

4. Ergebnisse

4.1. Optische Untersuchungen von Virussuspensionen

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Struktur von Polioviren durch äußere Bedingungen ändern läßt. Als Beispiel wurden zunächst Änderungen des pH-Wertes untersucht. Später wurde der Einfluß von Antikörpern auf Polioviren geprüft.

4.1.1. Direkte Auswertung der Spektren von Virussuspensionen nach pH-Änderungen

4.1.1.1. Säuretitration

Proben von Poliovirus Typ 1, 2 und 3 (in PBS, Cacodylatpuffer oder MES) wurden von pH 7 in kleinen Schritten mit HCl bis etwa pH 2 titriert. Bei jedem Schritt wurde ein Spektrum aufgenommen im UV- und sichtbaren Bereich. Dabei wurde die optische Dichte gegen die Wellenlänge aufgetragen und gespeichert.

Bei pH 7 sehen die Kurven aller drei Virusstämme ähnlich aus (siehe Abb.4.1).

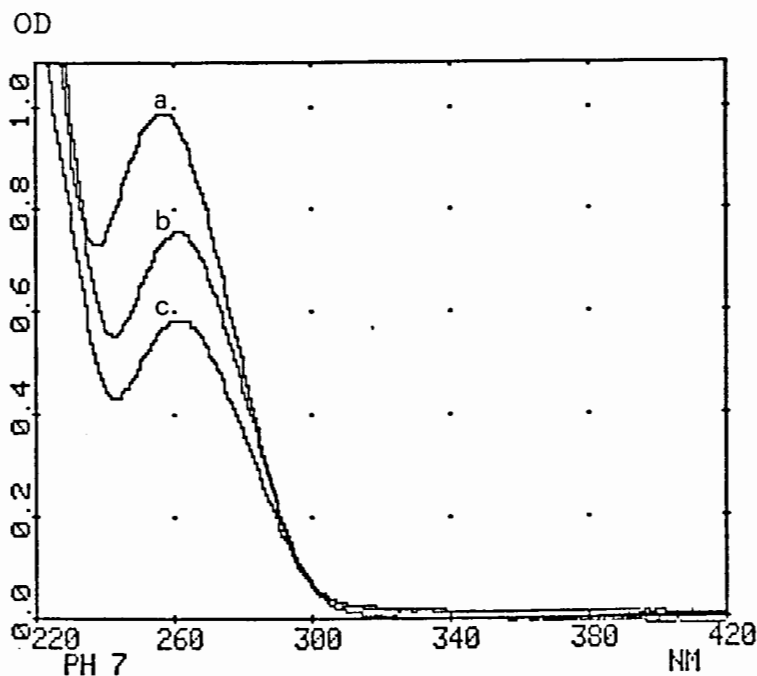


Abb.4.1 Vergleich der 3 Poliovirusstämme bei pH 7.

a = Mahoney (Typ 1), b = MEF₁ (Typ 2), c = 1658

Titriert man Polioviren in pH-Bereiche zwischen pH 7 und pH 4,5, so erhält man nach Berücksichtigung der Verdünnung stets die Ausgangskurve von pH 7. Dividiert man die OD_{260} zusätzlich durch ihren Anfangswert bei pH 7, so ergibt sich stets ein Wert, der 1 ist. (Einige Proben zeigten von Anfang an einen Wert, der leicht über 1 war. In diesen Proben lag - wie Zentrifugation zeigt - schon ohne Titration etwas Aggregation vor.)

Sobald pH 4,5 oder ein pH-Wert darunter erreicht ist, steigt die optische Dichte des gesamten Spektrums rapide an. Abb.4.2 zeigt den Anstiegsbeginn bei pH4,5 in einer Probe von Mahoney Pool 47. Pool 46 und 765 ergaben gleiche Anstiege.

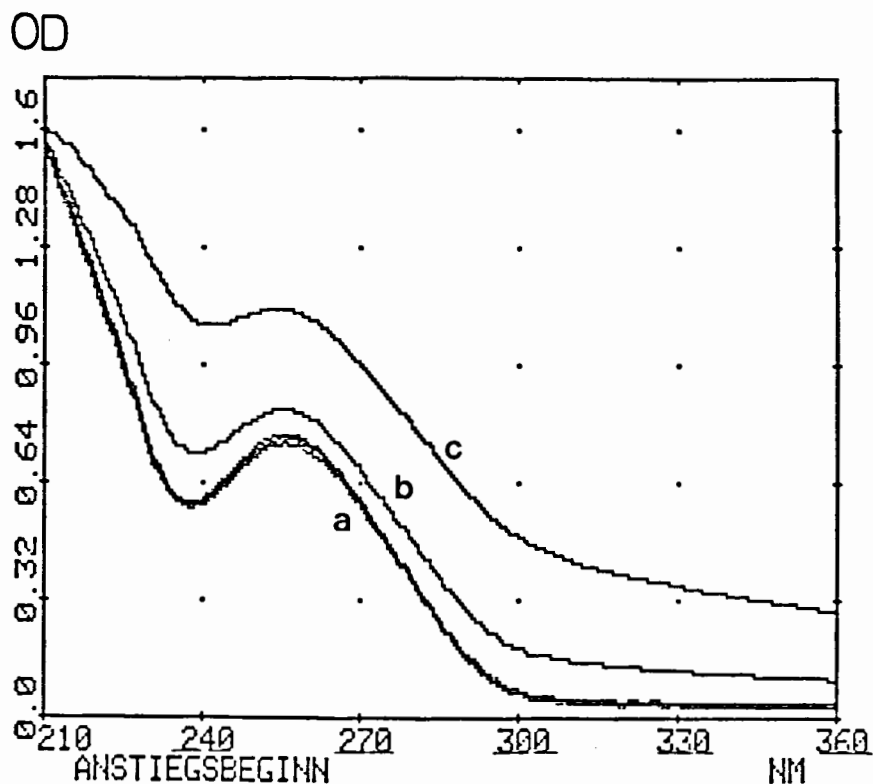


Abb.4.2 Anstiegsbeginn des Spektrums einer Mahoneyvirusprobe.

a = pH 7,44, pH 6,41, pH 5,70 und pH 4,93. b = pH 4,49. c = pH 3,66.

Die optische Dichte steigt sofort nach Änderung des pH-Wertes und bleibt dann konstant. Bei etwa pH3 erreicht die OD ein neues Plateau (d.h. weitere Säurezugabe bleibt in diesem Bereich ohne Folgen). Das Plateau liegt 1,7- bis 1,8mal so hoch wie das um pH 7 bei Poliovirus Typ 1, Mahoney.

Die Normierung der optischen Dichte erfolgte nach der Formel

$$\text{relative OD} = \frac{\text{OD aus Spektrum} \times \text{Verdünnung}}{\text{Anfangs - OD}}$$

Es zeigte sich, daß der Anstieg unabhängig von der Viruskonzentration ist. Die Zugabe der Säure in ml wurde so klein gehalten, daß die Änderung der Ionenstärke unter 4 % blieb, so daß die beobachteten Änderungen nicht auf Unterschieden in der Ionenstärke der Lösungen beruhen konnten.

Titriert man Poliovirus von pH 7 mit NaOH, so tritt kein Anstieg der optischen Dichte auf.

Da die optische Dichte bei der Säuretitation auch im sichtbaren Bereich anstieg, war zu erkennen, daß sich Virusaggregate gebildet hatten. Aggregate lassen sich bei niedrigtouriger Zentrifugation sedimentieren; so wurden die Proben bei verschiedenen pH-Werten 10 min lang bei 8250g zentrifugiert und erneut ein Spektrum des Überstandes aufgenommen (Abb.4.3). Die optische Dichte im sichtbaren Bereich des Spektrums läßt sich durch die Zentrifugation vollständig entfernen, weil alle Aggregate abzentrifugiert werden. Je mehr Aggregation an der OD im sichtbaren Bereich vor der Zentrifugation zu erkennen war, desto mehr OD im UV-Bereich fehlte nach der Zentrifugation. Auf dem Plateau im Sauren lagen alle Viren in abzentrifugierbaren Aggregaten vor.

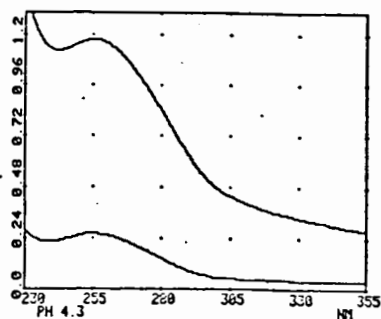
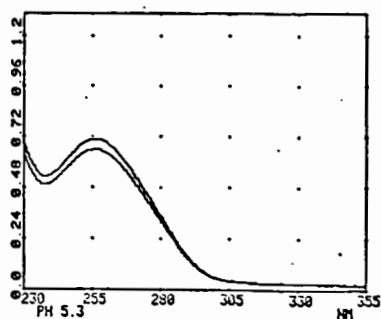
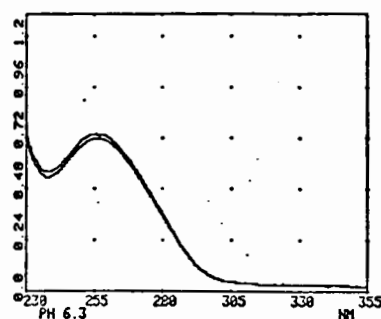
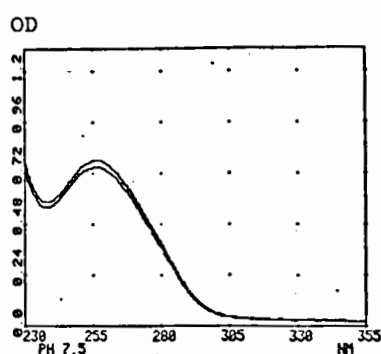
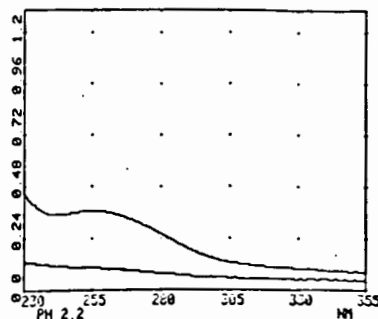


Abb.4.3 Abzentrifugation von Virus-Aggregaten bei verschiedenen pH-Werten.

Die oberste Darstellung entspricht pH 7,5, darunter folgen pH 6,3, pH 5,3, pH 4,3 und pH 2,2. Die jeweils obere Kurve ist die vor einer Zentrifugation, die jeweils untere die nach der Zentrifugation. Für alle 5 Abbildungen wurde nur eine Probe verwendet. Der Überstand der abzentrifugierten Probe wurde auf den nächst niedrigeren pH-Wert gebracht und erneut zentrifugiert. Während die Abnahme der Viren bei den ersten drei Darstellungen noch sehr gering ist, steigt die OD bei pH 4,3 stark an, und die Virus-Aggregate lassen sich zum größten Teil abzentrifugieren. Die Rest-OD läßt sich durch pH 2,2 noch einmal erhöhen und die restlichen Aggregate lassen sich dann abzentrifugieren.



Das Aggregationsverhalten von verschiedenen Poliovirusstämmen, auch das der 3 Typen, unterscheidet sich voneinander. Der starke Anstieg der OD bei Mahoneyviren (Typ 1) ist bei MEF₁-Viren (Typ 2) reduziert auf etwa das 1,2-fache der relativen OD. Außerdem scheinen MEF₁-Viren unter pH 4 labiler zu sein als Mahoney- oder 1658-Viren (Typ3). Die optische Dichte von 1658-Viren steigt kontinuierlich mit der Säurezugabe schon ab pH 7 an. (Abb.4.4)

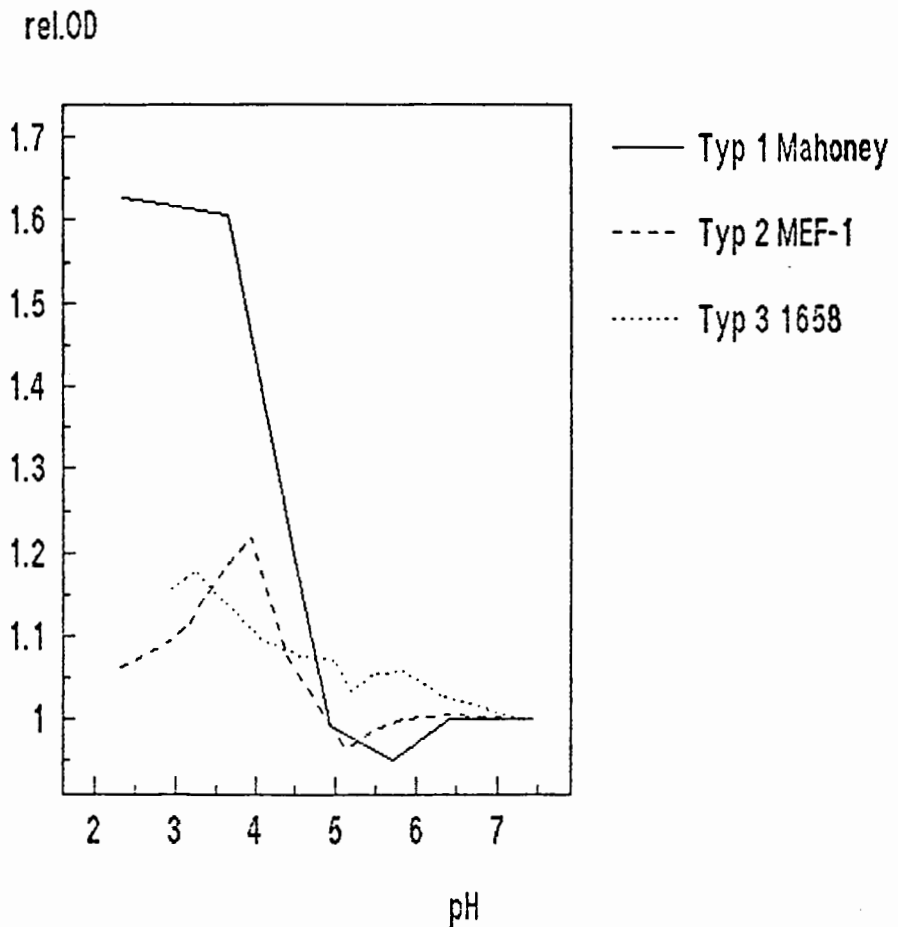


Abb.4.4 Veränderung der relativen OD_{260nm} bei Säurezugabe

4.1.1.2. Base - Rücktitration

Proben, die so lange mit Säure titriert waren, bis die OD auf dem Plateau im Sauren lag, wurden von dort mit NaOH zurücktitriert. Es zeigte sich, daß die optische Dichte bei einem pH > 4,5 wieder auf die Ausgangswerte bei pH 7 zurückging. Die Aggregate der Viren lösten sich auf und waren auch nicht mehr abzentrifugierbar (Abb.4.5). Die Aggregation von Polioviren durch einen sauren pH-Wert ist demnach ein völlig reversibler Vorgang. Nach einer vollständigen Säure-Base-Titration läßt sich der gleiche Vorgang beliebig oft wiederholen.

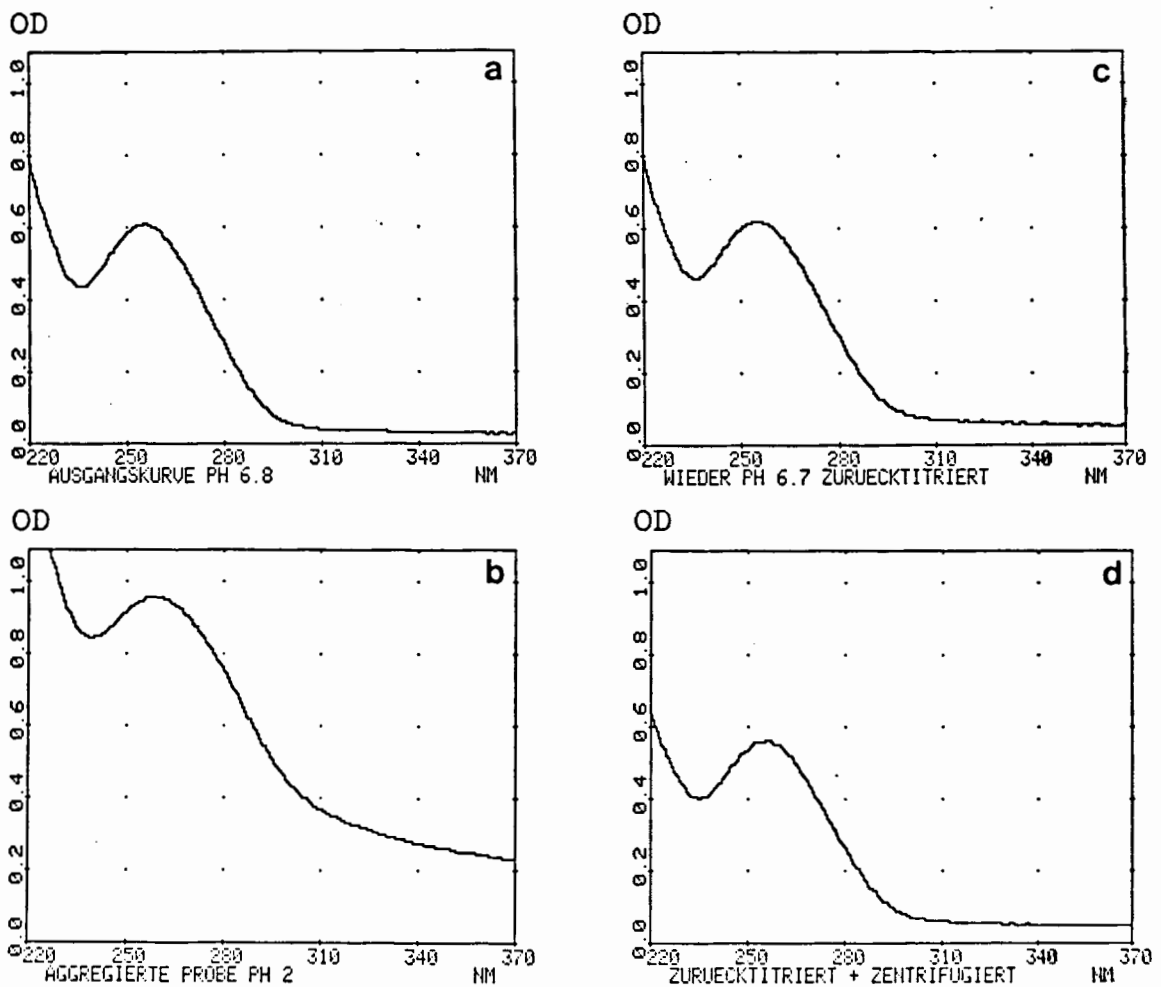


Abb.4.5 Rückgang der durch Säure erhöhten OD-Werte durch Base-Titration.

a: Ausgangsspektrum. b: Spektrum einer stark aggregierten Probe bei pH 2 (Diese OD-Werte würden bei Zentrifugation auf 0 sinken.) c: Spektrum der von pH 2 auf pH 6,7 zurück titrierten Probe. d: Spektrum der zentrifugierten Probe nach Rücktitration (c).

4.1.1.3. Infektiosität in Abhängigkeit vom pH -Wert

Um die Infektiosität der Viren bei verschiedenen pH-Werten, bzw. in verschieden aggregiertem Zustand festzustellen, wurden Plaque-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Gesamtinfektiosität über den pH-Bereich von pH 2,5 bis pH 7 recht konstant bleibt (Abb.4.6). Durch die mit dem Plaque-Test verbundene pH-Neutralisierung gehen auch die Viren der Aggregate wieder einzeln in Lösung. Zentrifugiert man die sauren Proben vorher, so kann man die Infektiosität der Aggregate im Niederschlag von der der in Lösung verbliebenen Viren getrennt messen.

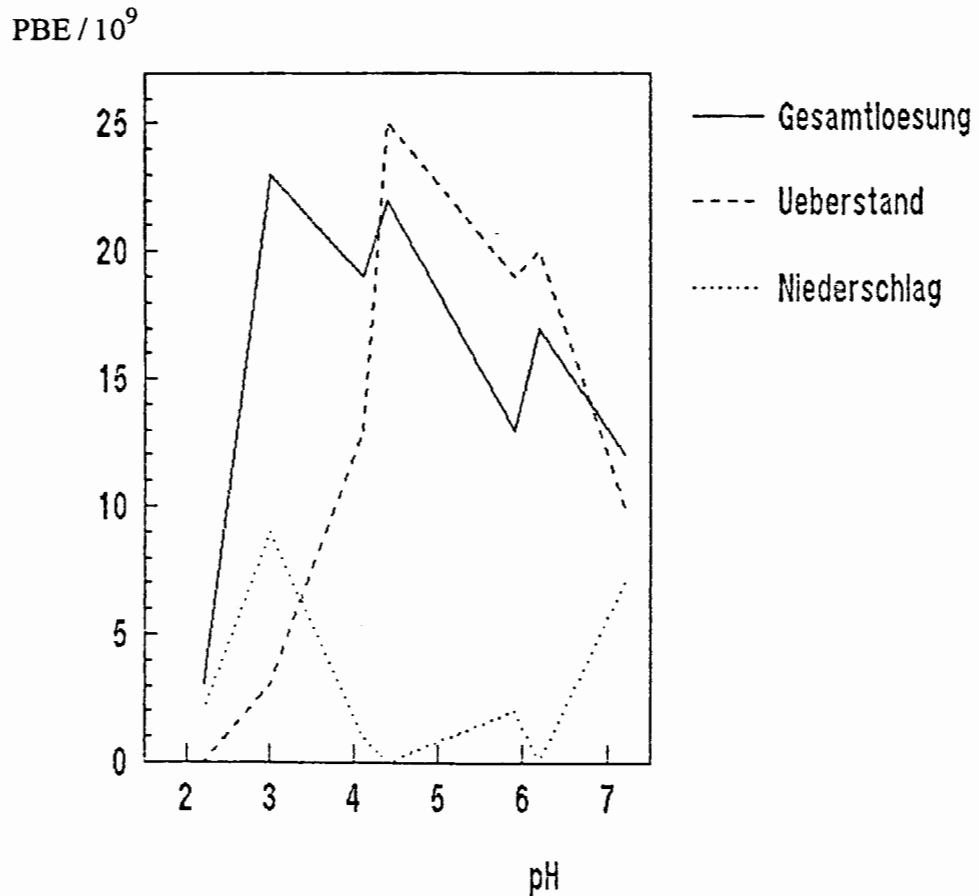


Abb.4.6 Verteilung der Infektiosität in Gesamtlösung, Überstand und Niederschlag bei einer Mahoneyvirussuspension in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Infektiosität im Überstand bleibt bis pH 4,5 erhalten. Sie sinkt unter pH 4,5 rapide, weil die Viren als Aggregate abzentrifugiert werden. Die Niederschläge werden für den Plaque-Test in PBS aufgenommen, d.h. die Aggregate sollten sich wegen des neutralen pH-Wertes wieder auflösen. Auf diese Weise läßt sich die Anzahl der in den Aggregaten vorhandenen infektiösen Partikel bestimmen, außer einem Anteil, der nicht wieder in PBS auflösbar ist. Wie Abb.4.6 zeigt, steigt die Infektiosität in dem Moment, in dem die Infektiosität des Überstandes sinkt, bei pH 4,5. Die Infektiosität der Viren bleibt im Aggregat erhalten oder ist durch Disaggregation zurückzugewinnen; sie wird durch einen pH-Wert zwischen 2 und 4,5 nicht zerstört. pH-Aggregation reicht also nicht zur Aufhebung der Infektiosität.

Die Infektiosität bei pH 2 nimmt mit der Zeit ab. 2 Stunden bei pH 2,37 zerstören die Viren irreversibel. Im Alkalischen nimmt die Infektiosität über pH 9 ab.

4.1.1.4. Hemmung der pH-Aggregation durch Ca²⁺

Wie Floyd und Sharp (1978) gezeigt haben, läßt sich die spontane Aggregation von Polioviren im Sauren durch Ca²⁺ oder Mg²⁺ verhindern. Die minimale Hemmkonzentration beträgt 50 mM Ca²⁺. Proben von Poliovirus in 20 mM MES mit 50 mM Ca²⁺ wurden auf pH 2,2 gebracht.

Zunächst änderte sich nichts am Verlauf des Spektrums. Auch nach 45 min war noch das Anfangsspektrum zu sehen. Nach 6,5 Stunden trat jedoch Aggregation im gleichen Umfang wie bei Lösungen ohne Ca^{2+} ein (Abb.4.7).

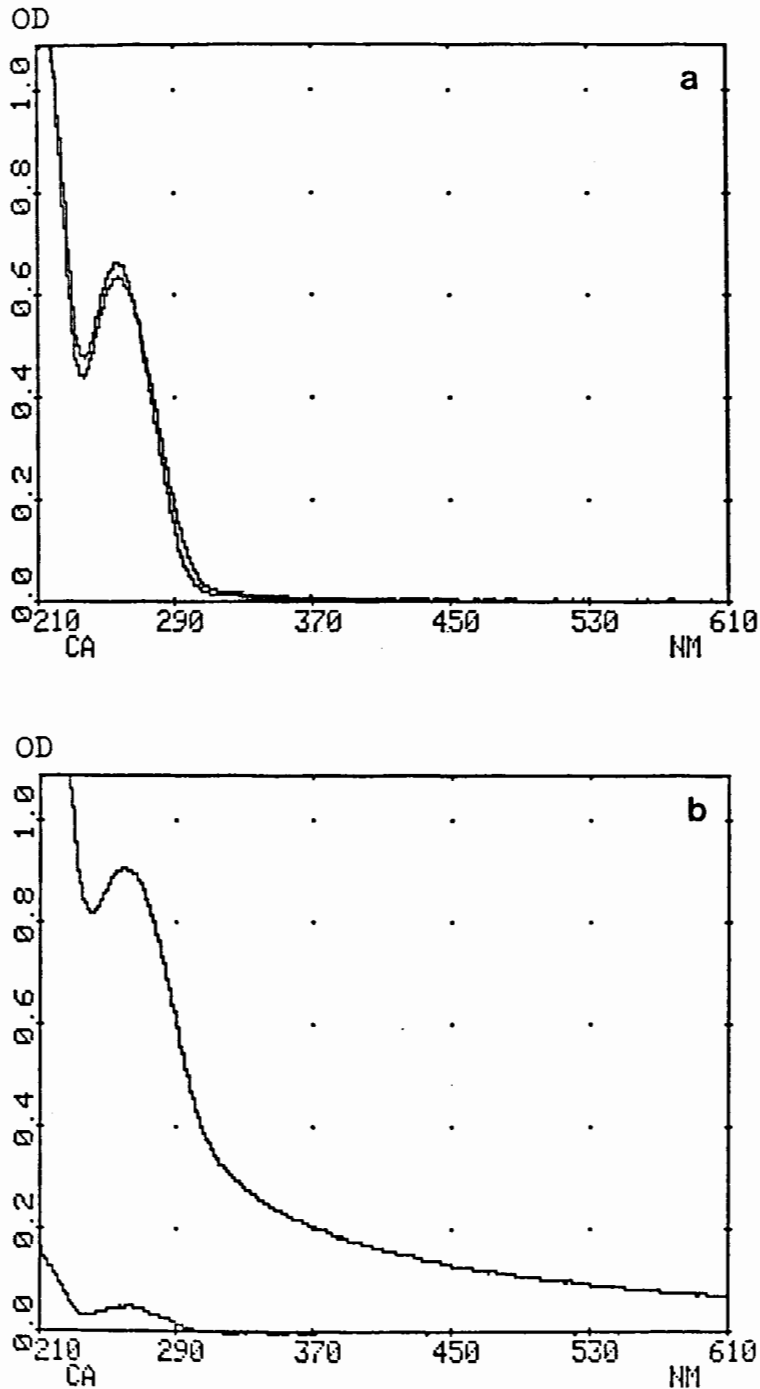


Abb.4.7 Verzögerung der Aggregation durch 50 mM Ca^{2+} .

a: obere Kurve: Anfangsspektrum bei pH 6,5; untere Kurve: unverändertes Spektrum bei pH 2 nach 45 min (leichte OD-Abnahme durch Verdünnung). b: obere Kurve: Anstieg der OD nach 6,5 Stunden bei pH 2; untere Kurve wie obere nach Zentrifugation.

