgehend von den zehn Patienten der Frankfurter HIV-Kohorte mit der stärksten Plasmareaktivität gegen das gp41-Epitop, wurden im Rahmen der Dissertation von Karsten Steinhoff die EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper aus den Plasmaproben aufgereinigt. Die isolierten Antikörper sollten in der Folge hinsichtlich ihrer Neutralisationsaktivität und einer möglichen Kreuzreaktivität mit Phospholipiden genauer untersucht werden, um eine potentielle therapeutische Wirksamkeit solcher EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper zu evaluieren. Zunächst erfolgte der Nachweis einer spezifischen Bindung des MPER-Epitops durch die Patienten-abgeleiteten Antikörper mittels ELISA (Abschnitt 3.3.10). Wie aus den Ergebnissen in Abbildung 4.26A hervorgeht, konnte für alle aufgereinigten Antikörper der zehn HIV-Patienten (#1 - #10) eine Interaktion mit dem EC26-2A4ΔM Peptid beobachtet werden. Die Epitop-spezifischen Antikörper der Patienten #1, #2, #7, #8 und #9 (~1,4 – 2,2 AU) zeigten hierbei in Relation zum EC26-2A4-IgG (1,6 AU) eine starke Reaktion mit dem HIV-1 Peptid, während für die Patienten #3, #5 und #10 eine moderate (~0,7 – 1 AU) und für die Patienten #4 und #6 eine schwache Bindung (0,4 – 0,5 AU) ausgemacht wurde.

Im Anschluss daran erfolgte die Analyse der Neutralisationsaktivität der Patienten-abgeleiteten Antikörper gegen Env-pseudotypisierte Viren unterschiedlicher HIV-1 Subtypen (Tabelle 4.11). Die Anzahl an Pseudoviren, gegen die ein Antikörper getestet wurde, war hierbei von der Menge aufgereinigter Immunglobuline abhängig. So konnten die EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper der Patienten #2, #4, #8, #9 und #10 insgesamt gegen sieben HIV-1 Isolate getestet werden. Für den Patienten #1 wurde die Neutralisationsaktivität der Epitop-spezifischen Antikörper gegen sechs und für die Patienten #3 und #6 jeweils gegen drei HIV-Pseudoviren bestimmt. Aufgrund geringer Volumina der Plasmaproben und einer schwachen Ausbeute aufgereinigter Antikörper konnten für die Patienten #5 und #7 keine Neutralisationsstudien durchgeführt werden. Die in der Tabelle 4.11 dargestellten ermittelten IC₅₀-Werte der Antikörper gegen das jeweilige Pseudovirus zeigten eine heterogene Neutralisationsaktivität, verursacht durch sieben der acht untersuchten Patienten-abgeleiteten Antikörper. Die Neutralisationsbreite variierte hierbei zwischen einem (#10) und fünf (#9) neutralisierten Pseudoviren. Zudem wurde ebenso festgestellt, dass neben den Tier 1-Viren auch die neutralisationsresistenteren Tier 2 HI-Viren durch einige der aufgereinigten Antikörper (#1, #2, #4, #8 und #9) an der Infektion der Zielzellen gehindert wurden. Die ermittelten IC₅₀-Werte der Patienten-abgeleiteten Antikörper gegen die verschiedenen Pseudovirus-Isolate schwankten hierbei stark zwischen 1,4 bis 20 µg/mL. Im Mittel konnten für die Patienten IC₅₀-Werte aller neutralisierten Virusstämme von 4,1 (#10) bis 17,2 µg/mL (#8) ausgemacht werden, wobei der Patient #10 lediglich den Tier 1 HIV-162.LS-Klon neutralisieren konnte.

Zusätzlich sollte in einer abschließenden Studie eine mögliche Kreuzreaktivität der EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper der acht HIV-Patienten mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin untersucht werden, um eine für mAb 2F5 beschriebene Autoreaktivität der Antikörper auszuschließen. Die Patienten-abgeleiteten Immunglobuline wurden hierfür in kommerziellen 96 Well-Mikrotiterplatten mit immobilisiertem Cardiolipin bzw. Phosphatidylserin inkubiert. Danach erfolgte die Detektion gebundener Antikörper, wie unter 3.3.10 beschrieben, mit Hilfe eines HRP-konjugierten Zweitantikörpers. Für die Interpretation

der photometrisch bestimmten Messergebnisse fungierten jeweils interne Positiv- und Negativkontrollen als Bezugsgröße (Abbildung 4.26B). Anhand des Vergleiches der ermittelten Reaktivitäten der Epitop-spezifischen Antikörper mit den Kontrollen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass keine der Patienten-abgeleiteten Immunglobuline eine Kreuzreaktivität mit einem der beiden Phospholipide aufzeigte. Darüber hinaus wurden zusätzlich auch die polyreaktiven HIV-1 MPER-Antikörper 2F5 und 4E10 als Referenzantikörper mit analysiert (Liu et al., 2014). Wie erwartet, zeigte der mAb 4E10 eine starke Polyreaktivität mit beiden Phospholipiden, während der mAb 2F5 ausschließlich mit Cardiolipin kreuzreagierte.

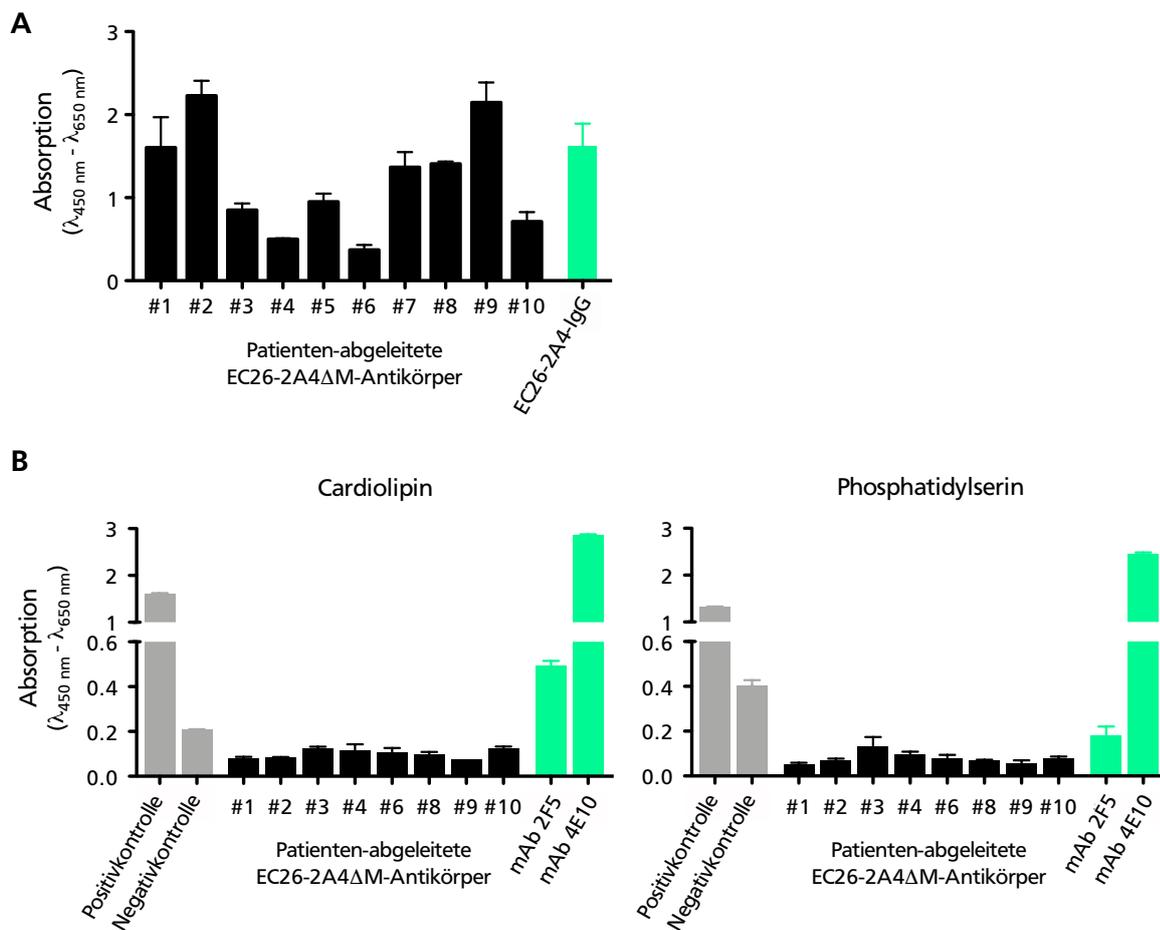


Abbildung 4.26 Untersuchung der Kreuzreaktivität Patienten-abgeleiteter EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper. (A) Nachweis der Erkennung des optimierten MPER-Epitops durch Affinitäts-aufgereinigte Antikörper von zehn HIV-positiven Patienten im ELISA. Dargestellt ist die Reaktivität der Patientenantikörper mit dem immobilisierten EC26-2A4ΔM-Epitop (schwarz). Als positive Assaykontrolle wurden EC26-2A4-IgG (grün) verwendet. (B) Gezeigt ist die Reaktivität von acht der zehn aufgereinigten EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper (10 µg/mL/ schwarz) mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin im ELISA. Interne Assaykontrollen sind durch graue Säulen und die polyreaktiven, monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 durch grüne Säulen dargestellt. Die Antigenerkennung der Antikörper wurde mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Fehlerbalken entsprechen den relativen Standardabweichungen von Duplikaten einer Messung.

Tabelle 4.11 Charakterisierung der *in vitro* Neutralisationsaktivität der EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper abgeleitet von acht HIV-1 positiven Patienten gegen bis zu sieben genetisch unterschiedliche HIV-1 Pseudoviren. Aufgeführt sind die IC₅₀-Werte (µg/mL) der aufgereinigten Antikörper aus jedem Patienten gegen das jeweilige Pseudovirus, ermittelt in standardisierten TZM-bl-Reporterzellassays. Die IC₅₀-Werte sind farbkodiert dargestellt: < 0,2 µg/mL (rot), 0,2 – 2 µg/mL (orange), 2 – 20 µg/mL (gelb), >20 µg/mL (farblos). Je HI-Virus und Antikörper wurde eine Messung in Duplikaten durchgeführt. Abkürzungen: n.d., nicht bestimmt.

HIV-1 Pseudovirus	Subtyp	Tier	Patienten-abgeleitete EC26-2A4ΔM-Antikörper							
			#1	#2	#3	#4	#6	#8	#9	#10
HIV-Bal.26	B	1	n.d.	12,3	n.d.	15,2	n.d.	>20	12,6	>20
HIV-SF162.LS	B	1	5,1	1,4	6,0	5,0	>20	9,8	5,3	4,1
HIV-SS1196.1	B	1	20	>20	16,6	>20	>20	>20	17,3	>20
HIV-398_F1_F6_20	A	2	20	3,9	n.d.	15,8	n.d.	20	12,6	>20
HIV-CNE8	A/E	2	20	>20	n.d.	>20	n.d.	20	>20	>20
HIV-THRO4156.18	B	2	>20	>20	>20	>20	>20	>20	12,5	>20
HIV-X1632_S2_B10	G	2	>20	20	n.d.	>20	n.d.	19,0	>20	>20
Anzahl neutralisierter HI-Viren			4/6	4/7	2/3	3/7	0/3	4/7	5/7	1/7

Neutralisationspotenz (IC₅₀) >20 µg/mL 20 – 2 µg/mL 2 – 0,2 µg/mL <0,2 µg/mL

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass etwa ein Viertel der getesteten Plasmaproben einer ART-naiven HIV-Patientenkohorte mit dem EC26-2A4ΔM-Epitop reagierte. Darüber hinaus korrelierte die Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper im Plasma dieser Patienten mit verringerten Mengen an viraler RNA und proviraler DNA. Des Weiteren waren Patienten-abgeleitete Epitop-spezifische Antikörper in der Lage, Tier 1 und Tier 2 Pseudoviren vier unterschiedlicher HIV-1 Subtypen zu neutralisieren. Für die aufgereinigten Antikörper konnte ebenso nachgewiesen werden, dass diese keine Polyreaktivität mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin aufzeigten.



5 DISKUSSION

5.1 PROJEKT #1 / Identifikation und Charakterisierung HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente mittels Phagen-Display Technologie

Auch 35 Jahre nach der erstmaligen Beschreibung des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 gibt es immer noch keine sterilisierende Heilung von einer Infektion mit dem Pathogen. Patienten, die sich mit dem HI-Virus infiziert haben, sind auf eine lebenslange, oftmals tägliche Therapie mit antiretroviralen Medikamenten (ART) angewiesen (Xu et al., 2017). Trotz des massiven Fortschritts in der Entwicklung und Herstellung neuer Therapeutika gibt es eine Vielzahl an Herausforderungen, mit denen HIV-Patienten konfrontiert sind. Neben der Stigmatisierung von Menschen mit einer HIV-1 Infektion und der „Last der Pille“ sowie den lebenslangen Therapiekosten, sind vor allem Nebenwirkungen und die Gefahr von auftretenden viralen Resistenzen gegenüber den ART-Medikamenten ein großes Problem (Buell et al., 2016). Daher ist die Suche nach alternativen Therapiestrategien, die eine bessere Verträglichkeit und langanhaltenderen Schutz vor einer Vermehrung von HIV-1 bieten, ein wichtiges Ziel in der HIV-1 Forschung. Zu solchen Strategien gehören unter anderem verschiedene gentherapeutische Ansätze wie bspw. die Deletion von 32-Basenpaaren einer Transmembrandomäne des CCR5-Rezeptors (CCR5 Δ 32/ Δ 32) im Genom von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), welche in der Folge die Infektion der gereiften Zielzellen durch R5-trope HI-Viren verhindern kann (Gupta et al., 2019; Hütter et al., 2009). Ein weiterer Ansatz beschreibt die Einführung des Gens einer HIV-1 spezifischen Endonuklease (Brec1) ins HSZ-Erbgut, die integriertes HIV-Provirus aus dem Genom infizierter CD4+ T-Zellen wieder entfernt und somit die Entstehung neuer HIV-Viruspartikel unterbindet (Karpinski et al., 2016). Allerdings ist der Einsatz einer Stammzelltransplantation auch mit enormen Risiken für den Patienten verbunden. So besteht unter anderem die Gefahr, dass sich die modifizierten Stammzellen nach der Transplantation im Organismus nicht etablieren und somit nicht dauerhaft überleben (Herberts et al., 2011). Darüber hinaus ist jede Stammzelltherapie auch heute noch mit einem hohen Mortalitätsrisiko assoziiert (Styczyński et al., 2019).

Neben den konventionellen antiviralen Medikamenten, spielen in jüngster Zeit auch breit neutralisierende HIV-1 Antikörper (bnAbs) als komplementärer Therapieansatz eine große Rolle. Durch die Bindung des HIV-1 Hüllproteins, der einzigen viralen Komponente auf der Oberfläche der Viruspartikel, können solche Antikörper CD4+ Immunzellen vor einem Befall des Erregers schützen und so die Progression der Infektion eindämmen (Parren & Burton,

2001). Therapeutisch gesehen können bnAbs beispielsweise in notwendigen Therapiepausen eingesetzt werden (Kumar et al., 2018). Aktuell werden einige der potentesten bisher identifizierten bnAbs in klinischen Studien auf deren therapeutisches Potential hin untersucht und zeigten dabei bereits vielversprechende Ergebnisse (Margolis et al., 2017). So konnte eine Phase 2a-Studie mit 13 HIV-Patienten belegen, dass durch zweimalige Infusion des HIV-1 CD4-Bindestellen spezifischen Antikörpers 3BNC117 die HIV-Replikation während einer Unterbrechung der konventionellen antiviralen Therapie für rund sieben Wochen unterdrückt werden konnte (Scheid et al., 2016). Eine ähnliche Beobachtung haben Caskey und Kollegen in einer klinischen Phase I-Studie mit dem V3-Glykan spezifischen Antikörper 10-1074 gemacht. Sie konnten in einer kleinen Kohorte HIV-infizierter Patienten ebenfalls einen massiven Abfall der Viruslast nach einer einzelnen Behandlung mit dem Antikörper nachweisen (Caskey et al., 2017). Allerdings haben alle Studien auch offenbart, dass die HI-Viren im Zuge der Antikörperinfusion durch Ausbildung von Fluchtmutationen Resistenzen gegen die jeweiligen Antikörper entwickelt haben (Caskey et al., 2017; Scheid et al., 2016). Eine Kombination beider monoklonalen Antikörper (3BNC117 und 10-1074) in einer Phase Ib-Studie mit HIV-positiven Patienten im Jahr 2018 hat wiederum gezeigt, dass einerseits der Antikörper-vermittelte Schutz vor der HIV-Replikation deutlich länger andauerte als bei einer Behandlung mit nur einem bnAb und dass die aufkommenden HI-Viren der Patienten keine Resistenzmutationen gegen die Antikörper entwickeln konnten (Mendoza et al., 2018). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es ein großes Bestreben, weitere solcher therapeutisch wirksamen bnAbs zu identifizieren, um eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Antikörpern noch potenter und sicherer zu machen.

Die Identifikation HIV-1 neutralisierender Antikörper erfolgt vornehmlich mit löslichen artifiziellen Formen des viralen Hüllproteins (Xiang, 2013). Jedoch bedürfen diese angesichts der komplexen Natur des membranständigen Glykoprotein-Trimers einer Vielzahl an stabilisierenden Mutationen, wodurch die ursprüngliche Proteinsequenz maßgeblich verändert wird (Pugach et al., 2015; Sanders et al., 2013). Eine alternative Strategie für die Selektion HIV-1 Hüllprotein-spezifischer Antikörper stellt die Präsentation der viralen Env-*Spikes* auf der Oberfläche von humanen Zellen dar (Alfaleh, 2017). Die Verwendung von Zellen ermöglicht die Bereitstellung des Membranproteins in seiner nativen Konformation und imitiert parallel dazu auch eine physiologisch relevante Umgebung des Zielproteins (Jones et al., 2016). Zahlreiche Studien konnten bereits die erfolgreiche Isolation von Antikörpern gegen Antigene exprimiert auf der Zelloberfläche belegen (Ayat et al., 2013; Sánchez-Martín et al., 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden native membranassoziierte HIV-Hüllproteine generiert und für die Identifikation HIV-1 neutralisierender Antikörper mittels subtraktiver Selektionsstrategien verwendet. Die Herstellung rekombinanter Antikörperfragment-Bibliotheken sowie die Selektion und Charakterisierung der identifizierten HIV-1 neutralisierenden Antikörperklone werden in dem folgenden Kapitel diskutiert.

5.1.1 Generierung von zwei HeLa-Zelllinien, die native HIV-1 Hüllproteine konstitutiv auf der Zelloberfläche präsentieren

Für die Selektion HIV-1 neutralisierender Antikörper wurden zwei Zelllinien hergestellt, von denen jede jeweils eine Variante des viralen Hüllproteins auf der Zelloberfläche exprimiert. Ein Subtyp B abgeleitetes Env (SC422661, clone B (SVPB8)), isoliert aus einem Patienten mit einer frühen HIV-Infektion sowie einer Env-Variante des Subtyps C (pAncCgp160-opt), welche anhand einer phylogenetischen Stammbaum-Analyse aller bisher bekannten Subtyp C-Env Sequenzen synthetisch rekonstruiert wurde und somit eine Art Ursprungssequenz für diesen Subtyp darstellt (Kothe et al., 2006; Li et al., 2005). Solche „zentralisierten“ Sequenzen können die genetische Diversität zwischen unterschiedlichen Viren eines Subtyps um bis zu 50 % verringern und somit die Identifikation von Antikörpern mit einem breiteren Erkennungsspektrum erhöhen (Gaschen et al., 2002). Zudem werden weltweit etwa 50 % aller HIV-1 Infektionen durch Viren des Subtyps C verursacht (Hemelaar et al., 2011). Die Reduktion von HIV-1 Subtyp C-Infektionen ist daher eines der Hauptziele in der Bekämpfung der globalen HIV-1 Epidemie. Die höchste Prävalenz an HIV-Infektionen, hervorgerufen durch Subtyp B-Viren, findet sich in den Regionen West-Europa, Amerika und Australien (McCutchan, 2006). Aufgrund der wirtschaftlichen Stärke und der hohen industriellen Entwicklung stellt eine Antikörper-basierte HIV-1 Therapie in diesen Gebieten eine durchaus realistische Behandlungsstrategie dar.

Die FACS-Analyse der mittels stabiler Transfektion generierten Zelllinien zeigte für beide HIV-1 Env-Konstrukte, dass nahezu die gesamte Zellpopulation unter CMV-Promotorregulation und Puromycin-Selektion das virale Hüllprotein auf der Oberfläche exprimiert (EnvB 98,2 %, EnvC 97 %) (Abbildung 4.3A). Anhand einer quantitativen Analyse der Hüllprotein-Expression konnten zudem für beide Env-Varianten im Mittel über 3×10^4 HIV-*Spikes* auf der Zelloberfläche bestimmt werden (Abschnitt 4.1.2). Der lediglich schwache Unterschied in der Anzahl exprimierter Hüllprotein-*Spikes* zwischen dem EnvB (75974 HIV-*Spikes*/ Zelle) und EnvC (32562 HIV-*Spikes*/ Zelle) kann möglicherweise auf eine unterschiedlich umfangreiche Proteinbiosynthese der beiden HIV-1 Hüllproteinkomplexe zurückgeführt werden. So wurden z.B. für das Subtyp B-Env 25 potentielle N-Glykosylierungsstellen in der Proteinsequenz eines gp160-Monomers bestimmt, während für das EnvC sogar 30 mögliche N-Glykosylierungsmuster detektiert wurden (Gupta et al., 2004). Andererseits ist auch denkbar, dass die beobachtete Diskrepanz in der Env-Expressionsrate durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gegenüber den beiden HIV-Hüllproteinvarianten hervorgerufen wird (siehe weiter unten).

Durch die gezielte Mutagenese einer oder mehrerer Aminosäuren im cytoplasmatischen Teil (CT) des HIV-Env, wäre eine noch höhere Ausbeute an membranassoziierten Hüllproteinmolekülen möglich gewesen (Bhakta et al., 2011). Der cytoplasmatische Teil der gp41-Untereinheit weist verschiedene Tyrosin-basierte (Yxx ϕ) und Di-Leucin-basierte (LL) Sequenz-Motive auf, die im Zusammenhang mit der Internalisierung und dem Protein-*Trafficking* des HIV-Env stehen (Höning & Hunziker, 1995; Letourneur & Klausner, 1992). Geringe Expressionsmengen des viralen Hüllproteins auf der Oberfläche natürlicher infizierter Zellen führen zu einer verringerten Immunogenität und somit auch zu einer limitierten Immunantwort und stellen daher für das HI-Virus eine Art Immun-Fluchtmechanismus dar

(Postler & Desrosiers, 2013). Wissenschaftler der Universität Atlanta haben gezeigt, dass durch Substitution dieser CT-Motive eine 2- bis 14-fache Steigerung der HIV-Env Expression auf der Zelloberfläche erreicht wird. Allerdings hat die Studie ebenso offenbart, dass die mutierten Env-Varianten eine nahezu komplett reprimierte Fusiogenität und Infektiösität aufwiesen (Bhakta et al., 2011). Aufgrund des Verlustes der Env-Funktionalität und einem möglichen Mutations-bedingten Einfluss auf die Konformation der HIV-Hüllproteine, wurde auf eine solche CT-Modifikation in dieser Arbeit verzichtet.

Neben der Endocytose membranständiger Env-Moleküle ist auch bekannt, dass die viralen Hüllproteine bei einer natürlichen HIV-Infektion in unbeweglichen Nano-Clustern innerhalb größerer Domänen, sogenannter *Lipid Rafts*, auf der Zelloberfläche zusammengefasst sind. Diese Aggregation von Env-*Spikes* zu kleinen Bündeln wird durch das HIV-Protein Gag induziert (Roy et al., 2013). Die Assemblierung von Gag an den CT führt in der Folge zu einer unterdrückten Fusionsfähigkeit der Hüllproteine, welche wiederum die Ausbildung von Synzytien zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen verhindert. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus unter anderem die effiziente Produktion neuer HI-Viruspartikel sicherstellen soll (Huarte et al., 2016). Anhand der Ergebnisse der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde für beide Env-Zelllinien einerseits eine eindeutige Kolo-kalisation der viralen Hüllproteine mit der Zellmembran beobachtet und andererseits konnte ebenso eine homogene Env-Expression über die gesamte Plasmamembran ausgemacht werden (Abbildung 4.3C). Die membranweite Env-Expression lässt darauf schließen, dass die Hüllproteine nicht in immobilen Clustern zusammengefasst in der Zellmembran verankert sind und wird vermutlich durch das fehlende *gag*-Gen in der gewählten Expressionsstrategie verursacht. Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen von Roy et al., die bei einer gehemmten Interaktion zwischen dem CT und HIV-Gag ebenfalls weniger Clusterbildung, eine gesteigerte Mobilität und Fusiogenität der Env-Moleküle in der Plasmamembran nachweisen konnten (Roy et al., 2013). Eine Präsentation der viralen Hüllproteine aggregiert in Clustern hätte möglicherweise eine erschwerte Selektion HIV-1 Env-spezifischer Antikörper zur Folge, aufgrund der engeren räumlichen Anordnung der Env-*Spikes* zueinander und den daraus resultierenden sterischen Effekten.