4.1.1.5. Hemmung der pH-Aggregation durch Mg^{2+}

Die minimale Hemmkonzentration von Mg^{2+} liegt mit 0,5 M nicht mehr im isotonen Bereich, was einen Vergleich mit den Ergebnissen der Ca^{2+} -Versuche erschwert. Aber auch 0,5 M Mg^{2+} verlangsamen die Aggregation bei pH2. Nach 10 min ist noch kein Anstieg der Kurven zu erkennen. Es tritt jedoch allmählich Aggregation auf, die im Laufe von 6,5 Stunden immer stärker wird. Die optische Dichte bei 260 nm stieg zunächst an, um dann wieder leicht zu sinken (Abb.4.8).

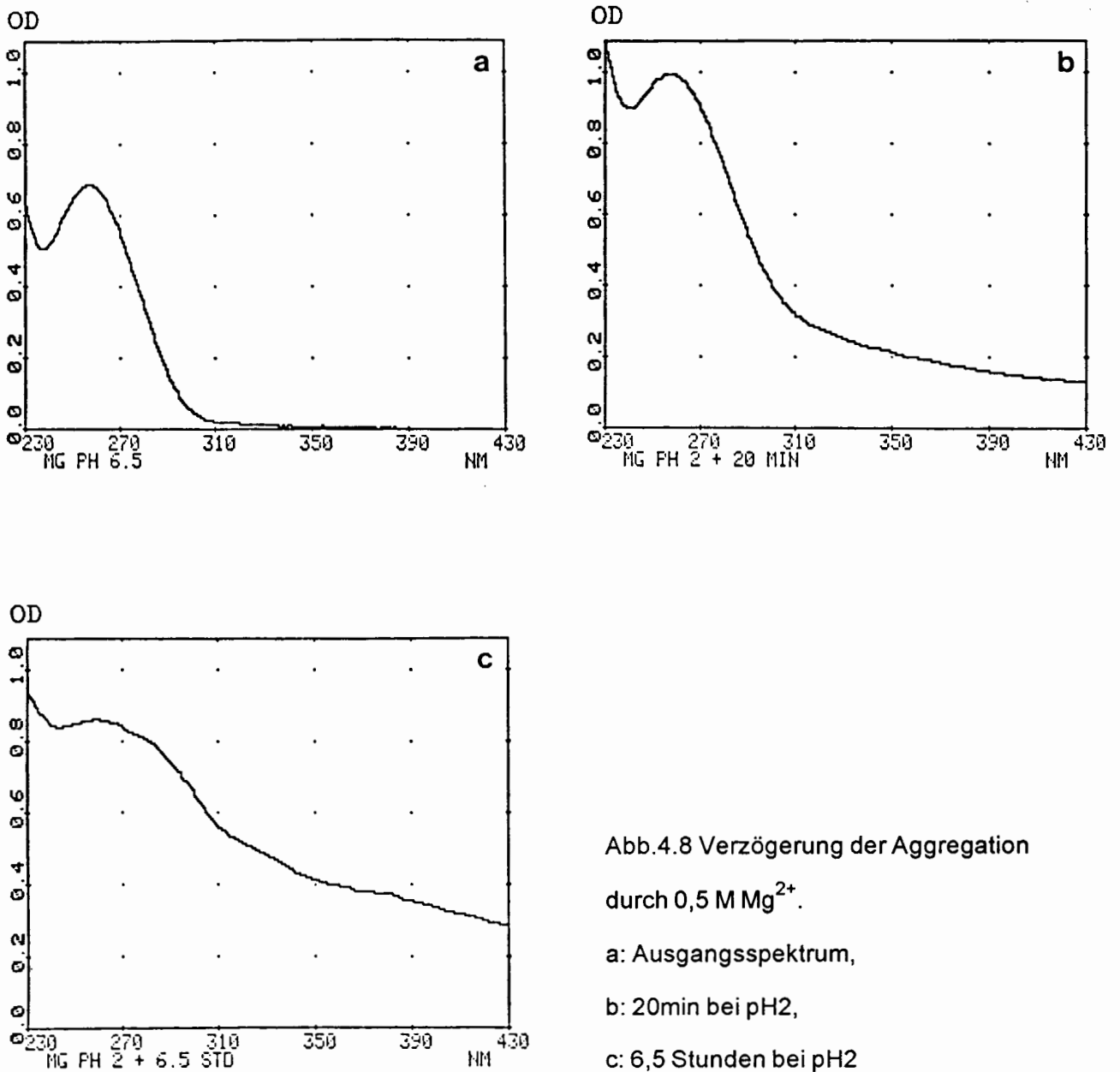


Abb.4.8 Verzögerung der Aggregation durch 0,5 M Mg^{2+} .

a: Ausgangsspektrum,

b: 20min bei pH2,

c: 6,5 Stunden bei pH2

4.1.1.6. Die Wirkung von SDS, Saccharose und EDTA auf die pH-Aggregation

Wurde dem Puffer 1% SDS vor der Säuretitation zugesetzt, so ergab sich ein kleiner Anstieg der OD bei pH 4,5, der aber unter pH 4 wieder verschwand. Die Aggregation wurde verhindert.

30 % Saccharose, in PBS gelöst, führte zu einem schwächeren Anstieg der OD₂₆₀ bei Säurezugabe. Auch die Basislinie bleibt stabiler. Der Aggregationseffekt blieb jedoch deutlich sichtbar, und im sauren pH-Bereich konnten alle Viren abzentrifugiert werden. Wegen der veränderten Pufferkapazität durch die Saccharose lassen sich die Ergebnisse nicht genau mit denen ohne Saccharose vergleichen, es sieht aber so aus, als habe Saccharose keinen Einfluß auf die Aggregation (Abb.4.9).

10 mM EDTA in PBS führen zu leichtem Absinken der OD₂₆₀ bei pH 7, verhindern die Aggregation durch saure pH-Werte jedoch nicht.

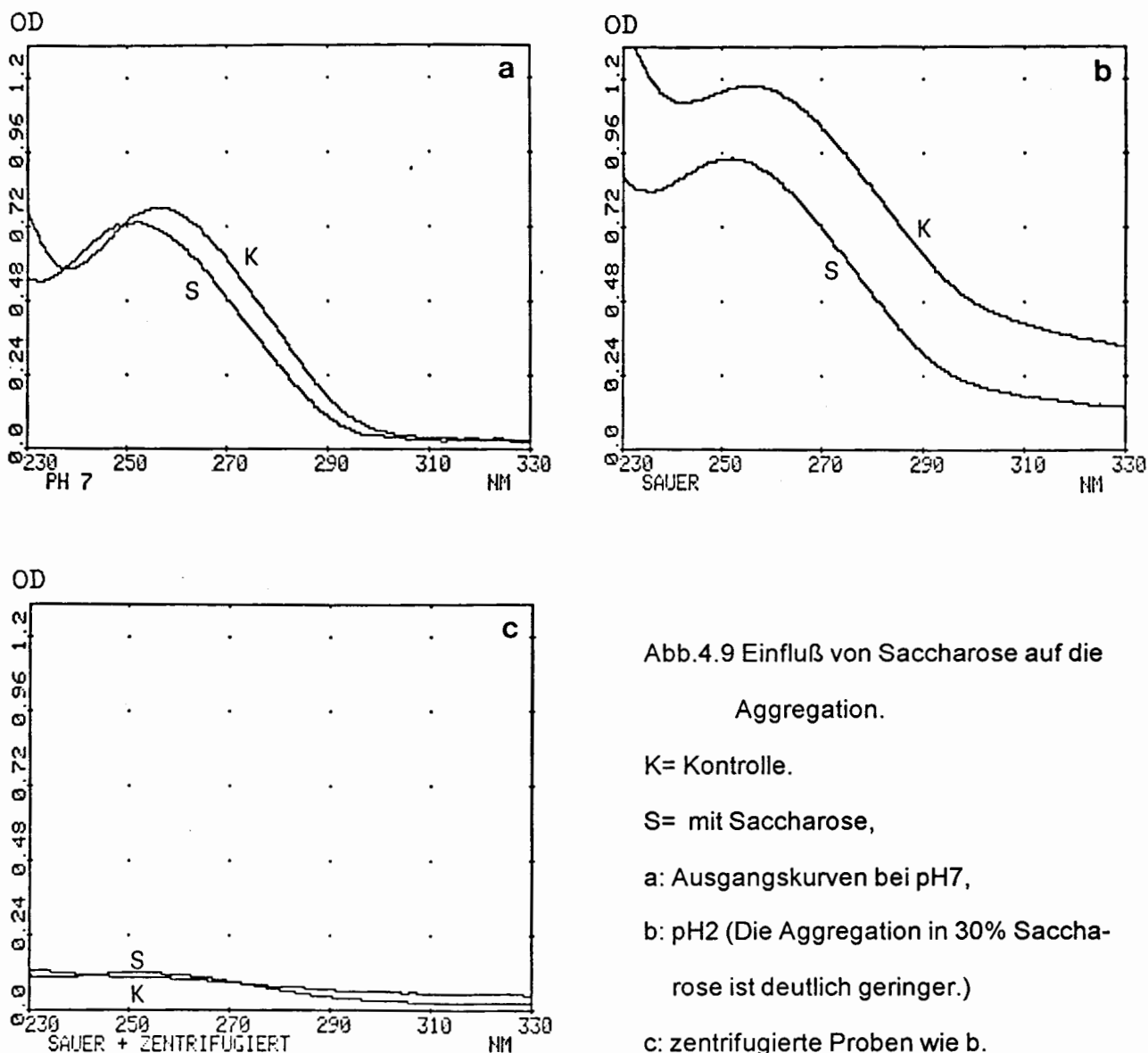


Abb.4.9 Einfluß von Saccharose auf die Aggregation.

K= Kontrolle.

S= mit Saccharose,

a: Ausgangskurven bei pH7,

b: pH2 (Die Aggregation in 30% Saccharose ist deutlich geringer.)

c: zentrifugierte Proben wie b.

4.1.2. Direkte Auswertung der Spektren von Virussuspensionen nach Serumzugabe

Die bekannteste Art der Virusaggregation ist die durch Antiseren. Bei Zugabe von Antikörperlösungen wird die optische Dichte auch durch die zugegebene Menge der Proteine dieser Lösungen erhöht. Deshalb wurde zu jeder Versuchsreihe mit Antikörperzugabe eine parallele Kontrolle ohne Viren untersucht; die Werte der Spektren dieser Kontrollen wurden von den Werten der Spektren der Virus-Antikörpermischungen abgezogen.

Kontrollversuche mit nicht neutralisierenden Seren:

Als Kontrolle wurden zunächst Poliovirus Typ 1, Mahoney, mit Seren titriert, die sehr schwach (Serum 65) oder gar nicht (Serum 63 und 64) neutralisierten. Wie erwartet, trat auch bei hohen Konzentrationen keine Aggregation auf. (z.B. Serum 1:10 verdünnt, davon 200 μ l in 1 ml Virussuspension mit $OD_{260}=0,7$).

Versuche mit neutralisierenden Seren:

Bei niedrigen Serumkonzentrationen konnte durch die optische Dichte keine Aggregation nachgewiesen werden, auch nicht, wenn die Proben über Nacht inkubiert wurden. Bei Zugabe von höheren Konzentrationen stieg die optische Dichte sofort sowohl im Maximum der Virusabsorption bei 260 nm als auch im sichtbaren Bereich an. Abb.4.10 zeigt den Anstieg der Spektren einer Mahoneyvirusprobe (Pool 47) in 50 mM Ca^{2+} -MES-Puffer nach Zugabe von Serum 155 (Kaninchenserum gegen ganze Mahoneyviren, Nt-Titer lg 50% = 4,5, 1:20 verdünnt). Im Gegensatz zur Aggregation durch einen sauren pH-Wert wird die Aggregation der Viren durch Antikörper nicht durch Ca-Ionen verzögert.

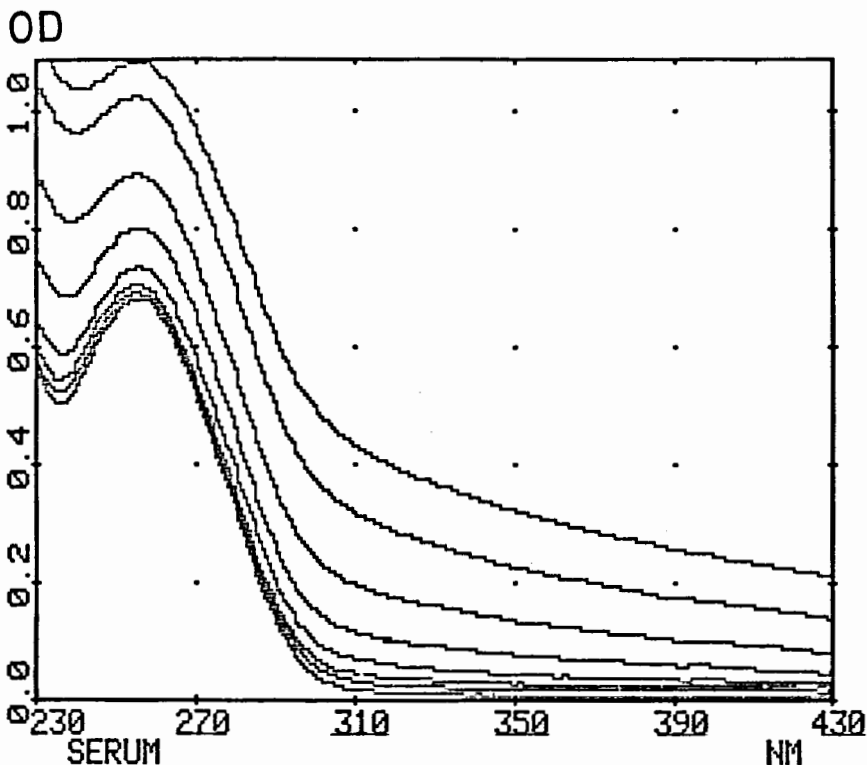


Abb.4.10 Anstieg von Mahoneyvirusspektren durch Serumzugabe.

Zugabe an Serum in μ l von der untersten zur obersten Kurve: 7, 17, 27, 50, 75, 100, 125,

150.

Die optische Messung der Aggregation ist ein schneller Weg, um festzustellen, ob große Mengen aggregierender Antikörper in einem Serum vorhanden sind. Andere gängige Tests benötigen wesentlich mehr Zeit und Aufwand.

Auch die Virus-Antikörper-Aggregate lassen sich abzentrifugieren. Hieraus ließe sich ein weiterer Schnelltest entwickeln, zu dem man radioaktives Standardvirus benötigt. Gleichgroße Proben von Mahoneyvirus (Pool 47) wurden mit verschiedenen Serummengen 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei 8250g zentrifugiert. Die Radioaktivität im Überstand wurde bestimmt. Ihr Absinken ist ein Maß für die Konzentration an vorhandenen Antikörpern. (Abb.4.11)

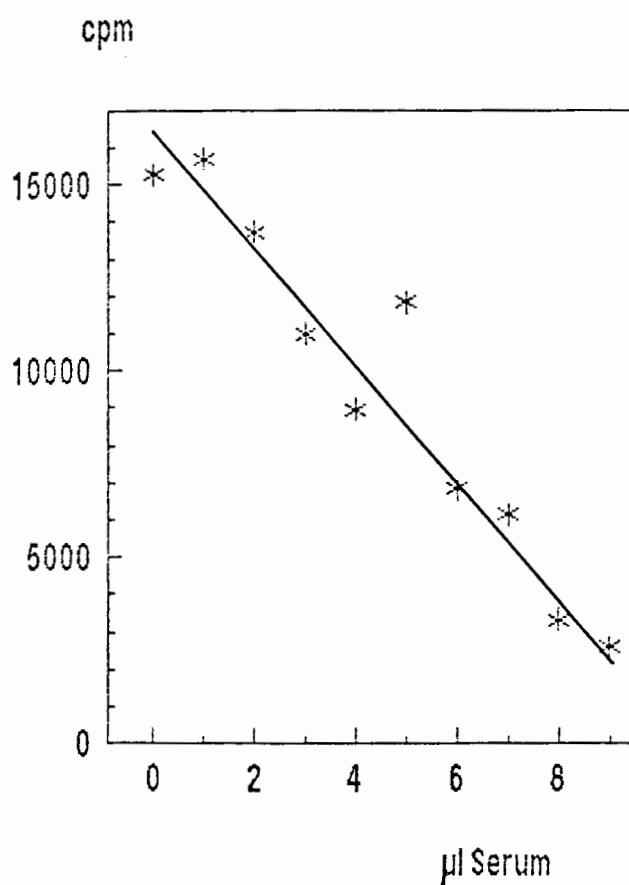


Abb.4.11 Absinken der Radioaktivität im Überstand (^{35}S Methionin-markierter Viren) nach Zugabe steigender Serummengen (155, 1:20 verd.) und anschließender Zentrifugation.

4.1.3. Trennung von Streuung und Absorption in Spektren aus pH-Titrationsen

Die optische Dichte einer Probe setzt sich aus der Absorption der in ihr vorhandenen Partikel und deren Streueffekt auf das Licht zusammen. Streulichtkurven von Partikeln sind hyperbelförmig, wenn man die optische Dichte einer Probe gegen die Wellenlänge aufträgt. Die Lage der Hyperbel ist von der Größe der Partikel abhängig. Mathematisch läßt sich eine Hyperbel durch logarithmieren beider Achsen (doppeltes Logarithmieren) in eine Gerade überführen. Wurde nun ein Spektrum mit Aggregation (bei niedrigem pH-Wert oder mit neutralisierenden Antikörpern) aufgenommen, so zeigt es sowohl die momentane Absorption der Viren, als auch die durch die Aggregation verursachte Streuung. Weil die Absorption der Viren bei Wellenlängen >350 nm null ist und nur Streuung im sichtbaren Bereich gemessen wird, läßt sich die aus der doppelt logarithmierten Hyperbel resultierende Gerade im sichtbaren Bereich berechnen. Durch Verlängerung dieser Gerade läßt sich dann der Anteil der Aggregation an der OD bei 260 nm bestimmen. Zieht man den logarithmierten Aggregationsanteil von der logarithmierten Gesamt-OD ab, so kann man den Wert für den Absorptionsanteil bestimmen. Abb.3.2 (Material und Methoden) zeigt den Verlauf von drei durch ein Computerprogramm errechneten Kurven und Geraden.

Optische Dichte = Virusabsorption + Streuung (durch Aggregation)

$$OD = A + S$$

Angabe der Zunahme der Aggregation bzw. Abnahme der Absorption in %: Die optische Dichte der unbehandelten Anfangsproben wurde auf 100% normiert. Eine Zunahme an Aggregation meint zusätzlich zu 100% in Ausgangslösung vorhandene optische Dichte. Eine Abnahme an Absorption bedeutet, daß die Absorption gegenüber der Anfangsabsorption um die entsprechenden Prozente gesunken ist.

4.1.3.1. Streuung und Absorption bei Säuretitration

Wie die Rechnungen ergaben, steigt die OD durch Lichtstreuung der Aggregate bei allen verwendeten Virusstämmen mit der Abnahme des pH-Wertes (Abb.4.12). Die OD erreicht durch die Aggregationsstreuung bei Mahoneyviren (Typ1) einen Wert auf dem Plateau im Sauren. Der Wert der OD, den die Streuung der Aggregate bewirkt, ist mit 100 % so hoch wie die Ausgangs-OD einer Mahoneysuspension bei pH 7 ohne Aggregation. Die Streuung bewirkt bei MEF₁-Viren (Typ2) 40 % Zunahme der Ausgangs-OD, bei 1658 (Typ3) 20 %.

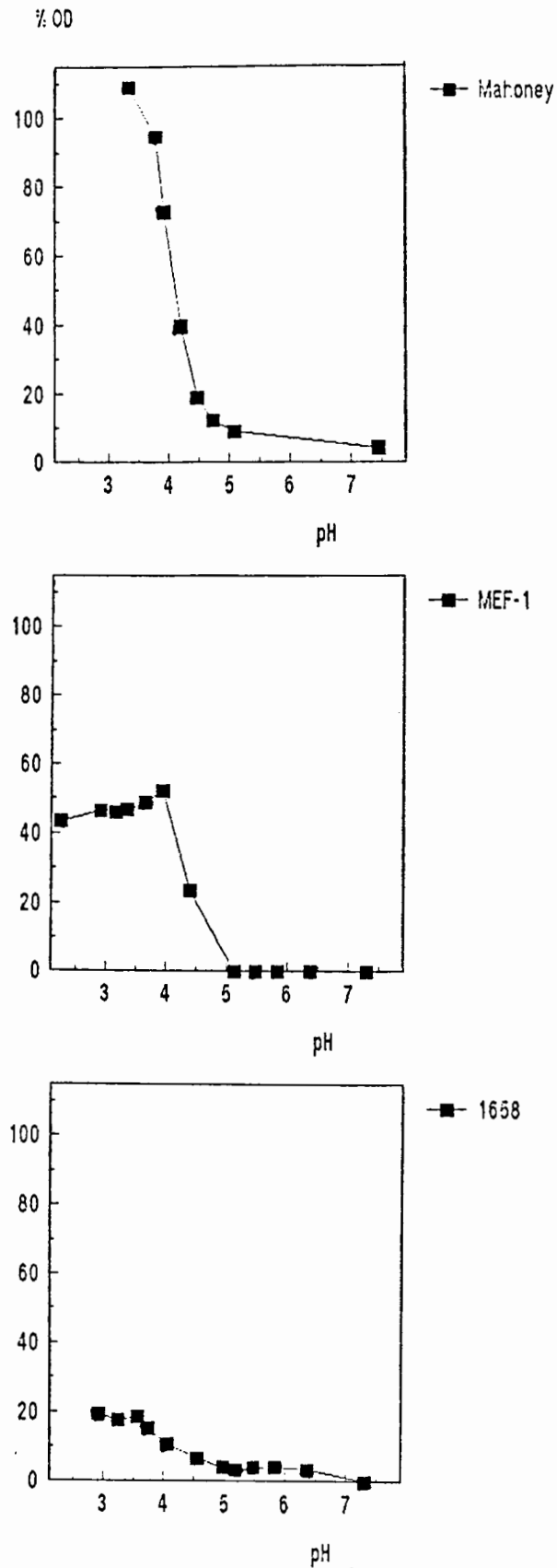


Abb.4.12 Anteil der Streuung durch Aggregation an der OD bei 260 nm.

Die OD_{260} bei pH 7 (also ohne Aggregation) wurde auf 100 % (=Ausgangs-OD) normiert. % OD: Durch die Aggregation steigt die OD im Säuren um die angegebenen Werte zusätzlich zu 100% an.

Bei MEF₁ und Mahoney sind nach Abzug des Aggregationsanteils von den gemessenen Werten deutlich Veränderungen der Absorption zu erkennen, bei 1658 Freiburg sind sie minimal. (Abb.4.13)

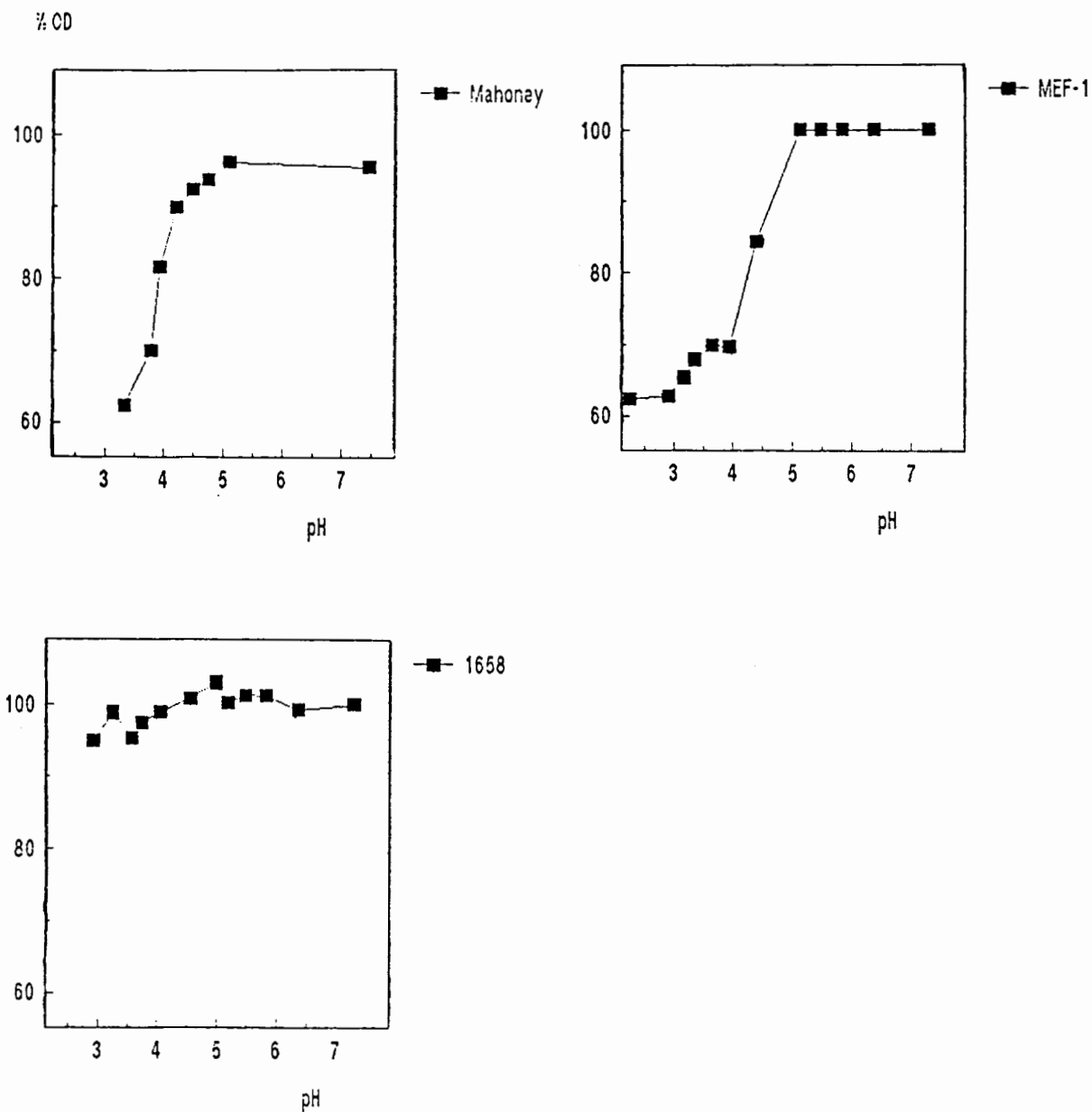


Abb.4.13 Abnahme der Virusabsorption bei 260 nm (nach Abzug des Streulichtanteils durch Aggregation von der Gesamt-OD) durch Zugabe von Säure.