Ein weiterer kritischer Punkt für die erfolgreiche Selektion antigenspezifischer Immunglobuline ist die Verwendung korrekt gefalteter Antigene (Jones et al., 2016). Da die Funktion eines Proteins abhängig ist von dessen nativer Struktur, wurde die Funktionalität der membranassoziierten HIV-Hüllproteine im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Zell-Zell-Fusions-Assays analysiert (Moore et al., 2006; Steipe, 2004). Die Fusiogenität der Env-exprimierenden Zelllinien wurde anhand der Synzytienbildung durch Kokultivierung mit einer CFDA-markierten Reporterzelllinie (CD4+/CCR5+) über einen Zeitraum von 2 h quantitativ untersucht (Abbildung 4.5). Sowohl die HeLa-EnvB als auch die HeLa-EnvC-Zellen waren in der Lage mit den Reporterzellen Synzytien auszubilden, während die Kontrollprobe mit HeLa-WT-Zellen über den gesamten Messzeitraum keine Synzytienbildung erkennen ließ. Der einzige Unterschied in den Ansätzen bestand in der Anwesenheit des HIV-Hüllproteins auf der Oberfläche der HeLa-EnvB und EnvC-Zellen. Daher ist eine Fusion der HeLa-Env Zellen mit den Reporterzellen, verursacht durch die Interaktion des HIV-Hüllproteins mit den Rezeptoren CD4 und CCR5, naheliegend. Das HIV-Hüllprotein bildet bekanntermaßen den entscheidenden viralen Faktor für den Eintritt eines Viruspartikels in eine Wirtszelle (Agrawal

et al., 2011). Erst durch die Bindung eines Env-*Spikes* an den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche der Wirtszelle und der dadurch induzierten massiven konformationellen Änderung, gefolgt von der Bindung eines Co-Rezeptors (CXCR4/ CCR5) und der anschließenden Bildung des 6-Helix Bündel-Motivs, kommt die Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran zustande (Wilens et al., 2012). Die für die umfangreichen Strukturwechsel benötigte Flexibilität und Stabilität des Hüllproteins wird ausschließlich bei einer nativen Konformation des HIV-Env ermöglicht (Checkley et al., 2011). Deshalb liefern fusionskompetente Hüllproteine einen deutlichen Hinweis auf eine native Konformation des trimeren Glykoprotein-Komplexes. Darüber hinaus haben Studien ebenso gezeigt, dass die Dauer der Membranfusion zwischen HI-Viruspartikeln und CD4+ Wirtszellen zwischen 30 min und 2 h beträgt (Seitz, 2016). Daher deuten die bereits nach 30 min Kokultivierung einsetzende Synzytienbildung und die damit verbundene schnelle Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen dem HIV-Env und den Wirtszell-Rezeptoren sowie der mit weit über 50 % liegende hohe Anteil fusionierter Zellen nach 60 min Kokultivierung auf die Expression einer Vielzahl funktionaler Env-Moleküle in der Plasmamembran der Zellen hin. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Beobachtung untermauert, dass sich Synzytien mit mehreren Zellkernen entwickelt haben, es also zu mehrfachen Fusionsereignissen einer Zelle gekommen ist (Abbildung 4.5B).

Zusätzlich zur Funktionalität wurde eine native Proteinstruktur ebenfalls durch die Antigenintegrität der membranständigen HIV-Hüllproteine nachgewiesen. Dies erfolgte mit Hilfe verschiedener gut charakterisierter HIV-1 Env-spezifischer Antikörper, die an unterschiedliche antigene Determinanten des viralen Glykoproteins binden (Abbildung 4.6). Das Resultat der Analyse offenbarte eine Interaktion beider Env-Konstrukte mit den monoklonalen Antikörpern 3BNC117, b12, VRC01 (CD4-Bindestelle) und dem mAb PGT121 (V3-Loop) (Abbildung 4.6). Für alle vier Antikörper ist bekannt, dass sie in der primären Proteinsequenz diskontinuierliche Epitope erkennen, die erst in der nativen quartären Struktur in räumlicher Nachbarschaft organisiert sind (Kwong et al., 2013). Die CD4bs-spezifischen Antikörper 3BNC117, b12 und VRC01 wechselwirken unter anderem mit verschiedenen β -Schleifen wie dem D-, dem V1/V2-, dem V5- und dem CD4-*Binding-Loop* des HIV-Hüllproteins (Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2010; Zhou et al., 2013). Im Gegensatz dazu bindet der monoklonale Antikörper PGT121 an komplexe Regionen innerhalb der V3-Domäne und an ein N-Glykan an der Position 332 (³³²NIS³³⁴) (Mouquet et al., 2012A). Somit liefern die erhaltenen Ergebnisse einen eindeutigen Hinweis darauf, dass einerseits für das Hüllprotein funktionell wesentliche Bereiche, wie die CD4-Bindestelle, durch Antikörper zugänglich sind und andererseits, dass die Hüllprotein-*Spikes* eine native Konformation besitzen. Die beobachtete stark heterogene Reaktivität der Antikörper mit den beiden HIV-Env-Subtypen wird vermutlich durch Sequenzunterschiede zwischen den Hüllproteinen und den originären Antikörperepitopen verursacht. So konnte beispielsweise für das HIV-EnvB eine Übereinstimmung mit der ursprünglichen Epitop-Sequenz des mAb PGT121 von etwa 67 % ermittelt werden, während das HIV-EnvC lediglich eine Übereinstimmung von etwa 41 % zeigte (HIV Database; Kuiken et al., 2003). Je höher also die Homologie der Epitop-Sequenzen, desto höher ist die Affinität bzw. Stabilität der Antikörperbindung und entsprechend auch die gemessene Reaktivität mit der Env-Variante. Darüber hinaus wurde anhand der Untersuchungsergebnisse ebenso festgestellt, dass der mAb 2G12 ausschließlich mit dem HIV-EnvB interagiert (Abbildung 4.6). Der mAb 2G12 ist ein Glykan-abhängiger

Antikörper, welcher das HIV-Hüllprotein über verschiedene konservierte N-Glykane nahe der V3- und V4-Schleife in der gp120-Untereinheit bindet (Trkola et al., 1996). Eine essentielle N-Glykosylierungsstelle für die Erkennung des HIV-Env durch den mAb 2G12 bildet die Position 295 (²⁹⁵NCT²⁹⁷) N-terminal des V3-Loops (Chen et al., 2005). Anhand einer Sequenzanalyse des EnvC-Klons wurde festgestellt, dass dieser kein Asparagin sondern ein Valin an der Position 295 besitzt (²⁹⁵VCT²⁹⁷), wodurch die potentielle Glykosylierungsstelle verloren geht und eine Interaktion mit dem mAb 2G12 nicht zustande kommt. Diese Beobachtung wird zudem durch Studien bestätigt, die belegen, dass Subtyp C-Viren an der Position 295 häufig eine Substitution des Asparagins durch ein Valin aufweisen und dadurch bedingt resistent gegenüber einer Neutralisation durch den mAb 2G12 sind (Gray et al., 2007). Eine ähnliche Reaktivität wie der mAb 2G12 zeigte auch der MPER-Antikörper 2F5 mit den Transmembranbereichen der Env-Proteine. Für diesen konnte ebenso nur eine Bindung an das HIV-EnvB ausgemacht werden (Abbildung 4.6). Im Gegensatz zu den gp120-spezifischen Antikörpern, erkennt der mAb 2F5 ein lineares kontinuierliches Epitop in der gp41-MPER. (Ofek et al., 2004). Die fehlende Reaktivität des mAb 2F5 mit dem EnvC-Klon lässt sich vermutlich auch durch Unterschiede in der Epitopsequenz erklären. Der MPER-Antikörper 2F5 erkennt ein 6 Aminosäure (AS) langes Kernepitop (⁶⁶²ELDKWA⁶⁶⁷), welches in der Proteinsequenz des HIV-EnvC in 3 AS geändert zu finden ist (⁶⁶²ALDSWE⁶⁶⁷) (Mehandru et al., 2004). Experimentelle Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass eine Substitution der AS ⁶⁶⁴DKW⁶⁶⁶ innerhalb des Kernepitops zu einem kompletten Verlust der Reaktivität mit dem mAb 2F5 geführt hat (Abbildung 4.22B). Auffällig ist zudem auch die schwache Intensität der Bindung des mAb 2F5 an das HIV-EnvB, trotz des vorhandenen 2F5-Epitops in der Hüllproteinsequenz. Diese Beobachtung ist auf die Lokalisation des Antikörperepitops in der geschlossenen Env-Struktur zurückzuführen. Chakrabarti und Kollegen konnten zeigen, dass die Zugänglichkeit der MPER für den mAb 2F5 durch Bindung an den CD4-Rezeptor erhöht wird. Sie haben postuliert, dass dieser Effekt durch die partielle Öffnung der MPER in Folge der CD4-Rezeptorinteraktion mit dem HIV-Env zustande kommt, wodurch das leicht nach innen gerichtete Epitop mehr nach außen exponiert wird und leichter durch den nAb 2F5 erkannt werden kann (Chakrabarti et al., 2011). Somit kann aufgrund der sehr schwachen mAb 2F5-Bindung an das HIV-Env von einer geschlossenen Proteinstruktur der membranständigen Env-*Spikes* ausgegangen werden. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der fehlenden Reaktivität der Antikörper 697-30D, 17b und 10E8 mit beiden Env-Konstrukten noch zusätzlich untermauert. Die drei Antikörper wurden im Rahmen der Antigenintegritäts-Bestimmung als Negativkontrollen eingesetzt. Studien zur Charakterisierung der Erkennungssequenzen haben gezeigt, dass die mAb 697-30D (V2-Loop), 17b (CD4i) und 10E8 (MPER) Epitope erkennen, welche ebenfalls in der CD4-ungebunden, geschlossenen nativen Env-Konformation im Inneren verborgen liegen und somit unzugänglich für die Antikörper sind (Huang et al., 2012B; Powell et al., 2017; Wyatt et al., 1995;). Eine Bindung dieser Antikörper hätte daher auf einen offeneren nicht-nativen Zustand des HIV-1 Hüllproteins hingedeutet, welcher bspw. durch ungespaltene gp160-Vorläuferproteine oder andere trimere Env-Isoformen in der Plasmamembran verursacht wird (Moore et al., 2006). Zudem wurde das Vorhandensein der Epitopsequenzen in beiden Hüllproteinvarianten anhand eines Sequenzabgleiches überprüft. Lediglich das Kernepitop des mAb 697-30D ist in der Proteinsequenz des HIV-EnvB stark abgeändert. Folglich beruht

die fehlende Antikörperreaktivität mit den Env-Konstrukten nicht auf Abwesenheit der spezifischen molekularen Erkennungsstrukturen.

Darüber hinaus konnte ebenso die für einen Selektionsprozess notwendige Stabilität der membranständigen HIV-Glykoproteine nachgewiesen werden. Aufgrund der nicht-kovalenten Natur des HIV-Env kommt es bei einer natürlichen Infektion häufig zur Abspaltung der gp120-Untereinheit von der membranassoziierten gp41-Untereinheit (Zhu et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einem Experiment, bei dem trypsinierte HeLa-Env Zellen vor und nach der Inkubation mit einem gp120-spezifischen Antikörper mehrfach stringent gewaschen wurden, jedoch kein signifikanter Unterschied in der Env-Oberflächenexpression im Vergleich zu schonend behandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.7). Zusätzlich wird diese Beobachtung noch durch das ermittelte Bindungsmuster des MPER-Antikörpers 2F5 unterstützt. Der Verlust der gp120-Untereinheit führt zu einer weniger sterisch abgeschirmten Struktur des gp41-Transmembranproteins in der Zellmembran, wodurch potentielle Antikörperepitope in dieser Env-Region leichter zugänglich werden (Frey et al., 2010). Somit hätte ein technisch bedingter hoher Anteil gespaltener gp120-gp41 Untereinheiten eine starke Reaktivität des mAb 2F5 mit den Env-Zellen zur Folge gehabt (Abbildung 4.6).

Zusammengefasst, konnten mittels stabiler Transfektion zwei Zelllinien generiert werden, die native und gut zugängliche HIV-Hüllproteine in einer hohen Dichte homogen über die gesamte Plasmamembran verteilt präsentieren, was für eine erfolgreiche Selektion antigenspezifischer Antikörper von wesentlicher Bedeutung ist (Hoogenboom, 2005). Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse kann also angenommen werden, dass die membranassoziierten HIV-1 Env-Moleküle eine geeignete Zielstruktur für die Selektion HIV-1 Env-spezifischer Antikörper darstellen.

5.1.2 Konstruktion von vier scFv-Immunbibliotheken aus dem Antikörperrepertoire HIV-positiver Patienten

Für die Untersuchung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit konnten sieben HIV-positive Patienten rekrutiert werden, die keine antiretrovirale Therapie erhalten hatten (Tabelle 4.4). Diese Patienten, sogenannte LTNPs, sind in der Lage durch verschiedene Wirts- oder virale Faktoren die Progression der HIV-Infektion zu kontrollieren (Kumar, 2013). Anhand von *in vitro* Neutralisationsstudien mit den hitzeinaktivierten Patientenserum, konnte für die LTNPs A2, E1, EC09, EC26 und MH04 die Anwesenheit HIV-1 neutralisierender Plasmaantikörper (nAb) nachgewiesen werden (Tabelle 4.5) (Humbert et al., 2007; Zhou M. et al., 2013A). Somit könnten neutralisierende Antikörper einen möglichen immunologischen Faktor dieser Patienten bei der Kontrolle der HIV-1 Infektion darstellen (González et al., 2018; Humbert et al., 2007). Alle fünf Patienten zeigten eine Neutralisationsaktivität gegen vier unterschiedliche Env-pseudotypisierte HI-Viren (4/6), die genetisch nicht den autologen Hüllproteinen entsprechen. Das Ausmaß der beobachteten Neutralisationsaktivität variierte hierbei zwischen den einzelnen getesteten Pseudoviren und den Patientenserum sehr deutlich (Tabelle 4.5 & Abbildung 4.8). So konnten bspw. die Patienten EC09 (1:11360) und EC26 (>1:12150) das Isolat HIV-SF162.LS mit sehr hohen ID₅₀-Serumverdünnungen neutralisieren,

während der Patient MH04 eine wesentlich geringere ID₅₀ von 1:3300 gegen das gleiche Pseudovirus offenbarte. Im Gegensatz dazu wurde für den Patienten MH04 die höchste ID₅₀ aller fünf Patientenseren gegen das Pseudovirus HIV-Bal26 bestimmt (1:1175). Eine detaillierte Aussage, ob die ungleiche Neutralisationsaktivität der Patientenseren durch hohe HIV-Env-spezifische Antikörpertiter oder durch besonders potente Antikörperklone verursacht wurde, konnte aufgrund unbekannter HIV-1 Antikörpertiter in den Patientenproben nicht getroffen werden. Da das Hauptaugenmerk der Analyse aber vorrangig auf der Beurteilung der Neutralisationsbreite der Patientenseren lag, wurden die Titer nicht weiter bestimmt. Darüber hinaus zeigten alle fünf Patientenseren insgesamt die schwächste Neutralisationsaktivität gegen die beiden Tier 2 HIV-Isolate (Tabelle 4.5 & Abbildung 4.8). Diese Beobachtung war nicht weiter überraschend, da Viren der Gruppe Tier 2 bekanntermaßen weniger sensitiv für eine Antikörper-vermittelte Neutralisation sind als Tier 1-Viren. Die Kategorisierung von HI-Viren in Untergruppen (Tier), abhängig von ihrer Neutralisationsempfindlichkeit, dient einer besseren Vergleichbarkeit der Virusstämme und soll dabei helfen, die Potenz und die Breite neutralisierender Antikörper genauer charakterisieren zu können (Seaman et al., 2010).

Für die beiden Patienten A1 und A3 konnte ebenfalls eine schwache Neutralisationsaktivität im Serum gegen zwei der sechs Pseudoviren bestimmt werden, allerdings waren die ermittelten ID₅₀-Serumverdünnungen verglichen mit den anderen fünf Patienten bedeutend geringer. Zudem zeigten beide LTNP ausnahmslos eine Neutralisationsaktivität gegen Tier 1 HIV-Pseudoviren (Tabelle 4.5). Die Erkenntnis fehlender potenter HIV-1 neutralisierender Antikörper im Serum der Patienten A1 und A3 ist nicht ungewöhnlich, da nur etwa 20 % aller Menschen mit einer HIV-1 Infektion Antikörper entwickeln, die neben den autologen auch heterologe HIV-Stämme neutralisieren können (Mikell et al., 2011). Daher ist davon auszugehen, dass die anhaltende Kontrolle der Virusinfektion beider Patienten auf anderen Faktoren beruht. Möglicherweise auf der Überexpression sogenannter *protektiver* HLA-Allele oder besonders wirksamer NK- oder HIV-1 spezifischer CD8-Zellen (Alter et al., 2007A; Pereyra et al., 2010; Sáez-Cirión et al., 2007). Denkbar ist allerdings auch, dass weniger replikationskompetente oder infektiöse HIV-1 Klone für die ausbleibende Progression der Virusinfektion verantwortlich sind (Carl et al., 2000).

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit, basierend auf der ermittelten Breite der Serumneutralisationsaktivität, die zu dem Zeitpunkt besten zur Verfügung stehenden Patientenproben für die Herstellung der Antikörperfragment-Bibliotheken ausgewählt. In Zukunft wäre aufgrund der Beobachtung, dass keines der Patientenseren das getestete HIV-1 Subtyp A Pseudovirus neutralisieren konnte, sondern ausschließlich Pseudoviren des Subtyps B, eine größere Anzahl an Spendern mit breiteren Plasmaneutralisationseigenschaften von Vorteil, um die Wahrscheinlichkeit der Identifikation breit neutralisierender HIV-1 Antikörper zusätzlich zu erhöhen.

Neben der Neutralisationsaktivität wurde auch die Reaktivität der Patientenseren mit dem auf Hela-Zellen exprimierten HIV-EnvB überprüft (Abbildung 4.9). Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation von Plasmaantikörpern, welche das Env-Konstrukt erkennen und binden können, um die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung solcher HIV-1 Hüllprotein-spezifischer Antikörper bei der anschließenden Selektion zu erhöhen. Von den fünf LNTPs, die zuvor eine breitere Neutralisationsaktivität aufgezeigt haben (A2, E1, EC09, EC26 und MH04), zeigten

alle Seren, bis auf das Serum des Patienten A2, eine Reaktivität mit den HIV-EnvB exprimierenden HeLa-Zellen (Abbildung 4.9). Aus diesem Grund wurde die Blutprobe des Patienten A2 für die Generierung der Antikörperfragment-Bibliotheken nicht berücksichtigt. In der Nachbetrachtung wäre eine Analyse der Reaktivität der Patientenserum mit dem HIV-EnvC ebenso sinnvoll gewesen, da gegebenenfalls der Patient A2 mit einer vergleichbaren Neutralisationsbreite wie die Patienten E1, EC09, EC26 und MH04, EnvC-spezifische Antikörper hätte aufzeigen können, welche somit für die Selektion nicht verfügbar waren. Der Verzicht, die Bindung der Patientenproben an das HIV-Hüllprotein des Subtyps C zu kontrollieren, ist damit begründet, dass einerseits die Seren vornehmlich Pseudoviren des Subtyps B neutralisieren konnten und andererseits alle Patienten mit Viren des Subtyps B infiziert sind, weshalb wir uns auf das Subtyp B-Env beschränkten. Dennoch erfolgte die Herstellung von Immunbibliotheken aus dem Antikörperrepertoire von vier der fünf HIV-positiven Patienten mit einer heterologen Serumneutralisationsaktivität.

Für die Verwendung von Immunbibliotheken gibt es gute Gründe, da durch die Isolierung der V-Gensegmente aus dem Immunglobulin G-Repertoire immunisierter Spender gereifte Antikörper abgeleitet werden können, die eine hohe Spezifität gegen ein bestimmtes Antigen besitzen (Clackson et al., 1991). Unter anderem konnte so bereits ein Fab-Fragment (X5) aus einer Immunbibliothek isoliert werden, das durch Bindung des HIV-1 Env-CD4-CCR5-Komplexes die Infektion von PBMCs inhibieren konnte. Die Immunbibliothek wurde aus dem Antikörperrepertoire eines HIV-seropositiven Patienten generiert (Moulard et al., 2002). Ebenso konnten Pelat und Kollegen aus einer scFv-Bibliothek, abgeleitet von immunisierten Makaken, ein Antikörperfragment isolieren, welches den Letalfaktor (LF) des Milzbranderreger *Bacillus anthracis* mit einer hohen Affinität bindet und dadurch die Ausbildung des Letaltoxins (LT) verhindert. Der scFv konnte zudem das Anthrax-LT *in vitro* und *in vivo* neutralisieren (Pelat et al., 2007). Des Weiteren konnten in der AG Dietrich durch Trott et al., ebenfalls aus einer Patienten-abgeleiteten Immunbibliothek eines LTNP, zwei HIV-1 Env-spezifische scFv-Fragmente identifiziert werden, von denen ein Antikörperfragment (scFv A7) *in vitro* Neutralisationsaktivität gegen HIV-Pseudoviren aufzeigte (Trott et al., 2014).

Gerade im Zusammenhang mit der Identifikation HIV-1 spezifischer Antikörper, welche in der Lage sind das Pathogen zu neutralisieren, bieten Immunbibliotheken große Vorteile. Aufgrund der schnellen Mutationsrate und der hohen genetischen Flexibilität von HIV-1 müssen nAb mehrfache Reifungsprozesse durchlaufen, um die besonderen strukturellen Eigenschaften zu entwickeln, die für eine breite Neutralisationsaktivität verschiedener HIV-1 Klone notwendig sind (Geiß & Dietrich, 2015). Alle bisher identifizierten bnAbs sind häufig selbst- oder polyreaktiv, haben außergewöhnlich lange HCDR3-Domänen und weisen eine sehr hohe Anzahl an somatischen Hypermutationen auf (McElrath & Haynes, 2010). Bedingt durch die andauernde Ko-Evolution HIV-1 spezifischer Antikörper mit dem Virus, treten bnAbs erst mehrere Jahre nach der initialen Infektion in Patienten auf (Gray et al., 2011). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich LTNPs rekrutiert, die mindestens vier Jahre mit dem HI-Virus infiziert sind, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen gereifte HIV-1 neutralisierende Antikörper isolieren zu können. Die Generierung der scFv-Immunbibliotheken der vier HIV-Patienten erfolgte in zwei Klonierungsschritten. Aufgrund der hoch variablen HCDR3-Domänen tragen die Gene der schweren Ketten bedeutend mehr zur Diversität der

scFv-Bibliotheken bei (Little et al., 1999). Daher wurde das amplifizierte Genrepertoire der variablen Domäne der leichten Kette (κ und λ) zuerst in einen Phagen-Display Vektor inkloniert. Die Gene der schweren Antikörperkette wurden in der Folge in einem zweiten Klonierungsschritt in den Phagemid, welcher das Genrepertoire der leichten Ketten enthielt, eingebracht (Abschnitt 4.1.4). Im Zuge der Transformation von elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF' mit den erzeugten Plasmiden, wurden für die generierten Immunbibliotheken Bakterientiter von $2,1 \times 10^8$ bis $3,2 \times 10^9$ Transformanten erhalten (Tabelle 4.6). Aus der Literatur ist bekannt, dass Bakterientiter $>10^7$ für eine hohe Diversität der generierten Immunbibliotheken sprechen (Frenzel et al., 2014; Pardon et al., 2014). Um einen genaueren Eindruck bezüglich der Antikörperdiversität der scFv-Bibliotheken zu bekommen, wäre eine Sequenz- oder DNA-Fingerprint-Analyse mit einigen Bakterienklonen nach der Transformation durchaus sinnvoll gewesen (Marks et al., 1991). Allerdings wurde eine solche Kontrolle aufgrund der Vielzahl an generierten Subbibliotheken versäumt. Dennoch konnte mittels Kolonie-PCR nachgewiesen werden, dass die Insertionshäufigkeit des kompletten Antikörpergensatzes aller verwendeter Subbibliotheken zwischen 90 und 100 % lag, was zusätzlich auf eine hohe Qualität der Antikörperbibliotheken hindeutet. Darüber hinaus wurde die Verpackung der scFv::pIII-Fusionsproteine in die Hülle der produzierten rekombinanten Phagen anhand einer Western Blot-Analyse für alle vier generierten Immunbibliotheken bestätigt (Abbildung 4.11B). Etwas überraschend war hierbei die Beobachtung, dass trotz der hohen Insertionseffizienz des Antikörpergensatzes auch deutliche Signale detektiert werden konnten, die auf eine Produktion von Phagen mit nur einer variablen Domäne (VH oder VL) hindeuten. Vermutlich ist dieser Effekt durch die metabolische Last, der die Bakterien unterliegen, begründet. Es ist bekannt, dass die variablen Antikörperdomänen zur Aggregation neigen und daher toxisch für die Bakterien sind, wodurch die Wachstumsgeschwindigkeit vermindert wird und schließlich auch die Produktion von Phagen abnimmt. Dagegen haben Bakterien, die verkürzte Fusionsproteine herstellen, aufgrund einer geringeren metabolischen Last einen Selektionsvorteil, welcher schließlich in einer erhöhten Phagenproduktion mündet (Krebber et al., 1996).

Dennoch lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die generierten scFv-präsentierenden Phagenbibliotheken hinsichtlich ihrer Diversität und Qualität für die Selektion HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente geeignet sind.

5.1.3 Identifikation von fünf HIV-1 Env-spezifischen Antikörperphagen mittels subtraktiver zellbasierter Selektionsstrategie

Die Phagen-Display-Technologie ist eine seit langem etablierte Methode, um spezifische Liganden, wie Peptide, Proteine oder Fragmente zu identifizieren, die hoch affin mit Zielantigenen wechselwirken (Bazan et al., 2012; Dietrich et al., 2013). Im Zuge der *in vitro* Selektion HIV-1 Hüllprotein-spezifischer Antikörperfragmente, konnten mittels Phagen-Display insgesamt 63 Klone identifiziert werden, die spezifisch die generierten HIV-Env Konstrukte gebunden haben. Anhand einer Sequenzanalyse der isolierten Klone wurden letztlich fünf unterschiedliche Antikörperfragmente ermittelt (Tabelle 4.7). Die Klone scFv#1

und scFv#3 waren insgesamt je 19-mal vertreten, das VHH#2 6- und das VHH#1 5-mal, der scFv-Klon #2 war 1-mal unter den 63 Klonen zu finden. Trotz der mehrfachen Identifikation identischer Antikörperfragmente zeigten die Klone in dem Bindungs-ELISA deutliche Diskrepanzen in der Reaktivität mit den Env-exprimierenden Zelllinien (Abbildung 4.18). Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf eine unterschiedlich starke Expression der löslichen Antikörperfragment-pIII-Fusionsproteine im 96 Well-Format zurückführen. Die Menge eingesetzter Env-spezifischer Antikörperfragmente ist hierbei abhängig von der Anzahl scFv-/ VHH-produzierender Bakterien je Well und der Ausbeute an isolierten Antikörpern aus dem Periplasma der *E.coli* TG-1-Zellen. Zudem wurden auch Abweichungen in der Gesamt-Absorption zwischen einzelnen 96 Well-Mikrotiterplatten ausgemacht, wie die Varianz der Kontroll-Antikörper 2G12 (EnvB) und b12 (EnvC) mit den entsprechenden HeLa-Zelllinien zeigt (Abbildung 4.18).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt zudem auch auf, dass der Anteil unspezifisch an die Zellen bindender Phagenpartikel mit etwa 98,2 % aller analysierten Klone extrem hoch ist. Dieser hohe Anteil antigenunspezifischer Phagen ist keinesfalls unerwartet. Die Selektion von Liganden mit kompletten Zellen hat im Unterschied zur Verwendung aufgereinigter immobilisierter Proteine einige Erschwernisse. So existieren auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen eine Vielzahl irrelevanter organischer Moleküle, deren Menge verglichen mit der Anzahl exprimierter HIV-Env *Spikes* bedeutend größer ist (Alfaleh, 2017). Daher sind die Phagen hauptsächlich einer ungewollten Antigenpopulation ausgesetzt. Eine Alternative wäre hierbei unter anderem die Verwendung von Liposomen als Trägermolekül für die HIV-Hüllproteine. Diese imitieren eine zellähnliche Konformation und sind frei von störenden irrelevanten Oberflächenmolekülen, was zu einer verringerten Bindung falsch-positiver Phagen führt. Eine Studie konnte bereits die erfolgreiche Isolation von Antikörpern gegen einen Glutamatrezeptor belegen (Jespersen et al., 2000). Der große Nachteil dieser Strategie im Zusammenhang mit HIV-Hüllproteinen ist allerdings, dass die Herstellung der antigentragenden Liposomen mit artifiziell synthetisierten Proteinen oder Peptiden erfolgt und somit die essentielle native Struktur der Env-*Spikes* nicht gegeben ist (Tanaka et al., 2010). Eine andere Möglichkeit bietet der Einsatz verschiedener Env-präsentierender Wirtszelllinien bei jeder Selektionsrunde. Die geänderte Expression irrelevanter Proteine hilft dabei falsch-positive Phagen zu eliminieren, außerdem wird das Zielantigen in seiner nativen Konformation dargestellt (Jones et al., 2016).

Jedoch ist neben der Expression unerwünschter, nicht-relevanter zellulärer Kompartimente auch die unspezifische Anheftung von Phagen an die Zelloberfläche vermittelt durch deren *Coat*-Proteine (engl. Mantel) problematisch (Dziegiel et al., 1995). Es hat sich gezeigt, dass solchen unspezifisch bindenden Phagen, aufgrund Insert-freier Phagemide, häufig das Antikörperfragment, verknüpft an das pIII-Protein, fehlt. Vermutlich entstehen Plasmide ohne Antikörpergene während der Generierung der Phagenbibliotheken durch eine unvollständige Restriktion oder eine Re-Ligation (Berdichevsky et al., 1999). Diese Insert-freien Phagen haben zudem gegenüber Phagenpartikeln, die das vollständige Antikörperfragment produzieren, einen Selektionsvorteil und werden vermehrt amplifiziert (Krebber et al., 1996). Bedingt durch die Elution der unspezifisch bindenden Phagen, zusammen mit den antigenspezifischen Phagenklonen, werden diese über die einzelnen Selektionsrunden verstärkt angereichert (Alfaleh, 2017). Dass Phagenklone ohne oder mit einem verkürzten

Insert in den hergestellten Patienten-abgeleiteten Immunbibliotheken vorhanden sind, offenbarte auch die Western Blot-Analyse zur Kontrolle der Produktion scFv-präsentierender Phagen (Abbildung 4.11B).

Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine drastische Erhöhung der Waschzyklen und ein damit einhergehender gesteigerter Verdünnungseffekt nach jeder Positivselektion im *Biopanning* #9 und #10 zu einer wesentlichen Reduktion unspezifisch bindender Antikörperphagen führte (Abbildung 4.16). Darüber hinaus wurde in den beiden *Biopannings* im Vergleich zu den anderen Selektionsansätzen, aufgrund der gesteigerten Stringenz ebenso eine deutlich geringere Anzahl eluierter Phagenklone nach der ersten Positivselektion eluiert, was für eine effiziente Entfernung unspezifisch anheftender Phagen spricht. Allerdings war eine weitere Depletion unspezifisch bindender Phagen durch zusätzliche Wasch- und Zentrifugationsschritte nicht möglich, weil diese einen negativen Einfluss auf die Zellzahl der HeLa-Zellen offenbarten (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Feststellung wurde auch bei den *Biopannings* #11 bis #13 mit adhärennten HeLa-Zellen gemacht, dort haben sich die Zellen bereits nach fünfmaligem Waschen teilweise vom Zellkulturplattenboden abgelöst. Der Verlust von antigenpräsentierenden Zellen vor der Elution gebundener Phagen ist problematisch, da dieser möglicherweise auch in einem Verlust HIV-Env-spezifischer Antikörperklone resultieren könnte. Eine bekannte Strategie, den Anteil unspezifisch anhaftender Phagen noch weiter zu reduzieren ohne die Anzahl an Waschzyklen weiter zu steigern, besteht in der Verwendung von Waschpuffern mit einem niedrigen pH-Wert (pH 5,0) (Tur et al., 2001). Tur und Kollegen haben gezeigt, dass durch eine stringente Waschprozedur bei pH 5,0 nur etwa 12 % Insert-freie Phagen zurückgewonnen wurden, während der Anteil an Phagen ohne Insert nach der Behandlung mit einem Standard-Waschpuffer (pH 7,4) bei annähernd 73 % lag (Tur et al., 2001). Aus der Literatur ist jedoch auch bekannt, dass die Abspaltung der gp120- von der gp41-Untereinheit des viralen Hüllproteins bei einem pH von 4,5 bis 5,5 *in vitro* besonders stark ist und bei einem pH von 8,5 nicht auftritt (Fu et al., 1993). Die Abspaltung der gp120-Untereinheit vor der Elution ist nahezu gleichbedeutend mit dem Verlust kompletter Zielzellen, daher ist der Einsatz von Waschpuffern mit niedrigen pH-Werten im Rahmen der Identifikation HIV-1 Env-spezifischer Antikörper nicht zweckmäßig.

Neben der erhöhten Anzahl an Waschzyklen hat auch der Wechsel der Selektionstemperatur von RT auf 4 °C zu einem Rückgang unspezifisch bindender Phagen in den Selektionsansätzen geführt. Zudem wurden interessanterweise nahezu alle HIV-Hüllprotein spezifischen Antikörperklone (~97 %) bei einer Selektionstemperatur von 4 °C identifiziert. Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat kann durchaus erneut in der Stabilität des gp120-gp41-Proteinkomplexes begründet sein. Fu et al. konnten ebenso belegen, dass die Abspaltungshäufigkeit der gp120-UE nicht nur pH-, sondern auch Temperatur-abhängig ist. So wurde ein verstärkter Abwurf der gp120-UE bei Temperaturen von 22, 37 und 40 °C, aber nicht bei 16 oder 4 °C beobachtet (Fu et al., 1993). Der Hintergrund für die anfängliche Positivselektion bei RT bestand vorrangig darin, eine mögliche Verklumpung durch die Ausbildung von HIV-1 Hüllprotein-Clustern in der Zellmembran sowie eine erschwerte Expression funktionell wichtiger konformationsabhängiger Epitope bei niedrigen Selektionstemperaturen zu vermeiden (Eisenhardt et al., 2007). Anhand der quantitativen und qualitativen Untersuchungen der HIV-Env Oberflächenexpression, welche zuvor ebenfalls

bei 4 °C durchgeführt wurden, konnte allerdings auch bei niedrigen Temperaturen eine homogene Verteilung und gute Zugänglichkeit der membranassoziierten HIV-*Spikes* nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.2).

Darüber hinaus hat die Auswertung der Selektionsstudien ebenso ergeben, dass der Anteil identifizierter HIV-EnvB spezifischer scFv-Klone mit 62 % erkennbar größer ist, als der Anteil an scFv-Klonen mit einer EnvC-Spezifität (38 %). Die starke Subtyp B-Spezifität wurde auch schon für die Plasmaantikörper der vier LTNPs im Rahmen der Neutralisationsstudien mit den Patientenseren beobachtet und kann vermutlich auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass alle seropositiven Spender mit einem HI-Virus des Subtyps B infiziert sind (Tabelle 4.4).

Insgesamt liefert die starke Anreicherung von Phagen über drei bzw. vier Selektionsrunden und die Feststellung, dass antigenspezifische scFv- bzw. VHH-Klone mehrfach in einem Selektionsansatz identifiziert werden konnten, ein deutliches Indiz für eine funktionale Strategie, um HIV-Hüllprotein spezifisch bindende Antikörperfragmente zu identifizieren. Darüber hinaus konnte anhand der Ergebnisse ebenso die Eignung HIV-1 Env-exprimierender Zelllinien als Modell für die Antigenpräsentation erfolgreich aufgezeigt werden. Die Selektion von HIV-1 Env-spezifischen Antikörperkandidaten aus dem IgG-Genrepertoire von *Long Term Non-Progressors* mittels zellbasierten Phagen-Display, wurde im Kontext der Identifikation HIV-1 neutralisierender Antikörper bisher noch nicht gezeigt.

5.1.4 Drei der fünf selektionierten Antikörperklone zeigen *in vitro* Neutralisationsaktivität

Die fünf identifizierten HIV-Env-spezifischen Antikörperfragmente wurden nach der Fusion an ein Fc-Fragment eines humanen IgG1 gegen insgesamt 16 HIV-1 Pseudoviren auf ihre Neutralisationsfähigkeit hin untersucht (Abschnitt 4.1.8). 12 dieser Env-pseudotypisierten HI-Viren bilden einen globalen Standardsatz an HIV-1 Referenz-Stämmen, welcher anhand eines statistischen Modells erstellt wurde und alle weltweit epidemiologisch relevanten Subtypen und CRF von HIV-1 repräsentiert (deCamp et al., 2014). Der Einsatz eines solchen standardisierten Referenzsatzes soll dabei helfen, die Aussagekraft verschiedener Impfstudien vergleichbarer zu machen und die Neutralisationsaktivität einzelner HIV-1 Env-spezifischer Antikörper, hinsichtlich ihrer therapeutischen Effektivität, besser vergleichen zu können (deCamp et al., 2014).

Die Ergebnisse der *in vitro* Neutralisationsanalyse zeigten, dass drei der fünf reformatierten Antikörperfragment-Fc-Konstrukte (scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc) verschiedene Tier 1 und Tier 2 HIV-Pseudoviren mit teils sehr niedrigen mittleren inhibitorischen Antikörperkonzentrationen (IC₅₀) neutralisieren konnten (Tabelle 4.8). Entgegen der Beobachtung, dass die Patientenseren ausschließlich Env-pseudotypisierte HI-Viren des Subtyps B neutralisieren konnten, zeigten die beiden selektionierten scFv-Antikörperkonstrukte (scFv#1-Fc und scFv#3-Fc) überraschend auch eine Neutralisationsaktivität gegen HIV-Isolate der Subtypen A, AC, AE, BC, C und G (Tabelle 4.9). Denkbar ist, dass nicht- oder autolog-neutralisierende Antikörper aufgrund der Erkennung

immundominanter Epitope im Vergleich zu den Antikörperklonen mit heterologen Neutralisationseigenschaften in den Patienten überrepräsentiert sind und somit die Serumneutralisationsbreite eingeschränkt ist (Tomaras & Haynes, 2009). Diese Annahme wird zusätzlich durch die Identifikation des scFv#2-Fc untermauert, da dieser Klon zwar eine HIV-Env-Spezifität, aber keine Neutralisationsaktivität besitzt (Tabelle 4.8). Potentiell könnte dieses Ergebnis aber auch aus einem Rekombinationsereignis eines VH-Gens mit einem neuen VL-Gen entstanden sein, wodurch ein neues Antikörperfragment mit anderen Bindungseigenschaften entstehen würde.

Darüber hinaus wurde für die drei scFv-/ VHH-Antikörper (scFv#1-Fc, scFv#3-Fc und VHH#2-Fc) ebenso eine sehr heterogene Neutralisationsaktivität ausgemacht. So war der scFv#1-Fc als einziger in der Lage die Isolate HIV-246-F3_C10_2 (Subtyp AC), HIV-TRO.11 (B) und HIV-CH119.10 (BC) zu neutralisieren, während der scFv#3-Fc alleinig den Klon HIV-CNE8 (AE) und das VHH#2-Fc-Konstrukt exklusiv die Klone HIV-CNE55 (AE) und HIV-X2278_C2_B6 (B) neutralisieren konnte. Bis auf das Pseudovirus HIV-BJOX002000.03.2, welches durch alle drei Antikörperklone neutralisiert werden konnte, wurde allerdings keine Beziehung bezüglich einer Subtyp-spezifischen Neutralisationsaktivität zwischen den Antikörperfragmenten erkannt. Das inhomogene Neutralisationsmuster lässt sich möglicherweise auf unterschiedliche Epitope, die von den Antikörperfragmenten in der HIV-Hüllproteinstruktur erkannt und gebunden werden, zurückführen.

Zudem kann auch aufgrund der größeren Anzahl neutralisierter HIV-Pseudoviren durch die Antikörperklone scFv#1-Fc und VHH#2-Fc (je 9/16) angenommen werden, dass die beiden Konstrukte eher konservierte und somit funktionell wichtige Domänen des HIV-Hüllproteins erkennen, als der scFv#3-Fc (6/16). Je essentieller ein Epitop für die Infektion der Wirtszelle ist, desto stärker konserviert ist dessen Proteinsequenz, was folglich auch in einer erhöhten Auftretshäufigkeit des Epitops in verschiedenen HIV-1 Stämmen resultiert (Wibmer et al., 2015). Neben der Anwesenheit hoch konservierter konformationeller Determinanten innerhalb des viralen Hüllproteins, sind ebenso strukturelle Merkmale der Antikörper für die Neutralisationsaktivität von besonderer Bedeutung. Beispielsweise erkennen die bekannten bnAbs b12 und VRC01 Epitope in der CD4-Bindestelle des HIV-Env. Allerdings ist für den mAb b12 mit 33 % und den VRC01 mit 87 % eine unterschiedliche Neutralisationsbreite in der Literatur beschrieben, welche in der Art der Wechselwirkung mit dem Hüllprotein begründet ist (Kwong et al., 2013). Während der mAb b12 das Env klassisch über die hypervariablen Regionen (CDR) erkennt, imitiert der VRC01 Antikörper eher die Struktur des CD4-Rezeptors. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass aufgrund einer ungewöhnlich hohen Anzahl an somatischen Hypermutationen in den CDRs, aber auch in den *Framework*-Regionen der schweren Kette, der mAb VRC01 strukturell und chemisch ähnlich mit dem HIV-Env interagiert wie der natürliche CD4-Rezeptor (Klein et al., 2013A).

Auch bei den drei scFv-/ VHH-Konstrukten lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Antikörperstruktur und der Neutralisationsaktivität erkennen. So zeigten die beiden Antikörperkonstrukte scFv#1-Fc und VHH#2-Fc mit den längsten CDR3-Abschnitten der schweren Kette (HCDR3) nicht nur die größte Neutralisationsbreite, sondern auch die stärkste Potenz (HCDR3-Länge: scFv#1 17 AS/ VHH#2 19 AS) (Tabelle 4.7). Der Klon scFv#1-Fc war in der Lage, die neun HIV-1 Pseudoviren mit einer mittleren IC_{50} von 5,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu neutralisieren, für den VHH#2-Fc Antikörper wurde sogar eine mittlere IC_{50} von 1,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$

für alle neutralisierten Pseudoviren bestimmt. Im Unterschied dazu konnte der scFv#3-Fc mit einer HCDR3-Länge von 7 Aminosäuren die sechs Pseudoviren mit einer mittleren IC_{50} von $9,4 \mu\text{g/mL}$ inhibieren. Abhängig von der Lokalisation der Epitope Env-spezifischer Antikörper innerhalb des trimeren Hüllproteinkomplexes, können ungewöhnlich lange HCDR3-Bereiche für eine effektive Bindung notwendig sein (McLellan et al., 2011). Unter anderem ist bekannt, dass speziell HIV-1 breit neutralisierende Antikörper, die an die V1/V2-Region binden, außergewöhnlich lange HCDR3-Abschnitte von mehr als 25 Aminosäuren aufweisen, um das dicht gepackte Glykanschild zu durchdringen und mit darunterliegenden Aminosäureresten in Wechselwirkung treten zu können (Pancera et al., 2013).

Darüber hinaus konnte auch eine Korrelation zwischen der Neutralisationspotenz der Antikörperfragmente und der Bindungsstärke an die für die Selektion verwendeten Env-Varianten beobachtet werden (Abbildung 4.20B). Das Antikörperkonstrukt mit der stärksten Neutralisationspotenz VHH#2-Fc offenbarte auch die höchste Affinität mit dem HIV-EnvC (K_d 0,8 nM), gefolgt von dem scFv#1-Fc (HIV-EnvB, K_d 1,1 nM) und dem scFv#3-Fc (HIV-EnvC, K_d 1,7 nM). Für das VHH#2-Fc-Konstrukt wurde allerdings auch eine starke Affinität erwartet, da die Hüllprotein-Variante des Subtyps C auch für die Immunisierung von Dromedaren zur Induktion HIV-1 neutralisierender VHHs eingesetzt worden ist (Koch, 2017A). Dennoch führt eine Bindung hoch-affiner Antikörper zur Ausbildung stabilerer Antikörper-Antigen-Komplexe und dadurch bedingt auch zu einer erhöhten Antikörper-vermittelten Neutralisationsaktivität (Maynard et al., 2002).

Die ermittelte Neutralisationsaktivität des VHH#2-Fc-Konstruktes ist in der Breite und Potenz durchaus vergleichbar mit der Neutralisationsfähigkeit HIV-Env-spezifischer Nanobodies, die in der AG Dietrich durch Koch et al. im Rahmen einer anderen Selektionsstudie mit der gleichen VHH-Bibliothek identifiziert wurden (Koch, 2017A; Koch et al., 2017B). Einige dieser breit neutralisierenden Nanobodies befinden sich derzeit in der präklinischen Weiterentwicklung für potentielle therapeutische und prophylaktische HIV-Therapieansätze. Somit konnte anhand der erfolgreichen Selektion eines breit neutralisierenden VHH zusätzlich die Funktionalität und auch die Qualifikation der gewählten zellbasierten Selektionsstrategie bestätigt werden. Verglichen mit dem aktuell wohl potentesten bnAb 3BNC117 ist die gemessene Neutralisationsaktivität der drei Antikörperfragmente allerdings signifikant niedriger und das sowohl in der Neutralisationsbreite als auch -potenz (Scheid et al., 2016). Der klinisch relevante mAb 3BNC117 ist in der Lage, 11 der 12 HI-Viren des Referenzsatzes mit IC_{50} -Werten von 0,017 (HIV-X2278_C2_B6) bis $6,23 \mu\text{g/mL}$ (HIV-CH119.10) zu neutralisieren (HIV Database). Es zeigt sich zwar auch, dass das Pseudovirus HIV-BJOX002000.03.2 durch alle drei scFv-/ VHH-Antikörper, nicht aber durch den mAb 3BNC117 neutralisiert werden kann, dennoch ist die Neutralisationsaktivität des 3BNC117 aufgrund der konstant extrem niedrigen IC_{50} -Werte gegen fast alle Virusstämme bedeutend stärker (Webb et al., 2015). Wie schon im Abschnitt 5.1.2 angemerkt, wird die Notwendigkeit nach einer Ausweitung der Patientenzahl und die Anforderung breit neutralisierender Plasmaeigenschaften für die Identifikation neuer potenter breit neutralisierender HIV-1 Antikörper an dieser Stelle nochmal zusätzlich durch die Tatsache bestärkt, dass Scheid und Kollegen den Antikörper 3BNC117 aus einem Patienten isolieren konnten, der einer Kohorte von etwa 1500 gut charakterisierten HIV-1 *Elite Controllern* entstammt (Scheid et al., 2011).

Eine weitere Ursache für die Identifikation von Antikörperfragmenten, die verglichen mit den potentesten bnAbs nur eine mäßige Neutralisationsaktivität aufzeigen, könnte allerdings auch in der Strategie zur Herstellung Patienten-abgeleiteter scFv-Fragment-Phagenbibliotheken begründet sein. Die Immunbibliotheken wurden ausgehend von $4 - 5 \times 10^7$ isolierten PBMCs der HIV-Patienten generiert (Tabelle 4.6). Circa 0,1 – 0,2 % der Zellen des peripheren Blutes sind Leukozyten. Der Anteil an antikörperproduzierenden B-Zellen in der Leukozytenpopulation entspricht wiederum etwa 1 – 7 % (Stemcell Technologies). Somit wurden zwischen 400 bis 7000 B-Zellen je Patient isoliert und weiter prozessiert. Bei einem theoretischen Antikörperrepertoire des Menschen von rund $2,6 \times 10^6$ Möglichkeiten, bedingt durch die kombinatorische Diversität, ohne Berücksichtigung weiterer spezifitätssteigernder Prozesse wie der Verknüpfungsdiversität oder Affinitätsreifung, entspricht die Anzahl an isolierten B-Zellen in etwa nur 0,02 – 0,3 % des humanen Antikörperrepertoires (Alberts et al., 2002). Auch wenn der Anteil HIV-1 spezifischer B-Zellen in der gesamten B-Zellpopulation im peripheren Blut der infizierten Patienten infolge der akuten Belastung mit dem Pathogen sicherlich dominanter ist, besteht durchaus die Möglichkeit, dass aufgrund der geringen Probengröße ein B-Zellklon, welcher HIV-neutralisierende Antikörper produziert, nicht mit isoliert wurde. Eine weitere Besonderheit bei einer HIV-Infektion besteht zudem in der fortlaufenden Entstehung neuer HIV-Fluchtmutanten, verursacht durch die hohe Fehlerrate der viralen Reversen Transkriptase und die damit verbundene hohe genetische Antigenvariabilität des Virus (Abschnitt 1.3.2; Variabilität) (Fraser et al., 2014; Laming et al., 2013; Perelson, 2002). Daher entwickeln Patienten im Verlauf einer Infektion mit HIV-1 eine Vielzahl an Pathogen-spezifischen Antikörpern, allen voran nicht-neutralisierende Antikörper. Diese erkennen besonders immundominante Epitope in der Hüllproteinstruktur, wodurch die Diversität virusspezifischer B-Zellen im Blut ansteigt (Geiß & Dietrich, 2015; Tomaras & Haynes, 2009). Diese Annahme wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich anhand der Identifikation der zwei HIV-1 spezifischen, aber nicht neutralisierenden Antikörperfragmente scFv#2 und VHH#1 untermauert. Darüber hinaus wurde die synthetisierte PBMC-cDNA abhängig von der Amplifikation der Gene für die schwere (VH) bzw. leichte Antikörperkette (VL κ / VL λ) in drei Ansätze aufgeteilt. Dies hat zur Folge, dass der Anteil an VH-Genen, welche bekanntermaßen aufgrund ihrer besonderen strukturellen Eigenschaften ausschlaggebend für Neutralisationsaktivität der Antikörper sind, im Vorfeld der Vervielfältigung um zwei Drittel reduziert worden ist (McElrath & Haynes, 2010). Die Gefahr potentiell wirksame Antikörperklone während der Generierung der Antikörperbibliotheken zu verlieren, könnte durch ein vergrößertes Probenvolumen und daraus resultierend eine höhere Anzahl an PBMCs und B-Zellen aufgefangen werden.

Neben der methodischen Limitation ist ebenso denkbar, dass die erhaltenen Ergebnisse auf die HIV-Patienten selbst zurückzuführen sind, welche möglicherweise keine potenteren HIV-1 neutralisierenden Antikörper besitzen. Die Anwesenheit von HIV-spezifischen Antikörpern mit heterologen Neutralisationseigenschaften konnte zwar für alle vier Patienten anhand der Serumneutralisationsaktivität nachgewiesen werden, allerdings war diese ausschließlich auf Pseudoviren des Subtyps B beschränkt (Tabelle 4.5 & Abbildung 4.8). Diese Beobachtung deckt sich mit Studien von Mikell et al. und Simek et al.. Sie konnten zeigen, dass während der Progression einer natürlichen HIV-Infektion etwa 20 % aller Betroffenen Subtyp-spezifisch neutralisierende Antikörper generieren und nur rund 1 % der HIV-positiven Patienten sehr potente bnAbs entwickeln, die in der Lage sind, eine Vielzahl an Tier 2 HI-Viren über die

Subtypen zu neutralisieren (Mikell et al., 2011; Simek et al., 2009). Möglicherweise sind die in den vier Patienten vorhandenen nAbs für eine Kontrolle der jeweiligen HIV-Infektion ausreichend. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass andere genetische oder immunologische Faktoren zu der langanhaltenden Repression der HIV-Replikation führen (Abschnitt 1.5.3). Um das Ausmaß schützender Effekte durch neutralisierende Antikörper im Vorfeld besser einordnen zu können, ist eine detailliertere Charakterisierung der Patienten empfehlenswert, beispielsweise durch die Untersuchung der Anwesenheit *protektiver* HLA-Allele oder der CCR5 Δ 32-Mutation in CD4⁺ T-Zellen (Antoni et al., 2007; de Silva & Stumpf, 2004; Pereyra et al., 2010).