% OD: Verminderung der OD in % vom Wert bei pH 7.

Proben von Mahoneyvirus reagieren auf einen sauren pH-Wert nicht nur mit Verklumpen, sondern die Absorption der viralen RNS wird auch verändert. Sie sinkt um etwa 38% bei pH 3,33. Die Absorption in Proben mit MEF₁-Viren ist um etwa 36% bei pH 3 vermindert, die in Proben mit 1658 um etwa 4% bei pH 3. Dies bedeutet, daß eine Zunahme des "basestackings" der RNS stattfindet. Die virale RNS bekommt einen größeren Anteil an Sekundärstruktur und durch Basenpaarung mehr Tertiärstruktur. Eventuell könnte hierdurch eine stabilere Form entstehen.

Das Absinken der Gesamt-OD in Proben von MEF₁-Viren im Säuren deutet entweder auf eine höhere Säurelabilität dieser Viren oder ihre leichtere Aggregierbarkeit zu großen Aggregaten hin. Durch das Absinken der Gesamt-OD unter pH 4 bei MEF₁-Viren wird eine größere Strukturänderung vorgetäuscht, als in Wirklichkeit vorhanden. Viren vom Stamm 1658 (Typ 3) scheinen keine Strukturänderung durch Säure zu bekommen. Bei Typ3 ist auch die Aggregation am schwächsten, beginnt jedoch früher.

4.1.3.2. Hemmung der Aggregation und Absorptionsänderung durch Ca²⁺

Die mathematische Auswertung zeigte, daß nach 6,5 Stunden in 50 mM Ca²⁺-MES-Puffer bei pH 2,23 neben der Aggregation eine Verminderung der Absorption um 32% auftrat. Kalzium kann Polioviren also nicht dauerhaft vor niedrigen pH-Werten schützen. Die gemessene Änderung war durch den sauren pH-Wert und nicht durch das Ionenmilieu hervorgerufen, denn sowohl 25 mM als auch 72 mM Ca²⁺ in isotonischer Kochsalzlösung hatten keinen Einfluß auf die Virusabsorption bei pH7. Solche Spektren waren nach 6 Stunden noch den Anfangsspektren gleich.

4.1.3.3. Hemmung der Aggregation und Absorptionsänderung durch Mg²⁺

Durch die Auswertung nach Englander und Epstein zeigte sich, daß 2-3 Stunden nach Säurezugabe, bei pH2,76, in MES-Puffer mit Mg-Ionen nicht nur die Hemmung der Aggregation aufgehoben ist, sondern die Absorption der Viren auch wie in Proben ohne Mg²⁺ gesunken ist (26%). Die von Floyd & Sharp gefundene Hemmung ist also nur ein vorübergehende Eigenschaft. Ähnliche zeitliche Verzögerungen sind z.B. auch durch die Dissoziation von Polioviren bekannt.

4.1.3.4. Saccharose hemmt die Änderung der Absorption

In PBS mit 30% Saccharose trat bei pH 3,25 weniger Aggregation auf (s.o.). Wie die mathematische Auswertung zeigte, war nur eine vernachlässigbare Änderung der Virusabsorption zu erkennen (6%). Saccharose schützt Polioviren somit vor sauren pH-Werten zwischen 3 und 4.

4.1.4. Trennung von Streuung und Absorption in Spektren nach Antikörperzugabe

4.1.4.1. Streuung und Absorption nach Serumzugabe

Die mathematische Auswertung der Ergebnisse nach Serumzugabe zu verschiedenen Viruspensionen ergab, daß der Anstieg der Gesamt-OD bei Zugaben kleiner Serummengen allein auf die Zunahme der Aggregation zurückzuführen ist. Eine Strukturänderung der RNS ist hier nicht nachweisbar. Wenn Neutralisation durch Strukturänderung hervorgerufen werden sollte, so ist diese Änderung nicht so groß, daß die RNS mit davon betroffen ist. Bei Serumkonzentrationen im Sättigungsbereich und darüber konnte eine geringe Strukturänderung nicht ganz ausgeschlossen werden, weil die Werte durch die hohe Eigen-OD der Seren dort ungenauer werden. Abb.4.14 zeigt die Anstiege der Gesamt-OD und der Aggregation, sowie das Gleichbleiben der Struktur für Polioviren drei verschiedener Stämme (Typen). Die Werte für die Aggregation wurden um 100% nach oben geschoben, um die Korrelation zwischen Gesamt-OD und Aggregation besser zu zeigen.

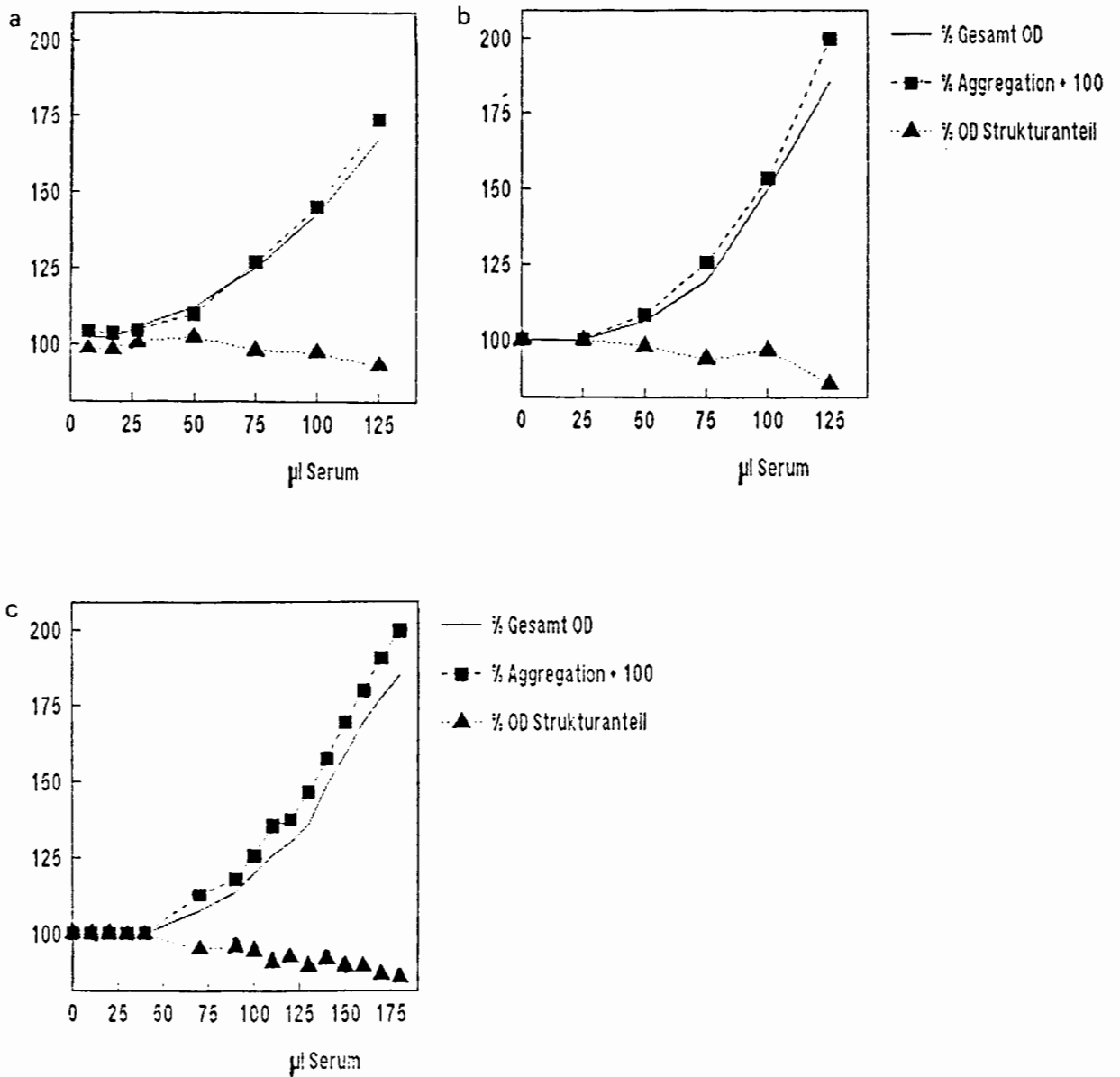


Abb.4.14 Änderung der OD₂₆₀ bei Zugabe von Seren.

Die OD wird allein durch die Aggregation erhöht. Eine Änderung der Absorption ist nicht deutlich.

a: Mahoneyviren mit Zugabe von Kaninchen serum 155 gegen Typ 1 (1:20 verdünnt), b: MEF₁-Viren mit Kaninchen serum 54 gegen Typ 2 (1:200 verd.), c: 1658-Viren mit Maus serum 107 gegen Typ 3 (3:50 verd.)

4.1.4.2. Streuung und Absorption nach Zugabe monoklonaler Antikörper

Die Frage, ob monoklonale Antikörper Viren ähnlich wie ganze Seren aggregieren, wurde zunächst mit IgM aus Hybridoma-Überstand für MEF₁ (Abb.4.15a) und mit IgM Ascites für Mahoney untersucht. Beide IgM-haltigen Flüssigkeiten scheinen Viren homolog wie ganze Seren zu aggregieren. (Abb.4.15b).

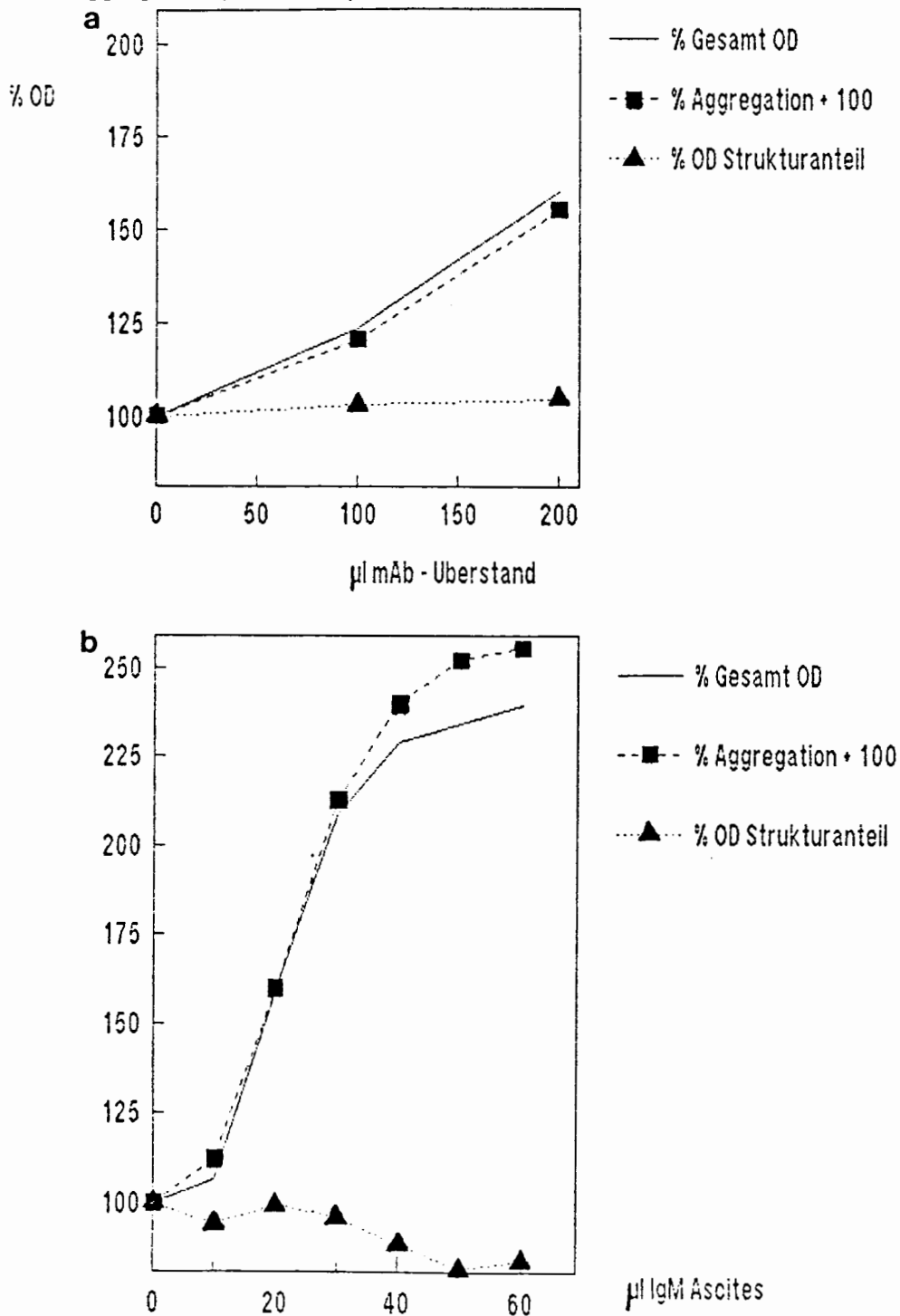


Abb.4.15 Änderung der OD₂₆₀ bei Zugabe von IgM.

a: MEF₁-Viren mit Zugabe von 7J3 mAb Überstand gegen Typ 2, b: Mahoneyviren mit 19.9 mAb Ascites gegen Typ 1 (1:10 verd.)

Homologes IgG in Ascites aggregiert Mahoney ebenfalls wie Serum. Eine deutliche Änderung der Struktur ist nicht zu erkennen. (Abb.4.16)

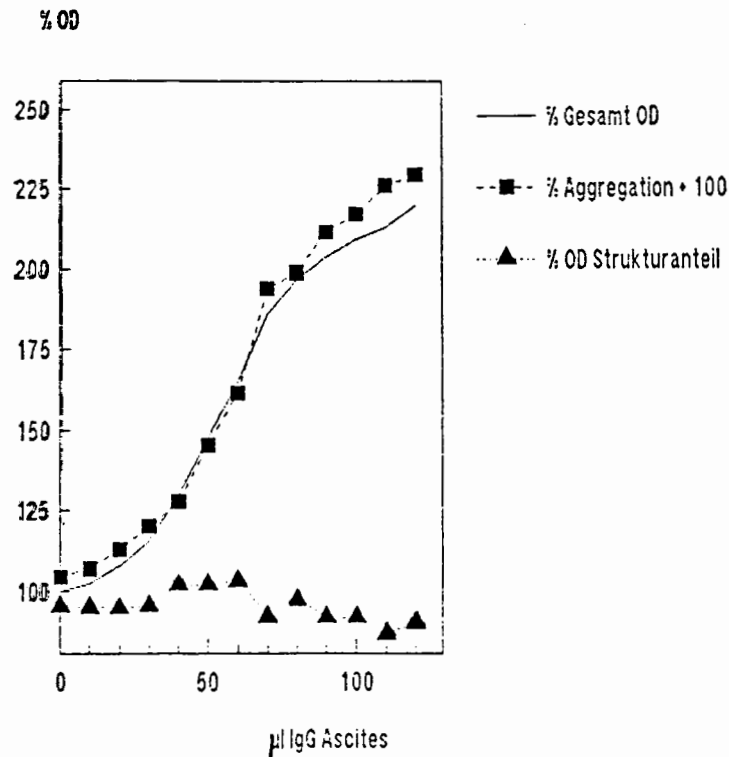


Abb.4.16 Änderung der OD_{260} nach Zugabe von homologem IgG.

Mahoneyviren mit 19.2 mAb Ascites gegen Typ 1 (1:10 verd.)

4.1.4.3. Der Antikörper 7J6

Als weitere IgG-Quelle wurde ein IgG-Hybridomaüberstand verwendet. Die Mausantikörper dieses Überstandes wurden gegen Typ 2-, MEF_1 Viren gebildet. Sie sind insofern eine Ausnahme, daß sie auch heterolog Typ 1-, Mahoneyviren neutralisieren. Die Reaktion dieser kreuzreagierenden Antikörper mit Mahoneyviren, also heterolog, entspricht der Reaktion, die sonst mit homologen Seren und Viren gefunden wurde. Mit homologen MEF_1 -Viren tritt ein neuer Typ von Reaktion auf. Die Reaktion ist so heftig, daß die gesamte OD absinkt. Ein Niederschlag fällt auf dem Küvettenboden aus. Der Beginn der Aggregation in der homologen Reaktion erfolgt früher als in der heterologen. (Abb.4.17)

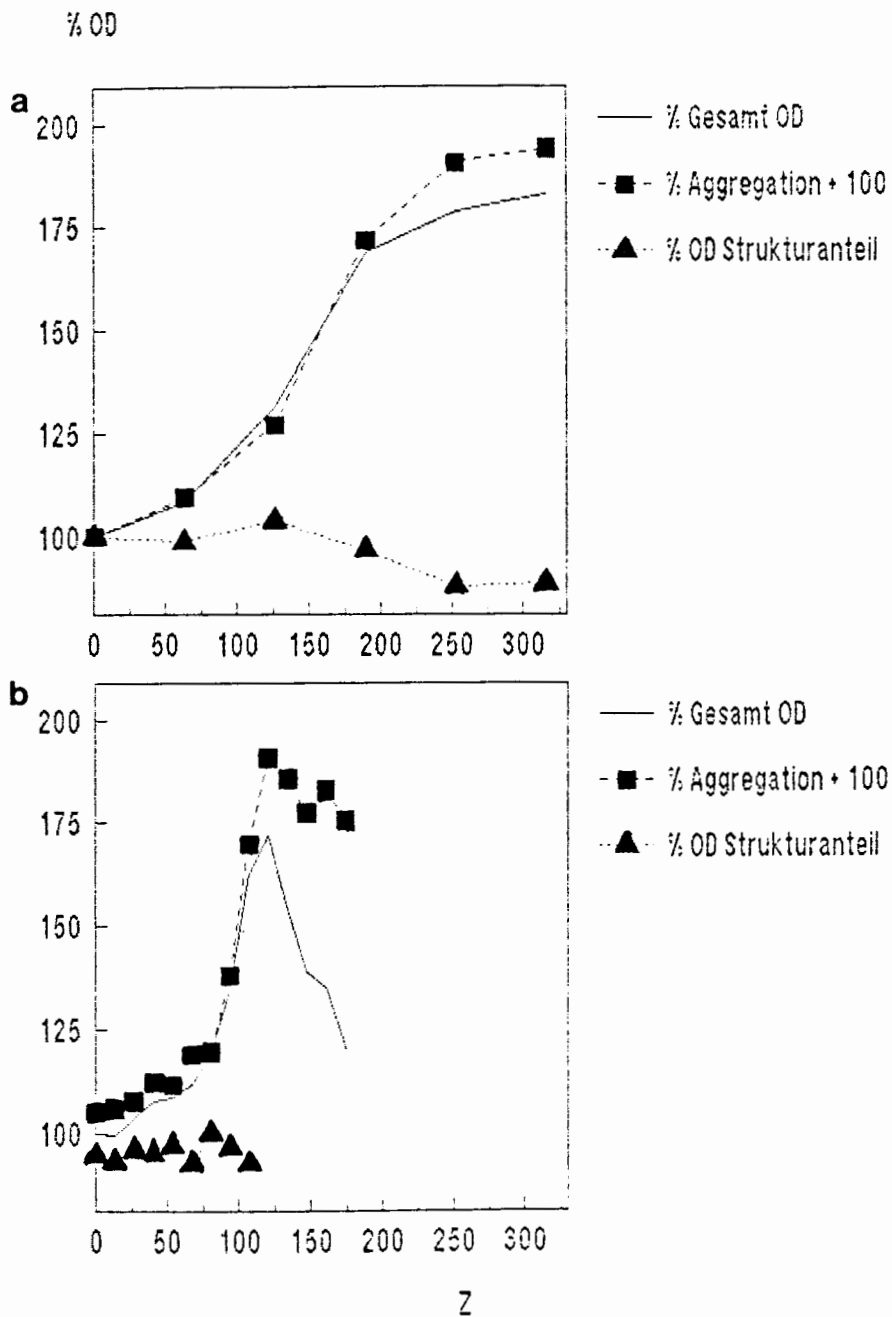


Abb.4.17 Vergleich einer heterologen und einer homologen Reaktion des IgG mAb 7J6 (gegen Typ 2) aus Maushybridomaüberstand.

a: heterolog, Zugabe zu Mahoneyviren, b: homolog, zu MEF₁Viren. Z = Zugabe an Antikörpern; die Volumenzugabe wurde auf die eingesetzte Virusmenge normiert, so daß die beiden Kurven verglichen werden können.

4.1.5. Versuch einer Gegenüberstellung der aggregationsbedingten Anstiege der optischen Dichte mit den von anderen bestimmten Neutralisationstitem

Wenn der Mechanismus der Neutralisation, wie die optischen Versuche vermuten lassen, hauptsächlich die Aggregation von Viren ist (also "Pseudoneutralisation"), so sollten die Werte der Neutralisation grob den Neutralisationstitem entsprechen. (Tab. 4.1)

Tab. 4.1: Vergleich von Nt-Titem mit den 50% OD-Anstiegswerten aus Aggregationskurven.

Serum oder Ak gegen Virustyp	getestetes Virus	Ak-Nr.	Art der Ak*	Nt-Titer lg50%	X=Aggregations-äquivalent**
1	1	155	KS	4,5	15
1	1	63	KS	0	n.d.
1	1	64	KS	0	n.d.
1	1	65	KS	1	n.d.
1	1	19.9	MAIgM	?	16
1	1	19.2	MAIgG	?	21,5
2	2	54	KS	5	2
2	2	7J3	MHIgM	>4 MNt	463
2	2	7J6	MHIgG	3 MNt	206
2	1	7J6	MHIgG	n.d.	290
3	3	107	MS	3	29,5

* K=Kaninchen
M=Maus

S=Serum
H=Hybridomaüberstand
A=Ascites

** X = theoretische Zugabe an unverdünntem Serum (oder Ak-Suspension) in μl , die zu 50% OD-Erhöpfung führen würde, wenn 1 ODE Virus in einem ml wäre.

n.d. = nicht bestimmt, weil zu hoch (bzw. unendlich)

Die Werte entsprechen einander; d.h. je höher die Verdüpfung der Seren zur Neutralisation sind, desto weniger Äquivalente an Serum sind auch für die Aggregation notwendig.

4.2. Einordnung der bekannten Epitope in die durch Computerdaten und Programme zu erhaltenden Daten (auch zur Suche neuer Epitope)

Nach der relativ groben Reaktion ganzer PV-Partikel mit Seren und Antikörpern soll nun auf die Lage und Struktur von Epitopen eingegangen werden. Zu diesem Zweck wurden die bekannten epitopbildenden AS aus der Literatur gesucht. Sie werden sowohl der Sequenz mit errechenbaren Vorhersagen von Eigenschaften als auch der Röntgenstruktur gegenübergestellt.

4.2.1. Epitope und Sequenzanalysen von Poliovirusproteinen

Da mir eine große Menge von Programmen zur Sequenzanalyse zur Verfügung stand, konnten oder mußten die Ergebnisse ausgewählt werden. In Darstellung 4.19 treten deshalb nur solche Ergebnisse auf, die besonders klar erschienen. Um einen Überblick zu ermöglichen, wurden diese ausgewählten Daten an der Sequenz dargestellt.

Je eine Sequenz pro Virus-wt und die Sequenz von Sabin1 wurden der Swiss Protein Bank entnommen und grob ausgerichtet (aligned). Wegen der großen Ähnlichkeit der PV-Stämme ergibt sich dabei schon eine gute Darstellung der Homologien. An wenigen Stellen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit Lücken eingeführt. Dadurch wurden bei VP1 und VP2 zwei Nummerierungsleisten notwendig. Ein durchgehender waagerechter Strich ordnet die Sequenzen der richtigen Numerierung zu. Die angegebenen Zahlen gelten immer für die AS, die unter bzw. über der letzten Ziffer der Zahl steht.

"1M" bedeutet Typ 1 Mahoney (Baltimoresequenz), "1S" = Sabin 1, "2L" = Typ 2 Lansing, "3L" = Typ3 Leon.

Hinter diesen Kurzbezeichnungen für die Stämme ist das Virusprotein (VP) angegeben. Während bei VP1, VP3 und VP4 je hundert AS in eine Reihe aufgenommen wurden, sind es bei VP2 wegen der größeren Datenfülle nur 80 AS. Im Vorgriff auf die Peptidversuche im dritten Teil der Ergebnisse wurden auch Peptiddaten in die Darstellung von VP2 aufgenommen.

4.2.1.1. Strukturdaten

Die ersten Zeilen geben Strukturdaten aus der Röntgenstruktur an. Mit "A" sind alle AS bezeichnet, die im Kristall auf der äußeren Oberfläche liegen, mit "I" die auf der inneren Oberfläche. Abweichungen von der Struktur in Lösung sind nicht auszuschließen. Die Oberflächendaten wurden nach Korrektur aus Zeichnungen von Sgro (persönliche Mitteilung) übernommen. Sie lagen uns nur von PV1 Mahoney vor. Diese Daten sind wichtig für die Entscheidung, ob eine AS in direkten Kontakt zu einem Ak treten kann, oder ob die Mutation der AS von innen die Struktur verändert. - Eine weitere Zeile gibt Auskunft über die Struktur der Virusproteine. Die Daten sind direkt aus der Brookhaven Datenbank abgelesen. "H" bedeutet, daß die AS wahrscheinlich in einem helikalen Abschnitt des Proteins liegt, "S", sie liegt in einem β -Strang, "T", in einem Turn. Der Rest kann keiner bekannten Struktur zugeordnet werden. Wurden von den Röntgenstrukturforschern einer AS mehrere verschiedene Strukturmerkmale zugeordnet, so habe ich dies durch einen **Punkt** gekennzeichnet. Eine Sequenz von mehr als

vier T bedeutet ineinander übergehende Turns. Bei allen Strukturangaben wurde die Angabe von T bei gleichzeitiger Angabe von S bevorzugt, da die Struktur dann besser mit Abbildungen des Rückgrates der AS-Kette übereinstimmte. Fiel dadurch jedoch ein Stück als Strang aus, so wurde in dieser Situation doch der "Turn" nur mit drei AS angegeben. Die hier ausgedruckten Daten weichen von den veröffentlichten Banddiagrammen ab, weil ich mich strikt an die Daten gehalten habe, um idealisierende Angleichungen an das Strukturgrundmodell zu vermeiden (siehe Hogle et al. 1985). Die Zeichnungen von Hogle et al. weichen stark von den Daten ab.