5.1.5 Der Klon scFv#1-Fc vermittelt eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität

Die im Rahmen der Analyse identifizierter HIV-1 spezifischer Antikörperfragmente durchgeführten ADCC-Assays mit den scFv- und VHH-Fragmenten, fusioniert an eine immunregulatorisch aktive Fc-Domäne eines humanen IgG1, offenbarten zudem überraschenderweise für das Antikörperkonstrukt scFv#1-Fc eine Antikörper-abhängige Zellvermittelte zytotoxische Aktivität (Abschnitt 4.1.10). Dieses Ergebnis war deshalb überraschend, da bekannt ist, dass ADCC im Zusammenhang mit HIV-1 Env-spezifischen Antikörpern neben der Fc-Effektorfunktion insbesondere von der Lage des Epitops innerhalb der Hüllproteinstruktur abhängig ist (Richard et al., 2018). So konnte bereits gezeigt werden, dass ADCC-vermittelnde Antikörper vorrangig CD4-induzierte (CD4i) Epitope erkennen (Richard et al., 2015). Solche CD4i-Epitope liegen in der CD4-ungebundenen *geschlossenen* Konformation des HIV-Env häufig im Inneren abgeschirmt und unzugänglich vor. Erst durch Bindung des CD4-Rezeptors, der eine Konformationsänderung im Hüllprotein auslöst und dieses in einen *partiell offeneren* Zustand überführt, werden diese kritischen Epitope exponiert (Abschnitt 1.2.2) (Munro et al., 2014). Darüber hinaus hat die RV144-Impfstudie ergeben, dass eine ADCC-Aktivität im Plasma HIV-infizierter Patienten hauptsächlich durch nicht-neutralisierende HIV-1 Antikörper vermittelt wird (Veillette et al., 2014). Allerdings hat die Untersuchung zur Antigenintegrität der beiden HIV-1 Hüllproteine der Subtypen B und C auf der Oberfläche von HeLa-Zellen gezeigt, dass der verwendete CD4i-Antikörper 17b nicht mit den membranassoziierten HIV-Env Molekülen interagiert. Außerdem wurde ebenfalls anhand der Reaktivitäten der HIV-Env-spezifischen Antikörper 697-30D, 2F5 und 10E8 eine eher geschlossene Konformation der Env-*Spikes* nachgewiesen (Abbildung 4.6 & Abschnitt 5.1.1). Somit kann eine Bindung des scFv#1-Fc an ein klassisches Epitop, welches mit ADCC in Verbindung steht, ausgeschlossen werden.

Der mit rund 6 % geringe Anteil durch ADCC eliminiertes HIV-infizierter CD4⁺ Zellen, wird möglicherweise durch die schwache Bindung des scFv#1-Fc-Klons an das für die Untersuchung verwendete HIV-Env Isolat verursacht (Abbildung 4.21A). Dies zeigte sich besonders in der geringen Änderung der gemessenen MFI (~2,5-fach) zwischen den uninfizierten Mock- und den mit HIV-1 NL4.3 ADA GFP-N⁻ U⁻ infizierten CEM.NKr-CCR5-sLTR-Luc-Zellen (Abbildung 4.21B). Zudem konnte für die Positivkontrolle mit dem mAb A32

ebenso nur eine etwa doppelt so starke ADCC-Aktivität von rund 11 % ausgemacht werden (Abbildung 4.21C). Es ist durchaus denkbar, dass die geringe ADCC-Aktivität der Antikörper generell auf die niedrige Infektionsrate der CD4⁺ Zellen mit dem HIV-Isolat zurückzuführen ist ($M \sim 5$ % der Gesamtzellpopulation), da der massive Anteil nicht-infizierter Zellen in der Probe einen störenden Einfluss auf die Interaktion zwischen den Antikörpern und den HIV-positiven Zellen haben könnte. Darüber hinaus wurden als Effektorzellen PBMCs eingesetzt. Die Fraktion an zytotoxischen Leukozyten in der PBMC-Population ist mit etwa 0,1 % zusätzlich sehr gering, sodass aufgrund der hohen Dichte irrelevanter Zellen eine effektive Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität erschwert ist (Chávez-Galán et al., 2009; Stemcell Technologies). Eine Steigerung der ADCC-Aktivität in dem Assay ließe sich durch die Verwendung einer NK (natürliche Killerzellen)-Zelllinie oder primärer NK-Zellen als Effektorzellen erreichen (Chung et al., 2014). Dennoch lassen die Ergebnisse der ADCC-Aktivitätsbestimmung den Schluss zu, dass der Klon scFv#1-Fc ein Epitop in der Liganden-ungebundenen geschlossenen Env-Struktur erkennt, wie es auf der Oberfläche von HI-Viruspartikeln vorkommt und trotzdem in der Lage ist ADCC zu vermitteln. Allerdings wären für eine robustere Aussage über die tatsächliche ADCC-Aktivität des Antikörperklons, aufgrund der schwachen Interaktion mit dem HIV-Env Isolat (HIV-1 NL4.3 ADA), zusätzliche Analysen mit weiteren Env-Varianten, die durch den scFv#1-Fc stärker gebunden werden, sinnvoll.

Eine vorsichtige Hypothese, die sich aus den Beobachtungen und Erkenntnissen dieser Arbeit ableiten lässt ist, dass der Antikörper scFv#1-Fc möglicherweise in der Lage ist, durch Bindung einer bisher unbekannt Region des viralen Hüllproteins nicht nur mit dem HI-Virus infizierte CD4⁺ T-Zellen durch ADCC zu eliminieren, sondern auch freie zirkulierende Viruspartikel an einer Infektion der Zielzellen durch Fc-Effektorfunktionen oder Neutralisation zu hindern.

5.2 PROJEKT #2 / Optimierung des EC26-2A4-Epitops in der gp41-MPER des HIV-1 Hüllproteins

Neben der Entwicklung neuer HIV-Therapien ist ein weiteres wichtiges Bestreben der HIV-1 Forschung, neutralisierende Antikörper durch Immunisierung mit viralen Antigenen *in vivo* zu induzieren. In erster Linie mit dem Ziel, eine funktionale und protektive Impfung gegen das Humanpathogen zu erhalten. Darüber hinaus kann die Induktion potenter HIV-1 bnAbs durch eine therapeutische Impfung zudem auch die körpereigene Immunabwehr Betroffener verbessern und somit die Progression einer HIV-1 Infektion verlangsamen. Insgesamt wurden bisher vier große HIV-Impfkonzeppte bezüglich ihrer klinischen Effektivität getestet (Abschnitt 1.6.3) (Barouch, 2013B). Allerdings konnten in keiner der durchgeführten Impfstudien wirksame bnAbs in den Patienten induziert werden. Die Ursachen für den ausbleibenden Erfolg sind unter anderem in der hohen genetischen Diversität des HI-Virus und der komplexen Struktur des viralen Hüllproteins begründet. Bis heute ist es Wissenschaftlern nicht gelungen, trotz der detaillierten molekularen Charakterisierung der Wechselwirkung besonders potenter bnAbs mit dem HIV-Env und der Herstellung konformationell komplexer Antigene, solche funktionalen Antikörper in Affen oder Menschen zu induzieren (Burton et al., 2012).

In einer vorausgegangenen Dissertation konnte das lineare Epitop EC26-2A4, welches innerhalb der *membrane-proximal external region* (MPER) der gp41-Untereinheit des HIV-Env-Proteins lokalisiert ist, durch Mingkui Zhou identifiziert werden (Zhou M., 2013B). Es wurde zudem gezeigt, dass EC26-2A4 gekoppelt an ein Trägermolekül zur Induktion schwach neutralisierender Antikörper gegen die benutzten HIV-1 Stämme in immunisierten Mäusen geführt hat (Zhou M. et al., 2012). Ausgehend von dem 29 Aminosäure langen kontinuierlichen MPER-Epitop EC26-2A4, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Immunogenität einer optimierten Peptidvariante (EC26-2A4 Δ M) hinsichtlich eines Peptidimpfstoffs untersucht.

5.2.1 Der Austausch einer Aminosäure im EC26-2A4-Kernepitop führt zum Verlust der Bindung durch den kreuzreaktiven mAb 2F5

Die detaillierte Bestimmung essentieller Aminosäuren (AS) für die Erkennung des EC26-2A4-Kernepitops durch die Antikörper 2F5 und EC26-2A4-IgG mittels Alaninscan, wurde vor dem Hintergrund der Entwicklung einer auf dem EC26-2A4 Epitop basierenden Peptidvaccine durchgeführt. Ziel war es, Aminosäuren zu identifizieren, die differentiell für die Erkennung durch EC26-2A4 IgG und den mAb 2F5 notwendig sind, da letzterer autoreaktiv ist. Die Analyse offenbarte, dass beide Antikörper unterschiedliche Aminosäuren innerhalb des EC26-2A4-Kernepitops für eine Bindung benötigen (Abbildung 4.22B). Anhand der Charakterisierung notwendiger Aminosäuren für die Bindung Patienten-abgeleiteter EC26-2A4-spezifischer Antikörper, konnten zudem die Vorarbeiten von Zhou et al. zur Feinkartierung des EC26-2A4-Kernepitops bestätigt werden (Zhou M. et al., 2013A).

Darüber hinaus hat sich innerhalb der überlagerten Region beider Kernepitope (mAb 2F5/EC26-2A4-IgG) nur eine potentielle Möglichkeit zur Modifikation des EC26-2A4-Kernpeptids (⁶⁵⁹ELLELDKW⁶⁶⁶) ergeben, die zu einem Verlust der Bindung des mAb 2F5 führte, aber die Reaktivität mit den Epitop-spezifischen EC26-2A4-IgG nicht störte (Abbildung 4.22B). Da die Asparaginsäure an Position 664 (D⁶⁶⁴) und das Lysin an Position 665 (K⁶⁶⁵) für die Interaktion beider Antikörper mit dem MPER-Peptid elementar sind, konnten diese AS nicht verändert werden. Ebenso wäre ein Austausch der Glutaminsäure an Position 662 (E⁶⁶²), aufgrund der fehlenden Notwendigkeit der AS für eine Erkennung des Epitops durch beide Antikörper, nicht sinnvoll. Allerdings konnte eine unterschiedliche Antikörpererkennung des EC26-2A4-Kernepitops bei den Aminosäuren Leucin an Position 663 (L⁶⁶³) und Tryptophan an Position 666 (W⁶⁶⁶) ausgemacht werden. Während das L⁶⁶³ ausschließlich für die Interaktion mit den Epitop-spezifischen EC26-abgeleiteten Plasmaantikörpern essentiell ist, zeigte das W⁶⁶⁶ ein gegensätzliches Ergebnis hinsichtlich der Bedeutung für die Bindung durch die beiden HIV-1 nAbs (Abbildung 4.22B). Das W⁶⁶⁶ ist essentiell für die Bindung des mAb 2F5. Jedoch hat der Austausch der AS mit einem Alanin auch gezeigt, dass die Erkennung durch den EC26-2A4-IgG im Vergleich zu dem Wildtyp-Peptid herabgesetzt war. Möglicherweise wirkt die AS an der Position 666 stabilisierend auf die EC26-2A4-IgG Bindung. Daher wurde das Tryptophan gegen alle natürlichen AS substituiert (Abbildung 4.22C).

Von den 15 potentiellen Peptidvarianten, die ausschließlich durch den EC26-2A4-IgG gebunden werden konnten, wurde; aufgrund der deutlich stärksten Reaktivität mit den EC26-abgeleiteten Epitop-spezifischen Antikörpern; das Peptid ELLELDKM für die weiteren Untersuchungen ausgewählt (Abbildung 4.22C). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen *in vivo* maßgeblich mit entscheidend ist für die Regulation der Antikörper-vermittelten Immunantwort, wie z.B. die Aktivierung von B-Zellen oder die Eliminierung des Antigens (Božič et al., 2014). Überdies konnte eine vergleichbare Reaktivität des EC26-2A4-IgG mit den löslichen Formen des Wildtyp-Kernepitops (⁶⁵⁹ELLELDKW⁶⁶⁶) und der modifizierten Epitopvariante EC26-2A4ΔM (⁶⁵⁹ELLELDKM⁶⁶⁶) nachgewiesen werden (Abbildung 4.22D). Das bedeutet, die Bindungsstärke des EC26-2A4-IgG an das gp41-Peptid wird durch die Substitution des Tryptophans gegen ein Methionin nicht beeinträchtigt. Bedingt durch die höhere Antigenität aromatischer AS wäre eine Substitution gegen ein Histidin, Phenylalanin oder Tyrosin für eine erhöhte Immunogenität des optimierten EC26-2A4-Epitops ebenfalls sinnvoll gewesen (Gill, et al., 1967). Zudem reagierte der EC26-2A4-IgG auch verhältnismäßig stark mit der Peptidvariante ELLELDKF, allerdings wurden die drei Peptide alle auch durch den mAb 2F5 erkannt und konnten daher nicht weiter berücksichtigt werden.

5.2.2 Die Immunisierung mit dem EC26-2A4ΔM-Epitop führt zur Induktion neutralisierender Antikörper in Mäusen

Unter Verwendung von Prime-Boost-Ansätzen mit dem modifizierten EC26-2A4ΔM Peptid, konnten in den durchgeführten Impfstudien hohe Titer Epitop-spezifischer Antikörper in immunisierten NMRI-Mäusen induziert werden (Abbildung 4.23B). Allerdings zeigten die verschiedenen gewählten Impfstrategien starke Unterschiede in der Effizienz der Antikörperinduktion. So wurde unter anderem eine deutliche Varianz in der Stärke der Immunantwort beobachtet, welche durch die verwendeten Adjuvantien Monophosphoryl Lipid A (MPL; Antikörpertiter M 1:1870) und Montanide ISA 720 (Antikörpertiter M 1:198) ausgelöst worden sind (Abbildung 4.23B). Für MPL, ein Adjuvanz in wässriger Lösung, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass es zu einer rapiden Immunstimulation innerhalb eines Tages nach der Immunisierung führt (Del Giudice et al., 2018). Im Gegensatz dazu ist Montanide ISA 720 als Wasser-in-Öl-Emulsion auf einen Langzeit-protectiven Effekt ausgelegt (Aucouturier et al., 2002). Die moderate Immunantwort durch Montanide ISA 720 ist vermutlich in der Wirkweise des Adjuvanz begründet. Bollinger et al. haben beschrieben, dass die Mineralöl-Komponente solcher Emulsionen an der Injektionsstelle verbleibt und langsam über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten durch immunkompetente Zellen abgebaut wird (Bollinger, 1970). Darüber hinaus unterliegen Adjuvantien bekanntermaßen auch einer starken Speziesabhängigkeit, was ebenso einen Einfluss auf das erzielte Resultat haben könnte (Del Giudice et al., 2018).

Des Weiteren wurde im Rahmen der Immunisierungsansätze das Hapten EC26-2A4 an die Trägermoleküle SOC₂ und KLH gekoppelt. Die ermittelten induzierten Epitop-spezifischen Antikörpertiter offenbarten, dass die Verwendung von KLH (Antikörpertiter M 1:22500) als Trägermolekül im Vergleich zu SOC₂ eine beträchtlich stärkere Immunantwort in den Mäusen auslöste (Abbildung 4.23B). Für SOC₂-EC26-2A4 konnte bereits im Vorfeld die Induktion neutralisierender EC26-2A4-spezifischer Antikörper in Mäusen erfolgreich nachgewiesen werden (Zhou M. et al., 2012). Dennoch wurde, aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Schlitzschnecken-Hämocyanins nach Kopplung des gp41-Peptids an KLH, eine stärkere HIV-1 Epitop-spezifische Immunantwort in den Mäusen erwartet. KLH ist mit einem Molekulargewicht (m_M) von $4.5 \times 10^5 - 1.3 \times 10^7$ Da rund 1800-fach größer als SOC₂ (m_M $1,6 \times 10^3$ Da). Aus der Literatur ist bekannt, dass die molekulare Masse eines Moleküls maßgeblich mitentscheidend ist für dessen Immunogenität. So führen große Moleküle häufig auch zu einer größeren immunologischen Reaktion als kleine Antigene (Dintzis et al., 1976; Zimecki & Webb, 1978). Zudem kann die immunstimulierende Eigenschaft von KLH möglicherweise auch auf dessen xenogenen Ursprung zurückgeführt werden (Swaminathan et al., 2014).

Die beobachtete nur leicht schwächere Induktion Epitop-spezifischer Antikörpertiter durch die optimierte Peptidvariante EC26-2A4ΔM (Antikörpertiter M 1:16100), verglichen mit dem ursprünglichen MPER-Epitop, lässt sich sehr wahrscheinlich nicht mit der unterschiedlichen Molekülgröße der beiden Haptene begründen, da die Differenz von $\sim 2,7$ kDa zwischen dem Wildtyp-Peptid (ca. 3,7 kDa) und dem EC26-2A4ΔM-Epitop (ca. 1 kDa) im Kontext der Kopplung an KLH nur marginal ist. Vielmehr wird der Effekt vermutlich durch die chemischen Eigenschaften der beiden HIV-1 Epitope verursacht. Die etwas höhere Immunogenität des EC26-2A4-KLH-Konstrukts beruht möglicherweise auf dem höheren Anteil aromatischer

Aminosäuren in der Primärsequenz des Epitops (EC26-2A4 4 AS/ EC26-2A4ΔM keine), welche nachweislich zu einer verstärkten Antigenität führen können (Gill et al., 1967).

Darüber hinaus waren die Immunseren der Tiere, welche mit dem verkürzten EC26-2A4ΔM Peptid geimpft wurden, auch in der Lage heterologe HIV-1 Pseudovirus-Stämme zu neutralisieren (Abbildung 4.24). Die Neutralisationsaktivität beschränkte sich allerdings ausschließlich auf neutralisationssensitivere HI-Viren der Gruppe Tier 1. Ebenso fiel die ermittelte Neutralisationspotenz mit einer mittleren ID₅₀ aller neutralisierten Virusisolate von 33 relativ gering aus. Dennoch war die Neutralisationsaktivität der durch das EC26-2A4ΔM induzierten Antikörper in der Breite und Potenz generell mit der Neutralisationsaktivität der Antikörper, die durch Immunisierung mit dem Wildtyp-Epitop in den Mäusen freigesetzt wurden, vergleichbar (gemittelte ID₅₀ EC26-2A4: 32). Es zeigte sich lediglich eine leichte Varianz in der Potenz einzelne Env-pseudotypisierte HI-Viren neutralisieren zu können. So wurde für die EC26-2A4ΔM-spezifischen Serumantikörper eine starke Neutralisationspotenz gegen das HIV-SF162.LS Isolat ausgemacht, während die HIV-1 Pseudoviren HIV-Bal26 und HIV-1196 durch die Wildtyp-Epitope spezifischen Antikörper effektiver neutralisiert wurden (Abbildung 4.24). Womöglich beruhen die Beobachtungen auf der Induktion von Antikörpern mit differierenden Erkennungssequenzen, bedingt durch die unterschiedliche Länge und Primärsequenz der beiden HIV-1 Peptide, was schlussendlich auch in leicht abweichenden Funktionalitäten der Antikörper resultiert (Abbildung 4.22A).

Die allgemein schwache Neutralisationsaktivität der induzierten Serumantikörper durch beide Epitope war allerdings nicht unerwartet. Auch in vorangegangenen Impfstudien mit löslichen trimeren HIV-1 Env-*Spikes* zeigten immunisierte Mäuse keine Neutralisationsaktivität gegen Tier 2-Viren (Hu et al., 2015). Die genaue Ursache für diesen Effekt konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Jedoch könnte eine mögliche Erklärung in der Unfähigkeit des murinen Antikörpergenrepertoires begründet sein, Immunglobuline mit solchen speziellen Eigenschaften zu generieren, die benötigt werden um bspw. das ausgeprägte Glykanschild des HIV-1 Hüllproteins zu durchdringen (Sanders & Moore, 2017). Eine Alternative zum verwendeten Mausmodell stellen unter anderem Meerschweinchen oder Kaninchen dar, da Immunisierungsexperimente mit artifiziellen HIV-Env Molekülen in diesen Tieren nachweislich zur Freisetzung von Antikörpern geführt haben, die zumindest autologe Tier 2 Virusstämme neutralisieren konnten (Feng et al., 2016; Sanders et al., 2015). Allerdings waren Tierversuchsarbeiten mit diesen Modellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der verfügbaren technischen Begebenheiten nicht möglich. Darüber hinaus sollte anhand der Immunisierungsstudien vorrangig das Potential untersucht werden EC26-2A4ΔM-spezifische Antikörper mit einer Neutralisationsaktivität gegen HIV-1 zu induzieren.

Ein weiterer Aspekt der ebenso mitverantwortlich für die mäßige Neutralisationsaktivität der induzierten Serumantikörper sein könnte, ist die Präsentation des HIV-Antigens in monomerer, linearer Form. Fu et al. konnten mittels NMR-Spektroskopie zeigen, dass die drei monomeren MPER-Domänen in der originären Anordnung innerhalb eines nativen Hüllprotein-*Spikes* eine Art α -helikales Cluster ausbilden (Fu et al., 2018). Möglicherweise wäre daher die Darstellung des Epitops als Strukturmotiv aus drei miteinander interagierenden α -Helices wie dem *Three-stranded Coiled-Coil* oder *Three-Helix Bundle* sinnvoll (Schneider et al., 1998). Aufgrund der natürlichen Sekundärstruktur des monomeren Epitops und der räumlichen Anordnung der α -Helices zueinander in einem solchen Motiv

könnte eine nativere Konformation der gp41-Stammstruktur mutmaßlich besser nachgebildet werden, was eventuell in der Freisetzung anderer Antikörper mit einer verbesserten Neutralisationsaktivität resultieren könnte.

5.2.3 Evaluation der klinischen Relevanz EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper

Anhand der Evaluationsergebnisse der Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper in der ART-positiven Frankfurter HIV-Kohortenstudie zeigte sich kein Unterschied in den beiden wichtigsten HIV-Surrogatmarkern, der Viruslast und der CD4-Zellzahl zwischen den Patienten mit und ohne solcher Epitop-spezifischer Antikörper (Abbildung 4.25A). Diese Beobachtung war nicht unerwartet und ist vermutlich in der Behandlung aller Patienten der HIV-Kohorte mit antiretroviralen Medikamenten begründet. Seit den frühen 90er Jahren und der Einführung der Kombinationstherapie, auch bekannt als HAART (engl. *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), bestehend aus einem Cocktail verschiedener antiretroviraler Agenzien, wurde die HIV-Therapie immer effektiver. Der Erfolg der HAART spiegelt sich in einer deutlich reduzierten Morbidität und Mortalität HIV-1 assoziierter Infektionen wieder (Arts & Hazuda, 2012). Eine funktionale Kombinationstherapie kann die HIV-1 Replikation massiv einschränken und dadurch die Viruslast im Blut dauerhaft unterhalb der Nachweisgrenze der gängigen klinischen HIV-Assays senken (20 bis 50 HIV-RNA-Kopien/ mL Blut) (den Oudsten et al., 2019; Ryscavage et al., 2014). In der Folge führt die verminderte Virusreproduktion auch zu einer Erholung des Immunsystems und zu einer Stabilisierung der CD4-Zellzahl (Arts & Hazuda, 2012). Somit ist denkbar, dass körpereigene Faktoren, welche die Progression einer Virusinfektion verlangsamen können, wie z.B. HIV-1 nAbs, möglicherweise aufgrund des starken suppressiven Therapieeffekts in den Patienten überlagert werden. Interessanterweise wurde für die Patienten der ART-positiven Kohorte mit EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörpern allerdings ein signifikant höherer CD4-Nadir ausgemacht als bei den EC26-2A4ΔM-negativen Patienten (Abbildung 4.25A). Der Nadir beschreibt den niedrigsten Wert an CD4-Zellen, der nach der Erstdiagnose einer HIV-Infektion, in der Regel vor ART-Beginn, gemessen wird und ist aus klinischer Sicht unter anderem wichtig für die Bestimmung der Phase einer HIV-Infektion nach CDC (engl. *Centers for Disease Control*) (CDC, 1992). Zudem haben verschiedene Studien gezeigt, dass der CD4-Nadir auch eine Vorhersage über das Ausmaß der Größe viraler Reservoirs und der Erholung der T-Zellen während der antiretroviralen Therapie ermöglicht (Boulassel et al., 2012; Negredo et al., 2010). So prognostiziert ein niedriger CD4-Nadir die Ausbildung vieler HIV-1 Reservoirs und eine schwache Regeneration des Immunsystems. Daher könnte der leicht erhöhte CD4-Nadir, der EC26-2A4ΔM-positiven Patienten der mit ART therapierten Kohorte, auf eine etwas verlangsamte Etablierung der HIV-Infektion in den Betroffenen, bedingt durch die Epitop-spezifischen Antikörper, hindeuten.

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen der ART-positiven Kohorte konnte innerhalb der nicht-therapierten ARNS CO15 ALT-Kohorte für HIV-Patienten, die EC26-2A4ΔM-spezifische Antikörper aufweisen, signifikant geringere Mengen an HIV-RNA (*m* 501 HIV-1 RNA-Kopien/mL) ausgemacht werden als bei den Patienten ohne solche Antikörper

(*m* 21271 HIV-1 RNA-Kopien/mL) (Abbildung 4.25B). Die Viruslast ist der Hauptindikator für eine produktive HIV-Infektion. Je höher die Anzahl an freien HIV-1 RNA-Kopien im Blut, desto stärker ist die Virusreplikation und entsprechend auch der Infektionsfortschritt (Blaser et al., 2014). Daher lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper in den Patienten zu einer verbesserten Kontrolle der HIV-Progression beitragen. Diese Annahme wird zudem ebenso durch die Korrelation der Mengen an proviraler DNA und dem Vorkommen solcher gp41-Epitop spezifischer Antikörper untermauert. So wiesen EC26-2A4ΔM-positive Patienten im Mittel eine etwa 3-fach niedrigere Anzahl an HIV-1 Provirus-Kopien auf als EC26-2A4ΔM-negative Patienten (Abbildung 4.25B). Als Provirus wird die ins Wirtszell-Genom integrierte HIV-DNA bezeichnet, daher dient die Bestimmung der Menge proviraler DNA als Gradmesser für die Infektion von Immunzellen (Re et al., 2006). Es ist durchaus vorstellbar, dass die niedrigere Anzahl infizierter Zellen in den EC26-2A4ΔM-positiven Patienten aufgrund der Neutralisation freier HI-Viren durch die Epitop-spezifischen Antikörper beruht. Eine Antikörper-vermittelte Kontrolle der HIV-Infektion wurde bereits in verschiedenen Studien an nichtmenschlichen Primaten nachgewiesen (Escolano et al., 2017). Beispielsweise haben Barouch und Kollegen nach der passiven Immunisierung von SHIV-infizierten Rhesusaffen mit dem bnAb PGT121 allein oder in Kombination mit dem mAb 3BNC117 eine Antikörpertiter-abhängige Kontrolle der Virusinfektion beobachtet. Diese äußerte sich einerseits in einem rapiden Abfall der Viruslast kurze Zeit nach der Gabe der Antikörper und andererseits auch in einer Abnahme an proviraler DNA in verschiedenen Zellen und Geweben der Tiere (Barouch et al., 2013B). Die Vermutung einer möglichen therapeutischen Relevanz EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper bei der Bekämpfung einer HIV-Infektion wird darüber hinaus auch durch den weitaus größeren Anteil an EC26-2A4ΔM-positiven LTNPs in der ARNS CO15 ALT-Kohorte (~27 %) im Vergleich zur Frankfurter HIV-Kohortenstudie (8,5 %), deren Teilnehmer keine LTNPs sind, unterstützt.

Allerdings konnte bei der CD4-Zellzahl ebenfalls kein Unterschied zwischen den EC26-2A4ΔM-positiven und -negativen Patienten der ARNS CO15 ALT-Kohorte festgestellt werden. Wahrscheinlich ist diese Tatsache in der Selektion der Kohorte selbst begründet, da für diese ausschließlich Patienten mit stabilen CD4-Zellzahlen über einen Zeitraum von fünf Jahren ausgewählt wurden (>600 CD4+ T-Zellen/μL Blut) (Autran, 2014). Zudem handelt es sich bei allen Studienteilnehmern um LTNPs. Wie im Abschnitt 1.5.3 beschrieben können solche HIV-Patienten eine Infektion mit dem Virus durch verschiedene Wirtsfaktoren kontrollieren. Um den immunologischen Einfluss der EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper auf die HIV-Infektion der Patienten genauer bestimmen zu können, wäre daher die Charakterisierung protektiver Effekte anderer Wirtsfaktoren auf die Infektionsprogression durchaus sinnvoll. Ebenso interessant wäre außerdem eine Untersuchung der dominierenden HI-Virusvariante der Patienten, da möglicherweise auch weniger replikationskompetente HIV-1 Klone für die gut kontrollierbare Virusinfektion verantwortlich sein könnten (Walker & Yu, 2013).

Aus der Literatur ist unter anderem bekannt, dass Patienten der ARNS CO15 ALT-Kohorte, die nAbs gegen ein anderes HIV-1 Env-Epitop m3S besitzen, ebenfalls eine deutlich reduzierte Viruslast aufwiesen (Petitdemanche et al., 2013). Das m3S-Epitop ist auch in der MPER-Domäne der gp41-Untereinheit des HIV-1 Hüllproteins, leicht N-terminal des EC26-2A4ΔM-Epitops, lokalisiert (Vieillard et al., 2005). Vieillard und Kollegen konnten außerdem zeigen,

dass die Immunisierung mit dem gp41-Epitop eine verminderte Depletion an CD4-positiven Immunzellen in SHIV-infizierten Makaken zur Folge hatte (Veillard et al., 2008).

Eine Korrelation der Patienten mit Antikörpern gegen beide MPER-Epitope (EC26-2A4ΔM und m3S) hat ergeben, dass die Menge an HIV-1 RNA-Kopien im Blut sogar um das 80-fache verringert war im Vergleich zu LTNP ohne solche Antikörper (Abbildung 5.1). Das entspricht einer doppelt so starken Reduktion der Virusreplikation, welche durch die Anwesenheit EC26-2A4ΔM-spezifischer Antikörper allein erreicht wurde. Somit deuten die gewonnenen Erkenntnisse mutmaßlich auf einen synergistischen Effekt hin, der durch beide Antikörper bezüglich der Suppression der HIV-1 Replikation in den LTNP erreicht wird. Daher könnte eine Kombination beider gp41-Peptide eine potentielle Impfstrategie zur Induktion therapeutisch wirksamer HIV-1 Antikörper darstellen.

Für eine detaillierte Bestimmung einer möglichen EC26-2A4ΔM-IgG vermittelten Immunantwort, wurden die Epitop-spezifischen Antikörper aus dem Plasma von acht Patienten der Frankfurter HIV-Kohortenstudie aufgereinigt und auf ihre *in vitro* Neutralisationsaktivität hin untersucht (Abschnitt 4.2.3.2). Die Ergebnisse der Untersuchung offenbarten für die Patienten-abgeleiteten Epitop-spezifischen Antikörper eine heterogene Neutralisationsaktivität gegen verschiedene heterologe Tier 1 und Tier 2 Env-pseudotypisierte Viren von vier unterschiedlichen HIV-1 Subtypen (Tabelle 4.11). Die heterogene Neutralisationsaktivität der Antikörper lässt sich womöglich durch ungleiche originäre Epitopsequenzen der Patienten-abgeleiteten Immunglobuline begründen. Abhängig von ihrer favorisierten regulären Epitopsequenz, welche in der dominierenden HIV-1 Variante der Patienten auftritt, binden und neutralisieren die Antikörper verschiedene Hüllproteinvarianten unterschiedlich effizient. Diese Annahme wird zusätzlich durch die unterschiedlichen Reaktivitäten der aufgereinigten Epitop-spezifischen Antikörper mit dem EC26-2A4ΔM Peptid untermauert (Abbildung 4.26A). Dennoch ist die beobachtete Neutralisationsaktivität der EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper im Allgemeinen vergleichbar mit der Neutralisationspotenz des ursprünglichen EC26-2A4-IgG (Zhou M. et al., 2013A). Im Unterschied zu der Neutralisationsfähigkeit der HIV-1 neutralisierenden MPER-Antikörper 2F5 und 4E10 war die EC26-2A4ΔM-IgG vermittelte Neutralisationsaktivität jedoch etwas schwächer. Während der mAb 2F5 sechs der sieben Pseudoviren mit einer mittleren IC₅₀ von rund 6,5 µg/mL und der mAb 4E10 sogar alle sieben Stämme mit einer mittleren IC₅₀ von etwa 1,7 µg/mL neutralisieren kann, benötigten die Patienten-abgeleiteten EC26-2A4ΔM-IgG im Mittel rund 11,8 µg/mL für eine halbmaximale Inhibition der Virusinfektion (HIV Database).

Allerdings wiesen die EC26-2A4ΔM-IgG im Gegensatz zu den nAbs 2F5 und 4E10 keine Kreuzreaktivität mit den Phospholipiden Cardiolipin und Phosphatidylserin auf (Abbildung 4.26B). Zudem wurde für die EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper ebenso eine geringere Reaktivität mit Phosphatidylserin ausgemacht als für die ursprünglichen EC26-2A4-IgG (Zhou M. et al., 2013A). Ein Zusammenhang zwischen der Neutralisationsaktivität und der Polyreaktivität breit neutralisierender HIV-1 Antikörper konnte bereits durch verschiedene Studien belegt werden (Verkoczy et al., 2011). Beispielsweise haben Mouquet et al. gezeigt, dass B-Zellen im Zuge einer HIV-1 Infektion kreuzreaktive Antikörper produzieren, welche durch Bindung einer hoch-affinen HIV-Env Komponente und einem niedrig-affinen Paratop einer anderen molekularen HIV-Struktur, wie der Viruspartikelmembran, bivalent mit dem

Virus interagieren (Mouquet et al., 2010). Darüber hinaus konnten Haynes und Kollegen in einer anderen Studie nachweisen, dass die Polyreaktivität mit der Neutralisationsaktivität der Antikörper positiv korreliert (Haynes et al., 2005B). Die gleiche Beobachtung wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gemacht. So offenbarte der mAb 4E10 mit der potentesten Neutralisationsaktivität, im Vergleich zu dem mAb 2F5 und den EC26-2A4ΔM-IgG, auch die stärkste Reaktivität mit den beiden Phospholipiden.

Jedoch führt eine Kreuzreaktivität von Antikörpern mit Selbst- oder Autoantigenen in der Regel zur Eliminierung der entsprechenden B-Zellen durch periphere bzw. zentrale Immuntoleranzmechanismen oder Immun-Checkpoints (Wardemann et al., 2003). Vermutlich ist die polyspezifische Reaktivität gegen Autoantigene vieler potenter HIV-1 bnAbs auch eine wesentliche Ursache für deren seltene natürliche Entstehung und den bisher ausbleibenden Erfolg bei dem Versuch, solche Antikörper zu induzieren (Finney & Kelsoe, 2018). Dies wird unter anderem durch eine Studie von Zhang et al. deutlich. Sie haben festgestellt, dass 2F5-ähnliche Antikörper nach der Immunisierung von Makaken mit dem 2F5-Epitop entweder eliminiert wurden oder die gebildeten Antikörper nicht die Affinität aufzeigten, welche für die Ausbildung der gp41-Lipid-Komplexe notwendig ist, um die Neutralisationspotenz des mAb 2F5 zu erreichen (Zhang et al., 2016). Daher ist ein wichtiges Ziel der HIV-1 Impfstoffentwicklung gegen die MPER, breit neutralisierende Antikörper zu induzieren, welche ein tolerierbares Maß an Polyreaktivität aufweisen.

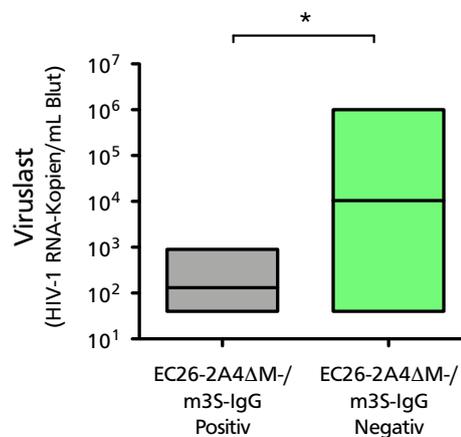


Abbildung 5.1 Korrelation der Viruslast in Abhängigkeit der Anwesenheit EC26-2A4ΔM- und m3S-spezifischer Antikörper im Plasma ART-naiver HIV-positiver Patienten der ARNS CO15 ALT-Kohorte (n = 71). Der Nachweis Epitop-spezifischer Antikörper (EC26-2A4ΔM-/ m3S-IgG Positiv, grau & EC26-2A4ΔM-/ m3S-IgG Negativ, grün) erfolgte mittels ELISA. Immobilisiertes, biotinyliertes EC26-2A4ΔM-Peptid wurde mit hitzeinaktiviertem Patientenplasma in Duplikaten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe eines HRP-konjugierten Sekundäntikörpers detektiert. Die Balken innerhalb der Boxen repräsentieren den Median. Die statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten t-Tests evaluiert (* P < 0,05).

Zusammengefasst konnte durch die Feststellung einer leicht verbesserten klinischen Konstitution von ART-negativen HIV-Patienten mit Antikörpern gegen das EC26-2A4ΔM-Epitop ein therapeutischer Effekt dieser HIV-1 neutralisierenden sowie nicht-

kreuzreaktiven Epitop-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die mäßige Neutralisationsaktivität der Patienten-abgeleiteten Epitop-spezifischen Immunglobuline und die Tatsache, dass EC26-2A4ΔM-positive HIV-Patienten der Frankfurter HIV-Kohortenstudie therapiert werden müssen, offenbarte allerdings auch, dass die Anwesenheit solcher EC26-2A4ΔM-spezifischen Antikörper allein nicht ausreichend ist, um eine Infektion mit dem HI-Virus zu kontrollieren. Dennoch kann anhand der Beobachtung einer signifikant verstärkten Kontrolle der HIV-Replikation durch synergistisch wirksame Antikörper gegen zwei unterschiedliche Epitope innerhalb der gp41-UE des viralen Hüllproteins (EC26-2A4ΔM und m3S) postuliert werden, dass die Kombination mehrerer solcher HIV-Env Mimetika, welche zur Induktion von HIV-1 neutralisierenden Antikörpern ohne Polyreaktivität führen, ein denkbarer Ansatz für die Entwicklung einer funktionalen und effektiven therapeutischen Vakzine gegen das HI-Virus sein könnte.



6 AUSBLICK

6.1 PROJEKT #1 / Identifikation und Charakterisierung HIV-1 neutralisierender Antikörperfragmente mittels Phagen-Display Technologie

Aufgrund der erfolgreichen Selektion von HIV-neutralisierenden Antikörperfragmenten aus Patienten-abgeleiteten Immunbibliotheken HIV-positiver LTNPs, stellt die in dieser Arbeit etablierte Phagen-Display-basierte Selektionsstrategie mit nativen zellassoziierten HIV-1 Hüllproteinen eine gute Möglichkeit dar, um weitere HIV-Env-spezifische Antikörperfragmente mit noch besseren Neutralisationseigenschaften zu identifizieren. Allerdings ist es sinnvoll, hierfür die Patientenkohorte auszuweiten, da bekanntlich nur rund 1 % aller HIV-*Controller* potente bnAbs mit heterologer Neutralisationsaktivität im Zuge einer HIV-Infektion entwickeln (Simek et al., 2009). Aufgrund der Generierung der Immunbibliotheken aus dem Antikörpergenrepertoire von HIV-infizierten Menschen wäre es sinnvoll, die Neutralisationsaktivität der Spenderseren im Vorfeld zukünftig noch detaillierter zu charakterisieren. So ist eine Testung gegen einen größeren und diverseren Satz an verschiedenen, insbesondere Tier 2 Env-pseudotypisierten, HI-Virusisolaten denkbar. Beispielweise bietet sich hierfür das Referenzpanel, bestehend aus 12 unterschiedlichen HIV-1 Env-Stämmen, an (deCamp et al., 2014). Durch einen Vergleich mit der Neutralisationsbreite besonders potenter bnAbs, wie z.B. dem mAb 3BNC117, VRC01 oder 10-1074, gegen dieselben Pseudoviren, kann die Entscheidung über die Herstellung Patienten-abgeleiteter Antikörperbibliotheken dann besser getroffen werden.

Eine andere Möglichkeit die Neutralisationsbreite der Antikörperkonstrukte zu erhöhen könnte durch die Generierung von bispezifischen Antikörpern erreicht werden. Moquet et al. haben bereits eine gesteigerte Neutralisationsaktivität solcher konstruierten bispezifischen Anti-HIV-1 Antikörper im Vergleich zu den parentalen Immunglobulinen *in vitro* nachgewiesen und postuliert, dass dieser Effekt in der Heterologation der bispezifischen scFv-Fc-Konstrukte an das HIV-Hüllprotein begründet ist (Mouquet et al., 2012B). Aufgrund der Kopplung zweier scFv-Fragmente, welche unterschiedliche Bereiche des HIV-Env erkennen, an eine Fc-Domäne, wird einerseits das Env-Bindungsspektrum eines Antikörpermoleküls erweitert und andererseits die Gefahr eines mutationsbedingten Verlustes der Antikörpererkennung durch den gesteigerten Selektionsdruck verringert. Konkret wäre eine Fusion des scFv#1 mit dem VHH#2 vorstellbar, da beide Klone zusammen die stärkste Neutralisationsbreite aufzeigten und insgesamt 14 der 16 getesteten HIV-Pseudoviren neutralisieren konnten.

Darüber hinaus wäre es interessant, für den identifizierten Klon scFv#1-Fc, der sowohl in der Lage ist HIV-Pseudoviren zu neutralisieren als auch ADCC zu vermitteln, das konkrete Epitop innerhalb der HIV-Hüllproteinstruktur, welches beide Antikörper-Effektorfunktionen ermöglicht, zu ermitteln. Da eine ADCC-Aktivität bisher hauptsächlich für nicht-neutralisierende HIV-1 Antikörper beschrieben wurde, ist es durchaus denkbar, dass der scFv#1-Fc mit einer für nAbs untypischen Domäne des HIV-Env interagiert (Veillette et al., 2014; Wibmer et al., 2015). Eine grobe Abschätzung, in welchem Bereich der scFv#1-Fc an das Hüllprotein bindet, kann unter anderem mit Hilfe kompetitiver ELISAs getroffen werden. Durch sequentielle Inkubation des scFv#1-Fc-Konstrukts und HIV-1 Env-spezifischen Antikörpern mit bekannten Epitopen zusammen mit dem HIV-Env, kann anhand sich ändernder Bindungsmuster eine Region innerhalb der Env-Struktur eingegrenzt werden (Koch et al., 2017B). Alternativ dazu ist auch ein Einsatz der Kryoelektronenmikroskopie denkbar (Carroni & Saibil, 2016). Eine genauere Bestimmung des Antikörperepitops könnte ebenso mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgen. Allerdings ist eine Kristallisation aufgrund der membranständigen Natur des HIV-Env nur mit artifiziellen löslichen Formen des Hüllproteins möglich und könnte durch die weniger native Env-Struktur eine genaue Aussage erschweren (Medina-Ramírez et al., 2017).

Trotz erster Erfolge in der Entwicklung einer Antikörper-basierten HIV-1 Therapie ist die Identifikation weiterer potenter HIV-1 bnAbs nach wie vor enorm wichtig, um das Risiko eines Therapieversagens, bspw. durch die Ausbildung von viralen Resistenzmutationen, zu minimieren (Barouch et al., 2013B; Mendoza et al., 2018; Shingai et al., 2013). Daher stellen Antikörper mit neutralisierenden Eigenschaften, welche an verschiedene Regionen des viralen Hüllproteins binden, besonders geeignete Kandidaten für einen möglichen therapeutischen Einsatz dar.

6.2 PROJEKT #2 / Optimierung des EC26-2A4 Δ M-Epitops in der gp41-MPER des HIV-1 Hüllproteins

Anhand der Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, konnte einerseits ein schwacher therapeutischer Effekt für die EC26-2A4 Δ M-spezifischen Antikörper in HIV-positiven Patienten nachgewiesen werden und andererseits auch die Fähigkeit des EC26-2A4 Δ M-Epitops, neutralisierende Antikörper in immunisierten Mäusen zu induzieren. Daher wäre es durchaus interessant, das therapeutische Potential des MPER-Epitops weiter zu beleuchten. Eine Möglichkeit die protektive Wirksamkeit des gp41-Peptids zu untersuchen, könnte mit Hilfe humanisierter Mäuse erfolgen. Humanisierte Mäuse tragen anstelle eines murinen Immunsystems Komponenten der humanen Immunabwehr in sich (Yong et al., 2018). Durch die Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen sind die Tiere in der Lage alle Zellen des Blutes nachzubilden, so auch CD4⁺ T-Zellen (Pearson et al., 2008). Nach der passiven Immunisierung der humanisierten Tiere mit dem EC26-2A4 Δ M-Peptid und der Entwicklung Epitop-spezifischer Antikörper, können die Mäuse mit einem replikationskompetenten HI-Virusisolat infiziert werden, um zu analysieren, ob die EC26-2A4 Δ M-spezifischen Antikörper erfolgreich vor einer HIV-1 Transmission schützen können.

Die potentielle therapeutische Wirksamkeit der Epitop-spezifischen Antikörper könnte in einem ähnlichen Versuchsansatz untersucht werden. Allerdings werden die humanisierten Mäuse in diesem Fall erst nach der Etablierung einer HIV-1 Infektion mit dem Epitop immunisiert. Hierbei könnten verschiedene Strategien mit und ohne antiretrovirale Therapie verfolgt werden (Klein et al., 2012B).

Aufgrund der Beobachtung einer verstärkten Reduktion der HIV-Replikation in Patienten mit Antikörpern gegen das EC26-2A4ΔM- und das m3S-Epitop, könnte die Untersuchung einer kombinatorischen therapeutischen HIV-Vakzine mit beiden Peptiden zudem auch sehr vielversprechend sein. Hierbei sollte in ersten Studien zunächst analysiert werden, in welchem Verhältnis die Applikation der Peptide erfolgen müsste, damit die Induktion beider Epitop-spezifischen Antikörper in äquivalenten Titern resultiert. In der Folge wäre es ebenso sinnvoll zu untersuchen, ob das EC26-2A4ΔM- und das m3S-Epitop tatsächlich synergistisch wirksam sind. Anschließend könnte dann das therapeutische Potential einer solchen Peptid-Paarung bestimmt werden. Möglicherweise führt eine Kombination beider MPER-Epitope zu einer noch potenteren antiviralen Wirkung und erweist sich als geeignete Impfstrategie, um vor einer HIV-Infektion zu schützen oder die Virusreplikation zu vermindern.



LITERATUR

- Aasa-Chapman, M. M. I., Holuigue, S., Aubin, K., Wong, M., Jones, N. A., Cornforth, D. et al. (2005). Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, 79(5), 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2823-2830.2005>
- Abul Abbas, Andrew H. Lichtman & Shiv Pillai. (2015). *Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System* (5th Edition.). Elsevier.
- Agrawal, N., Leaman, D. P., Rowcliffe, E., Kinkead, H., Nohria, R., Akagi, J. et al. (2011). Functional Stability of Unliganded Envelope Glycoprotein Spikes among Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *PLOS ONE*, 6(6), e21339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021339>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M. & Hamid, M. (2012). scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- AIDSinfo. (2019). Limitations to Treatment Safety and Efficacy. Zugriff am 9.1.2020. Verfügbar unter: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/31/adverse-effects-of-antiretroviral-agents>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). The Generation of Antibody Diversity. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.
- Alfaleh, M. A. (2017). Strategies for Selecting Membrane Protein-Specific Antibodies using Phage Display with Cell-Based Panning.
- Alter, G., Martin, M. P., Teigen, N., Carr, W. H., Suscovich, T. J., Schneidewind, A. et al. (2007A). Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 3027–3036. <https://doi.org/10.1084/jem.20070695>
- Alter, G., Teigen, N., Ahern, R., Streeck, H., Meier, A., Rosenberg, E. S. et al. (2007B). Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(10), 1452–1460. <https://doi.org/10.1086/513878>
- André, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bültmann, A. & Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology*, 72(2), 1497–1503.