Die Strukturdaten für Poliovirus Typ 1 wurden der Datei "2PLV" in der Version vom Oktober 1981, revidiert im Juli 1990, entnommen (Filman et al. 1989, Hogle et al. 1989, Page et al. 1988, Hogle et al. 1988, Ypma-Wong et al. 1988, Martin et al. 1988, Hogle et al. 1987, Chow et al. 1987, Hogle et al. 1986, Hogle et al. 1985). Die Datei ist Teil der Protein Data Bank (Bernstein et al. 1977, Abola et al. 1987) am Brookhaven National Laboratory.

4.2.1.2. Antigenitätsdaten aus Antikörperbindungstests

Bei der Suche nach antigenen AS wurde eine große Menge Literatur durchforstet. Leider geben die meisten nur ungefähre Lagen von "immunogenen Schlaufen" an. Um kein falsches Bild von der Antigenität der AS entstehen zu lassen, wurden nur eindeutig bestimmte AS in die Abbildung 4.19 aufgenommen. Um keine Verwirrung entstehen zu lassen, wurde auf die Zuordnung der AS zu bestimmten antigenen Regionen verzichtet. "E" gibt eine AS an, die im Epitop eines Antikörpers gefunden wurde. Die entsprechende Literatur ist im Überblick aufgeführt (Minor 1990 u.a.). "W" bezeichnet eine AS, die in unserer Abteilung oder auch in unserer Abteilung als auf die Antikörperbindung wirkend erkannt wurde.

4.2.1.3. Peptide und ihre Immunreaktion

Vom VP2 des PV1, Mahoney, wurden tryptische Peptide für diese Arbeit hergestellt (Sequenzen siehe Methoden 3.4.8.). Sie sind durchgehend der Sequenz nach numeriert. Die erste Ziffer der Numerierung wurden unter der ersten AS des betreffenden Peptides eingetragen. Hinter der Peptidnummer ist durch "+"- oder "-"-Zeichen die Immunreaktion mit Seren angegeben. Bei Typ 1 wurde dabei das homologe Serum 45 verwendet. Da nur Typ-1-Peptide verwendet wurden, sind die Typ-2-Seren 54 und Typ-3-Seren 55 zu den verwendeten Peptiden heterolog. Sie sind nur für die Untersuchung von Kreuzreaktionen gedacht.

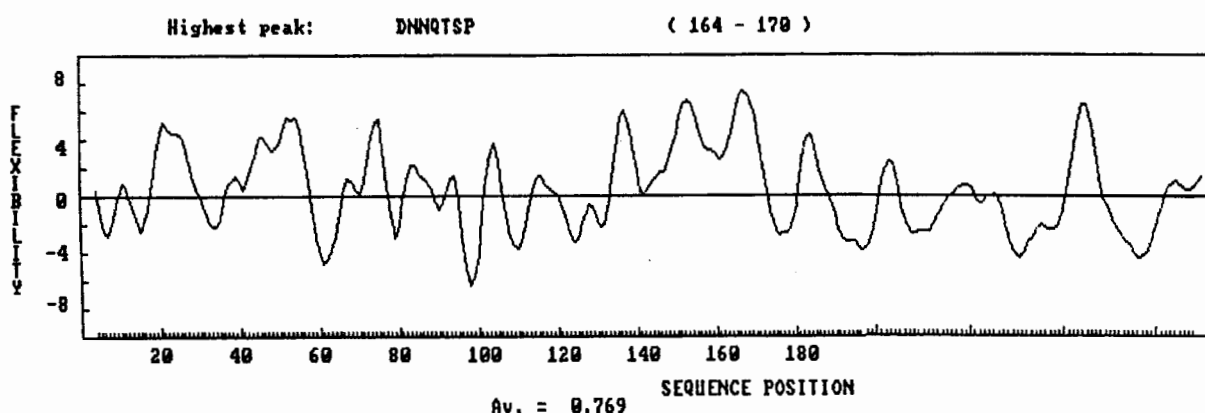
4.2.1.4. Sequenzanalysen durch Computerprogramme

Die Untersuchung der PV-Strukturproteinsequenzen erfolgte aus zwei Gründen. Einmal um zu zeigen, ob die ausgewählten Eigenschaften wirklich auch Voraussetzung für die Antigenität der bestimmten AS bei PV haben, zum anderen, um mit Hilfe der Programme Stellen zu finden, an denen weitere antigene AS mit großer Wahrscheinlichkeit gefunden werden können. Ersteres ermöglicht eine Abschätzung der Gewichtung der verwendeten Programme; das zweite kann die Suche nach neuen antigenen AS erleichtern. (Diese Aufgabe muß Grundlage anderer Arbeiten sein.) Aus der Gegenüberstellung wird die Antigenität der gefundenen antigenen AS

erklärbarer. Die hier verwendeten Programme stammen aus der Sammlung EPIPLOT (Menéndez-Arias & Rodríguez 1990).

4.2.1.5. Programme zur Erkennung von B-Zell-Epitopen

In allen Fällen wurden entlang der AS-Sequenz Profile hergestellt. Da nie die ganze Sequenz analysiert werden konnte, wurde sie in Teilsequenzen zerlegt. Abb.4.18 zeigt ein Beispiel, in dem die Sequenz fototechnisch wieder zusammengesetzt und stark verkleinert wurde. Außerdem wurden alle Daten ausgedruckt.



Durch Augenschein wurden in den Profilen Grenzen festgelegt, über denen die Eigenschaft als stark bzw sehr stark angegeben wurden. Es ist Zufall, daß bei allen hier aufgeführten Daten die Grenze für stark bei 2 und die für sehr stark bei 4 lag. Die Zahlen sind willkürlich für die Programme von den Autoren festgelegte Einheiten.

Antigenität: Von vielen Autoren wird die Hydrophilie als Voraussetzung für die Antigenität einer AS angegeben. In meinen Untersuchungen erwies sich das Programm von Parker et al. (1985) als besonders aussagekräftig. Es beruht auf der HPLC-Untersuchung synthetischer Peptide. Zusätzlich wurden Hydrophiliedaten von Hopp & Woods (1981), Zugänglichkeitsdaten von Chothia (1976) und Flexibilitätswerten von Karplus & Schulz (1985) eingearbeitet. Das Programm berücksichtigt somit die wichtigsten Eigenschaften, die z.Z. für Antigenität angenommen werden. "c" bedeutet starke Hydrophilie ($c > 2$), "C" sehr starke Hydrophilie ($C > 4$). Dabei gilt die Aussage "hydrophil" immer für ein Fenster von 6AS, d.h. die AS direkt über dem c bzw C, die zwei davor und die drei dahinter. **β-Turn:** Die β-Turn Wahrscheinlichkeit (Chou & Fasman 1978) wurde mit in diese Liste aufgenommen, weil sie nicht nur die Lage echter β-Turns angibt, sondern auch andere Abschnitte mit geknickten Strukturen. Diese Strukturen haben sich bei der Suche nach antigenen Peptiden aus Proteinsequenzen bewährt. "b" bedeutet eine starke Tendenz zur Biegung ($b > 2$), "B" eine sehr starke ($B > 4$). Die unter einer AS angegebene Wahrscheinlichkeit gilt wieder für ein Peptid aus 6AS, das auch die zwei AS davor und die drei da-

nach enthält. **Flexibilität:** Eine weitere sehr wichtige Voraussetzung für die Antigenität einer Region ist eine lokale Beweglichkeit, die geringe Angleichungen an Antikörper ermöglicht. Diese Flexibilität wurde nach Karplus & Schulz (1985) bestimmt. Das Programm arbeitet mit einem **Fenster von 7AS**, d.h. die angegebene Flexibilität gilt für ein Peptid, das zusätzlich zu der AS, die über der Angabe steht, auch die drei AS davor und dahinter enthält; dabei wurden "f" als starke Flexibilität und "F" als sehr starke Flexibilität angegeben.

4.2.1.6. Programme zur Erkennung von T-Zell-Epitopen

Da sich in den letzten Jahren immer stärker herauskristallisiert, daß für die Ausprägung eines B-Zell-Epitopes benachbarte T-Zell-Sequenzen wichtig sind, wurden vier Vorhersagen für T-Zell-Epitope mit in die Liste aufgenommen. In diesem Fall gelten alle Angaben genau nur für die über der Stelle angegebene AS. Die T-Zell-Epitope der verschiedenen Stämme sind sehr ähnlich. Während ich bei VP1, VP3 und VP4 T-Zell-Angaben nur beispielhaft für Typ 1 angebe, habe ich sie wegen der besseren Auswertbarkeit bei VP2 für alle Wildtypen eingefügt.

4AS- und 5AS-Motiv: Die ersten beiden T-Zell-Epitop-Leisten geben Motive an, die von T-Zellen häufig erkannt werden. Das erste Motiv besteht aus 4AS; die erste ist geladen oder ein G, dann folgen zwei hydrophobe AS (ob), eine polare oder ein G schließen das Motiv ab. (+/-/G, ob, ob, p/G) Das zweite Motiv besteht aus 5AS; zwischen die dritte und vierte AS des 4er-Motivs ist eine weitere hydrophobe AS oder ein P eingeschoben. (+/-/G, ob, ob, ob/P, p/G) (Rothbard & Taylor 1988) **Sette-Matrix:** Auch bei der Sette-Matrix handelt es sich um häufig in T-Zell-Epitopen vorkommende AS, jedoch steht hier die Statistik ohne Motiv im Vordergrund. Die entsprechenden Stellen sind mit "x" markiert. **Amphipatie:** T-Zell-Epitope sollen amphipatische Helices sein, die die Zellen aus denaturiertem Protein an der Zelloberfläche exprimieren. Die letzte Zeile gibt die mögliche Amphipatie der Sequenz an; die Werte stammen aus zwei Programmen. (Stille et al. 1987)

Abb.4.19 Struktur, Antigenität und Vorhersagen zu VP1

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
1MVP1	GLGQMLESMIDNTVRET	VGAATSRDALP	NTEASGPTH	SKEIPAL	TAVETGATN	NPLVPSD	VQTRHV	VQHR	SRSESSIES	FFARGAC	VTIMTVDN	PASTTN
										AA A	AAAA	
	IIIII	III III II I I	IIIII	I I I II	II I							
		SSS	SSS TT..S	TTTT	T...HH			TTT...HHHH	SSSSSSSSS	TTTT		W WW
	c cc	cCCcccccc	CCcccccc	CCCCcCCc	cccCCc	cCCc	cCCCCc	c	cccCCCC		cccCCCC	
			b bbb	bB	bb bb b		bB		bBb bb		bBb bb	
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff	
		4444444			4444	4444	4444					
		55555	55555						55555			
		xxxxxxxxx		xxxxxx					xxxxxxxxxxx			

1SVP1	GLGQMLESMIDNTVRET	VGAATSRDALP	NTEASGPAH	SKEIPAL	TAVETGATN	NPLVPSD	VQTRHV	VQHR	SRSESSIES	FFARGAC	VAIITVDN	SASTKN
	c cc	cCCcccccc	CCcccccc	CCCCcCCc	cccCCc	cCCc	cCCCCc		cCCCCCC		cCCCCCC	
			b bbb	bB	bb bb b		bB		bBb Bb		bBb Bb	
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff	
2LVP1	GLGDIEGVVGVTRN	ALPTLPANNLP	DTQSSGPAH	SKEIPAL	TAVETGATN	NPLVPSD	VQTRHV	IQKR	TRSESTVES	FFARGAC	VAIIEVDN	DAPTKE
	c c	cCc c	cc ccc	CCCCCCCC	cccCCc	cCCc	cCCCCc		cCCCCCC		cCCCCCC	
			b bB	bB	bb bb b		bB		bBb Bb		bBb Bb	
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff	
3LVP1	GIEDLISEVAQ	GAL--T	LSLPKQ	QDSL	PDTKASG	PAH	SKEIPAL	TAVETGATN	NPLAPSD	VQTRHV	VQRR	SRSESTIES
	c Cc	ccCCc	CCc	CCCCc	cccCCc	cccCCc	ccCCCCc		ccCCCCc		ccCCCCc	
			b bB	bB	bb bb b		bB		bBb Bb		bBb Bb	
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff	
	10	20	30	40	50	60	70	80	90			

1MVP1	KDKLFAVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSR	DFMELT	FVV	TANFT	TETN	NGHAL	NQVYQ	IMYV	PPGAP
	AA AA	AAA A	AA					AAAA			AA	AAAAAAA
	SSSS	HHHHH..	TTSSSS	SSSSSSSS	SSSSSS	TTTT	TTTTTT	TTTTTT	SSSSSS	SSSS		SSSS
	W				W							
	C	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC
	Ff				fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff
		4444	4444			4444				4444		
		55555		xxxxxx					55555			xxxxxxx

1SVP1	KDKLFTVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSR	DFMEFT	FVV	TANFT	TETN	NGHAL	NQVYQ	IMYV	PPGAP
	C	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC
	Ff				fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff
2LVP1	ASKLFSVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSR	DFMEFT	FVV	TANSY	NTDAN	NGHAL	NQVYQ	IMYI	PPGAP
	E E											
	c	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC
	ff				fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff
3LVP1	AQKLFAM	MRITYK	DTVQLRR	KLEFF	TYSR	DFMEFT	FVV	TANFT	NAN	NGHAL	NQVYQ	IMYI
	EE											
	c	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC
	ff				fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190		

	210	220	230	240	250	260	270
1MVP1	ISNAYSHFYDGF	SKVPLK-DQSAALG	DSLYGAASLND	FGILAVRVVND	HNP	TKVTSKIRVYL	KPKHIRVMCPRPPR
		A A A AAA A A	AAA A	AA A A A A			
	I				IIIII	I I	I I I
	SSS SSS	TT TTHHHHH	TTTT SSSSSSS		SSSSSSSSSS	SSSS	
		WEWE W		W			
	cc c cc	c cCcccc	cc cc		ccCCCccC		cc
	b b b bb	b bBb	b		BBB		BBb
		f fff			ffffffFf		ff
	4444		4444	4444	4444		5555
	xxxxxx		xxxxxx				
1SVP1	ISNAYSHFYDGF	SKVPLK-DQSAALG	DSLYGAASLND	FGILAVRVVND	HNP	TKVTSKIRVYL	KPKHIRVMCPRPPR
	cc c cc	c cCcccc	cc cc		ccCCCccC		cc
	b b b bb	b bBb	b		BBB		BBb
		f fff			ffffffFf		ff
2LVP1	IANAYSHFYDGF	AKVPLA-GQASTE	GDSLYGAASLND	FGSLAVRVVND	HNP	TKLTSKIRVYM	KPKHVRVMCPRPPR
		E E					
	c c c	cCCCCCccc	cc cc		ccCCCccC	c	cc
	b	bB bBb	bbb		BBB		BBb
		ffffffFf			ffffffFf		ff
3LVP1	LANAYSHFYDGF	AKVPLKTDANDQ	IGDSLYSAMTVDD	FGVLAVRVVND	HNP	TKVTSKIRIYM	KPKHVRVMCPRPPR
		E					
	c c c	ccCCCcCC	cc cc c		ccCCCccCcc	c	cc
	b	bb Bb B			BBB		BBb
		ffffffFf			ffffffFf		ff

	280	290	300	
1MVP1	AVAYYGPVDYK	DGTLPLSTKDL	TTY	Mahoney VP1
	A A	AAAAAAAAAAAA		äußere Oberfläche: A= außen
		I I		innere Oberfläche: I= innen
		TTTT	TTTT	H= α -Helix, S= β -Strang, T= Turn, .= Übergang
	ccccCccc	cc ccc		E= antigene AS aus Literatur, W= antigene AS HPI
	BBBBbbb	b b		Hydrophilie C>4, c>2
	ffffffFf			β -Turn-Vorhersage B>4, b>2
	4444	4444		Beweglichkeitsvorhersage F>4, f>2
				T-Zell-Motiv aus 4 AS
				T-Zell-Motiv aus 5 AS
				Sette-Matrix
				mögliche Bildung amphipatischer Helices
1SVP1	AVAYYGPVDYK	DGTLPLSTKDL	TTY	Sabin 1 VP1
	ccccCccc	cc ccc		Hydrophilie C>4, c>2
	BBBBbbb	b b		β -Turn-Vorhersage B>4, b>2
	ffffffFf			Beweglichkeitsvorhersage F>4, f>2
2LVP1	AVPYYPGVDYK	DGLAPLPGKGL	TTY	Lansing VP1
	ccccCccc	c cc		E= antigene AS aus Literatur
	bBBBBbbb	b bBb		Hydrophilie C>4, c>2
	ffffFf			β -Turn-Vorhersage B>4, b>2
				Beweglichkeitsvorhersage F>4, f>2
3LVP1	AVPYYPGVDYK	NNLDPLSEKGL	TTY	Leon VP1
	ccccCccc	cc cc		E= antigene AS aus Literatur
	bBBBBbbb	bb		Hydrophilie C>4, c>2
	ffffffFf			β -Turn-Vorhersage B>4, b>2
				Beweglichkeitsvorhersage F>4, f>2

Struktur, Antigenität und Vorhersagen zu VP2

	10	20	30	40	50	60	70	80
1MVP2	SPNIEACGYSDRVLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYLRDSEANPVDQPTPEPDVAACRFYTLDTVSWTKESRGWWW							
							AAAA	AAAAA A
	III III IIIIIIII I		I IIIIIIIIIIIII IIII I II I					
	SSSS.T..SSSS		SS.TTT TTTT		s HHHH	SSS	SSSTTTT	SSSS
							WW	
1(+)	2+		3(+)	4+++		5+		6nd7+
ccc ccCc c	c cccccCCCc		ccccCCcCcccCCCccccc			c c	ccCc	
BBb	b b		bbb bb Bb bb				b	
	FFFFFFFf		FFFFFFFfFFFFFFf				FFFFf	
4444	4444		4444			4444 4444		5555
			xxxxxx					

1SVP2	SPNIEACGYSDRVLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYLRDSEANPVDQPTPEPDVAACRFYTLDTVSWTKESRGWWW							
							c c	ccCc
	BBb		bbb		bb Bb bb			b
			FFFFFFFf		FFFFFFFfFFFFFFf		FFFFf	
2LVP2	SPNIEACGYSDRVMQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYIKDSEANPVDQPTPEPDVAACRFYTLDTVTWRKESRGWWW							
1-	2nd		3-	4++		5nd		6nd7-
ccc ccCc c	c cccccCCCc		cccCCcCcccCCCccccc			c	ccCc	
bbB	b b		bbb bb Bb bb				b	
	FFFFFFFf		FFFFFFFfFFFFFFf				fffff	
4444	4444		4444			4444 4444		5555
			xxxxxx					

3LVP2	SPNVEACGYSDRVLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEFIRDDEANPVDQPTPEPDVATCRFYTLDTVMWGKESKGWWW							
1-	2nd		3-	4-		5nd		6nd7-
ccc ccCc c	c cccccCCCc		bb	ccCCCCCcccCCCccccc			cCc	
BBb	b b			bB Bb bb			b b	
	FFFFFFFf			ffffffFFFFFFf			fffff	
4444	4444		4444			4444 4444		5555
			xxxxxx					

	10	20	30	40	50	60	70	80

```

          90      100      110      120      130      140      150      160
          -      |      -      -      -      -      -      -
1MVP2  KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFHQGALGVFAVPEMCLAGDSNTTTMHTSYQANANPGEKGGTFTGT
          A      A      A                      A                      AAA  A  A  AA  AAAAAAAAA
          II  I
          SSSHHHHH HHHHHHHHHH  SSSSSSSSSSS  TT..SSSSSSSSS                      HHHHHH TTTTSS
          W
          8nd  9++      10-      11++      12+++
          cc      b  b      Ccc  ccCcccc  c      cCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCc  c
          ff      b  b      bbB  b      bBBBB  b  bBBBBBBb  b
          4444  4444      4444  4444      fFFFf  fFFFFFFFffff
          5      55555      4444      44444
          xxxxxx
          -----
1SVP2  KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFHQGALGVFAVPEMCLAGDSNTTTMHTSYQANANPGEKGGTFTGT
          cc      Ccc  ccCcccc  c      cCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCc  c
          ff      b  b      bbB  b      bBBBB  b  bBBBBBBb  b
          fFFFf  fFFFFFFFffff
          -----
2LVP2  KLPDALKDMGLFGQNMFYHYLGRAGYTVHVQCNAKFHQGALGVFAVPEMCLAGDS - TTHMFTKYENANPGEKGGEFKGS
          E
          8nd  9-      10-      11-      12-?
          cc      c      ccCcccc  c      ccCC C      cCCCCCCCCCCCCc
          b      b      b      b      b  bb      bBBBBBBb  bb
          ff      fF  f      fFFFf  fFFFFFFFffff
          4444  4444      4444  4444      4444  55555
          5      55555
          -----
3LVP2  KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFHQGALGVFAIPEYCLAGDS - DKQRYTSYANANPGERGGKFYSQ
          8nd  9-      10-      11-      12-
          cc      Ccc  ccCcccc  c      cCCC CCCCCCCCCCCCCCCc  cc  c
          ff      b  b      bbB  b      bbBB  bb  bBBBBBBb  bb
          4444  4444      4444  4444      fF  FFFFf  fFFFFFFF
          5      55555      4444      4444
          -----
          -      |      -      -      -      -      -
          90      100      110      120      130      140      150
    
```

	170	180	190	200	210	220	230	240
1MVP2	FTPDDNQTSPPARRFCVPDYLLGNGTLLGNFVFPHQIINLRNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPLNFA							
	AAAAAAAAAAAAA A I I I A AA							
	TTTT HHHHHHHHSSSSS..TT SSSSSS HHH..S SSSSSS S S..							
	EWWWEE X13(+) 14+ 15+ W W							
	ccCCCCCCC ccCCc cc ccc c c							
	bbBBBBBb bbbbbb bbbb bb Bbb							
	ffffFFFFFF ffff ff							
	44 5555 5555 xxxxxx xxxxxx							

1SVP2	FTPDDNQTSPPARRFCVPDYLLGNGTLLGNFVFPHQIINLRNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPLNFA							
	ccCCCCCCC ccCCc cc ccc c c							
	bbBBBBBb bbbbbb bbbb bb Bbb							
	ffffFFFFFF ffff ff							
<hr/>								
2LVP2	FTLDTNATNPARNFCVPDYLLGSGVLGNFVFPHQIINLRNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPL DFA							
	E X13- 14- 15- E							
	ccCCcCc ccCCc cc ccCccc c							
	bbb bb b bb bbbb bb bBbb							
	ffffFff ffff							
	5555 5555 xxxxxx xxxxxx							

3LVP2	FNKDNAVTSPKREFCPVDYLLGCGVLLGNFVFPHQIINLRNNSATIVLPYVNALAIDSMVKHNNWGIAILPLSPL DFA							
	E EE E X13- 14- 15- C							
	CCcCCcccCccc ccCCc ccc c Bbb b							
	bbbb ffff ffff							
	5555 5555 xxxxxx xxxxxx							

	160	170	180	190	200	210	220	230

250 260 270
 1MVP2 SESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITLPR LQ
 AAAA A A A AAA
 II
 TT SSSSSSSSSS SSS W
 W W 16(+) 17
 cCCcc c
 bb b b b
 fFFFFf

xxxxxx xxxxxx

1SVP2 SESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITLPR LQ
 cCCcc c
 bb b b b
 fFFFFf

2LVP2 TESSTEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITVPR TQ
 W E 16+ 17
 cCCc c c
 b b f
 fFFFFf f
 4
 55
 xxxxx xxxxxx xxxxxx

3LVP2 QDSSVEIPITVTIAPMCSEFNGLRNV TAPKFQ
 16- 17
 cCCc c c cc
 b b f
 fff f
 4
 xxxxxxxxxxxx xxxxxx

 240 250 260 270

Mahoney VP2

äußere Oberfläche: A= außen

innere Oberfläche: I= innen

H= α -Helix, S= β -Strang, T= Turn, .= Übergang

E= antigene AS aus Literatur, W= antigene AS HPI

erste Ziffer ist Beginn des Peptids Nr.X,

+= Antigenität Serum 45

Hydrophilie: C>4, c>2

 β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2

T-Zell-Motiv aus 4 AS

T-Zell-Motiv aus 5 AS

Sette-Matrix

mögliche Bildung amphipatischer Helices

Sabin 1 VP2

Hydrophilie: C>4, c>2

 β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2

Lansing VP2

E= antigene AS aus Literatur

Kreuzreaktion der Typ 1 Peptide mit Typ 2

Serum 54

Hydrophilie: C>4, c>2

 β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2

T-Zell-Motiv aus 4 AS

T-Zell-Motiv aus 5 AS

Sette-Matrix

mögliche Bildung amphipatischer Helices

Leon VP2

E= antigene AS aus Literatur

Kreuzreaktion der Typ 1 Peptide mit Typ 3

Serum 55

Hydrophilie: C>4, c>2

 β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2

T-Zell-Motiv aus 4 AS

T-Zell-Motiv aus 5 AS

Sette-Matrix

mögliche Bildung amphipatischer Helices

Struktur, Antigenität und Vorhersagen zu VP3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1MVP3	GLPVMNTPGSNQYLTA	DNFQSPCALPEFDVTP	PPIDIPGEVKNMELAE	IDTMI	PFDSL	SATKKN	MEMYRV	RLSDKP	HTDDPILCLSLSPASDP	PRLSHTML
	III I I IIII I IIIII	SSSSS.TTTTT TTTT	I III IIIII III I	SSSS..HH...T SSS	HHHH TTTT	SSSS	SSSSSHHHHHH..T.HH			
	ccCCcCc cc cccc	cc c c c c	cc	c Cc	c	ccCCCC	ccccCCCC	ccCCccc		
	BBBBb Bb b	ff	ff	ffff	4444	fffff	fffff	b bBB bb	ffff	
	fffff	fff	ff	ffff		fffff	fffff	fffff	fffff	
					4444		4444			5555
								xxxxxxx	xxxxxx	
1SVP3	GLPVMNTPGSNQYLTA	DNFQSPCALPEFDVTP	PPIDIPGEVKNMELAE	IDTMI	PFDSL	SAKKNT	MEMYRV	RLSDKP	HTDDPILCLSLSPASDP	PRLSHTML
	ccCCcCc cc cccc	cc	c Cc	c	ccCCCC	ccccCCCC	ccCCccc			
	BBBBb Bb b	ff	ff	ffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	
2LVP3	GLPVLNTPGSNQYLTA	DNYQSPCAIPEFDVTP	PPIDIPGEVRNMELAE	IDTMI	PLNLT	NQRKNT	MDMYRV	VELNDA	AHSDTPILCLSLSPASDP	PRLAHTML
	cCCcCc cccCCCCc	cc	c cc	c	ccCCcCc	c	ccccCCCCc	ccCCcc		
	BBBBb bbBBb b	ff	ff	ffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	
3LVP3	GLPVLNTPGSNQYLTS	DNHQSPCAIPEFDVTP	PPIDIPGEVKNMELAE	IDTMI	PLNLE	STKRN	TMDMYRV	TLSDSAD	LQGPILCLSLSPASDP	PRLSHTML
	cCCcCc cccCCCCc	cc	c Cc	c	ccCCcCc	cccCCCCc	ccCCccc			
	BBBBb bbBBb b	ff	ff	ffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	
	fffff	fffff	ff	ffff	fffff	fffff	fffff	fffff	fffff	
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1MVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGFM	MATGKLLVSYAPPGAD	PPKPKRKEAMLGTHVI	WDIGLQSSCTM	VVPWISNTTYRQT	IDDSFTEGGYISVFYQ	TRIVV		
	II I I I I IIIII	HHHHHHSSSS	SSSSSSSSS	TTT.SSSSSSSS	HHHH..TTSSSSSSS	SSSSSSS	SSS	HHHH	SSSSSSSSSSS	
	4444	4444								
	5		55555		55555	55555				
			xxxxxx			xxxxxx		xxxxxx		xxx
1SVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGSM	MATGKLLVSYAPPGAE	PKRKEAMLGTHVI	WDIGLQSSCTM	VVPWISNTTYRQT	INDSFTEGGYISM	FYQTRVVV		
2LVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGSM	MATGKILVAYAPPGA	QPTSRKEAMLGTHVI	WDLGLQSSCTM	VVPWISNVTYRQT	QDSFTEGGYISM	FYQTRIVV		
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200