-
- Antoni, S., Walz, N., Landersz, M., Humbert, M., Seidl, C., Dittmar, M. T. et al. (2007). Genetic and biological characterization of recombinant HIV type 1 with Env derived from long-term nonprogressor (LTNP) viruses. *AIDS research and human retroviruses*, 23(11), 1377–1386. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0113>
- Arts, E. J. & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161>
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S. & Ganne, V. (2002). Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 1(1), 111–118. <https://doi.org/10.1586/14760584.1.1.111>
- Autran, B. (2014). ANRS CO15 ALT - Cohort of Long-Term Asymptomatic Subjects Infected with HIV.
- Ayat, H., Burrone, O. R., Sadghizadeh, M., Jahanzad, E., Rastgou, N., Moghadasi, S. et al. (2013). Isolation of scFv antibody fragments against HER2 and CEA tumor antigens from combinatorial antibody libraries derived from cancer patients. *Biologicals*, 41(6), 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.05.004>
- Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–7982.
- Barouch, D. H. (2013A). The quest for an HIV-1 vaccine--moving forward. *The New England Journal of Medicine*, 369(22), 2073–2076. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1312711>
- Barouch, D. H., Whitney, J. B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T. Y., Liu, J. et al. (2013B). Therapeutic Efficacy of Potent Neutralizing HIV-1-Specific Monoclonal Antibodies in SHIV-Infected Rhesus Monkeys. *Nature*, 503(7475), 224–228. <https://doi.org/10.1038/nature12744>
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(12), 877–883. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3132>
- Barton, J. P., Goonetilleke, N., Butler, T. C., Walker, B. D., McMichael, A. J. & Chakraborty, A. K. (2016). Relative rate and location of intra-host HIV evolution to evade cellular immunity are predictable. *Nature Communications*, 7, 11660. <https://doi.org/10.1038/ncomms11660>
- Bazan, J., Całkosiński, I. & Gamian, A. (2012). Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(12), 1817–1828. <https://doi.org/10.4161/hv.21703>
- Berdichevsky, Y., Ben-Zeev, E., Lamed, R. & Benhar, I. (1999). Phage display of a cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* and its application as a tool for antibody engineering. *Journal of Immunological Methods*, 228(1), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00096-4)

-
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyö, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P. et al. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature*, *391*(6664), 240. <https://doi.org/10.1038/34571>
- Bernardin, F., Kong, D., Peddada, L., Baxter-Lowe, L. A. & Delwart, E. (2005). Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Journal of Virology*, *79*(17), 11523–11528. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11523-11528.2005>
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J. et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, *107*(12), 4781–4789. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4818>
- Bhakta, S. J., Shang, L., Prince, J. L., Claiborne, D. T. & Hunter, E. (2011). Mutagenesis of tyrosine and di-leucine motifs in the HIV-1 envelope cytoplasmic domain results in a loss of Env-mediated fusion and infectivity. *Retrovirology*, *8*, 37. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-37>
- Bhiman, J. N. & Lynch, R. M. (2017). Broadly Neutralizing Antibodies as Treatment: Effects on Virus and Immune System. *Current HIV/AIDS reports*, *14*(2), 54–62. <https://doi.org/10.1007/s11904-017-0352-1>
- BLASER, N., WETTSTEIN, C., ESTILL, J., VIZCAYA, L. S., WANDELER, G., EGGER, M. et al. (2014). Impact of viral load and the duration of primary infection on HIV transmission: systematic review and meta-analysis. *AIDS (London, England)*, *28*(7), 1021–1029. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000135>
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J. S. & Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(25), 15773–15778. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15773>
- Bollinger, J. N. (1970). Metabolic Fate of Mineral Oil Adjuvants Using ¹⁴C-Labeled Tracers II: Mannide Monooleate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *59*(8), 1088–1092. <https://doi.org/10.1002/jps.2600590805>
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, *68*(9), 6103–6110.
- Boulassel, M.-R., Chomont, N., Pai, N. P., Gilmore, N., Sékaly, R.-P. & Routy, J.-P. (2012). CD4 T cell nadir independently predicts the magnitude of the HIV reservoir after prolonged suppressive antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Virology*, *53*(1), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.09.018>
- Božič, B., Čučnik, S., Kveder, T. & Rozman, B. (2014). Chapter 5 - Affinity and Avidity of Autoantibodies. In Y. Shoenfeld, P.L. Meroni & M.E. Gershwin (Hrsg.), *Autoantibodies (Third Edition)* (S. 43–49). San Diego: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00005-8>
- Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H. et al. (2006). Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS (London, England)*, *20*(15), 1923–1930. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000247113.43714.5e>

-
- Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M. et al. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS research and human retroviruses*, 10(4), 359–369. <https://doi.org/10.1089/aid.1994.10.359>
- Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D. et al. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet (London, England)*, 372(9653), 1881–1893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61591-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61591-3)
- Buell, K. G., Chung, C., Chaudhry, Z., Puri, A., Nawab, K. & Ravindran, R. P. (2016). Lifelong antiretroviral therapy or HIV cure: The benefits for the individual patient. *AIDS care*, 28(2), 242–246. <https://doi.org/10.1080/09540121.2015.1074653>
- Burrer, R., Haessig-Einius, S., Aubertin, A.-M. & Moog, C. (2005). Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology*, 333(1), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.12.034>
- Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Reviews. Immunology*, 2(9), 706–713. <https://doi.org/10.1038/nri891>
- Burton, D. R., Ahmed, R., Barouch, D. H., Butera, S. T., Crotty, S., Godzik, A. et al. (2012). A Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 396–407. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.008>
- Burton, D. R., Barbas, C. F., Persson, M. A., Koenig, S., Chanock, R. M. & Lerner, R. A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10134–10137.
- Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R. et al. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5628), 2065–2071. <https://doi.org/10.1126/science.1083182>
- Calin, R., Hamimi, C., Lambert-Niclot, S., Carcelain, G., Bellet, J., Assoumou, L. et al. (2016). Treatment interruption in chronically HIV-infected patients with an ultralow HIV reservoir. *AIDS*, 30(5), 761. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000987>
- Carl, S., Daniels, R., Iafate, A. J., Easterbrook, P., Greenough, T. C., Skowronski, J. et al. (2000). Partial „repair“ of defective NEF genes in a long-term nonprogressor with human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 132–140. <https://doi.org/10.1086/315187>
- Carroni, M. & Saibil, H. R. (2016). Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 95, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.023>
- Caskey, M., Schoofs, T., Gruell, H., Settler, A., Karagounis, T., Kreider, E. F. et al. (2017). Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nature medicine*, 23(2), 185–191. <https://doi.org/10.1038/nm.4268>

-
- CDC. (1992). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 41(RR-17), 1–19.
- Chakrabarti, B. K., Walker, L. M., Guenaga, J. F., Ghobbeh, A., Poignard, P., Burton, D. R. et al. (2011). Direct Antibody Access to the HIV-1 Membrane-Proximal External Region Positively Correlates with Neutralization Sensitivity ∇ . *Journal of Virology*, 85(16), 8217–8226. <https://doi.org/10.1128/JVI.00756-11>
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- Charneau, P., Borman, A. M., Quillent, C., Guétard, D., Chamaret, S., Cohen, J. et al. (1994). Isolation and Envelope Sequence of a Highly Divergent HIV-1 Isolate: Definition of a New HIV-1 Group. *Virology*, 205(1), 247–253. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1640>
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. (2009). Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*, 6(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.3>
- Checkley, M. A., Luttge, B. G. & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of Molecular Biology*, 410(4), 582–608. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042>
- Chen, H., Ndhlovu, Z. M., Liu, D., Porter, L. C., Fang, J. W., Darko, S. et al. (2012). T cell receptor clonotypes modulate the protective effect of HLA class I alleles in HIV-1 infection. *Nature immunology*, 13(7), 691–700. <https://doi.org/10.1038/ni.2342>
- Chen, H., Xu, X., Bishop, A. & Jones, I. M. (2005). Reintroduction of the 2G12 epitope in an HIV-1 clade C gp120. *AIDS (London, England)*, 19(8), 833–835.
- Chen, J., Kovacs, J. M., Peng, H., Rits-Volloch, S., Lu, J., Park, D. et al. (2015). Effect of the cytoplasmic domain on antigenic characteristics of HIV-1 envelope glycoprotein. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6244), 191–195. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9804>
- Chojnacki, J., Waithe, D., Carravilla, P., Huarte, N., Galiani, S., Enderlein, J. et al. (2017). Envelope glycoprotein mobility on HIV-1 particles depends on the virus maturation state. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00515-6>
- Chun, T.-W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W. et al. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(5), 714–720. <https://doi.org/10.1086/527324>
- Chung, S., Lin, Y. L., Reed, C., Ng, C., Cheng, Z. J., Malavasi, F. et al. (2014). Characterization of in vitro antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of therapeutic antibodies — Impact of effector cells. *Journal of Immunological Methods*, 407, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.021>
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352(6336), 624–628. <https://doi.org/10.1038/352624a0>

-
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N. et al. (1986). Human immunodeficiency viruses. *Science*, *232*(4751), 697–697.
<https://doi.org/10.1126/science.3008335>
- Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M. & Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(11), 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2223>
- Corti, D. & Lanzavecchia, A. (2013). Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annual Review of Immunology*, *31*, 705–742. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095916>
- Crooks, E. T., Moore, P. L., Franti, M., Cayanan, C. S., Zhu, P., Jiang, P. et al. (2007). A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology*, *366*(2), 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.033>
- Cuevas, J. M., Geller, R., Garijo, R., López-Aldeguer, J. & Sanjuán, R. (2015). Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS biology*, *13*(9), e1002251.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002251>
- Dahirel, V., Shekhar, K., Pereyra, F., Miura, T., Artyomov, M., Talsania, S. et al. (2011). Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), 11530–11535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105315108>
- Datta, P. K., Kaminski, R., Hu, W., Pirrone, V., Sullivan, N. T., Nonnemacher, M. R. et al. (2016). HIV-1 Latency and Eradication: Past, Present and Future. *Current HIV research*, *14*(5), 431–441.
- De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D. et al. (2003). The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European Journal of Immunology*, *33*(9), 2410–2418. <https://doi.org/10.1002/eji.200324141>
- deCamp, A., Hraber, P., Bailer, R. T., Seaman, M. S., Ochsenbauer, C., Kappes, J. et al. (2014). Global Panel of HIV-1 Env Reference Strains for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, *88*(5), 2489–2507.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02853-13>
- Del Giudice, G., Rappuoli, R. & Didierlaurent, A. M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines (Immune Correlates of Vaccine Adjuvanticity, Immunogenicity and Efficacy in Infectious Diseases and Cancer.). *Seminars in Immunology*, *39*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
- Dietrich, U., Dürr, R. & Koch, J. (2013). Peptides as drugs: from screening to application. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *14*(5), 501–512.
<https://doi.org/10.2174/13892010113149990205>
- Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z. & Vogelstein, B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(10), 3671–3675.
- Duffy, S., Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, *9*(4), nrg2323.
<https://doi.org/10.1038/nrg2323>

-
- Dziegiel, M., Nielsen, L. K., Andersen, P. S., Blancher, A., Dickmeiss, E. & Engberg, J. (1995). Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen, rhesus D. *Journal of Immunological Methods*, 182(1), 7–19.
- Eisenhardt, S. U., Schwarz, M., Bassler, N. & Peter, K. (2007). Subtractive single-chain antibody (scFv) phage-display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules. *Nature Protocols*, 2(12), 3063–3073. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.455>
- Ellery, P. J., Tippett, E., Chiu, Y.-L., Paukovics, G., Cameron, P. U., Solomon, A. et al. (2007). The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), 6581–6589. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6581>
- Engelman, A. & Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(4), 279–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>
- Escolano, A., Dosenovic, P. & Nussenzweig, M. C. (2017). Progress toward active or passive HIV-1 vaccination. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(1), 3–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20161765>
- Evans, D. T., O'Connor, D. H., Jing, P., Dzuris, J. L., Sidney, J., da Silva, J. et al. (1999). Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nature Medicine*, 5(11), 1270–1276. <https://doi.org/10.1038/15224>
- Evans, J. T., Cluff, C. W., Johnson, D. A., Lacy, M. J., Persing, D. H. & Baldrige, J. R. (2003). Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPLTM adjuvant and Ribi.529. *Expert Review of Vaccines*, 2(2), 219–229. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.2.219>
- Famulok, M. & Faulhammer, D. (1994). Spezifische Bindung von Antikörpern an DNA mit kombinatorischen Antikörper-Bibliotheken. *Angewandte Chemie*, 106(18), 1911–1914. <https://doi.org/10.1002/ange.19941061806>
- Feng, Y., Tran, K., Bale, S., Kumar, S., Guenaga, J., Wilson, R. et al. (2016). Thermostability of Well-Ordered HIV Spikes Correlates with the Elicitation of Autologous Tier 2 Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathogens*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005767>
- Finney, J. & Kelsoe, G. (2018). Poly- and autoreactivity of HIV-1 bNAbs: implications for vaccine design. *Retrovirology*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0435-0>
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T. et al. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine*, 5(5), 512–517. <https://doi.org/10.1038/8394>
- Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G. E., Shirreff, G., Hollingsworth, T. D., Alizon, S. et al. (2014). Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6177), 1243727. <https://doi.org/10.1126/science.1243727>
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>

-
- Frenzel, A., Kügler, J., Wilke, S., Schirrmann, T. & Hust, M. (2014). Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 215–243. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_12
- Frey, G., Chen, J., Rits-Volloch, S., Freeman, M. M., Zolla-Pazner, S. & Chen, B. (2010). Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nature structural & molecular biology*, 17(12), 1486–1491. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1950>
- Fu, Q., Shaik, M. M., Cai, Y., Ghantous, F., Piai, A., Peng, H. et al. (2018). Structure of the membrane proximal external region of HIV-1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), E8892–E8899. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807259115>
- Fu, Y. K., Hart, T. K., Jonak, Z. L. & Bugelski, P. J. (1993). Physicochemical dissociation of CD4-mediated syncytium formation and shedding of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of Virology*, 67(7), 3818–3825.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F. et al. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500–503. <https://doi.org/10.1126/science.6200936>
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F. et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–441. <https://doi.org/10.1038/17130>
- Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D. et al. (2002). Diversity Considerations in HIV-1 Vaccine Selection. *Science*, 296(5577), 2354–2360. <https://doi.org/10.1126/science.1070441>
- Geiß, Y. & Dietrich, U. (2015). Catch Me If You Can--The Race Between HIV and Neutralizing Antibodies. *AIDS reviews*, 17(2), 107–113.
- Gill, T. J., Kunz, H. W. & Papermaster, D. S. (1967). Studies on Synthetic Polypeptide Antigens XVIII. THE ROLE OF COMPOSITION, CHARGE, AND OPTICAL ISOMERISM IN THE IMMUNOGENICITY OF SYNTHETIC POLYPEPTIDES. *Journal of Biological Chemistry*, 242(14), 3308–3318.
- González, N., McKee, K., Lynch, R. M., Georgiev, I. S., Jimenez, L., Grau, E. et al. (2018). Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long term non-progressors. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193773>
- Gorry, P., Purcell, D., Howard, J. & McPhee, D. (1998). Restricted HIV-1 infection of human astrocytes: potential role of nef in the regulation of virus replication. *Journal of Neurovirology*, 4(4), 377–386. <https://doi.org/10.3109/13550289809114536>
- Goto, T., Nakai, M. & Ikuta, K. (1998). The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron*, 29(2), 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(98\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(98)00002-X)
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L. & Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *Aids*, 23(9), 1163–1169. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832b44c8>

-
- Graham, B. S. & Ambrosino, D. M. (2015). History of passive antibody administration for prevention and treatment of infectious diseases. *Current opinion in HIV and AIDS*, 10(3), 129–134. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000154>
- Gray, E. S., Madiga, M. C., Hermanus, T., Moore, P. L., Wibmer, C. K., Tumba, N. L. et al. (2011). The Neutralization Breadth of HIV-1 Develops Incrementally over Four Years and Is Associated with CD4+ T Cell Decline and High Viral Load during Acute Infection ▽. *Journal of Virology*, 85(10), 4828–4840. <https://doi.org/10.1128/JVI.00198-11>
- Gray, E. S., Moore, P. L., Pantophlet, R. A. & Morris, L. (2007). N-Linked Glycan Modifications in gp120 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Render Partial Sensitivity to 2G12 Antibody Neutralization. *Journal of Virology*, 81(19), 10769–10776. <https://doi.org/10.1128/JVI.01106-07>
- Graziani, G. M. & Angel, J. B. (2015). Evaluating the efficacy of therapeutic HIV vaccines through analytical treatment interruptions. *Journal of the International AIDS Society*, 18(1). <https://doi.org/10.7448/IAS.18.1.20497>
- Greenwood, B. (2014). The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1645), 20130433. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0433>
- Guha, D. & Ayyavoo, V. (2013). Innate immune evasion strategies by human immunodeficiency virus type 1. *Isrn Aids*, 2013, 954806. <https://doi.org/10.1155/2013/954806>
- Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. (In preparation).
- Gupta, R. K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L. E., Mok, H. P., Peppas, D., Salgado, M. et al. (2019). HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 568(7751), 244–248. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- den Haan, J. M. M., Arens, R. & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2 Pt B), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011>
- Hammer, S. M., Sobieszczyk, M. E., Janes, H., Karuna, S. T., Mulligan, M. J., Grove, D. et al. (2013). Efficacy Trial of a DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 369(22), 2083–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310566>
- Hammers, C. M. & Stanley, J. R. (2014). Antibody Phage Display: Technique and Applications. *The Journal of investigative dermatology*, 134(2), e17. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.521>
- Harris, J. R. & Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30(6), 597–623. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00036-0)
- Haynes, B. F., Fleming, J., Clair, E. W. S., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R. et al. (2005A). Cardiophilin Polyspecific Autoreactivity in Two Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Science*, 308(5730), 1906–1908. <https://doi.org/10.1126/science.1111781>
- Haynes, B. F., Gilbert, P. B., McElrath, M. J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G. D., Alam, S. M. et al. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England Journal of Medicine*, 366(14), 1275–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113425>

-
- Haynes, B. F., Moody, M. A., Verkoczy, L., Kelsoe, G. & Alam, S. M. (2005B). Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: A hypothesis. *Human antibodies*, 14(3–4), 59–67.
- He, Y. (2006). Immunogenicity of SARS-CoV: the receptor-binding domain of S protein is a major target of neutralizing antibodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 581, 539–542. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33012-9_98
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of Hiv-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids*, 20(16). <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000247564.73009.bc>
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of Hiv-1 during 2000–2007. *Aids*, 25(5), 679–689. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93>
- Henry, C. J., Ornelles, D. A., Mitchell, L. M., Brzoza-Lewis, K. L. & Hiltbold, E. M. (2008). IL-12 Produced by Dendritic Cells Augments CD8+ T cell Activation through the Production of the Chemokines CCL1 and CCL17. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(12), 8576–8584.
- Herberts, C. A., Kwa, M. S. & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9, 29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-29>
- Hess, G. T., Cragolini, J. J., Popp, M. W., Allen, M. A., Dougan, S. K., Spooner, E. et al. (2012). An M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. *Bioconjugate chemistry*, 23(7), 1478–1487. <https://doi.org/10.1021/bc300130z>
- HIV Database. (o. J.). . Zugriff am 11.1.2020. Verfügbar unter: <https://www.hiv.lanl.gov>
- hivbuch. (o. J.). . Zugriff am 11.1.2020. Verfügbar unter: <https://www.hivbuch.de>
- Hoffmann, D., Schott, J. W., Geis, F. K., Lange, L., Müller, F.-J., Lenz, D. et al. (2017). Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Therapy*, 24(5), 298–307. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.20>
- Holehonnur, R., Lella, S. K., Ho, A., Luong, J. A. & Ploski, J. E. (2015). The production of viral vectors designed to express large and difficult to express transgenes within neurons. *Molecular Brain*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0100-7>
- Hollier, M. J. & Dimmock, N. J. (2005). The C-terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function. *Virology*, 337(2), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.04.015>
- Höning, S. & Hunziker, W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-I) in MDCK cells. *The Journal of Cell Biology*, 128(3), 321–332. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.3.321>
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1105–1116. <https://doi.org/10.1038/nbt1126>

-
- Hu, J. K., Crampton, J. C., Cupo, A., Ketas, T., van Gils, M. J., Slieden, K. et al. (2015). Murine Antibody Responses to Cleaved Soluble HIV-1 Envelope Trimers Are Highly Restricted in Specificity. *Journal of Virology*, 89(20), 10383–10398. <https://doi.org/10.1128/JVI.01653-15>
- Hu, W.-S. & Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
- Huang, J., Kang, B. H., Pancera, M., Lee, J. H., Tong, T., Feng, Y. et al. (2014). Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. *Nature*, 515(7525), 138–142. <https://doi.org/10.1038/nature13601>
- Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M. K., Doria-Rose, N. A., Longo, N. S. et al. (2012B). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*, 491(7424), 406–412. <https://doi.org/10.1038/nature11544>
- Huang, J. X., Bishop-Hurley, S. L. & Cooper, M. A. (2012A). Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4569–4582. <https://doi.org/10.1128/AAC.00567-12>
- Huarte, N., Carravilla, P., Cruz, A., Lorizate, M., Nieto-Garai, J. A., Kräusslich, H.-G. et al. (2016). Functional organization of the HIV lipid envelope. *Scientific Reports*, 6, 34190. <https://doi.org/10.1038/srep34190>
- Humbert, M., Antoni, S., Brill, B., Landersz, M., Rodes, B., Soriano, V. et al. (2007). Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *European Journal of Immunology*, 37(2), 501–515. <https://doi.org/10.1002/eji.200636560>
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A. et al. (2011). A human scFv antibody generation pipeline for proteome research (Towards sustainable biotechnology). *Journal of Biotechnology*, 152(4), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.945>
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K. et al. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>
- Hyperphage. (2017, Juni 16). *Hyperphage*. Zugriff am 26.6.2018. Verfügbar unter: <http://www.hyperphage.com/>
- Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S. & Ahmad, A. (2008). Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), 27–49. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907649>
- Iwamoto, M., Mori, C., Hiraoka, Y. & Haraguchi, T. (2014). Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate Tetrahymena. *Gene*, 534(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.049>
- Jespersen, L. K., Kuusinen, A., Orellana, A., Keinänen, K. & Engberg, J. (2000). Use of proteoliposomes to generate phage antibodies against native AMPA receptor. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1382–1389. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01137.x>

-
- Jones, M. L., Alfaleh, M. A., Kumble, S., Zhang, S., Osborne, G. W., Yeh, M. et al. (2016). Targeting membrane proteins for antibody discovery using phage display. *Scientific Reports*, 6, 26240. <https://doi.org/10.1038/srep26240>
- Karpinski, J., Hauber, I., Chemnitz, J., Schäfer, C., Paszkowski-Rogacz, M., Chakraborty, D. et al. (2016). Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity. *Nature Biotechnology*, 34(4), 401–409. <https://doi.org/10.1038/nbt.3467>
- Klein, F., Disking, R., Scheid, J. F., Gaebler, C., Mouquet, H., Georgiev, I. et al. (2013A). Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell*, 153(1), 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.018>
- Klein, F., Halper-Stromberg, A., Horwitz, J. A., Gruell, H., Scheid, J. F., Bournazos, S. et al. (2012). HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature*, 492(7427). <https://doi.org/10.1038/nature11604>
- Klein, F., Mouquet, H., Dosenovic, P., Scheid, J. F., Scharf, L. & Nussenzweig, M. C. (2013B). Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6151), 1199–1204. <https://doi.org/10.1126/science.1241144>
- Koch, K. (2017A). *Generation, selection and characterization of single domain antibody fragments (VHHs) derived from HIV-1 Env immunized dromedaries.*
- Koch, K., Kalusche, S., Torres, J. L., Stanfield, R. L., Danquah, W., Khazanehdari, K. et al. (2017B). Selection of nanobodies with broad neutralizing potential against primary HIV-1 strains using soluble subtype C gp140 envelope trimers. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08273-7>
- Kosmrlj, A., Read, E. L., Qi, Y., Allen, T. M., Altfeld, M., Deeks, S. G. et al. (2010). Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature*, 465(7296), 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature08997>
- Kothe, D. L., Li, Y., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Zammit, K. P., Salazar, M. G. et al. (2006). Ancestral and consensus envelope immunogens for HIV-1 subtype C. *Virology*, 352(2), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.011>
- Krebber, A., Burmester, J. & Plückthun, A. (1996). Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene*, 178(1–2), 71–74.
- Kügler, J., Wilke, S., Meier, D., Tomszak, F., Frenzel, A., Schirrmann, T. et al. (2015). Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries. *BMC Biotechnology*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0125-0>
- Kuiken, C., Korber, B. & Shafer, R. W. (2003). HIV Sequence Databases. *AIDS reviews*, 5(1), 52–61.
- Kumar, P. (2013). Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. *The Indian Journal of Medical Research*, 138(3), 291–293.
- Kumar, R., Qureshi, H., Deshpande, S. & Bhattacharya, J. (2018). Broadly neutralizing antibodies in HIV-1 treatment and prevention. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 6(4), 61–68. <https://doi.org/10.1177/2515135518800689>

-
- Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nature Reviews. Immunology*, 13(9), 693–701. <https://doi.org/10.1038/nri3516>
- Lackner, A. A., Lederman, M. M. & Rodriguez, B. (2012). HIV Pathogenesis: The Host. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007005>
- Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringgaard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E. et al. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353), 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
- Langedijk, J. P. M. & Schuitemaker, H. (2012). A sweet surprise for HIV broadly neutralizing antibodies. *Nature Medicine*, 18(11), 1616–1617. <https://doi.org/10.1038/nm.2993>
- Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E. et al. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*, 50(6), 975–985. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90524-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90524-1)
- Lauring, A. S., Frydman, J. & Andino, R. (2013). The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(5), 327–336. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3003>
- Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fätkenheuer, G. et al. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011110>
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M. & Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6588–6592. <https://doi.org/10.1073/pnas.0936469100>
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. & Gregory, T. J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10373–10382.
- Letourneur, F. & Klausner, R. D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*, 69(7), 1143–1157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90636-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90636-Q)
- Leys, R. D., Vanderborght, B., Haesevelde, M. V., Heyndrickx, L., Geel, A. van, Wauters, C. et al. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of Virology*, 64(3), 1207–1216.
- Li, H., Chien, P. C., Tuen, M., Visciano, M. L., Cohen, S., Blais, S. et al. (2008). Identification of an N-linked glycosylation in the C4 region of HIV-1 envelope gp120 that is critical for recognition of neighboring CD4 T cell epitopes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(6), 4011–4021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4011>

-
- Li, M., Gao, F., Mascola, J. R., Stamatatos, L., Polonis, V. R., Koutsoukos, M. et al. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 env Clones from Acute and Early Subtype B Infections for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 79(16), 10108–10125. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005>
- Lifson, A. R., Buchbinder, S. P., Sheppard, H. W., Mawle, A. C., Wilber, J. C., Stanley, M. et al. (1991). Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *The Journal of Infectious Diseases*, 163(5), 959–965. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.5.959>
- Little, M., Welschof, M., Braunagel, M., Hermes, I., Christ, C., Keller, A. et al. (1999). Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *Journal of Immunological Methods*, 231(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00164-7)
- Liu, M., Yang, G., Wiehe, K., Nicely, N. I., Vandergrift, N. A., Rountree, W. et al. (2014). Polyreactivity and Autoreactivity among HIV-1 Antibodies. *Journal of Virology*, 89(1), 784–798. <https://doi.org/10.1128/JVI.02378-14>
- Liu, Y., Cruikshank, W. W., O’Loughlin, T., O’Reilly, P., Center, D. M. & Kornfeld, H. (1999). Identification of a CD4 domain required for interleukin-16 binding and lymphocyte activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23387–23395. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23387>
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M. A., Arlehamn, C. L. et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*, 39(4), 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031>
- Loetscher, P., Moser, B. & Baggiolini, M. (2000). Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Advances in Immunology*, 74, 127–180. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60910-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60910-4)
- Lu, L., Yu, F., Du, L.-Y., Xu, W. & Jiang, S.-B. (2013). Tactics used by HIV-1 to evade host innate, adaptive, and intrinsic immunities. *Chinese Medical Journal*, 126(12), 2374–2379.
- Lu, M., Blacklow, S. C. & Kim, P. S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Structural Biology*, 2(12), 1075–1082. <https://doi.org/10.1038/nsb1295-1075>
- Lynch, R. M., Wong, P., Tran, L., O’Dell, S., Nason, M. C., Li, Y. et al. (2015). HIV-1 Fitness Cost Associated with Escape from the VRC01 Class of CD4 Binding Site Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 89(8), 4201–4213. <https://doi.org/10.1128/JVI.03608-14>
- Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- Makowski, L. (1994). Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(2), 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90312-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90312-3)
- Margolis, D. M., Koup, R. A. & Ferrari, G. (2017). HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunological reviews*, 275(1), 313–323. <https://doi.org/10.1111/imr.12506>