	210	220	230	
1MVP3	PLSTPREMDILGFVSACNDFSVRLLRDTTHIEQKALAQ			Mahoney VP3
	AAA AA		AA AAAA	äußere Oberfläche: A= außen
	I I		I I	innere Oberfläche: I= innen
	SSSSSSSSSSS.TTTSSS			H= α -Helix, S= β -Strang, T= Turn, .= Übergang
	W W		W	E= antigene AS aus Literatur, W= antigene AS HPI
	ccC	ccc c	cccccc cc	Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff		f fff	Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2
	4444444	44444444		T-Zell-Motiv aus 4 AS
			55555	T-Zell-Motiv aus 5 AS
	xxx			Sette-Matrix
	-----	-----		mögliche Bildung amphipatischer Helices
1SVP3	PLSTPREMDILGFVSACNDFSVRLMRDTTHIEQKALAQ			Sabin 1 VP3
	ccC	ccc c	cccccc cc	Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff		fff	Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2
2LVP3	PLSTPRKMDILGFVSACNDFSVRLLRDTTHISQEAMPQ			Lansing VP3
	E			E= antigene AS aus Literatur
	ccc	ccc c	cccccc cc	Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff		f f	Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2
3LVP3	PLSTPKSMSMLGFVSACNDFSVRLLRDTTHISQSALPQ			Leon VP3
	cccc	ccc c	cccccc cc	E= antigene AS aus Literatur
	bbbb	bbb		Hydrophilie: C>4, c>2
	fff		f fff	β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
				Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2
	210	220	230	

Struktur, Antigenität und Vorhersagen zu VP4

	10	20	30	40	50	60		
1MVP4	MGAQVSSQKVG	AHENS	NRAYGG	STINYTT	INYYRDS	SASNAASKQ	DFSQDPSKFTEPIKDVLIKTAPMLN	Mahoney VP4
	I I I I I I		IIII I I	III I I	I IIIIII I	IIIIIIIII I		innere Oberfläche
	SSSSSS	SSS	SSSS	TTTT	SSSS	HHHHH	TTTT	α -Helix, β -Strang, Turn
	ccCcCccccC	CCCCcccccccc	c	ccCCCCCCCC	CcCCCCCcccc	cc		Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		BbbBb	b b	bBBBbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff	ffff	ffff	ff	ffffffffff	ffff		Beweglichkeitsvorhersage
		4444			4444			T-Zell-Motiv aus 4 AS
						55555		T-Zell-Motiv aus 5 AS
				xxxxxx				Sette-Matrix
	-----	-----	-----	-----	-----	-----		ev. amphipatischer Helices
1SVP4	MGAQVSSQKVG	AHENS	NRAYGG	STINYTT	INYYRDS	SASNAASKQ	DFSQDPSKFTEPIKDVLIKTSPMLN	Sabin 1 VP4
	ccCcCccccC	CCCCcccccccc	c	ccCCCCCCCC	CcCCCCCcccc	cc		Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		BbbBb	b b	bBBBbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff	ffff	ffff	ff	ffffffffff	ffff		Beweglichkeitsvorhersage
2LVP4	MGAQVSSQKVG	AHENS	NRAYGG	STINYTT	INYYRDS	SASNAASKQ	DFSQDPSKFTEPIKDVLIKTAPTLN	Lansing VP4
	ccCcCccccC	CCCCcccccccc	c	ccCCCCCCCC	ccccCccCcccc	cc	c c	Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		BbbBb	b	bbb		β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff	ffff	ffff	ff	ffff	ffffffffff	fff	Beweglichkeitsvorhersage
3LVP4	MGAQVSSQKVG	AHENS	NRAYGG	STINYTT	INYYKDS	SASNAASKQ	DYDPSKFTEPLKDVLIKTAPALN	Leon VP4
	ccCcCccccC	CCCCcccccccc	c	CcCCCCCCCC	CCCCCCCCcccc	cc		Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		bB	Bb	b	BbBBBbb	β -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff	ffff	ffff	fff	ffffffffff	ffff		Beweglichkeitsvorhersage
	10	20	30	40	50	60		

4.2.2. Lage der als antigen bekannten Aminosäuren auf der Virusoberfläche

Die AS F3123 der in dieser Arbeit bevorzugten Baltimoresequenz ist in der Röntgenstruktur nach Hogle ein S3123.

Von den 812 AS der PV-Kapsidproteine berühren 178 AS der Röntgenstrukturanalyse zufolge die äußere Oberfläche. Sie können zur Antigenität des PV direkt beitragen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß z.Z. noch AS falsch der Oberfläche zu- oder nicht zugerechnet werden. Ein Teil der AS ist schon als Bindungspartner für Ak bestimmt worden. Diese AS wurden durch Mutationsversuche mit anschließender Sequenzanalyse bestimmt (Zitate siehe Überblick 1.4.).

Dabei fand man auch AS, die gar nicht an der Oberfläche liegen. Entweder hat die Röntgenstrukturanalyse an diesen Stellen Fehler durch Denaturierung der Virushülle bei der Kristallisation, oder Antikörper wurden gegen denaturierte Viren gebildet, oder diese AS beeinflussen indirekt durch Änderung der Struktur. Solche AS sind P2245 und S3183.

Abb.4.20 bis Abb.4.23C entstanden über das Programm MOLSCRIPT (Kraulis 1991). Die Abbildungen enthalten je ein komplettes Protomer. Die Abb.4.20 A-D zeigen die räumliche Struktur und Lage der Virusproteine VP1-4 im Protomer. Der räumliche Eindruck entsteht durch das Weglassen der weiter innen liegenden Strukturteile. Die Schattierung gibt die räumliche Struktur lokaler Elemente an. Das Programm MOLSCRIPT ordnet die Daten in drei Dimensionen an, im Papier läuft die X-Achse waagrecht nach rechts, die Y-Achse senkrecht nach oben; die Z-Achse steht senkrecht auf dem Papier, zeigt also auf den Betrachter zu. In den ersten Abbildungen ist ein gedrehtes Originalprotomer aus den Brookhavendaten dargestellt. Beim direkt aus der Datenbank entnommenen Protomer ist die Zweiersymmetrieachse gleich der MOLSCRIPT-Z-Achse. Die Ikosaederkante liegt auf der Y-Achse. Die Daten in Richtung VP2 sind der räumlichen Struktur entsprechend hinter der Papierebene, also kleiner dargestellt. Um einen Eindruck der Oberfläche zu ermöglichen, wurden die Daten um $-22,5^\circ$ um die Y-Achse gedreht, so daß auch VP2 in der Papierebene liegt. Eine positive Rotation ist laut Programm eine Drehung im Gegenuhrzeigersinn, wenn man von positiven Werten in Richtung der negativen Werte schaut. Da der Betrachter im allgemeinen gewohnt ist, die Spitze des Ikosaeders in der Mitte oben zu suchen, wurden die Abbildungen zusätzlich noch -36° um die Z-Achse gedreht.

Differenzen um eine AS in der Struktur sind möglich, weil die Struktur in den Brookhavendaten immer für eine bestimmte AS angegeben ist, in MOLSCRIPT ist eine AS jedoch Grenze zwischen zwei Strukturelementen.

Waren mehrere Strukturarten für eine AS angegeben, so habe ich der Übersichtlichkeit wegen die Struktur nur als "coil" zeichnen lassen.

VP1 ist erst ab AS 20 eingezeichnet, obwohl Hogle et al. eine Struktur für AS 6-10 angeben. Die Sequenz dieser Region enthielt jedoch die falschen AS. Die Daten von VP2 sind ab AS5 vorhanden. Bei VP3 fehlen die AS 236-238. Bei VP4 ist anstelle des abgespaltenen Methionins das Myristin in Position 1; VP4 hat eine Lücke von AS17-22.



Abb.4.20A Die Lage von VP1 im Protomer

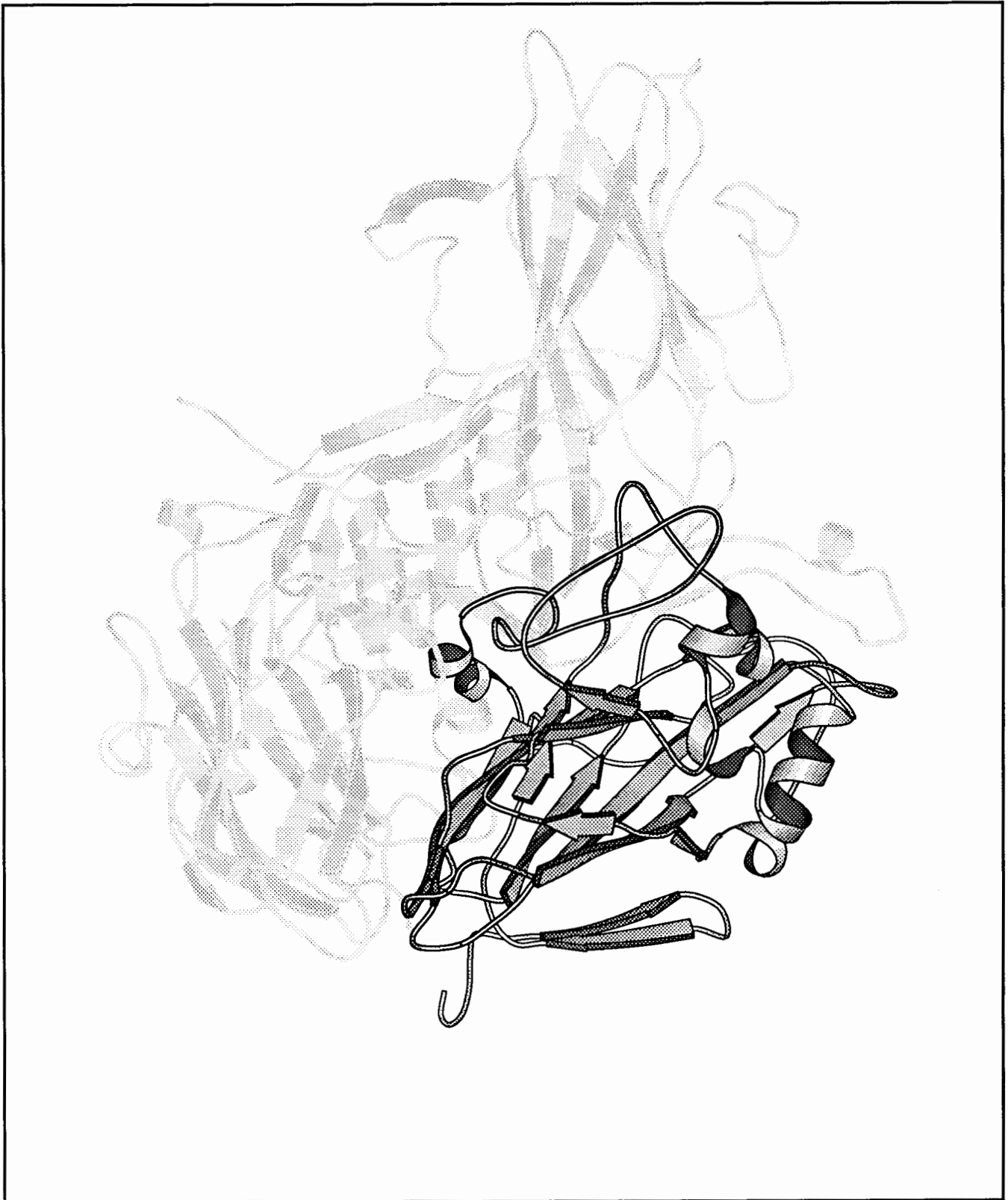


Abb.4.20B Die Lage von VP2 im Protomer

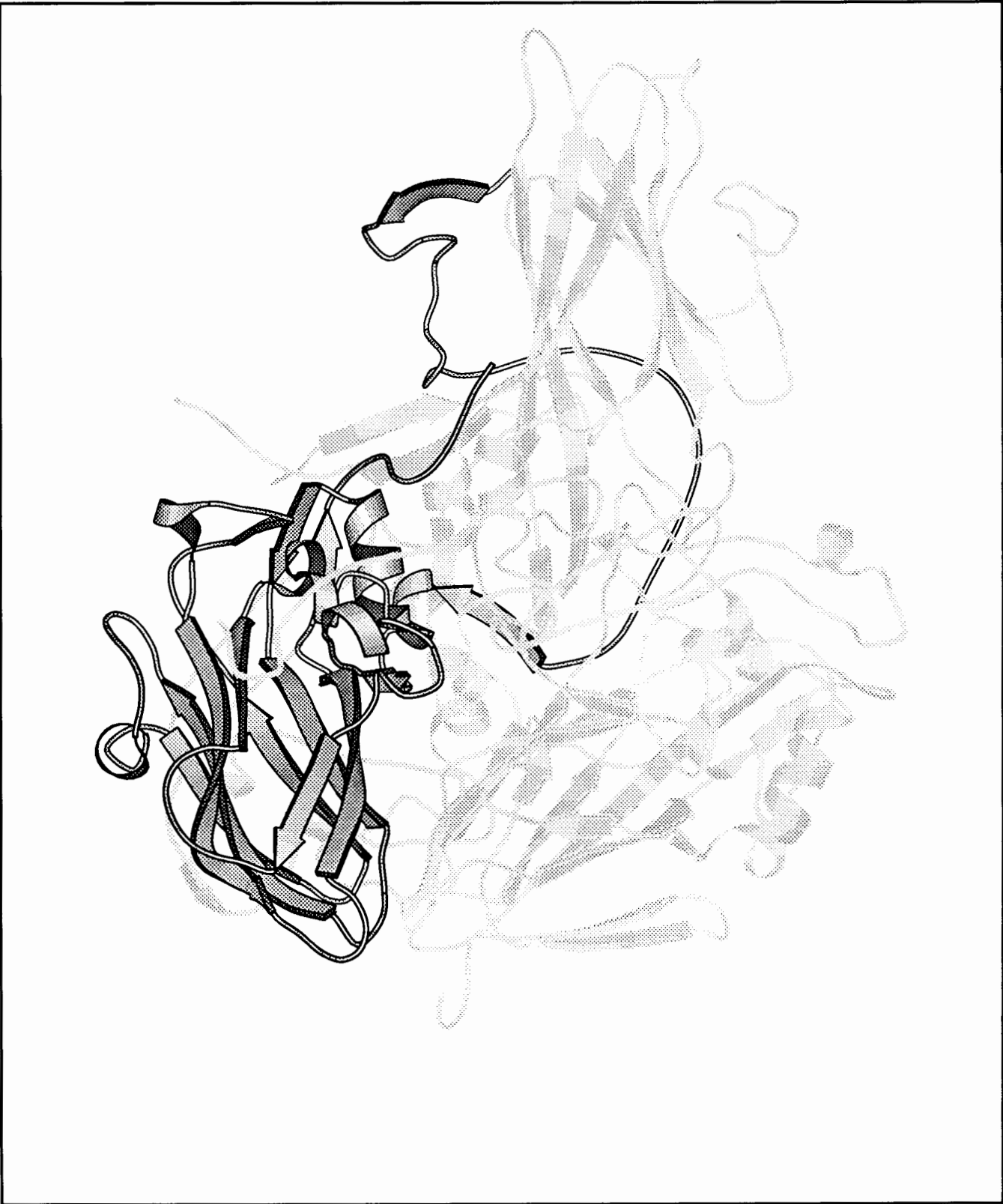
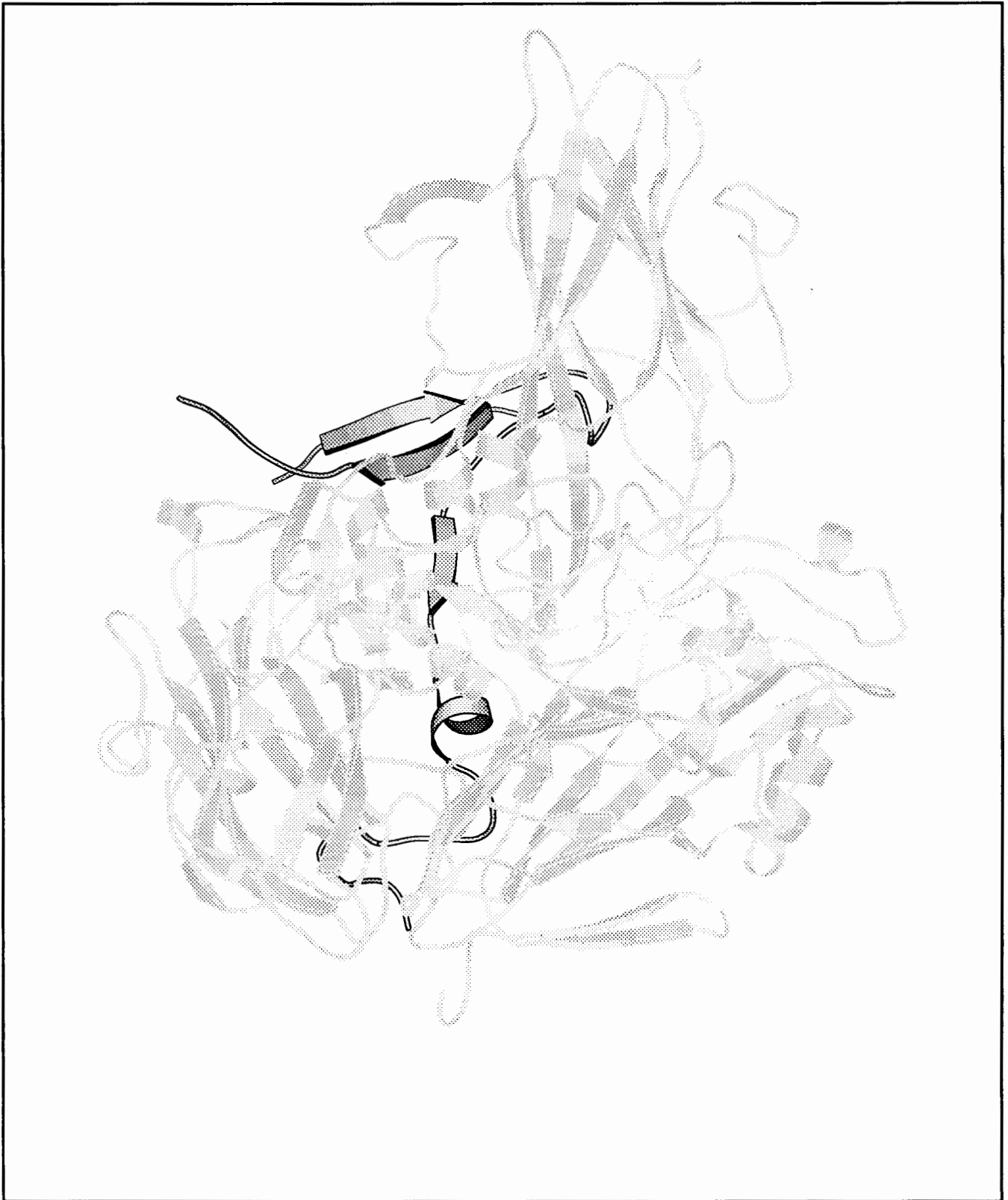


Abb.4.20C Die Lage von VP3 im Protomer



Die beiden gut sichtbaren Enden in Abb.4.20D am linken Rand sind durch eine Sequenz unbekannter Struktur verbunden, die Daten fehlen noch in der Röntgenstruktur.

Abb.4.21 Lage der Oberflächen-AS im Protomer

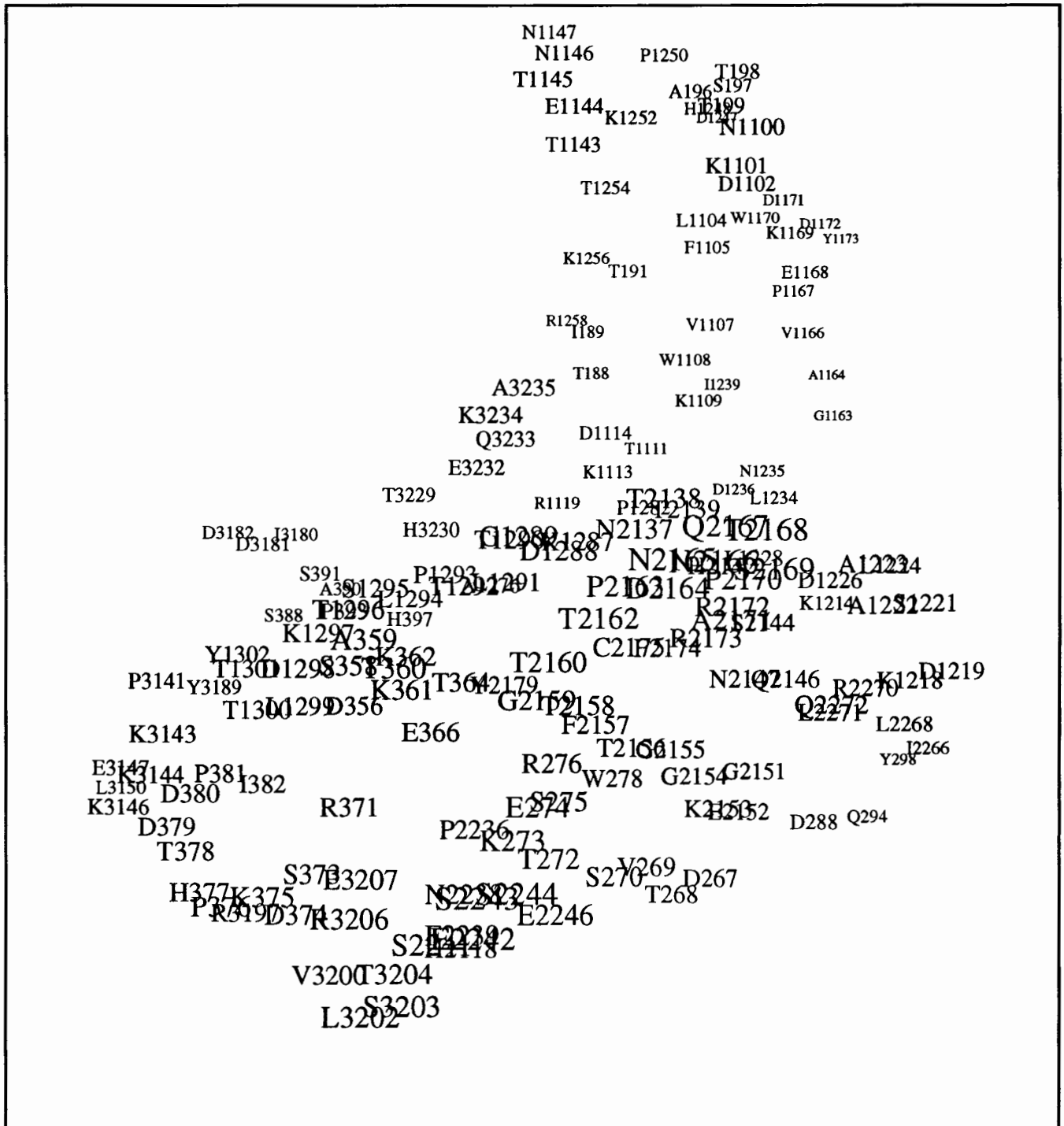
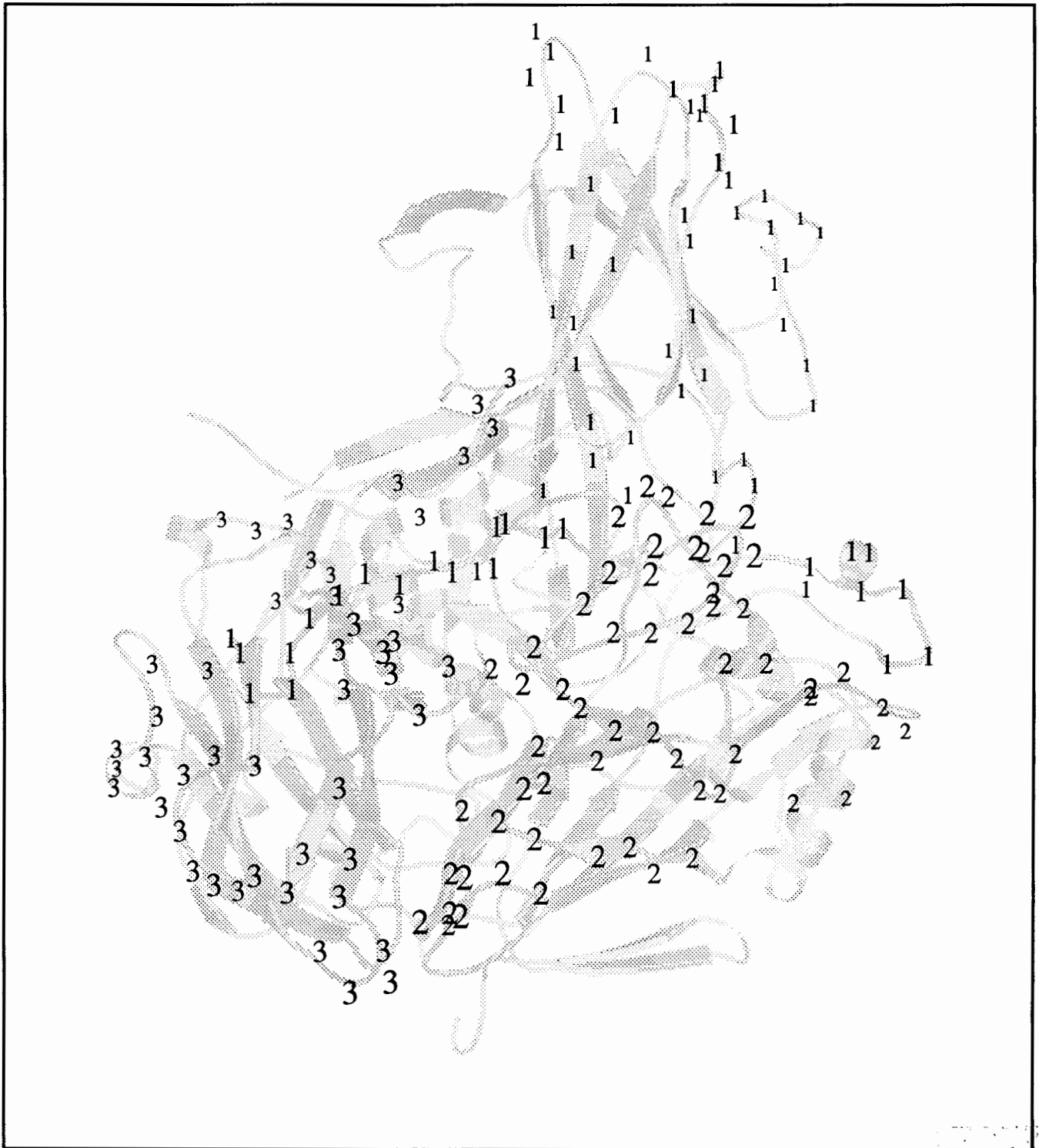


Abb.4.21 zeigt alle an der Oberfläche liegenden AS. Die AS sind mit ihrer AS-Art (im "one letter code") und mit ihrer AS-Nummer angegeben. Die erste Ziffer der Zahl bedeutet die Nummer des Virusproteins, dahinter steht direkt die Nummer der AS im VP. Die Mitte der Beschriftung gibt immer die Lage des C_α-Atoms der betreffenden AS an, je näher zum Betrachter, desto größer.

Abb.4.22 Räumliche Exposition der AS auf der Oberfläche



In Abb.4.22 sind die AS der Oberfläche nur durch die Zahl vertreten, die das VP angibt, auf dem sie liegen. Je größer die Zahl geschrieben ist, desto näher ist sie dem Betrachter, also exponierter auf der Oberfläche. Die Abb. ergibt dadurch einen Teileindruck der Oberflächenstruktur. Deutlich ist die Schlucht um VP1 zu erkennen.

Die Abb.4.23 A-C zeigen die antigenen AS der Regionen 1-3. In der antigenen Region 1 liegen die AS S197, T199, N1100 und K1101 in einer Schlaufe, H1248 und E1144 jeweils in anderen benachbarten Schlaufen.



Abb.4.23A Die Oberflächen-AS der antigenen Region 1

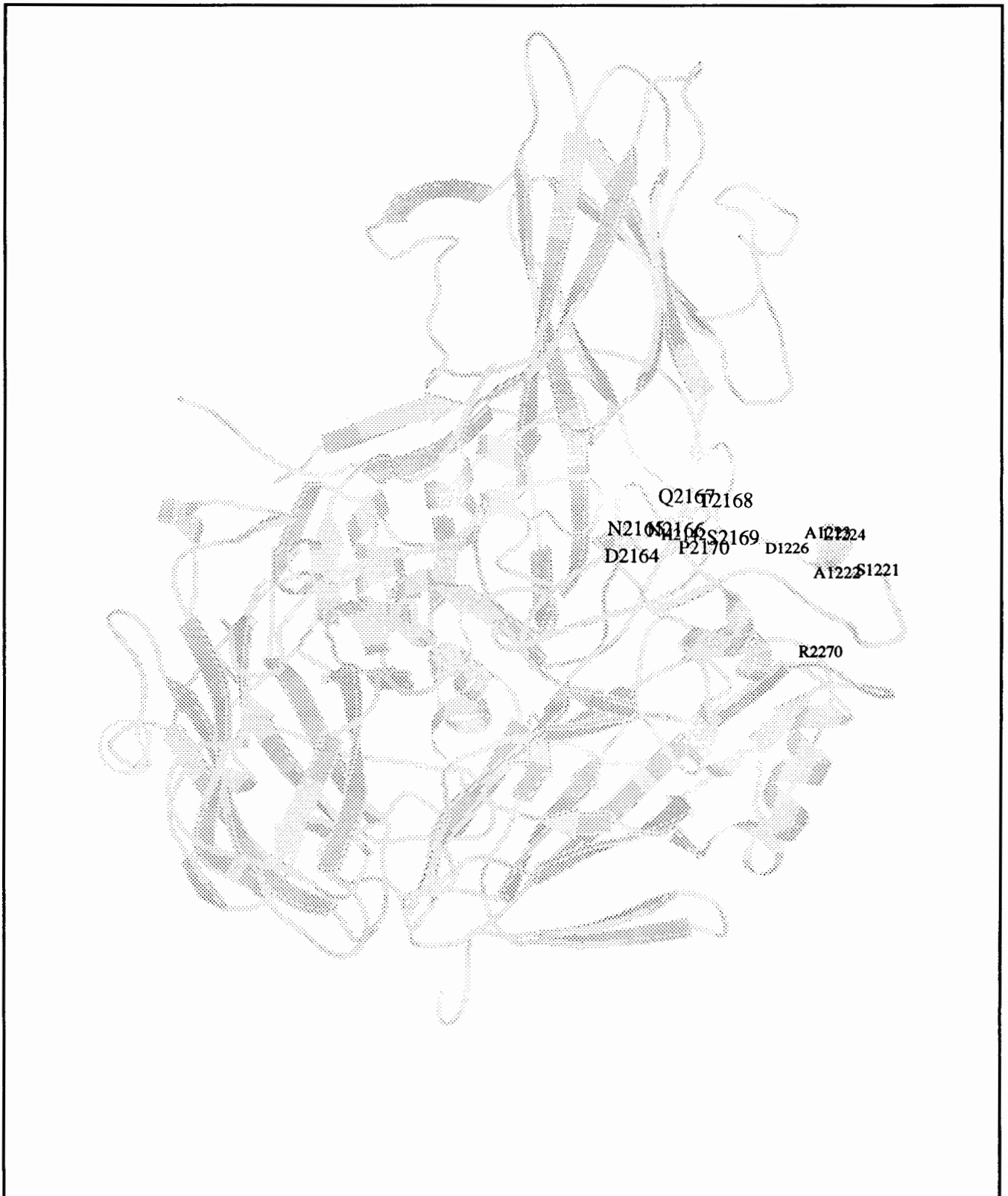


Abb.4.23B Die Oberflächen-AS der antigenen Region 2

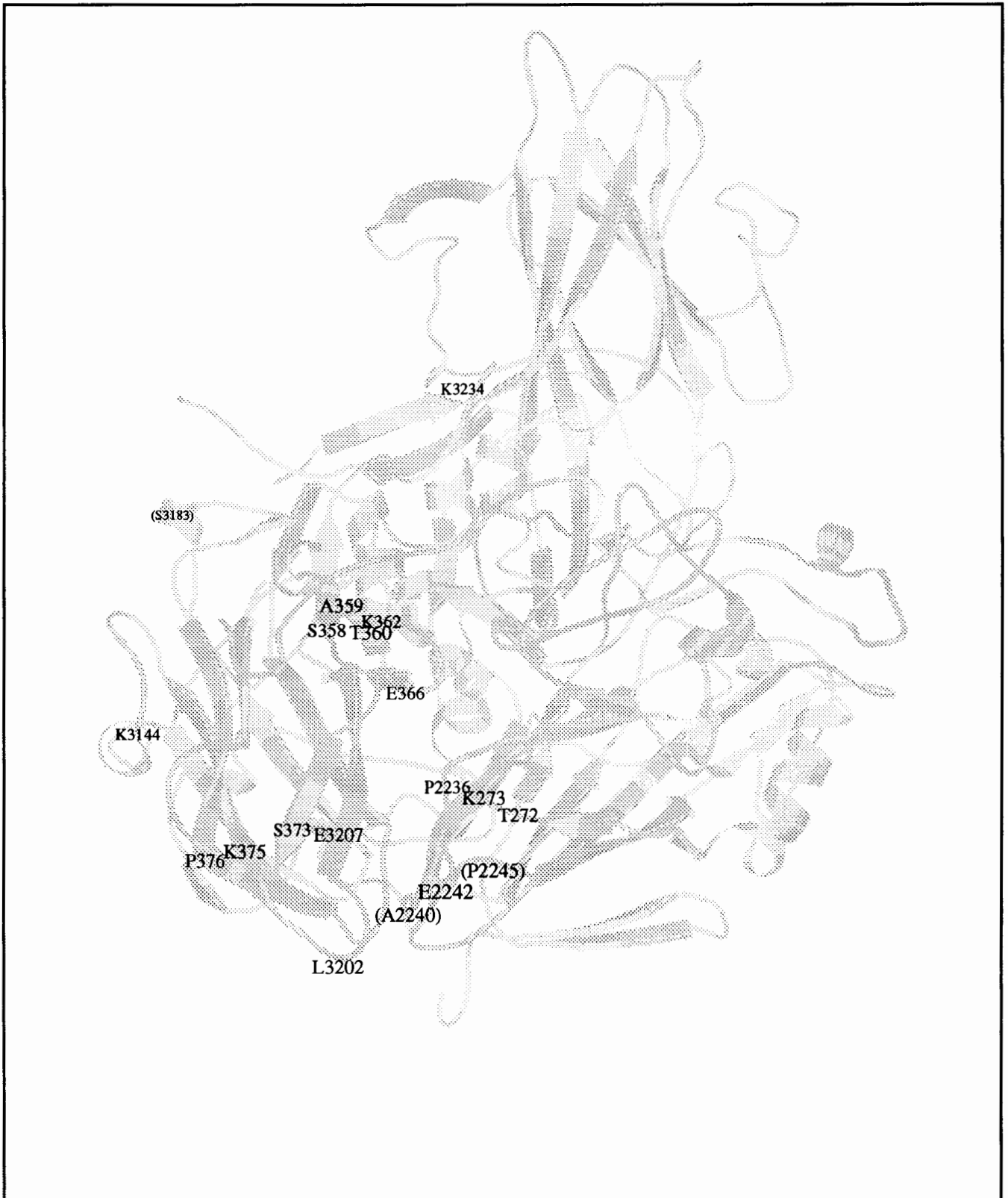


Abb.4.23C Die Oberflächen-AS der übrigen antigenen Regionen

Die antigenen AS der Region 1 und 2 ließen sich nicht ohne Überschneidungen darstellen, ohne die Lage der AS zu beeinträchtigen, die der Mitte der Schrift entspricht. So ist in Region 1 E1144 auf der DE-Schleife (Die Schleifen werden nach den Strängen benannt, die an den Enden der Schleife liegen.) gut zu erkennen; das H1248 auf der HI-Schleife ist von T1099 auf der darüberliegenden BC-Schleife teilweise verdeckt. Die BC-Schleife enthält die antigenen AS S1097, T1099, N1100 und K1101. Abb.4.23A II zeigt deshalb die antigene Region 1 noch einmal, nicht mehr aus der Aufsicht der Ikosaederfläche, sondern im Blick senkrecht von oben auf die fünfzählige Achse. Alle fünf VP1-Keilspitzen sind abgebildet, durch Rotation der Daten um 72° um die fünfzählige Achse (Die Matrix zur Drehung ist in den Brookhavendaten angegeben.). Der Fußabdruck eines Antikörpers ist groß genug, mehr als eine Symmetrieeinheit dieser Region zu überdecken. Durch die Schlucht ist die Suche nach weiteren antigenen AS der Region 1 auf die erhobene fünfzählige Achse beschränkt.

Im helikalen Teil der Region 2, dem VP1-Anteil, stoßen die Beschriftungen der AS S1221 und A1222 aneinander, A1223 und L1224 liegen übereinander. Zusätzlich liegt auf der GH-Schleife, die in diesem Abschnitt eine helikale Region hat, D1226. In der großen Schleife von VP2, AS D2164 bis P2170, überdecken sich AS N2165 mit N2166, Q2167 mit T2168 und S2169 mit P2170. Die antigene Sequenz dieser AS ist auffallend kontinuierlich. Außer der Helix in der Schleife zwischen G- und H-Strang von VP1 (entspricht "MKS-Schleife") und der großen Oberflächenschleife in der Schleife zwischen E- und F-Strang von VP2 sind an Region 2 noch AS H2142 und R2270 beteiligt. AS H2142 ist Teil eines anderen, tiefer gelegenen Abschnitts der EF-Schleife von VP2. AS R2270 liegt im COOH-Terminus von VP2. Während über den erhobenen COOH-Terminus von VP1 hinweg in Richtung VP3 weitere AS das Epitop ergänzen könnten, sind in Richtung des angrenzenden Protomers starke Vertiefungen vorhanden. Abb.23B II zeigt Region 2 in Oberflächenaufsicht. Sowohl bei Region 1, als auch bei Region 2 liegt ein der Oberfläche zugängliches, antigenes H unter einer auf der Oberfläche besonders exponierten Schleife.

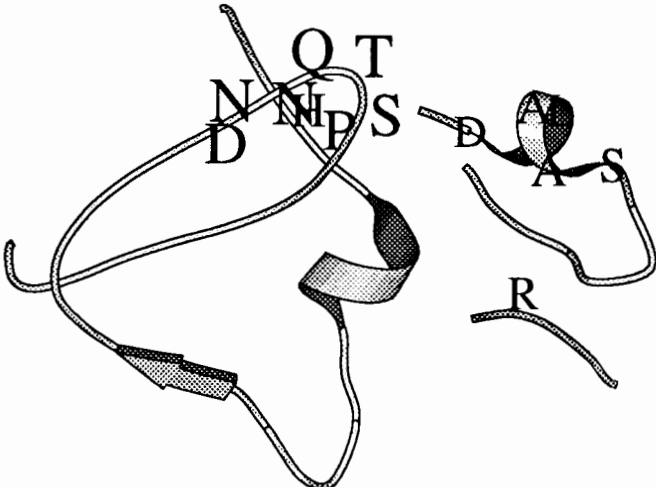
Die AS der Region "3 (bzw. 3A, 3B, 3C oder 4)" liegen so verstreut auf der Oberfläche, daß mir eine Unterteilung nicht zweckmäßig erschien. Die drei in Klammern angegebenen AS liegen nicht auf der Oberfläche. Einige AS gehören eventuell nicht zur "Region 3", (K3234, (S3183)).

Aus dem Vergleich der Abbildungen der bekannten antigenen AS mit z.B. Abb.4.22 sollte leicht auf weitere zu erwartende antigene AS geschlossen werden können.

Abb.4.23A II Die Struktur der antigenen Region 1



Abb.4.23B II Die Struktur der antigenen Region 2



4.3. Versuche mit tryptischen Peptiden von VP2

Durch die Messungen der optischen Dichte und ihre Aufteilung in Streuung und Absorption konnte Aggregation als Hauptfunktion der PV-Ak-Bindung identifiziert werden. Die Computerverarbeitung ermöglicht eine Einordnung der antigenen AS in Struktur und Oberflächenlage.

Die allgemeine Struktur, die Antigenität zugrunde liegt, ist unbekannt, ebenso die Reaktion verschieden wirkender Ak. Mit den VP2 Peptiden des PV1 sollen deshalb folgende Fragen geklärt werden.

1. Wieviele Mole Peptid sind für eine Immunreaktion im DOT-Test mit VP2-Peptiden nötig?
2. Haben polyklonale Seren Ak gegen VP2-Peptide im Virusinneren?
3. Lassen sich mit Hilfe der Programme schwache Kreuzreaktionen mit den nicht spezifischen Peptiden erkennen?
4. Ist ein Zusammenhang zwischen den mit Computerprogrammen errechneten, der Antigenität günstigen Bedingungen, und der Reaktivität der Peptide feststellbar? D.h. läßt sich die Reaktivität der Peptide mit Seren durch einen Vergleich der Ergebnisse von Computerdaten erklären?
- 5 Binden monoklonale Ak, die nicht neutralisieren, an gleiche Stellen wie neutralisierende Ak? D.h., haben virusbindende, nicht neutralisierende Ak die gleichen Bindungsstellen wie neutralisierende Antikörper?

4.3.0. Isolierung der Peptide des Oberflächenproteins, VP2, von Poliovirus-wt 1

Nach Dissoziation der Viren wurden die Proteine über eine Säule mit hydrophobem Material isoliert. Anschließend wurde VP2 alkyliert und tryptisch verdaut. Die entstandenen Peptide wurden über eine weitere hydrophobe Säule aufgetrennt. (Methode und Nomenklatur der Peptide siehe 3.4.8.) Abb.4.24 zeigt einen typischen Gradienten zur Trennung der VP2-Peptide. Ihre Lage ist durch die Numerierung angegeben. Um alle verwendeten Peptide zu erhalten, waren eine Reihe weiterer, aber ähnlicher Gradienten notwendig. Der hier gezeigte Gradient wurde mit steigender Acetonitrilkonzentration (0-75%) in 0.05M H_3PO_4 -Puffer bei 25°C in 130 min eluiert. Ein Teilstreich entspricht dabei 10% Acetonitril.

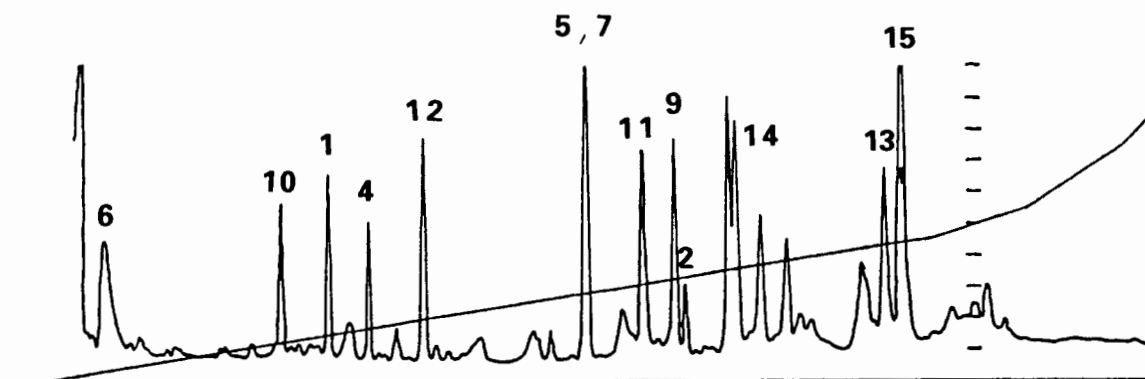


Abb. 4.24 Gradient zur Isolierung der VP2-Peptide

Die Identifizierung der Peptide erfolgte nach Vorsäulenderivatisierung mit Dansylchlorid auf einer Säule mit reverser Phase. Die Bedingungen wurden gegenüber Dernick und Heukeshoven 1989 (andere Zitate siehe dort) leicht modifiziert, um die Auftrennung zu optimieren. Das Peptid 3 erschien an zwei verschiedenen Stellen.

4.3.1. Wieviele Mole Peptid werden aufgetragen?

Viruspräparate sind sehr teuer in der Herstellung, deshalb stehen für Versuche mit Virusprodukten nur sehr geringe Mengen zur Verfügung. So sollten möglichst kleine Tropfen von Peptidlösungen auf Nitrozellulosefolien aufgetragen werden, um dort später mit Antikörpern in Lösungen zu reagieren, DOT-Test, siehe 3.4.11.

Nachdem eine ganze Reihe herkömmlicher Bestimmungsmethoden der AS-Konzentration wegen der geringen Menge an Material scheiterten, wurde eine empfindliche Fluoreszenzmethode zur Bestimmung der Gesamt-AS-Konzentration mit OPA-Mercaptopropionsäure ausgearbeitet (3.4.10). In einem Punkt des DOT-Tests wurde meistens je 1 μl aufgetragen, bei Peptid 1, 2 und 3a meist 2 μl . In Tabelle 4.2 sind die in diesen Lösungsmengen enthaltenen Mole bzw. ng Peptid pro Punkt angegeben. Für die Berechnung aus den Fluoreszenzeinheiten (FE) mußte berücksichtigt werden, daß die AS C, P und K nicht zu fluoreszierenden Produkten führen, deshalb ist neben der AS-Anzahl die Anzahl der fluoreszierenden AS angegeben. Bei der Umrechnung von FE in pMole wurden Verdünnungsfaktoren des Versuchsablaufs, der Hintergrundwert der Reaktion und die Steigung der Eichkurve aus einer Standard-AS-Lösung berücksichtigt. (Sequenzen der Peptide siehe 3.4.9) Eine weitere Spalte gibt die Ausbeute in % an, Peptidmole im Vergleich zu Molen VP2, die eingesetzt wurden.

Tab.4.2 VP2-Peptidkonzentration pro Punkt

Peptid-Nr.	Anzahl AS	AS ohne C, P, K	pmol Peptid /Punkt	ng /Punkt	% Ausbeute
1	12	10	77,2	102	24
2	25	25	9,4	26	3
3a	6	5	147,2	97	46
3b	6	5	24,4	16	15
4	19	15	184,9	390	116
5	11	10	76,2	92	48
7	5	4	45,5	25	28
9	16	16	46,9	82	29
10	13	11	74,7	110	47
11	37	33	63,1	260	39
12	19	17	128,0	270	80
13	28	25	43,3	130	27
14	22	18	42,8	100	27

Der DOT-Test war so empfindlich, daß schließlich alle aufgetragenen Peptide, die länger als oder 6AS-lang waren, mit Seren reagieren konnten. Selbst die geringe Konzentration an Peptid 2 reichte aus (siehe Tab.4.3). **Die Antwort auf Frage 1 lautet deshalb: Die Nachweisgrenze unseres DOT-Tests mit DAB-Nickel-Peroxidasereaktion liegt unter 10 pmol pro Punkt.**

Tab.4.3 Korrelation zwischen Peptidmenge und immunologischer Reaktion

tryptisches Peptid	Ø-Reaktion	pmol Peptid
1	(+)	77
2	+	9
3 a	(+)	147
3 b	(+)	24
4	+++	185
5	+	76
7	+	46
9	++	47
10	-	75
11	++	63
12	+++	128
13	(+)	43
14	+	43

Die nicht in Tab. 4.3 aufgeführten Peptide sind entweder zu kurz (6 und 17) oder konnten nicht in ausreichender Menge isoliert werden (8, 15 und 16), um einen Durchschnittswert zu erhalten.

4.3.2. Welche Peptide binden homologe Seren ?

Bei allen hier abgebildeten Versuchen mit Seren wurden die Peptide auf Streifen von 2 cm x 10 cm aufgetropft. Für je ein Peptid war die Mitte eines cm^2 bestimmt.

T1	PBS SDS	T3	T4	T5	-K	-K	T8	T9	T10
T11	T12	T13	T14	T15 ^N _C	T16	F15	F16	F20	+K

Ist ein Peptid an einer Stelle aufgetropft, so ist es mit "T" plus Nummer eingetragen. "-K" und "PBS+SDS" sind Negativkontrollen, "+K" ist Positivkontrolle durch direkt gebundene Ak. Im fünfzehnten Feld sind links T15, rechts oben der N-Terminus von T15 und rechts unten der C-Terminus von T15 aufgetragen. (Peptid 2 wurde nur in einem Teil der Versuche getestet.) Abb. 4.25 zeigt eine Auswahl von peptidbindenden Antikapsidseren und Seren gegen ganze Viren, die die im ganzen recht einheitlichen Reaktionen verdeutlichen sollen. Der dunklere Hintergrund entsteht durch längeres Laufenlassen der Peroxidase-reaktion.

Abb.4.25 Ähnlichkeit der immunologischen Reaktionen verschiedener Typ-1-Seren.

Von oben nach unten: Kapsidserum 42 und 43, Serum gegen ganze Viren 44 und 279

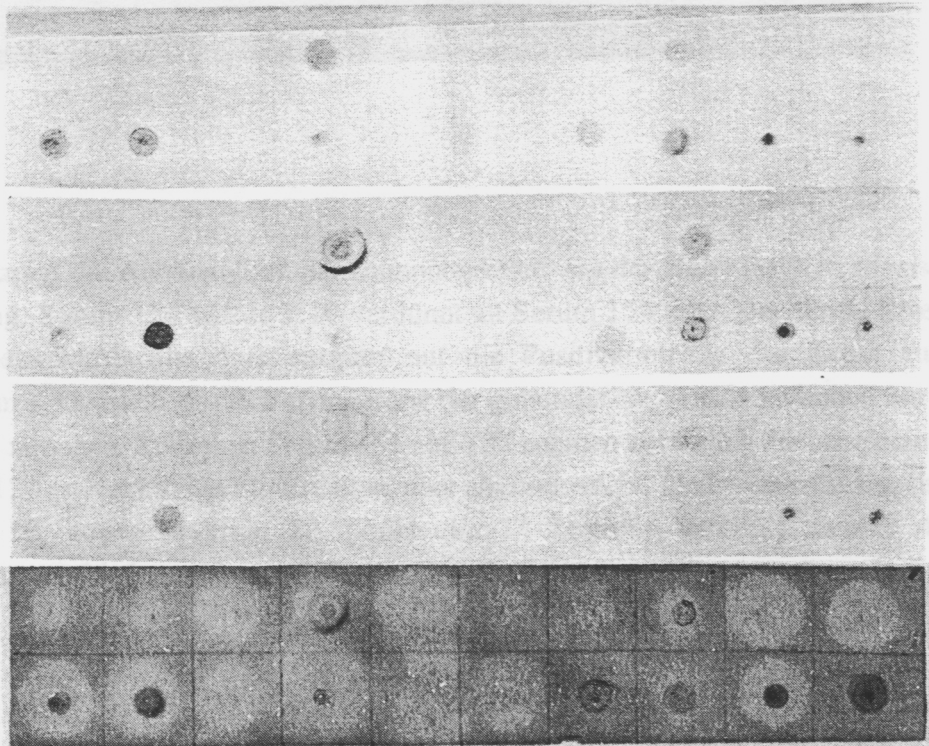


Abb.4.26 Auswirkung der Virusverdünnung bei der Immunisierung

Von oben nach unten: Serum 154, 155, 156, 157 und Präserum

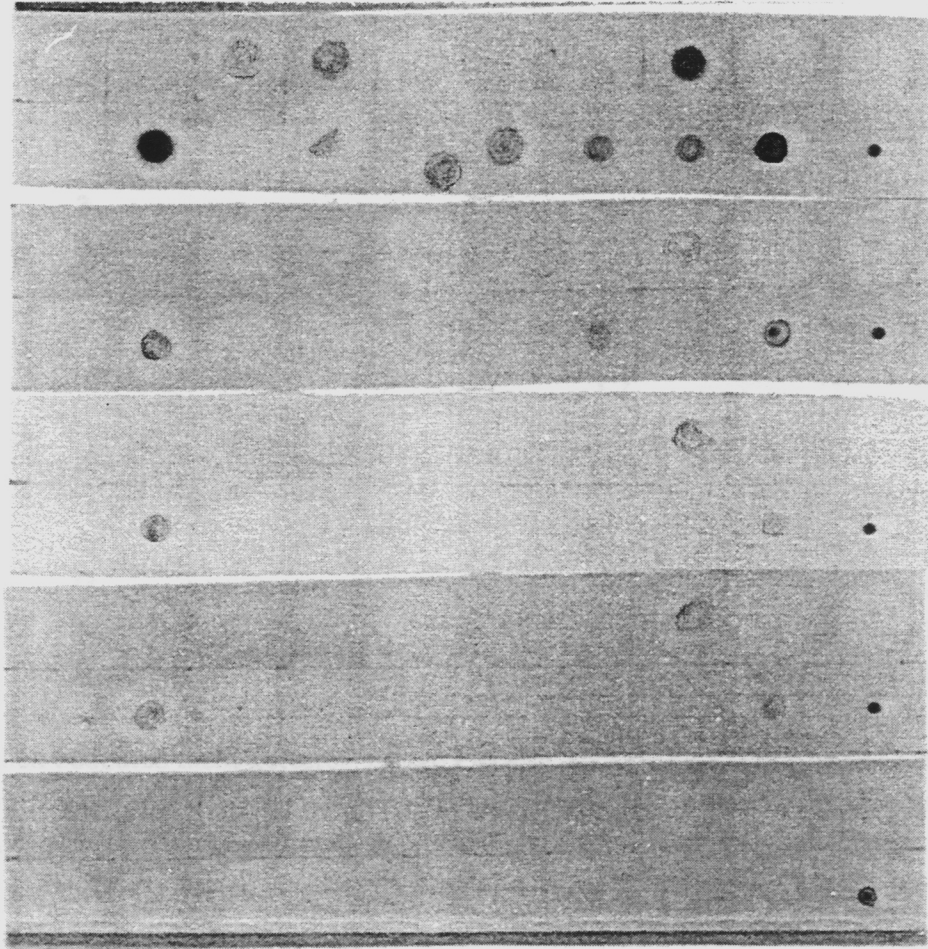


Abb. 4.26 zeigt die Abhängigkeit der Immunreaktion von der Höhe der Virusdosis bei der Immunisierung. Serum 154 wurde 1:10 verdünnt zu Serum 155 usw. Der fünfte Streifen ist eine Präserumnegativkontrolle, hier reagiert nur die Positivkontrolle des direkt aufgetragenen Primärserums. Deutlich ist die Verringerung der gebundenen Peptide zwischen Serum 154 und Serum 155 zu sehen. Zwischen Serum 155 und 157 nehmen zusätzlich die unbekanntes Fraktionen 15 und 20 an Reaktivität ab. Erhalten, aber abgeschwächt, bleiben nur die tryptischen Peptide 8 und 12, sowie Fraktion 20. (Auch die T4-Reaktion entfällt.) Tabelle 4.4 faßt die Reaktionen verschiedener Versuche zusammen.