-
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology*, 222(3), 581–597. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90498-U](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90498-U)
- Marmor, M., Sheppard, H. W., Donnell, D., Bozeman, S., Celum, C., Buchbinder, S. et al. (o. J.). Homozygous and heterozygous Ccr5-delta32 genotypes are associated with resistance to Hiv infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 27(5), 472–481.
- Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annual Review of Immunology*, 28, 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101256>
- Maynard, J. A., Maassen, C. B. M., Leppla, S. H., Brasky, K., Patterson, J. L., Iverson, B. L. et al. (2002). Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nature Biotechnology*, 20(6), 597–601. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-597>
- McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology*, 78(S1), S7–S12. <https://doi.org/10.1002/jmv.20599>
- McElrath, M. J. & Haynes, B. F. (2010). Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity*, 33(4), 542–554. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.011>
- McLellan, J. S., Pancera, M., Carrico, C., Gorman, J., Julien, J.-P., Khayat, R. et al. (2011). Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature*, 480(7377), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature10696>
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews. Immunology*, 10(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/nri2674>
- Medical Grafics. (o. J.). . Zugriff am 11.1.2020. Verfügbar unter: <http://www.medicalgraphics.de>
- Medina-Ramírez, M., Garces, F., Escolano, A., Skog, P., Taeye, S. W. de, Moral-Sanchez, I. D. et al. (2017). Design and crystal structure of a native-like HIV-1 envelope trimer that engages multiple broadly neutralizing antibody precursors in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 214(9), 2573–2590. <https://doi.org/10.1084/jem.20161160>
- Mehandru, S., Wrin, T., Galovich, J., Stiegler, G., Vcelar, B., Hurley, A. et al. (2004). Neutralization Profiles of Newly Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Monoclonal Antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *Journal of Virology*, 78(24), 14039–14042. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.14039-14042.2004>
- Melikyan, G. B. (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*, 5, 111. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-111>
- Mendoza, P., Gruell, H., Nogueira, L., Pai, J. A., Butler, A. L., Millard, K. et al. (2018). Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature*, 561(7724), 479–484. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0531-2>

-
- Mikell, I., Sather, D. N., Kalams, S. A., Altfeld, M., Alter, G. & Stamatatos, L. (2011). Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. *PLoS pathogens*, 7(1), e1001251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001251>
- Mildner, A. & Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity*, 40(5), 642–656. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
- Montefiori, D. C. (2004). Evaluating Neutralizing Antibodies Against HIV, SIV, and SHIV in Luciferase Reporter Gene Assays. *Current Protocols in Immunology*, 64(1), 12.11.1–12.11.17. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1211s64>
- Montefiori, D. C., Robinson, W. E. & Mitchell, W. M. (1988). Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), 9248–9252. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.9248>
- Montero, M., Houten, N. E. van, Wang, X. & Scott, J. K. (2008). The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralization and Target for Vaccine Design. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 54–84. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-07>
- Moore, P. L., Crooks, E. T., Porter, L., Zhu, P., Cayanan, C. S., Grise, H. et al. (2006). Nature of Nonfunctional Envelope Proteins on the Surface of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, 80(5), 2515–2528. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2515-2528.2006>
- Moore, P. L., Gray, E. S., Wibmer, C. K., Bhiman, J. N., Nonyane, M., Sheward, D. J. et al. (2012). Evolution of an HIV glycan-dependent broadly neutralizing antibody epitope through immune escape. *Nature Medicine*, 18(11), 1688–1692. <https://doi.org/10.1038/nm.2985>
- Moulard, M., Phogat, S. K., Shu, Y., Labrijn, A. F., Xiao, X., Binley, J. M. et al. (2002). Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120–CD4–CCR5 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6913–6918. <https://doi.org/10.1073/pnas.102562599>
- Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J. F. et al. (2012A). Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), E3268–E3277. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217207109>
- Mouquet, H., Scheid, J. F., Zoller, M. J., Krogsgaard, M., Ott, R. G., Shukair, S. et al. (2010). Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. *Nature*, 467(7315), 591–595. <https://doi.org/10.1038/nature09385>
- Mouquet, H., Warncke, M., Scheid, J. F., Seaman, M. S. & Nussenzweig, M. C. (2012B). Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3), 875–880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120059109>
- Munro, J. B., Gorman, J., Ma, X., Zhou, Z., Arthos, J., Burton, D. R. et al. (2014). Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science*, 346(6210), 759–763. <https://doi.org/10.1126/science.1254426>

-
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G. et al. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 67(11), 6642–6647.
- Negredo, E., Massanella, M., Puig, J., Pérez-Álvarez, N., Gallego-Escuredo, J. M., Villarroya, J. et al. (2010). Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*, 50(9), 1300–1308. <https://doi.org/10.1086/651689>
- Neil, S. J. D., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), 425–430. <https://doi.org/10.1038/nature06553>
- Niedrig, M., Gelderblom, H. R., Pauli, G., März, J., Bickhard, H., Wolf, H. et al. (1994). Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *The Journal of General Virology*, 75 (Pt 6), 1469–1474. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1469>
- NIH. (o. J.). . Zugriff am 11.1.2020. Verfügbar unter: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J. R., Wyatt, R. et al. (2004). Structure and Mechanistic Analysis of the Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody 2F5 in Complex with Its gp41 Epitope. *Journal of Virology*, 78(19), 10724–10737. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10724-10737.2004>
- Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. & Sodroski, J. (1990). Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *Journal of Virology*, 64(12), 5701–5707.
- den Ouden, M., van Kampen, J., Rijnders, B., van de Vijver, D. & van der Ende, M. (2019). Is HIV-1 viraemia below 20 copies/mL in antiretroviral-treated patients associated with virologic outcome? *Infectious Diseases (London, England)*, 51(4), 259–267. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1554909>
- Ozaki, D. A., Gao, H., Todd, C. A., Greene, K. M., Montefiori, D. C. & Sarzotti-Kelsoe, M. (2012). International Technology Transfer of a GCLP-Compliant HIV-1 Neutralizing Antibody Assay for Human Clinical Trials. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030963>
- Pancera, M., Shahzad-ul-Hussan, S., Doria-Rose, N. A., McLellan, J. S., Bailer, R. T., Dai, K. et al. (2013). Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1–neutralizing V1–V2–directed antibody PG16. *Nature structural & molecular biology*, 20(7), 804–813. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2600>
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G. F., Wohlkönig, A., Ruf, A. et al. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature protocols*, 9(3), 674–693. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.039>
- Parkin, J. & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Parren, P. W. & Burton, D. R. (2001). The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Advances in Immunology*, 77, 195–262. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)77018-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)77018-6)

-
- Patel, P., Borkowf, C. B., Brooks, J. T., Lasry, A., Lansky, A. & Mermin, J. (2014). Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS (London, England)*, 28(10), 1509–1519. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000298>
- Pearson, T., Greiner, D. L. & Shultz, L. D. (2008). Creation of “Humanized” Mice to Study Human Immunity. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, CHAPTER, Unit-15.21. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1521s81>
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D. et al. (2007). High-Affinity, Human Antibody-Like Antibody Fragment (Single-Chain Variable Fragment) Neutralizing the Lethal Factor (LF) of Bacillus anthracis by Inhibiting Protective Antigen-LF Complex Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), 2758–2764. <https://doi.org/10.1128/AAC.01528-06>
- Perelson, A. S. (2002). Modelling viral and immune system dynamics. *Nature Reviews. Immunology*, 2(1), 28–36. <https://doi.org/10.1038/nri700>
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5255), 1582–1586. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1582>
- Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufmann, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A. et al. (2008). Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(4), 563–571. <https://doi.org/10.1086/526786>
- Pereyra, F., McLaren, P. J., Telenti, A., de Bakker, P. I. W., Walker, B. D., Ripke, S. et al. (2010). The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6010), 1551–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1195271>
- Peterson, C. W., Younan, P., Jerome, K. R. & Kiem, H.-P. (2013). Combinatorial anti-HIV gene therapy: using a multipronged approach to reach beyond HAART. *Gene Therapy*, 20(7), 695–702. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.98>
- Petitdemange, C., Achour, A., Dispinseri, S., Malet, I., Sennepin, A., Fang, R. H. T. et al. (2013). A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clinical Infectious Diseases*, 57(5), 745–755. <https://doi.org/10.1093/cid/cit335>
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A. H., Nantermet, P. V., Klein, C. A. et al. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *Journal of Virology*, 68(12), 8017–8027.
- Phillips, A. N. (1996). Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5248), 497–499. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.497>
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F. et al. (2006). Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(12), 1661–1671.

-
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., Oliveira, F. D., Cordonnier, F., Lemée, V. et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), nm.2016. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
- Pomerantz, R. J. (2002). Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(1), 91–97. <https://doi.org/10.1086/338256>
- Postler, T. S. & Desrosiers, R. C. (2013). The Tale of the Long Tail: the Cytoplasmic Domain of HIV-1 gp41. *Journal of Virology*, 87(1), 2–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-12>
- Powell, R. L. R., Totrov, M., Itri, V., Liu, X., Fox, A. & Zolla-Pazner, S. (2017). Plasticity and Epitope Exposure of the HIV-1 Envelope Trimer. *Journal of Virology*, 91(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00410-17>
- Pugach, P., Ozorowski, G., Cupo, A., Ringe, R., Yasmeen, A., Val, N. de et al. (2015). A Native-Like SOSIP.664 Trimer Based on an HIV-1 Subtype B env Gene. *Journal of Virology*, 89(6), 3380–3395. <https://doi.org/10.1128/JVI.03473-14>
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B.-Z. et al. (2010). Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q. et al. (2010). Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nature Medicine*, 16(10), 1147–1151. <https://doi.org/10.1038/nm.2232>
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F. et al. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 342(13), 921–929. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003303421303>
- Raska, M. & Novak, J. (2010). Involvement of envelope-glycoprotein glycans in HIV-1 biology and infection. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 58(3), 191–208. <https://doi.org/10.1007/s00005-010-0072-3>
- Re, M. C., Vitone, F., Bon, I., Schiavone, P. & Gibellini, D. (2006). Meaning of DNA detection during the follow-up of HIV-1 infected patients: a brief review. *The New Microbiologica*, 29(2), 81–88.
- Reitter, J. N., Means, R. E. & Desrosiers, R. C. (1998). A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature Medicine*, 4(6), 679–684. <https://doi.org/10.1038/nm0698-679>
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R. et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361(23), 2209–2220. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908492>
- Richard, J., Prévost, J., Baxter, A. E., von Bredow, B., Ding, S., Medjahed, H. et al. (2018). Uninfected Bystander Cells Impact the Measurement of HIV-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses. *mBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00358-18>

-
- Richard, J., Veillette, M., Ding, S., Zoubchenok, D., Alshafi, N., Coutu, M. et al. (2015). Small CD4 Mimetics Prevent HIV-1 Uninfected Bystander CD4 + T Cell Killing Mediated by Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity. *EBioMedicine*, 3, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.004>
- Ringel, O., Müller, K., Koch, J., Brill, B., Wolf, T., Stephan, C. et al. (2018B). Optimization of the EC26-2A4 Epitope in the gp41 Membrane Proximal External Region Targeted by Neutralizing Antibodies from an Elite Controller. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 34(4), 365–374. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0250>
- Ringel, O., Vieillard, V., Debré, P., Eichler, J., Büning, H. & Dietrich, U. (2018A). The Hard Way towards an Antibody-Based HIV-1 Env Vaccine: Lessons from Other Viruses. *Viruses*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/v10040197>
- Robbins, R. N., Spector, A. Y., Mellins, C. A. & Remien, R. H. (2014). Optimizing ART adherence: update for HIV treatment and prevention. *Current HIV/AIDS reports*, 11(4), 423–433. <https://doi.org/10.1007/s11904-014-0229-5>
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K. et al. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, 288(5463), 55–55. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
- Rodrigo, G., Gruvegård, M. & Van Alstine, J. M. (2015). Antibody Fragments and Their Purification by Protein L Affinity Chromatography. *Antibodies*, 4(3), 259–277. <https://doi.org/10.3390/antib4030259>
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology*, 19(1), 75–78. <https://doi.org/10.1038/83567>
- Roy, N. H., Chan, J., Lambelé, M. & Thali, M. (2013). Clustering and Mobility of HIV-1 Env at Viral Assembly Sites Predict Its Propensity To Induce Cell-Cell Fusion. *Journal of Virology*, 87(13), 7516–7525. <https://doi.org/10.1128/JVI.00790-13>
- Ruff, M., Levy, N., Eiler, S., Pradeau, K., Crucifix, C., Schaetzel, A. et al. (2014). Structural and functional studies of HIV-1 pre-integration complexes. *BMC Infectious Diseases*, 14(Suppl 2), O9. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-S2-O9>
- Ryman, J. T. & Meibohm, B. (2017). Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 6(9), 576–588. <https://doi.org/10.1002/psp4.12224>
- Ryscavage, P., Kelly, S., Li, J. Z., Harrigan, P. R. & Taiwo, B. (2014). Significance and Clinical Management of Persistent Low-Level Viremia and Very-Low-Level Viremia in HIV-1-Infected Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3585–3598. <https://doi.org/10.1128/AAC.00076-14>
- Sáez-Cirión, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F. et al. (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6776–6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>

-
- Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Vlachoyiannopoulos, P. G., Tzioufas, A. G. & Moutsopoulos, H. M. (1999). A new helicoid-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for developing potent antigens and immunogens. *Vaccine*, *18*(3), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00201-7)
- Sánchez-Martín, D., Sørensen, M. D., Lykkemark, S., Sanz, L., Kristensen, P., Ruoslahti, E. et al. (2015). Selection strategies for anti-cancer antibody discovery: searching off the beaten path. *Trends in biotechnology*, *33*(5), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.008>
- Sanders, R. W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeeen, A., Val, N. de et al. (2013). A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. *PLOS Pathogens*, *9*(9), e1003618. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003618>
- Sanders, R. W., van Gils, M. J., Derking, R., Sok, D., Ketas, T. J., Burger, J. A. et al. (2015). HIV Neutralizing Antibodies Induced by Native-like Envelope Trimers. *Science (New York, N.Y.)*, *349*(6244), aac4223. <https://doi.org/10.1126/science.aac4223>
- Sanders, R. W. & Moore, J. P. (2017). Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunological Reviews*, *275*(1), 161–182. <https://doi.org/10.1111/imr.12481>
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M. & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *Journal of Virology*, *84*(19), 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Sblattero, D. & Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology*, *18*(1), 75–80. <https://doi.org/10.1038/71958>
- Scheid, J. F., Horwitz, J. A., Bar-On, Y., Kreider, E. F., Lu, C.-L., Lorenzi, J. C. C. et al. (2016). HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature*, *535*(7613), 556–560. <https://doi.org/10.1038/nature18929>
- Scheid, J. F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M. S., Velinzon, K., Pietzsch, J. et al. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*, *458*(7238), 636–640. <https://doi.org/10.1038/nature07930>
- Scheid, J. F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T. Y. K. et al. (2011). Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6049), 1633–1637. <https://doi.org/10.1126/science.1207227>
- Schneider, J. P., Lombardi, A. & DeGrado, W. F. (1998). Analysis and design of three-stranded coiled coils and three-helix bundles. *Folding and Design*, *3*(2), R29–R40. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00011-X)
- Schoofs, T., Klein, F., Braunschweig, M., Kreider, E. F., Feldmann, A., Nogueira, L. et al. (2016). HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6288), 997–1001. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0972>
- Seaman, M. S., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A. et al. (2010). Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, *84*(3), 1439–1452. <https://doi.org/10.1128/JVI.02108-09>

-
- Seitz, R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
- Shaw, G. M. & Hunter, E. (2012). HIV Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418(6898), 646–650. <https://doi.org/10.1038/nature00939>
- Shingai, M., Nishimura, Y., Klein, F., Mouquet, H., Donau, O. K., Plishka, R. et al. (2013). ANTIBODY MEDIATED IMMUNOTHERAPY OF MACAQUES CHRONICALLY INFECTED WITH SHIV SUPPRESSES VIREMIA. *Nature*, 503(7475), 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature12746>
- Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 34(4), 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.004>
- de Silva, E. & Stumpf, M. P. H. (2004). HIV and the CCR5-Δ32 resistance allele. *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.040>
- Simek, M. D., Rida, W., Priddy, F. H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D. S. et al. (2009). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Neutralizers: Individuals with Broad and Potent Neutralizing Activity Identified by Using a High-Throughput Neutralization Assay together with an Analytical Selection Algorithm. *Journal of Virology*, 83(14), 7337–7348. <https://doi.org/10.1128/JVI.00110-09>
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S. et al. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine*, 4(9), 1032–1037. <https://doi.org/10.1038/2017>
- Simon, V., Ho, D. D. & Karim, Q. A. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 368(9534), 489–504. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69157-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69157-5)
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith, G. P. & Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410.
- Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D. R. & Mascola, J. R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nature Medicine*, 15(8), 866–870. <https://doi.org/10.1038/nm.1949>
- Stentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T.-B. G. et al. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal*, 32(10), 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>
- Steinhoff, K. (in Bearbeitung). *Seroprävalenz von Antikörpern gegen die gp41 Epitope EC26-2A4 und 3S und deren Einfluss auf den klinischen Verlauf.*

-
- Steipe, B. (2004). Consensus-Based Engineering of Protein Stability: From Intrabodies to Thermostable Enzymes (Protein Engineering). *Methods in Enzymology* (Band 388, S. 176–186). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)88016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)88016-9)
- Stemcell Technologies. (o. J.). . Verfügbar unter:
https://www.stemcell.com/?utm_source=google&utm_medium=cpc&gclid=EAlaIQobChMIqf6hgq6B5wIVWODtCh1h1ABEEAAYASAAEgLUwPD_BwE
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P. & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977), 848–853. <https://doi.org/10.1038/nature02343>
- Styczyński, J., Tridello, G., Koster, L., Iacobelli, S., van Biezen, A., van der Werf, S. et al. (2019). Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplantation*. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0624-z>
- Sundquist, W. I. & Kräusslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
- Swaminathan, A., Lucas, R. M., Dear, K. & McMichael, A. J. (2014). Keyhole limpet haemocyanin – a model antigen for human immunotoxicological studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(5), 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/bcp.12422>
- Swanstrom, R. & Coffin, J. (2012). HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007443>
- Tanaka, Y., Taneichi, M., Kasai, M., Kakiuchi, T. & Uchida, T. (2010). Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8+ T Cells. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015225>
- Tobin, G. J., Trujillo, J. D., Bushnell, R. V., Lin, G., Chaudhuri, A. R., Long, J. et al. (2008). Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design. *Vaccine*, 26(49), 6189–6199. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.080>
- Tomaras, G. D. & Haynes, B. F. (2009). HIV-1-specific antibody responses during acute and chronic HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, 4(5), 373–379. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32832f00c0>
- Tran, E. E. H., Borgnia, M. J., Kuybeda, O., Schauder, D. M., Bartesaghi, A., Frank, G. A. et al. (2012). Structural Mechanism of Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein Activation. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002797. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002797>
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N. et al. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 70(2), 1100–1108.
- Trott, M., Weiß, S., Antoni, S., Koch, J., von Briesen, H., Hust, M. et al. (2014). Functional Characterization of Two scFv-Fc Antibodies from an HIV Controller Selected on Soluble HIV-1 Env Complexes: A Neutralizing V3- and a Trimer-Specific gp41 Antibody. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097478>

-
- Tur, M. K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A. & Barth, S. (2001). Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *BioTechniques*, *30*(2), 404–8, 410, 412–3. <https://doi.org/10.2144/01302rr04>
- UNAIDS. (2019). Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. Zugriff am 21.12.2019. Verfügbar unter: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- Valdez, H., Smith, K. Y., Landay, A., Connick, E., Kuritzkes, D. R., Kessler, H. et al. (2000). Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. *AIDS (London, England)*, *14*(1), 11–21.
- Van Maele, B. & Debyser, Z. (2005). HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS reviews*, *7*(1), 26–43.
- Veillette, M., Désormeaux, A., Medjahed, H., Gharsallah, N.-E., Coutu, M., Baalwa, J. et al. (2014). Interaction with Cellular CD4 Exposes HIV-1 Envelope Epitopes Targeted by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Journal of Virology*, *88*(5), 2633–2644. <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-13>
- Verkoczy, L., Kelsoe, G. & Haynes, B. F. (2014). HIV-1 envelope gp41 broadly neutralizing antibodies: hurdles for vaccine development. *PLoS pathogens*, *10*(5), e1004073. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004073>
- Verkoczy, L., Kelsoe, G., Moody, M. A. & Haynes, B. F. (2011). Role of immune mechanisms in induction of HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Current opinion in immunology*, *23*(3), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.04.003>
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vieillard, V., Le Grand, R., Dausset, J. & Debré, P. (2008). A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents Nkp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6), 2100–2104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711629105>
- Vieillard, V., Strominger, J. L. & Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an Nkp44 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 10981–10986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504315102>
- Walker, B. D. & Yu, X. G. (2013). Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(7), 487–498. <https://doi.org/10.1038/nri3478>
- Ward, J., Bonaparte, M., Sacks, J., Guterman, J., Fogli, M., Mavilio, D. et al. (2007). HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood*, *110*(4), 1207–1214. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028175>
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. & Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science*, *301*(5638), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.1086907>

-
- Webb, N. E., Montefiori, D. C. & Lee, B. (2015). Dose–response curve slope helps predict therapeutic potency and breadth of HIV broadly neutralizing antibodies. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9443>
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X. et al. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422(6929), 307–312. <https://doi.org/10.1038/nature01470>
- Whitney, J. B., Hill, A. L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M. et al. (2014). Rapid Seeding of the Viral Reservoir Prior to SIV Viremia in Rhesus Monkeys. *Nature*, 512(7512), 74–77. <https://doi.org/10.1038/nature13594>
- Wibmer, C. K., Moore, P. L. & Morris, L. (2015). HIV broadly neutralizing antibody targets. *Current opinion in HIV and AIDS*, 10(3), 135–143. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000153>
- Wilén, C. B., Tilton, J. C. & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a006866. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
- Wolf, T., Fuß, B., Khaykin, P., Berger, A., Knecht, G., Gute, P. et al. (2014). Improved Virological and Immunological Efficacy of Resistance-Guided Switch in Anti- retroviral Therapy: A Frankfurt HIV Cohort Analysis. *Medical microbiology and immunology*, 203(6), 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0350-5>
- Woodberry, T., Gardner, J., Elliott, S. L., Leyrer, S., Purdie, D. M., Chaplin, P. et al. (2003). Prime Boost Vaccination Strategies: CD8 T Cell Numbers, Protection, and Th1 Bias. *The Journal of Immunology*, 170(5), 2599–2604. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2599>
- Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J. & Wallace, R. B. (1991). The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA and Cell Biology*, 10(3), 233–238. <https://doi.org/10.1089/dna.1991.10.233>
- Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J. & Sodroski, J. (1995). Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *Journal of Virology*, 69(9), 5723–5733.
- Xiang, S. (2013). Recent Advances on the Use of Structural Biology for the Design of Novel Envelope Immunogens of HIV-1. *Current HIV research*, 11(6), 464–472.
- Xu, W., Li, H., Wang, Q., Hua, C., Zhang, H., Li, W. et al. (2017). Advancements in Developing Strategies for Sterilizing and Functional HIV Cures. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6096134>
- Yong, K. S. M., Her, Z. & Chen, Q. (2018). Humanized Mice as Unique Tools for Human-Specific Studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(4), 245–266. <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0506-x>
- Zhang, R., Verkoczy, L., Wiehe, K., Alam, S. M., Nicely, N. I., Santra, S. et al. (2016). Initiation of immune tolerance–controlled HIV gp41 neutralizing B cell lineages. *Science translational medicine*, 8(336), 336ra62. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf0618>

-
- Zhang, Y. J., Fadeel, B., Hodara, V. & Fenyő, E. M. (1997). Induction of apoptosis by primary HIV-1 isolates correlates with productive infection in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS (London, England)*, *11*(10), 1219–1225. <https://doi.org/10.1097/00002030-199710000-00004>
- Zhou, M. (2013B). *Dissertation*.
- Zhou, M., Kostoula, I., Brill, B., Panou, E., Sakarellos-Daitsiotis, M. & Dietrich, U. (2012). Prime boost vaccination approaches with different conjugates of a new HIV-1 gp41 epitope encompassing the membrane proximal external region induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, *30*(11), 1911–1916. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.026>
- Zhou, M., Meyer, T., Koch, S., Koch, J., Briesen, H. von, Benito, J. M. et al. (2013A). Identification of a new epitope for HIV-neutralizing antibodies in the gp41 membrane proximal external region by an Env-tailored phage display library. *European Journal of Immunology*, *43*(2), 499–509. <https://doi.org/10.1002/eji.201242974>
- Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A. et al. (2010). Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5993), 811–817. <https://doi.org/10.1126/science.1192819>
- Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A. J., Van Ryk, D., Xiang, S.-H. et al. (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*, *445*(7129), 732–737. <https://doi.org/10.1038/nature05580>
- Zhou, T., Zhu, J., Wu, X., Moquin, S., Zhang, B., Acharya, P. et al. (2013). Multi-donor Analysis Reveals Structural Elements, Genetic Determinants, and Maturation Pathway for Effective HIV-1 Neutralization by VRC01-class Antibodies. *Immunity*, *39*(2), 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.012>
- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J. et al. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634931100>
- Zimecki, M. & Webb, D. R. (1978). The influence of molecular weight on immunogenicity and suppressor cells in the immune response to polyvinylpyrrolidone. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *9*(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(78\)90123-X](https://doi.org/10.1016/0090-1229(78)90123-X)
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M. et al. (2001). Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41. *Journal of Virology*, *75*(22), 10892–10905. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10892-10905.2001>

APPENDIX

A1 pcDNA™5/FRT-CMV-HIV-1 Env

Tabelle A1 Aminosäuresequenzen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten HIV-1 Env-Klone des Subtyps B (HIV-EnvB) und C (HIV-EnvC).