Tab.4.4 Übersicht der Peptidbindungen verschiedener Typ-1-Seren

T	AS-Anz.	42	43	44	45	154	279	AS- Nr.
1	12	(+)	+	+	+	-	+	1- 12
2	25	+	+	+	+	+	+	13- 37
3	6	(+)	+	(+)	(+)	+	(+)	38- 43
4	19	+++	+++	+++	+++	+	+++	44- 62
5	11	+	(+)	+	+	-	+	63- 73
6	3							74- 76
7	5	+	(+)	(+)	+	+	+	77- 81
8	6	+	+	+	+	++	+	82- 87
9	16	++	+	+	++	+	++	88- 103
10	13	-	-	-	-	(+)	-	104- 116
11	37	++	++	+	++	+	++	117- 153
12	19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	154- 172
13	28	-	+	-	-	+	-	174- 201
14	22	+	+	+	+	+	+	202- 223
15	41	+	+			+		224- 264
16	6	-	+	-	-	+	-	265- 270
17	2							271, 272

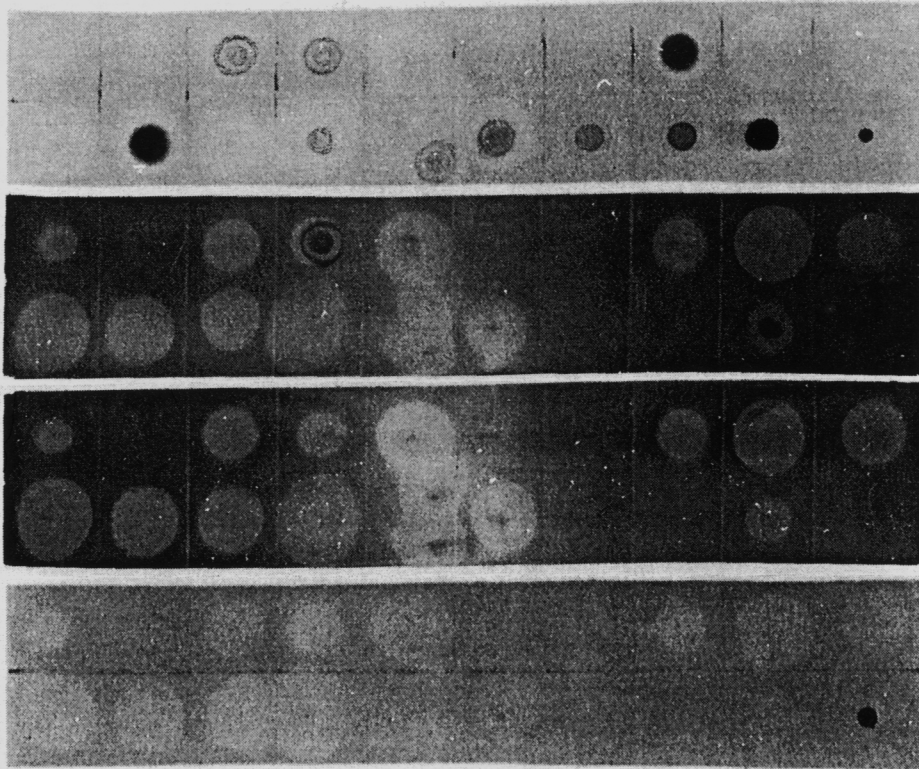
Freie Stellen bedeuten nicht getestet. Einige Flecken, so z.B. Peptid 9, sind auf den Fotos nicht mehr zu erkennen, weil die Farbreaktion nicht bei allen Peptiden stabil war. Die Liste der Reaktionen wurde gleich nach Beendigung der Färbung aufgezeichnet. **Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß polyklonale Seren Ak gegen VP2-Peptide im Virusinneren bilden (Frage 2).**

4.3.3. Welche Peptide binden heterologe Seren?

Um die Reaktion mit heterologen Seren zu verdeutlichen, wurden die Streifen stark überfärbt, da auch noch schwache Reaktionen sichtbar werden sollten (Abb.4.26). Die etwas hellere Mitte entstand bei den photographischen Aufnahmen durch Spiegeleffekte. Während die Peptide 8 und 12 mit Typ-1-Serum sehr stark reagieren, sind sie bei Typ 2 und 3 nicht zu sehen. Mit Typ-3-Serum reagiert nicht ein einziges Typ-1-Peptid. Mit Typ-2-Serum reagiert nur Peptid T4. (Dieses Peptid liegt innen im Virus.)

Abb.4.27 Heterologe Reaktion der Typ-1-Peptide mit Typ-2- und Typ-3-Serum

Von oben nach unten: Serum 154 (Typ 1), Serum 54 (Typ 2), Serum 55 (Typ3) und Präserum



4.3.4. Welche Peptide binden monoklonale Antikörper mit unbekanntem Epitop?

Unsere Abteilung besitzt eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern (mAk). Die Epitope der meisten dieser Ak wurden durch Sequenzierung von Mutanten teilbestimmt. Für einige mAk gelang dies jedoch noch nicht. Fünf unbekannte Epitope und eins, das durch Bindung des Antikörpers an ein Bromcyanpeptid von VP2 vorbestimmt war, sollten durch die Peptidbindung näher bestimmt werden. Zwei durch Sequenzierung bestimmte Epitope von monoklonalen Antikörpern dienten als Kontrolle. Abb. 4.28 zeigt eine Versuchsreihe mit monoklonalen Antikörpern.

Die ungleiche Schattierung des Untergrundes entstand durch Auflegen auf ein Küchentuch. Ich zeige trotzdem diesen Versuch, weil zu diesem Zeitpunkt auch noch von Peptid 2 Proben vorhanden waren, mit dem auch mAk reagierten. Außerdem sind die positiven Stellen mit Kreuzen versehen, die die Stärke der Reaktion direkt nach dem Versuch angeben. Die positiven, lilabraunen Flecken sind leider nicht dauerhaft zu sehen. Für die fotografische Aufnahme mußten die Streifen erneut angefeuchtet werden.

Die Felder der Streifen in der ersten Reihe 1-10 enthalten entsprechend die Peptide 1-10. Peptid 6 und 8 fehlen, was die diagonalen Striche anzeigen. In der unteren Reihe sind Feld 11-16 mit Tropfen von Peptid 11-16 versehen; 17-19 sind Negativkontrollen mit Puffern. Feld 20 gibt die

Nummer des Antikörpers an.

Die Peptidteststreifen wurden mit je 100µl Ascites in 10ml PBS mit Tween anstelle der oben verwendeten Primärseren inkubiert. Da die Ascites aus Mäusen stammten, folgte eine Sekundärinkubation mit Antimausserum (3.4.11).

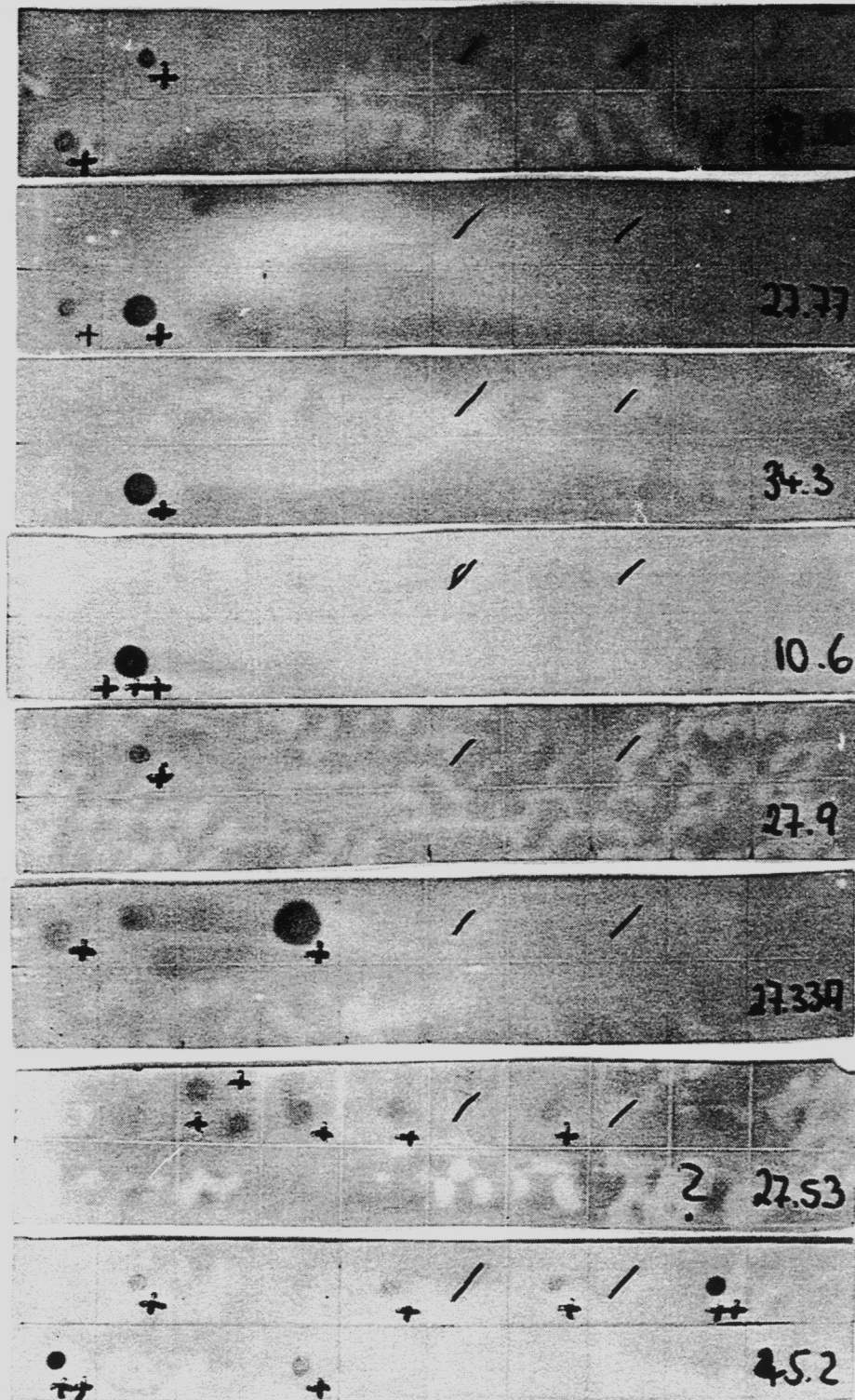


Abb.4.28 Immunreaktion monoklonaler Antikörper mit VP2-Peptiden

Von allen hier verwendeten Antikörpern war bekannt, daß sie VP2 binden. Tabelle 4.5 stellt die bekannten Bindungsregionen den gefundenen Peptidreaktionen gegenüber.

Tab.4.5 Bekannte Bindungsregion und gebundene Peptide

Ak-Nr.	AS-Nr.	Peptid-Nr.
27. 77	164-170 "Positivkontrolle"	11, 12
34. 3	164-170 "Positivkontrolle"	8, 12
27. 18	1-153 Welcher Teil?	2, 11
10. 6	?	12
27. 9	?	2
27. 33A	?	1, 4
27. 53	?	3a, 3b, 4, 5, 7
45. 2	?	2, 5, 7, 9, 11, 14

4.3.5. Auswertung der Peptidversuche

4.3.5.1. Hinweis auf eventuelle Kreuzreaktionen

Der enzymatische DOT-Test ist so empfindlich, daß der Nachweis von Kreuzreaktionen zu anderen Peptiden wahrscheinlich erscheint. Da die Peptide mit großer Wahrscheinlichkeit den Seren und Ak nur Teilepitope präsentieren, kommt es bei der Reaktion auf ausgesprochen wenige AS an. Schon drei homologe AS zwischen zwei Peptiden sind unter Umständen von Bedeutung. Aus diesem Grund wurde mit dem Programm PFAST (Pearson & Lipman 1988) die Homologie jedes der Peptide gegen jedes andere Peptid gesucht. Die Anzahl der Peptide, die nah beieinanderliegend 3-4 gleiche AS und dazu konservativ ausgetauschte AS haben, ist groß, deshalb sei hier nur ein Einzelfall abgebildet. Abb.4.29 zeigt die Homologie zwischen Peptid 4 und einem Teil von Peptid 15. Im Fettdruck sind die homologen AS dargestellt, im normalen Schriftbild die konservativ ausgetauschten; Kleinbuchstaben stehen für nicht homologe AS, P ist unterstrichen.

Abb.4.29 Homologie zwischen zwei Peptiden

Peptid 4	d SEAN <u>P</u> vdQp T ePdVAaCr
Peptid 15	SESS <u>P</u> ei <u>P</u> i T lTiA <u>P</u> mC

Im Gegensatz zu den lückenhaften Homologien kurzer Peptide gibt es zwischen den Virustypen lange durchgehende Homologien, die trotzdem nicht zur Kreuzreaktion der Ak zwischen den Typen führen.

Eine große Anzahl von Sequenzhomologien ließ sich zwischen den Peptiden finden (Antwort auf Frage 3). Für die folgende Tabelle 4.6 wurde angenommen, daß eine Kreuzreaktion stets schwächer ist als die eigentliche Reaktion; so konnte die Liste bedeutend gekürzt werden. Bei den in dieser Tabelle vorhandenen Peptiden könnte aufgrund von Sequenzhomologien Kreuzreaktion auftreten; bei anderen Peptiden ist sie wesentlich unwahrscheinlicher, aber auch nicht auszuschließen. Aufgenommen wurden Homologien von drei AS und mehr.

Tab.4.6 Mögliche Peptidkruzreaktion mit Seren oder Antikörpern

eventuell nur kreuzreagierendes Peptid	stärker reagierendes Peptid, das die Kreuzreaktion verursachen könnte
1	4
2	11 oder 12
11	4
13	2, 4, 14
15	4, 12

Bei den Peptiden 1, 2, 11, 13 und 15 muß also darauf geachtet werden, daß ihre immunologi-

sche Reaktion durch Antikörper gegen andere Peptide vorgetäuscht werden könnte. Die beiden sehr stark reagierenden Peptide 4 und 12 zeigen in Tests mit mAk keine Kreuzreaktion. Auch die immunologische Reaktion von Peptid 9 und 11 wurde noch einmal auf Kreuzreaktion überprüft, weil die Peptide bei der Isolation dicht beieinander lagen. Auch hier zeigte sich keine Kreuzreaktion.

4.3.5.2. Lage der antigenen Peptide auf VP2

Um die Antigenität der VP2-Peptide zu verstehen, ist es nötig, ihre Lage im VP2 und auf der Virusoberfläche zu kennen. Abb.A1 im Anhang 2 zeigt ein Stereobild von VP2. Abb. 4.20B zeigt die Lage von VP2 im Protomer so, daß das Protein parallel zur Ikosoederoberfläche in der Papierebene liegt. Diese Orientierung wird in Abb.4.30 beibehalten. Sie zeigt das ganze VP2 mit seinen antigenen AS in der EF-Schleufe und am C-Terminus. Daneben ist mit hellerer Struktur das zusätzliche Stück von VP1 eingefügt. "Außen" ist in dieser Darstellung zum Betrachter hin.

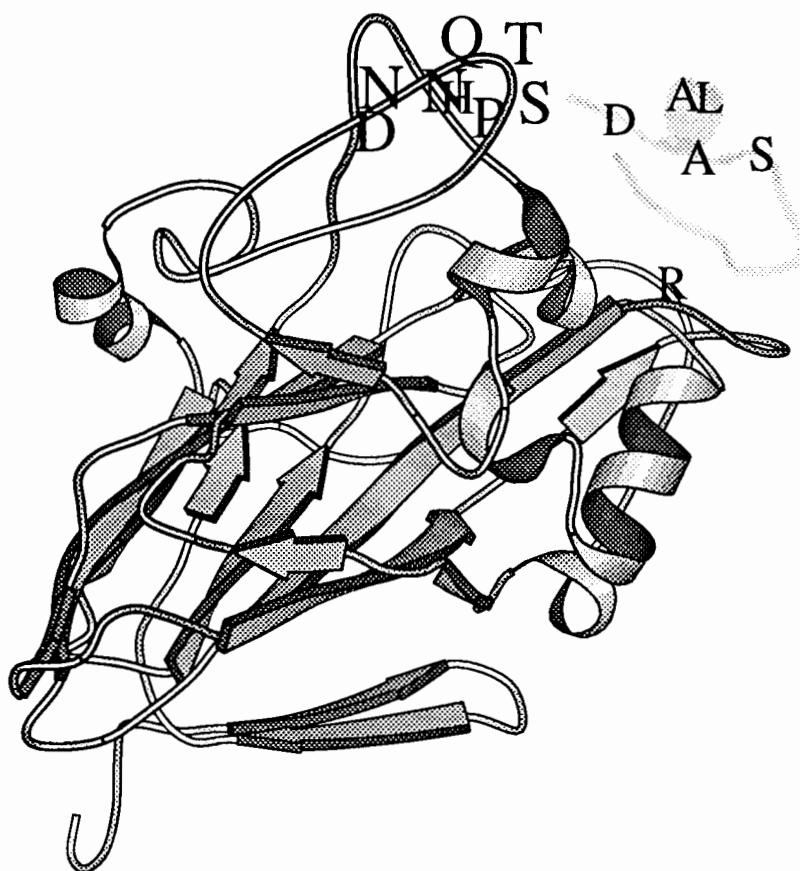


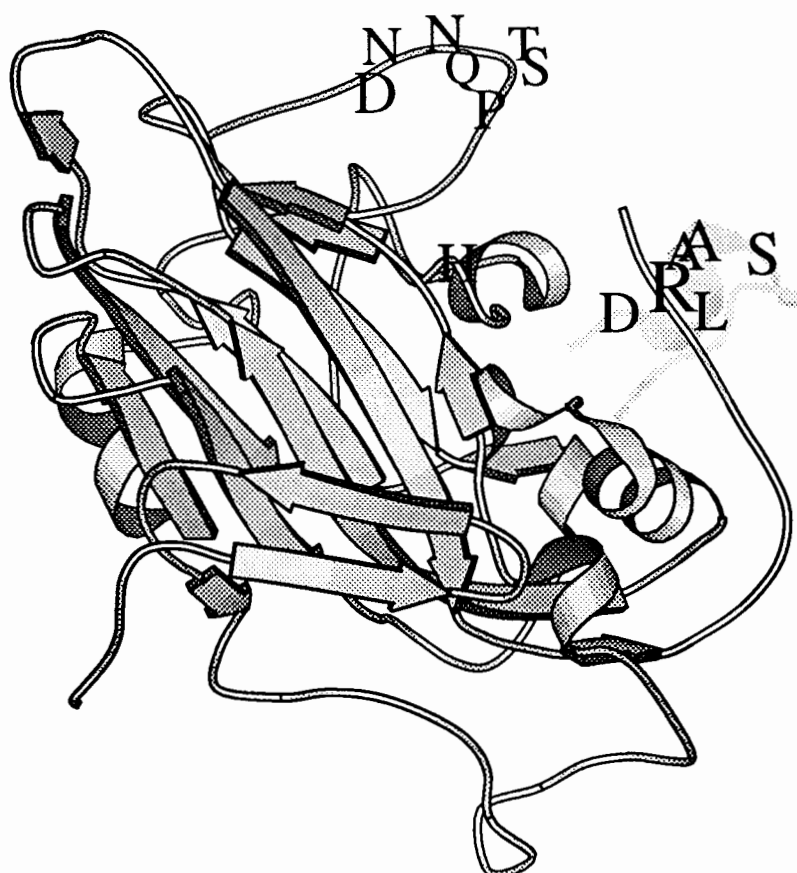
Abb.4.30 Aufsicht auf die Oberfläche von VP2 mit der antigenen Region 2

In der nächsten Darstellung, Abb.4.31, ist VP2 um -90° um die X-Achse gedreht. Das bewirkt,

daß nun die Oberfläche "oben" auf der Seite erscheint. Die inneren AS zeigen nach unten auf dem Blatt. Der Betrachter schaut tangential aus Richtung der zweizähligen Achse auf VP2. In dieser Darstellung wird die exponierte Lage der kontinuierlichen Sequenz auf der EF-Schleufe sehr deutlich. Das H derselben Schleufe liegt jedoch deutlich unterhalb der kontinuierlichen Sequenz. Es liegt zwar selbst an der Oberfläche, ist aber schwerer für Ak zugänglich. Werden in diese Abb.4.31 das H und die dem P2170 benachbarte AS 2171 als "ball and stick" in ihrer Räumlichkeit abgebildet, so entsteht der Eindruck, daß durch Austausch des H gegen eine andere AS leicht eine sterische Behinderung des äußeren Teils der EF-Schleufe auftreten kann. Der VP1-Anteil der antigenen Region 2 und R2270 liegen nicht so erhaben auf der Oberfläche, wie Abb.4.23B auch schon zeigte.

Abb.4.31 Seitenansicht von VP2

außen



innen

Die Abbildungen 4.32 und 4.33 zeigen VP2 aus den gleichen Blickwinkeln wie 4.30 und 4.31. In diesem Fall sind die Antigenitäten der Peptide eingetragen. Die dunklen Stücke stellen die sehr stark bindenden Peptide 4 und 12 dar, grau sind die Peptide, die stark reagieren, 2, 9, 11 und 14. Da fast alle übrigen Peptide auch schwach mit Seren reagieren, wurde auf ihre Hervorhebung verzichtet.

Abb.4.32 Aussicht auf die Oberfläche von VP2 mit Immunreaktion der tryptischen Peptide

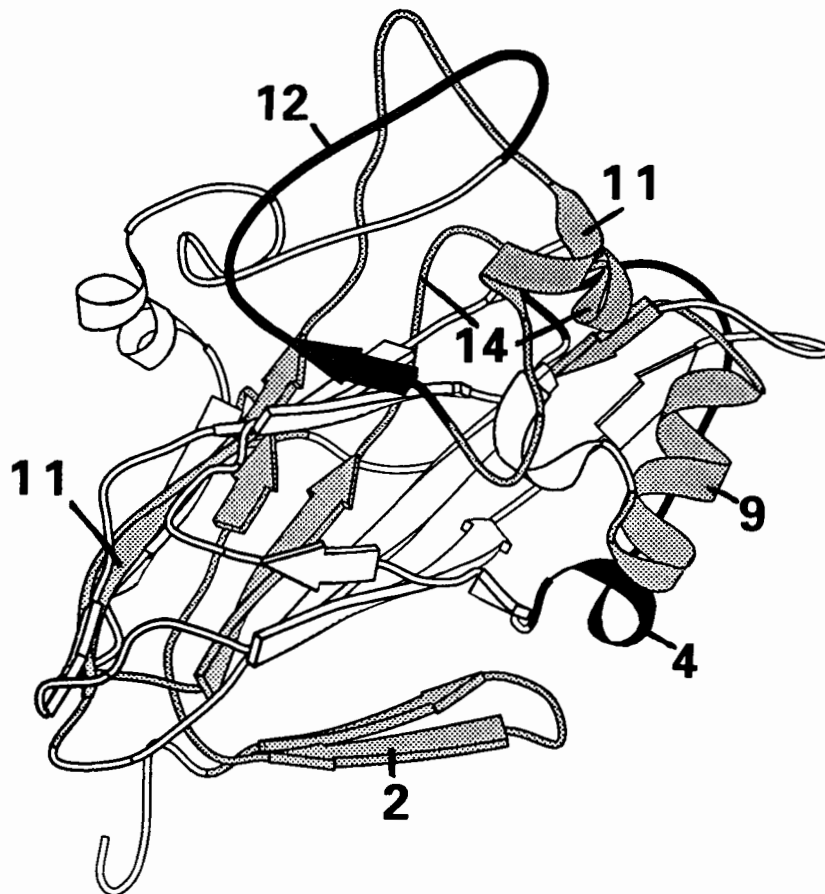
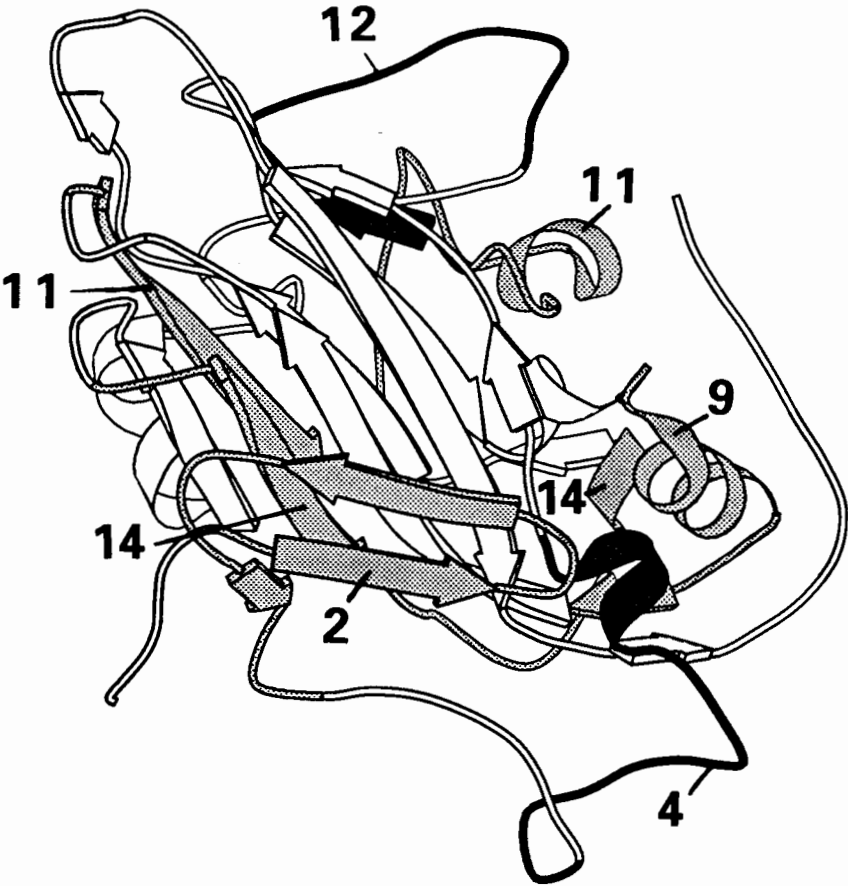


Abb.4.33 Seitenansicht von VP2 mit Immunreaktion der tryptischen Peptide
außen



innen

4.3.5.3. Analyse der immunreaktiven Peptide:

Peptid 1 reagiert sehr schwach. Es hat AS an der inneren Oberfläche und Homologie zu Peptid 4.