Klon-ID	Aminosäuresequenz
HIV-EnvB SC422661, clone B (SVPB8) <i>GenBank N°:</i> AY835441	MRVRETRRNWQHWWKWTMLLGLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAY ETEKHNWVATHACVPTDPDPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVEQMHEIISLWDQSLKPCVKL TPLCVTLNCTDELNRNGTYANVTVTEKGEIKNCSFNITTAIRDKVQKTYALFYRLDVVPIDNNHGN SSSNYSNYRLINCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKKFNGTGPCKNVSTVQCTH GIRPVVSTQLLNGLSLAEEVVIRSENFTDNAKTIIVQLNDSVIINCTRPNNNTRKGITIGPGRVY TGEIVGDIRQVHCNLSAKWNSTLKQVTKLREQFGNKTIVFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFF FCNTTQLFNSTWNINGTWHGTTVSNKTIILPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNITG LLLTRDGGNNNSTTEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGIAPTARRRVVQREKRAVGT IGAMFLGFLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLSGIVQQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQA RVLAVERYLRDQQLGIWGC SGR LICTTNPWN TSWSNKSLNDIWDNMTWMEWDREINNYT SLIYNLLEDAQNQEQEKNEQELLELDKASLWNWFDITHWLWYIKIFIMIIGGLIGLRIVFAVLSIV NRVRQGYSPFSQTHLPARREPDRPEGTEGEGGEKDRDRSRLVHGFLALIWDLLRSLCLFSYH RLTDLIVTRIVGLLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLDITIAIAVAEGTDRVIEAVR RIFIGVLHIPRRIRQGFERALL-
HIV-EnvC pAncCgp160-opt <i>GenBank N°:</i> DQ401076	MRVMGILRNCQQWWIWGILGFWMLMICSVVGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYE REVHNVWATHACVPTDPNPQEMVLENTENFNMWKNDMVDQMHEIISLWDQSLKPCVKLT PLCVTLNCTNVTNATNNTYNGEMKNCSFNITTEL RD KKKKEYALFYRLDIVPLNENSSEYRLINC NTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGKIPVSTQLLLN GSLAEEIIIIRSENLTDNAKTIIVQLNESVEIVCTRPNNNTRKSMRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAH CNISEDKWNKTLQQAELGKHFNPNTITFEPSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLFNSTYN NNTNSNSTITLPCRIKQIINMWQGVGQAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGKENTTETFRPG GGDMRDNRSELYKYKVV EIKPLGVAPTEAKRRVVEREKRAVGLGAVFLGFLGAAGSTMGAASI TLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAIEAQHMLQLTVWGIKQLQARVLAMERYLKDQQLGIWGC SGKLICTTAVPWNSSWSNKSLDDIWDNMTWMEWDREISNYTDTIYRLLEESQNQEQEKNEQDL LALDSWENLWNWFDITNWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIIFAVLSIVNRVRQGYSPFSQTLTPNPRG PDRLERIEEGGEQDRDRSIRLVSGFLALAWDDLRLSLCLFSYHRLRDFILIAARTVELLGRSSLRG LQRGWEALKYLGSLVQYWGQELKKS AISLLDITIAIAVAEGTDRIIEVVQRACRAILNIPRRIRQGF EAALL-

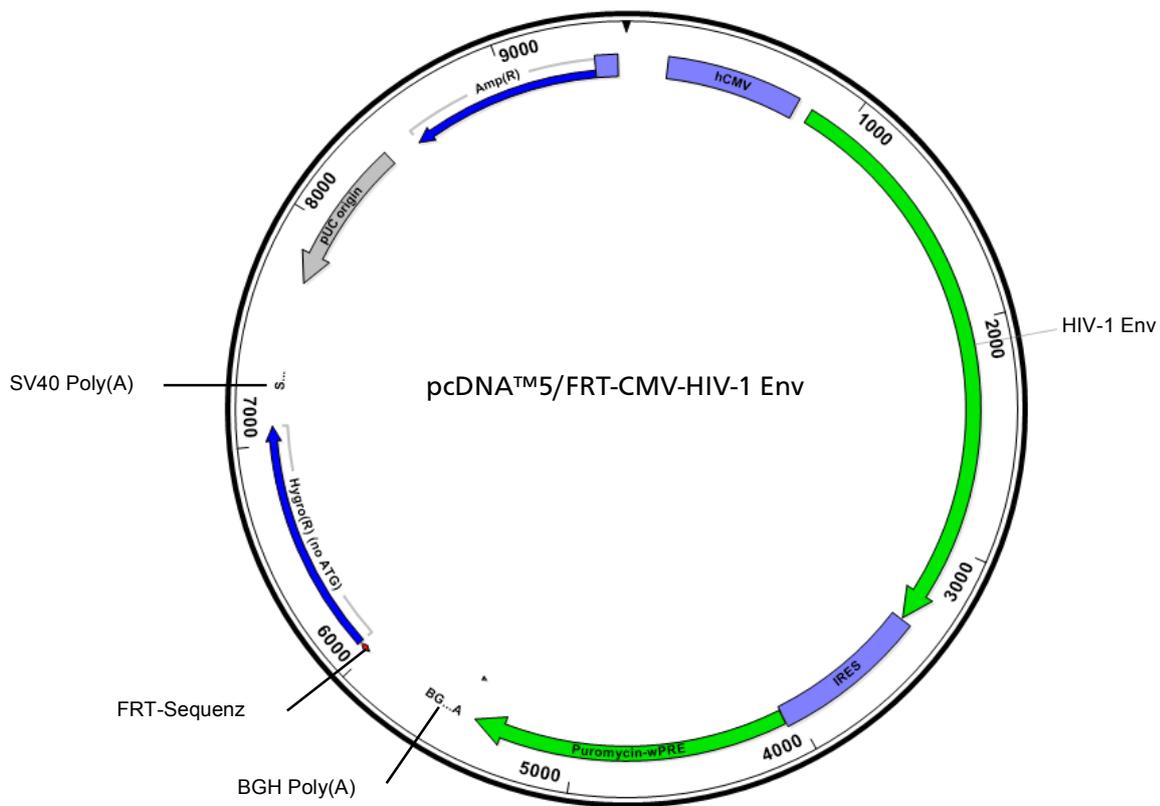


Abbildung A1 Karte des Expressionsvektors pcDNA™5/FRT-CMV-HIV-1 Env. Das DNA-Plasmid hat eine Größe von rund 5,1 kb ohne Insert. Der Vektor besitzt einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC-Origin) und ein Ampicillin-Resistenzgen (*ampR*). Darüber hinaus trägt das Plasmid auch eine FRT-Sequenz (engl. *Flp Recombination Target Site*) für eine Flippase-vermittelte Rekombination, strangabwärts gefolgt von einem ATG-defizienten Hygromycin-Resistenzgen (*hpt*) und einer SV40 Poly(A)-Terminatorsequenz. Das Insert steht unter der Kontrolle eines humanen CMV (Cytomegalovirus)-Promotors und wird am 3´-Ende durch eine BGH (engl. *Bovine Growth Hormone*) Poly(A)-Sequenz terminiert. Das DNA-Insert setzt sich aus dem HIV-1 *env*-Gen (Subtyp B oder Subtyp C) und einem Puromycin-Resistenzgen (*pac*) zusammen. Beide Gene sind durch eine IRES (engl. *Internal Ribosomal Entry Site*) miteinander verknüpft. Am 3´-Ende des *pac*-Gens ist zudem die DNA-Sequenz, kodierend für ein posttranskriptionelles regulatorisches Element (wPRE), angefügt.

A2 pHAL30

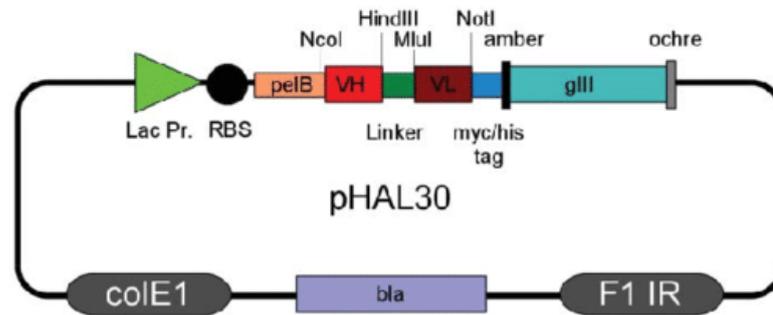


Abbildung A2 Karte des Phagen-Display Vektors pHAL30. Das DNA-Plasmid hat eine Größe von etwa 4,3 kb ohne Insert. Der Vektor besitzt einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1) und ein Antibiotika-Resistenzgen (*bla*, β -Lactamase). Darüber hinaus trägt das Plasmid auch eine für die Replikation und Verpackung neuer Phagen notwendige *f1 Intergenic Region* (F1 IR). Das DNA-Insert steht unter der Kontrolle eines Lactose (*lacZ*)-Promotors, strangabwärts gefolgt von einer ribosomalen Bindestelle (RBS) und einer *pelB*-Signalsequenz für den Proteintransport ins bakterielle Periplasma. Die Gene für die variablen Domänen der schweren (VH) und leichten (VL) Antikörperkette sind durch eine Linkersequenz miteinander verknüpft. Zudem ist das scFv-Fragment am 3'-Ende über die DNA-Sequenz, kodierend für einen C-Myc- und Histidin (His)-Protein-Tag, mit dem 5'-Ende des Gens für das Phagenhüllprotein (*pIII*) verbunden.

A3 pCMV2.5-IgG1-Fc-XP-Vektor

Tabelle A3 Aminosäuresequenzen der fünf selektierten Antikörperklone. Die Linkersequenz zwischen der schweren (VH) und leichten (VL) Antikörperkette der scFv-Fragmente ist grau markiert.

Klon-ID	Aminosäuresequenz
scFv#1	QVQLVQSGAELKKPGESLKISCKTSGYDFSTSWIGWVRQMPGKGPPEWMGFIYPEDSETAYSPSFQGHVT ISADRSTRAYIEWISLKASDTAMYYCASMVGTYQSDRSGGTDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPVSKLE EGEFSEARVQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLHWFGGGTKLTVLGQ
scFv#2	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISTRGRITTYADSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRALRFDYWGQGTLVTVSSASTKGPVSKLEEGEFSEARVDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYASRLQSGVPSRFRSGSGSGTDFD LTISSLQPEDFATYYCQQLTRFPATFGQGTKVEIKR
scFv#3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCRSTSGGTFIDYAIWVRQAPGQGLEWVGMVIRVGTPTNYAQKFGQGRV TITADESTSTGYMELRSLTSEDYVYCVRDGDDSDHWGQGTLVTVSSASTKGPVSKLEEGEFSEARVQ SVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAITGLQAEDADYYCQSYDSSLGVSFVGGGKTLTVLGQ
VHH#1	DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSNYAMSWVRQVPGKGLEWVSLINSGGQSTLYSDSARGRF TISRDNKNTVYLQNLDPEDTAMYYCAARRDSGNVWGQGTQVTVSS
VHH#2	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTASGFTTTSYSSTCIGWFRQAPGKEREAVATINAKGSTLYYVDSVKG RFTISRDNDAENTVYLQMNSLKPEDTSTYYCAADVYRGGYCSAYAGRFSYWGQGTQVTVSS

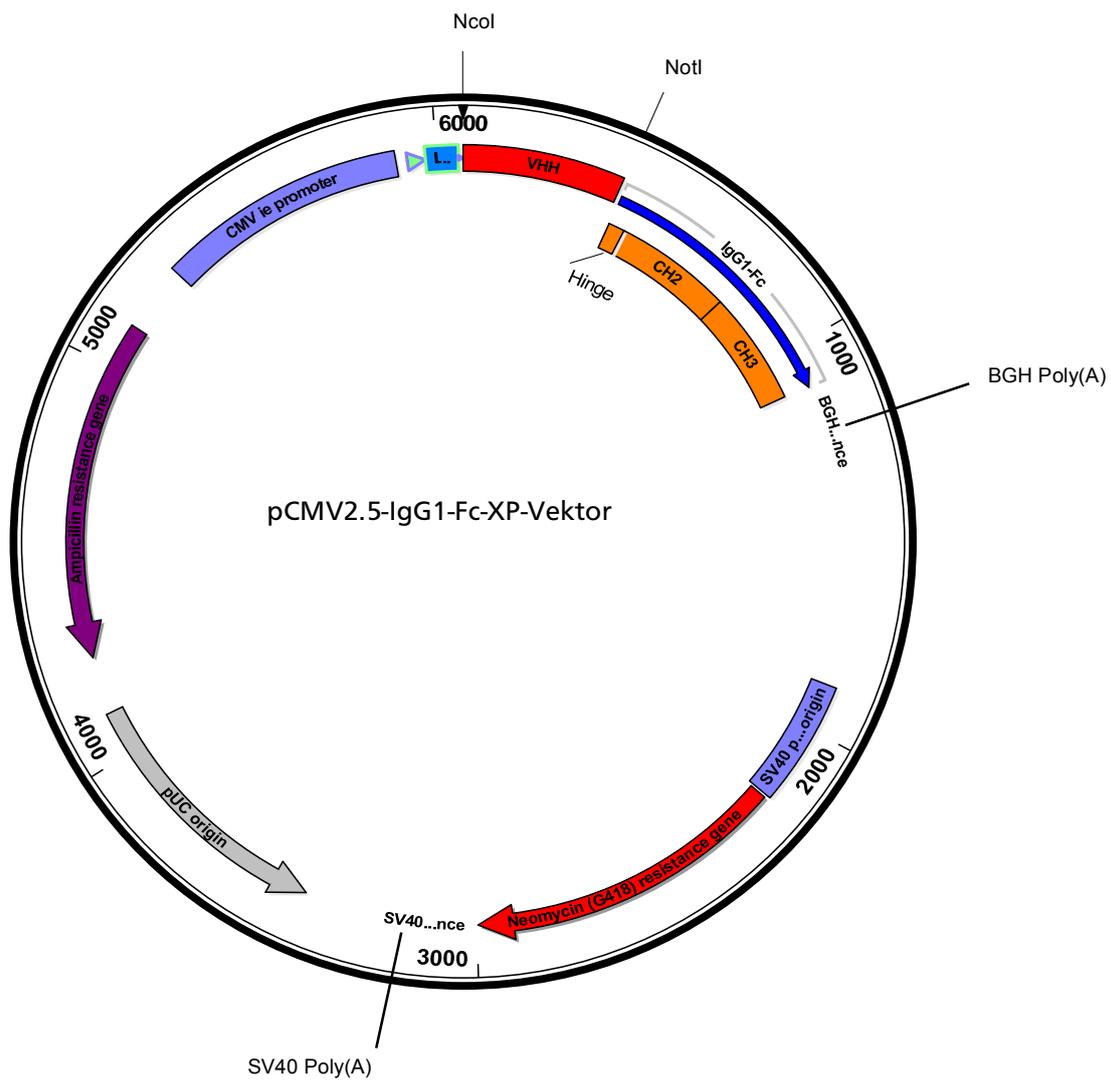


Abbildung A3 Karte des Expressionsvektors pCMV2.5-IgG1-Fc-XP. Das DNA-Plasmid hat eine Größe von etwa 5,7 kb ohne Insert. Der Vektor besitzt einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC-Origin) und ein Ampicillin-Resistenzgen (*ampR*). Als eukaryotischen Selektionsmarker trägt das Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen (*apt*), reguliert durch einen SV40-Promotor und eine SV40 Poly(A)-Terminatorsequenz. Das DNA-Insert steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und einer BHG Poly(A)-Terminatorsequenz. Die Gene der Antikörperfragmente wurden mittels der Restriktionsnukleasen NcoI und NotI in 5'-Orientierung zur DNA-Sequenz einer humanen IgG1-Fc-Domäne kloniert.

A4 Analyse der Mausseren

Tabelle A4 Untersuchung der Serumreaktivität immunisierter Mäuse mit dem Phospholipid Cardiolipin. Die Bestimmung der Kreuzreaktivität erfolgte unter Verwendung des *Mouse ACA-IgG (anti-Cardiolipin Antibody IgG) ELISA Kit* nach Anleitung des Herstellers (DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland). Hierbei wurden die Pre-Immun- und Immunsereen der Mäuse analysiert, die mit dem EC26-2A4 sowie EC26-2A4ΔM-Epitop, gekoppelt an KLH, behandelt wurden. Als Kontrolle dienten Mausseren die ausschließlich mit KLH allein immunisiert wurden. Alle Seren wurden einzeln und in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Die Antigenerkennung der Antikörper wurde mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers kolorimetrisch ($OD_{450\text{ nm}}$) nachgewiesen. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Massenkonzentration (β_{AK}) kreuzreaktiver Serumantikörper anhand eines Assay-internen Referenzstandards. Alle Seren wurden in Duplikaten vermessen.

Tier	KLH					KLH-EC26-2A4					KLH-EC26-2A4M				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Immunserum															
$OD_{450\text{ nm}}$	0,00	-0,02	-0,02	-0,03	-0,02	-0,03	-0,03	0,01	-0,03	-0,03	-0,04	-0,03	-0,02	-0,01	-0,02
β_{AK} (ng/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0,18	0	0	0	0	0	0	0
Pre-Immunserum															
$OD_{450\text{ nm}}$	-0,02	-0,06	-0,05	-0,06	-0,05	-0,04	-0,02	-0,02	-0,03	-0,03	-0,02	-0,04	-0,05	-0,05	-0,05
β_{AK} (ng/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Standard

$OD_{450\text{ nm}}$	0	0,028	0,096	0,271	0,448	1,001	2,04	3,017
β_{AK} (ng/mL)	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ab	Antikörper
ABK	Antikörperbindungskapazität
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom
ART	Antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheiten
B _{max}	Maximale Absorption
bnAb	Breit neutralisierender Antikörper
bp	Basenpaar
CCR5	C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CD4	engl. <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	engl. <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CDC	engl. <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
cfu	Koloniebildende Einheiten
CMV	Zytomegalievirus
CRF	Zirkulierende rekombinante Formen
CT	Zytoplasmatische Teil
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tage
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EFS	engl. <i>Elongation Factor 1α Short</i>
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Env	engl. <i>Envelope Glycoprotein</i>
FACS	Durchflusszytometrie
Fc	Kristallisierbares <i>Fragment</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht

GFP	engl. Green Fluorescent Protein
gp	Glykoprotein
h	Stunden
HCDR3	Komplementaritätsbestimmende Region 3 der schweren Kette
HEK-293T	Menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa-HF1-3	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ID ₅₀	Mittlere inhibitorische Dosis
IgG	Immunglobulin G
K _d	Dissotiationskonstante
kDa	Kilodalton
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin
LTNP	engl. <i>Long-Term Non-Progressors</i>
<i>M</i>	Mittelwert
<i>m</i>	Median
M	Molar
mAb	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
m _M	Molekulargewicht
MPER	engl. <i>Membrane Proximal External Region</i>
MPL	Monophosphoryl-Lipid A
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
NA	Neutralisationsaktivität
nAb	Neutralisierender Antikörper
NIH	engl. <i>National Institutes of Health</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pfu	Plaue bildende Einheiten
RLU	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
scFv	engl. <i>Single-Chain Variable Fragment</i>
SD	Standardabweichung

SHIV	engl. <i>Simian-Human Immundodeficiency Virus</i>
SIV	engl. <i>Simian Immundodeficiency Virus</i>
SOC	engl. <i>Sequential Oligopeptide Carrier</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
ssDNA	Einzeusträngige DNA
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenkonzentration
VE	Deionisiertes Wasser
VHH	Einzeldomänenantikörper
VL	Viruslast
w/v	Massenkonzentration
WT	Wildtyp
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter



LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name Oliver Ringel
Geburtstag 03. Dezember 1984
Geburtsort Leipzig

AKADEMISCHE LAUFBAHN

- 2013 – 2020 Doktorarbeit unter der Leitung von Frau Dr. Ursula Dietrich im Bereich Experimentelle Therapie am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/ Main, betreut durch Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Chemie, Fachgebiet Allgemeine Biochemie.
Titel: *HIV-1 neutralisierende Antikörper als Werkzeuge für prophylaktische und therapeutische Impfansätze.*
- 2012 Diplomarbeit unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz am Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt in der Arbeitsgruppe DNA-Reparatur, betreut durch Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Chemie, Fachgebiet Allgemeine Biochemie.
Titel: *Charakterisierung der nukleolytischen Resektion von DNA-Enden bei der Reparatur komplexer Schäden.*
- 2006 – 2012 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, mit den Studienschwerpunkten: Biochemie, Genetik, Zoologie/Physiologie
Abschluss: *Diplom-Biologe*

SCHULISCHE LAUFBAHN

- 1997 – 2004 Eliteschule des Sports „Friedrich Ludwig Jahn“, Potsdam
Abschluss: *Abitur*

PUBLIKATIONEN

- 2018 Ringel O, Vieillard V, Debré P, Eichler J, Büning H, Dietrich U. *Viruses*. **2018** Apr 15; 10(4). pii: E197
The Hard Way towards an Antibody-Based HIV-1 Env Vaccine: Lessons from Other Viruses.
- 2018 Ringel O, Müller K, Koch J, Brill B, Wolf T, Stephan C, Vieillard V, Debré P, Dietrich U. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **2018** Apr; 34(4):365-374.
Optimization of the EC26-2A4 Epitope in the gp41 Membrane Proximal External Region Targeted by Neutralizing Antibodies from an Elite Controller.
- 2014 Averbek NB, Ringel O, Herrlitz M, Jakob B, Durante M, Taucher-Scholz G. *Cell Cycle*. **2014**; 13(16):2509-16.
DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells.

POSTER

- 2015 DÖAK 2015 7. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress
Titel: *Characterization and optimization of the EC26-2A4 MPER epitope for vaccination purposes.*
Oliver Ringel, Karsten Müller, Joachim Koch, Mingkui Zhou, Christoph Stephan und Ursula Dietrich

VORTRAG

- 2017 DÖAK 2017 8. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress
Titel: *Characterization and optimization of the EC26-2A4 MPER epitope for vaccination purposes.*
Oliver Ringel, Karsten Müller, Joachim Koch, Mingkui Zhou, Christoph Stephan und Ursula Dietrich

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich besonders Frau Dr. Ursula Dietrich danken, für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und auch für ihr Interesse daran. Sie hat mich in der gesamten Zeit meiner Promotion exzellent betreut und stets tatkräftig unterstützt. Dabei hat sie jederzeit ein offenes Ohr gehabt und immer einen kühlen Kopf bewahrt. Vielen Dank dafür!

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar und Frau Prof. Dr. Beatrix Süß für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Herrn Kolmar gebührt an dieser Stelle noch ein besonderer Dank für seine Ausdauer und seinen Einsatz mich als Promotionsstudent des Fachbereiches Chemie, auch über die reguläre Promotionszeit hinaus, betreut zu haben.

Vielen Dank an Patrice Debré, Vincent Vieillard, José Marcelino und Christoph Stephan, für die erfolgreiche Kooperation im Rahmen des gemeinsamen HIVera-Projekts.

Des Weiteren möchte ich mich bei unserer Technischen Assistentin Patricia Schult-Dietrich bedanken, die immer äußerst hilfsbereit und für jegliche Diskussionen offen war.

Ich danke meinen lieben Kollegen Sebastian, Sarah, Kathrin, Yvonne, Svenja, Sonja, Karsten, Bianca und Ralf, die ihr Wissen immer bereitwillig mit mir geteilt haben, mich bei Experimenten unterstützt haben und mit denen ich viele erheiternde Arbeitsstunden und (sportliche) Mittagspausen verbracht habe.

Großen Dank auch an Boris Brill, Stefan Stein, Joachim Koch und Hagen von Briesen für die freundliche Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei verschiedenen experimentellen und methodischen Fragestellungen.

Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Frau Miri, die mich in schwierigen Phasen immer wieder beruhigt und motiviert hat und mich jeden Tag zu einem sehr glücklichen Menschen und Papa macht.

Danke auch Patrick und Katja für Eure wertvolle moralische Unterstützung.

Zum Abschluss möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium erst ermöglicht und mich fortwährend unterstützt haben. Sie haben mich immer angespornt und motiviert meinen Weg zu gehen. Ich danke Euch von ganzem Herzen!



ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Dr. Ursula Dietrich im Bereich Experimentelle Therapie am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main angefertigt und durch Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar im Fachbereich Chemie, Fachgebiet Allgemeine Biochemie, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Februar 2013 bis Januar 2020 betreut.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den

Oliver Ringel

ERKLÄRUNG DER ÜBEREINSTIMMUNG

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

Darmstadt, den

Oliver Ringel