Peptid 2 hat 25 AS, 2013-2037, VLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGR. Keine der AS erreicht die äußere Oberfläche, keine ist als antigen bekannt; einige AS reichen an die innere Oberfläche. Hydrophilie und Flexibilität (siehe Abb.4.19) sind in der Mitte des Peptides vorhanden. Die letzten 4 AS bilden einen Knick laut Röntgenstruktur. Auch innerhalb des Peptides selbst gibt es laut der Computerprogramme Möglichkeiten für T-Zell-Epitope. Auffallend sind am Anfang die antiparallel gelegenen β -Stränge, die im Virusinneren liegen. Peptid 2 besitzt Homologien zu den stärker reaktiven Peptiden 11 und 12. Reagiert ein mAk mit Peptid 2 und 11 oder 12, so könnte seine Reaktion mit Peptid 2 eine Kreuzreaktion sein.

Peptid 3 reagiert schwach, obwohl es nur aus 6 AS besteht. Sämtliche Vorhersageprogramme stimmen mit der Immunogenität von Peptid 3 überein. Es liegt ganz auf der inneren Oberfläche.

Peptid 4 hat 19 AS, 2044-2062, DSEANPVDQPTEPDVAACR. Keine der AS erreicht die äußere Oberfläche, keine ist als antigen bekannt, trotzdem gehört Peptid 4 zu den beiden besonders stark reagierenden Peptiden. Es reagiert als einziges sogar mit Seren gegen heterologes Typ-2-Serum. Das Peptid besitzt im vorderen Teil ausgedehnte Hydrophobizität, Flexibilität und Knickwahrscheinlichkeit. Die ersten 4 AS gehören zu einem Knick laut Röntgenstruktur. Es endet mit einem helikalen Abschnitt, der Beginn eines folgenden T-Zellepitopes sein könnte. Innerhalb des Peptides ist nur wenig Helixwahrscheinlichkeit. Das Peptid ist daher isoliert wahrscheinlich nicht immunogen.

Peptid 5 hat 6 AS an der Virusoberfläche. Es reagiert nur schwach. Die antigenen AS T2072 und K2073 sind die letzten von Peptid 5. Sie gehören zur antigenen Region 3. Von den Vorhersagen zur Antigenität fehlt dem Peptid nur die Knickwahrscheinlichkeit.

Peptid 6 besteht nur aus 3 AS, die aber zur antigenen Region 3 gehören könnten.

Peptid 7 hat nur 5 AS und reagiert nur sehr schwach. W2078 ist außen und gehört zur Region 3.

Peptid 8 hat nur 6 AS und reagiert nur sehr schwach. Ihm fehlt Knickwahrscheinlichkeit.

Peptid 9 hat 16 AS, 2088-2103, DMGLFGQNMYYHYLGR. Drei AS des Peptides erreichen die Virusoberfläche, D2088, Q2094 und Y2098, sie sind nicht als antigen bekannt. Peptid 9 reagiert stark mit Seren. Das Peptid enthält nur an seinem Ende etwas Hydrophobizität, Beweglichkeit und Knickwahrscheinlichkeit. Laut Röntgenstruktur besteht es aus einer auffallend langen Helix, in deren Bereich auch die Oberflächen-AS liegen, und dem Beginn des β -Strangs D. (Durch die unterschiedliche Färbung der Sequenz ist der Pfeil für den Strang D in Abb. 4.32 und 4.33 in zwei Pfeile geteilt.) Innerhalb und außerhalb der Sequenz liegen mögliche T-Zell-Epitope. Nach Computervorhersagen sollte Peptid 9 nicht besonders antigen sein; Tyrosine sind als Teil von antigenen Sequenzen jedoch häufig.

Peptid 10 ist nicht antigen. Die Flexibilität in diesem Bereich ist gering.

Peptid 11 ist mit 37 AS sehr lang, 2117-2153, FHQGALGVFAVPEMCLAGDSNTTMMHT-SYQNANPGEK. Alle Vorhersageprogramme deuten auf eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für

Antigenität. Auch T-Zell-Epitope sind vorhanden. 11 AS liegen an der Virusoberfläche (siehe Abb.4.19); davon ist nur eine einzige, AS H2142, als antigen bekannt. Peptid 11 besteht aus dem im Virusinnern liegenden β -Strang E und etwa der Hälfte der großen EF-Oberflächenschleufe. Auch die helikale Struktur der EF-Schleufe und der Anfang eines Knicks, der in Peptid 12 weitergeht, gehören zu Peptid 11. Peptid 11 hat Homologie zum Peptid 12.

Peptid 12 hat 19 AS, 2154-2172, GGTFTGTFTPDNNQTSPAR. Bis auf F2161 liegen alle AS sehr auf der Oberfläche exponiert. G2155- T2160 könnten zur Region 3 gehören. Der Rest der AS liegt auf der großen EF-Schleufe. Alle 7 AS zwischen 2164 und 2170, DNNQTSP, sind als antigen bekannt. Alle Vorhersageprogramme sagen die Antigenität voraus. Am Anfang besitzt das Peptid einen kurzen β -Strang, der Rest ist ungeordnet. Peptid 12 gehört zu den zwei besonders stark reagierenden Peptiden.

Peptid 13 reagiert trotz seiner Länge und der 4 Oberflächen-AS am Anfang nur sehr schwach. In der Region der 4 AS fehlt die Hydrophilität. Auch auf T-Antigenität deutet nur ein Programm. Peptid 13 besitzt Homologien zu den stärker reagierenden Peptiden 2, 4 und 14.

Peptid 14 hat 22 AS, 2202-2223, und ist nur schwach antigen, was den Vorhersagen entspricht. Das Peptid liegt vollständig innen.

Peptid 15 reagiert schwach, obwohl 8 seiner AS die Oberfläche erreichen und 4 davon als antigen bekannt sind, 2236, 2240, 2242 und 2245. Sie gehören zur Region 3. Ein Teil der AS liegt im Bereich schwacher Vorhersage für Antigenität. T-Zell-Motive fehlen. Peptid 15 hat Homologien zu Peptid 4 und 12.

Peptid 16 reagiert sehr schwach. Drei der sechs AS liegen auf der Oberfläche, R2270 ist als antigen bekannt. Außer einer Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Sequenz in antigenen Regionen zeigt kein Programm Antigenität an.

Tab.4.7 Übersicht der Peptideigenschaften

Peptid Nr.	AS außen	Immun- reaktion	Hydro- philie	Knickwahr- scheinlichkeit	Flexibilität
1	-	(+)	c	B	-
2	-	+	c	b	F
3(6AS)	-	(+)	c	b	f
4	-	+++	C	B	F
5	6	+	c	-	f
6(3AS)	3		c	b	f
7(5AS)	5	+	c	b	f
8(6AS)	-	+	c	-	f
9	3	++	c	b	f
10	-	-	c	B	f
11	11	++	C	B	F
12	18	+++	C	B	F
13	4	(+)	c	b	f
14	-	+	c	b	f
15	8	+	c	B	f
16(6AS)	3	(+)	-	b	-
17(2AS)	2		-	-	-

Die Hydrophilie, Flexibilität und Knickwahrscheinlichkeit wurden Abb. 4.19 entnommen. Dabei gibt "C" jetzt an, daß mehr als fünf Fenster von 6 AS mit starker Hydrophilie in der Peptidsequenz vorhanden sind; "c" bedeutet, Hydrophilie ist vorhanden oder ein Fenster des Nachbarpeptides reicht in die Sequenz des Peptides hinein. "B" heißt, mindestens ein Fenster mit sehr starker Knickwahrscheinlichkeit ist in der Sequenz, "b" ein Fenster reicht mindestens in die Sequenz. "F" heißt, daß eine starke Flexibilität mit mehr als sechs Fenstern aus 7 AS in der Sequenz vorkommt; "f" Flexibilität ist vorhanden. Die T-Antigenität wurde nicht aufgeführt, da sich zeigte, daß sie praktisch, nach verschiedenen Programmen, auf der gesamten VP2-Sequenz vorhanden ist. Peptid 9 besitzt besonders viele Möglichkeiten für T-Zell-Epitope.

Die Tabelle zeigt deutlich, daß eine **Korrelation zwischen der starken Antigenität und der Hydrophilie, der Knickwahrscheinlichkeit und der Beweglichkeit** besteht, Peptide 4, 11 und 12. Knickwahrscheinlichkeit und Flexibilität für sich allein reichen nicht aus, einem Peptid Antigenität zu verleihen. Einige der Peptide dürften für eine starke Reaktion einfach zu kurz sein (siehe AS-Anzahl). Auch die Oberflächenlage von AS des Peptids reicht allein nicht aus, um starke Antigenität des Peptides zu erzeugen, Peptid 5, 13 und 15. Dagegen können Peptide, die ganz im Innern des Virus liegen, sehr wohl antigen sein, Peptid 2 und 14, sehr antigen sogar Peptid 4. Peptid 9 besitzt Peptid 4, 11 und 12 gegenüber auffallend geringe Hydrophilie, reagiert aber trotzdem stark. Ein Peptid, das nur Hydrophilie besitzt und keine der anderen Eigenschaften, gibt es unter den tryptischen VP2-Peptiden nicht.

Wie Tabelle 4.7 zeigt, läßt sich die Reaktivität der Peptide sehr gut mit den Daten aus Compu-

tervorhersagen erklären. Nicht immer treffen alle Vorhersageprogramme, aber eine größere Auswahl, siehe Abb. 4.19, ermöglicht doch eine Interpretation der Ergebnisse (Antwort auf Frage 4).

4.3.5.4. Die Kreuzreaktion von Peptid 4 mit heterologem Typ-2-Serum

Mit Typ-3-Seren kreuzreagierte kein Peptid. Peptid 4 reagierte jedoch stark auch mit Serum gegen Typ 2. Die Sequenz der Peptide ist in Typ 1 und 2 gleich. Da das Stück auch lang ist, 19 AS, sollte ein antigenes Stück in seiner Mitte dem Immunsystem bei beiden Typen ähnlich dargeboten werden können, so daß kreuzreaktive Ak gebildet werden. Auch die Sequenz von Typ 3 an dieser Stelle ist sehr ähnlich (vergl. Abb. 4.19). Die geringen Unterschiede bewirken nur leichte Änderungen in der Beweglichkeit, Hydrophilie und Knickwahrscheinlichkeit. Ein neues 4AS-T-Zell-Motiv entsteht am Ende von Peptid 4 in Typ 3, dafür ist ein gleiches Motiv hinter Peptid 4 verschwunden.

4.3.5.5. Homologie der stark reagierenden Peptide 4 und 12

Wie die Versuche mit mAk zeigen, sind Ak gegen Peptid 4 nicht kreuzreaktiv mit Peptid 12, und umgekehrt auch nicht. Die Untersuchungen der Homologie ergaben jedoch überraschender Weise Übereinstimmungen. Diese betreffen AS 2049-2056 von Peptid 4 und AS 2164-2170 von Peptid 12.

Peptid 4	dseanPvDQPTEPdvaacr
Peptid 12	ggftgtftPdNNQTSPar

Bedeutung der Buchstaben siehe Abb.4.29.

4.3.5.6. Auswertung der Bindung monoklonaler Antikörper an die VP2-Peptide

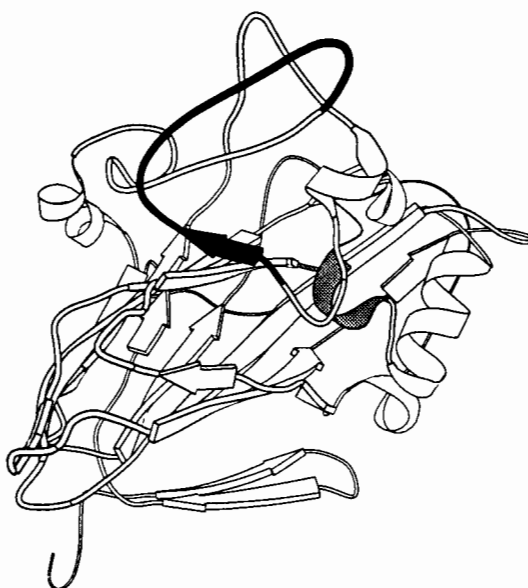
27.77: Die Region **2164-2170** war als Bindungsregion dieses Antikörpers angegeben. Die Sequenz liegt auf Peptid 12. Gleichzeitig reagierte der mAk auch noch mit **Peptid 11**. Da beide Peptide zusammen die große EF-Schleufe auf der Oberfläche bilden, und H2142 auf Peptid 11 auch als antigen bekannt ist, ist anzunehmen, daß das Epitop des Antikörpers in Richtung Peptid 11 weitergeht.

34.3: Die Bindungsstelle dieses Antikörpers wurde auch mit **2164-2170** angegeben, also auf Peptid 12. Zusätzlich band **Peptid 8**. Dieses Peptid liegt nicht an der Virusoberfläche sondern unter dem Ende von Peptid 11. Eine Ausdehnung des Epitopes von 34.3 in diese Richtung erscheint am intakten Virus unwahrscheinlich. Homologien besitzen die Peptide nicht (nur ein gemeinsames PD). Durch Verschieben der EF-Schleufe bei Denaturierung könnte Peptid 8 jedoch in der Nähe von Peptid 12 an die Oberfläche gelangen.

Abb.4.34 Immunreaktion des Antikörpers 34.3 (Hier getrennt aufgeführt, weil bei dieser Aufarbeitung Peptid 8 vorhanden war.)



Abb.4.35 Epitop des Antikörpers 34.3



27.18: Als Bindungsregion des monoklonalen Antikörpers war das lange Stück AS 2001-2153 angegeben. Die **Peptide 2 und 11** banden den Ak. Peptid 2 band stärker als Peptid 11. Bei einer Kreuzreaktion, die der Reaktionsstärke in Seren entspricht (siehe oben), wäre das Umgekehrte zu erwarten. Da die Peptide im VP2 jedoch so weit auseinanderliegen, daß ein gemeinsames Epitop nicht möglich scheint, muß 27.18 mit Peptid 2, das innen liegt, reagieren und kreuzreagiert mit Peptid 11. Die Homologie zwischen den Peptiden ist:

Peptid 2	VlQLtLGNSTi TTQ	AS 2013-2026
Peptid 11	VpEMcLAGDSn TTT	AS 2127-2140

Es läßt sich nicht entscheiden, ob die Viren zum Zeitpunkt der Entstehung des Antikörpers noch intakt waren. Wäre das der Fall, so wäre die Reaktion mit Peptid 2 eine Kreuzreaktion, die stärker ist, als die Ausgangsreaktion.

10.6: Das Epitop wurde neu bestimmt. Es liegt eindeutig auf **Peptid 12**. 10.6 reagiert nicht mit isoliertem VP2 (Wieggers, persönliche Mitteilung).

27.9: Das Epitop wurde neu bestimmt. Es liegt eindeutig auf **Peptid 2**. Dieser Ak zeigt, daß Ak-Bildung gegen ein innen liegendes Peptid möglich ist.

27.33A: Das Epitop wurde neu bestimmt. Der Ak reagierte mit Peptid 1 und 4. Da Peptid 4 deutlich stärker reagierte, und Peptid 1 mit Antikörpern gegen Peptid 4 kreuzreagieren kann - durch drei gleiche und drei konservativ getauschte AS- liegt das Epitop auf **Peptid 4**.

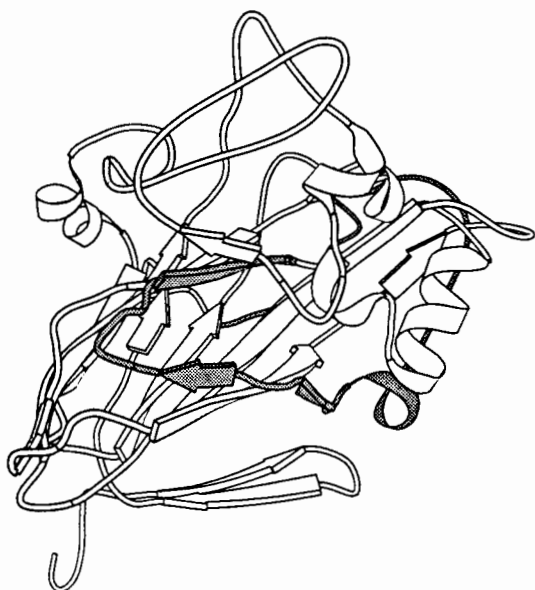
Peptid 1	<u>PNIEAC</u>	AS 2002-2007
Peptid 4	<u>PDVAAC</u>	AS 2056-2061

Dieses ist ein weiterer Ak, der deutlich ein Epitop im Inneren erkennt.

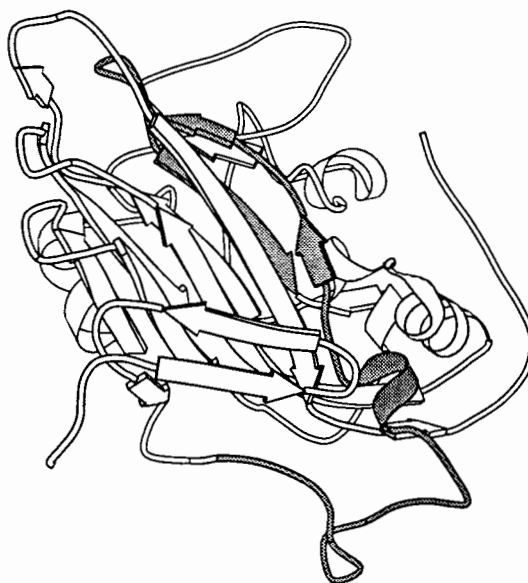
27.53: Das Epitop wurde neu bestimmt. Es enthält Peptid 3, 4, 5 und 7. **Peptid 3** besteht nur aus 6 AS; diese liegen alle innen, trotzdem reagiert das Peptid schwach mit 27.53. Bemerkenswert ist, daß die kurze Sequenz ein vollständiges 4AS-T-Zell-Epitop enthält. **Peptid 4** ist aus den Versuchen mit Seren (siehe oben) als hoch antigen bekannt, obwohl es auch vollständig innen liegt. Vor, in und hinter Peptid 4 liegen T-Zell-Epitop-Motive. **Peptid 5** besteht aus 11 AS, von denen sechs außen liegen, D2067, T2068, V2069, S2070, T2072 und K2073. T2072 und K2073 liegen in der BC-Schleife von VP2 und sind als Teil einer antigenen Region an der dreizähligen Achse bekannt. Peptid 6 ist zu kurz, um Ak zu binden, AS 2074-2076, ESR. Alle drei AS liegen außen. **Peptid 7** besteht aus nur 5AS, 2077-2081, trotzdem reagiert es mit 27.53. Die ganze Sequenz des Peptides ist ein 5AS-T-Zell-Motiv, GWWWK. Das erste W liegt außen. - Es fällt auf, daß das "Epitop" dieses Antikörpers eine durchgehende Sequenz von Peptiden überdeckt. Jedes der Peptide kann für sich reagieren. Die Strukturen der Peptide liegen jedoch in sehr unterschiedlichen Regionen. Ein Antikörper, der all diese Peptide erkennt, müßte ein ganz anders gefaltetes Protein vorfinden, als uns die Röntgenstruktur zeigt. Eine Mischung aus mehreren monoklonalen Antikörpern erklärt die fortlaufende Sequenz nicht.

Abb.4.36 Epitop des Antikörpers 27.53: a: in Oberflächenaufsicht, b: in Seitenansicht

a



b außen

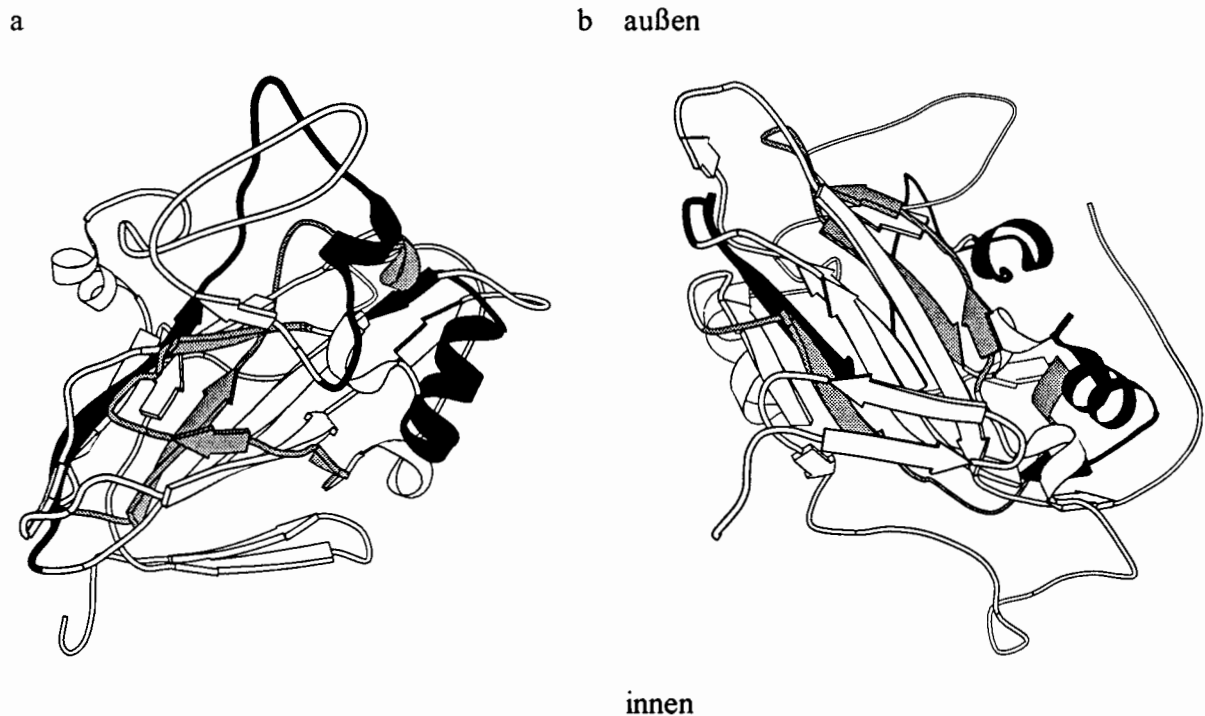


innen

(Um die Struktur nicht zu unterbrechen, wurden die drei AS von Peptid 6 und AS 2082 mit markiert.)

45.2: Das Epitop wurde neu bestimmt. Es ist sehr komplex. Der Ak reagiert mit Peptid 2, 5, 7, 9, 11 und 14. Die Reaktionen mit Peptid 9 und 11 sind deutlich stärker. Die Reaktion mit dem innen liegenden Peptid 2 läßt sich als Kreuzreaktion zu Peptid 11 erklären (siehe Ak 27.18). Die **Peptide 5 und 7** besitzen eine Reihe AS an der Oberfläche (siehe mAk 27.53), die ein Epitop auf der Oberfläche bilden könnten. Drei AS von Peptid 9 erreichen die Virusoberfläche, sie waren bislang nicht als antigen bekannt, D2088, Q2094 und Y2098. Sie liegen alle drei auf einer Helix, die Peptid 11 benachbart ist. Von den 11 AS von Peptid 11 an der Oberfläche ist erst H2142 als antigen bekannt, der C-Terminus liegt aber auch außen. **Peptid 9 und 11** liegen so, daß sie ein Epitop bilden können. Zwischen ihnen liegt in einer Vertiefung **Peptid 14** ganz im Virusinnern. Denaturierung könnte es zum Teil des Epitopes werden lassen. Die Lage auf dem Virus, laut Röntgenstruktur, läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß alle erkannten Peptide wirklich Epitop eines einzigen Antikörpers sind, es sei denn, Denaturierung würde sie näher zusammen bringen.

Abb.4.37 Epitop des Antikörpers 45.2 (Ansicht wie Abb.4.36)



4.3.5.7. Übersicht über die Peptidbindung der monoklonalen Antikörper

Die untersuchten Ak unterscheiden sich nicht nur in ihrer Bindung an VP2-Peptide, sondern auch in ihrem Neutralisationsverhalten und der Bindung an intakte Viren sowie H-Partikel (Wieggers, persönliche Mitteilung). Die Bindungstests wurden mit den Antikörpern in Lösung mit radioaktiven Viren durchgeführt. In Tabelle 4.8 sollen diese Eigenschaften den gefundenen gebundenen Peptiden gegenübergestellt werden.

Tab. 4.8 Übersicht der Antikörpereigenschaften

Ak Nr.	neutralisiert	bindet Virus	bindet H-Partikel	Ig	Epitop
34. 3	+	+	+	G(1)	Peptid 12 und 8 154-172, 82-87
27. 77	-	+	+	G(1)	Peptid 12 und 11 154-172, 117-153
45. 2	-	n.d.	+	M	Peptid 9, 11, 5, 7, 14 88-103, 117-153, 63-73, 77-81, 202-223
27. 18	-	-	+	G(1)	Peptid 2 (und 11), 13-37 (117-153)
10. 6	-	-	+	G(1)	Peptid 12, 154-172
27. 9	-	-	+	G(1)	Peptid 2, 13-37
27. 33A	-	-	+	G(1)	Peptid 4, 44-62
27. 53	-	-	-	G(1)	Peptid 3, 4, 5, 7 38-43, 44-62, 63-73, 77-81

1) Der neutralisierende Ak 34.3 erkennt neben der Region an der Oberfläche das innen liegende Peptid 8. Dies widerspricht der bislang angenommenen Hypothese, daß neutralisierende Ak nur die native Form der Viren erkennen.

2) Ak 27.77 neutralisiert dagegen nicht, aber erkennt Peptide, die außen liegende AS der Region 2 haben.

3) In der Gruppe von Ak, die nur denaturiertes Virus binden, gibt es sowohl solche, die die antigene Region 2 erkennen, 10.6, als auch solche, die andere Peptide binden. Die meisten erkennen auch innen liegende Strukturen.

4) Der nur noch VP2-bindende Ak 27.53 erkennt eine ganze Reihe von Peptiden, aber eine starke Reaktion ist nicht vorhanden.

Die Epitope der Ak 45.2 und 27.53 lassen sich nicht durch die Röntgenstruktur erklären.

Daraus ergibt sich die **Antwort auf Frage 5: Monoklonale Ak, die nicht neutralisieren, können die gleiche Stelle binden wie neutralisierende Ak, aber auch andere. Der virusbindende Ak 27.77 erkennt ein Epitop, das dem eines neutralisierenden Antikörpers entsprechen könnte.**