

# **Poliovirus, ein Antigen**

Untersuchungen zur Struktur und Antigenität des Erregers der Kinderlähmung

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christiane Bergmann  
aus Altena /Westfalen

Hamburg 1994

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Hamburg, den 17.06.1994



A handwritten signature in black ink, appearing to read "D. Noack".

Prof. Dr. D. Noack  
Sprecher des Fachbereichs Biologie

Für meinen Vater, der sich von seiner zehnjährigen Tochter eine Doktorarbeit wünschte,

für meine Mutter und meine geduldigen Kinder,

für Rolf.

## Inhaltsverzeichnis

	ZUSAMMENFASSUNG	I
	ABKÜRZUNGEN	III
1.	<b>LITERATURÜBERBLICK</b>	1
1.0.	Neue Viruserkrankungen	1
1.1.	<b>Poliovirus</b>	1
1.1. 1.	Die Krankheit Kinderlähmung	1
1.1. 2.	Umstrittene Folgen einer Poliovirusinfektion und eventuelle Persistenz	3
1.1. 3.	Bestimmung von Poliovirusstämmen	5
1.1. 4.	Chemotherapie gegen Polioviren	5
1.1. 5.	Klassifizierung der Polioviren	6
1.1. 6.	Die Eigenschaften von Polioviren	7
1.1. 7.	Die Impfung gegen Kinderlähmung	8
1.1. 8.	Poliovirus-Neurovirulenz	11
1.1. 9.	Verbesserung der Poliovakzine	13
1.1.10.	Poliofälle nach Einführung der Impfung	15
1.1.11.	IPV oder OPV?	17
1.1.12.	Die Struktur des Poliovirus	18
1.1.12.1.	Die Struktur des Poliovirusgenoms	19
1.1.12.2.	Chimären des Poliovirusgenoms	24
1.1.12.3.	Die Struktur der Poliovirus-RNS	26
1.1.13.	Infektion der Zelle durch Polioviren	30
1.1.13.1.	Bindung von Polioviren an die Zelle	30
	a) Der humane Rezeptor	30
	b) Der Mausrezeptor	32
1.1.13.2.	Die Aufnahme von Polioviren in die Zelle	33
1.1.13.3.	Veränderungen der Wirtszelle	34
1.1.14.	Vermehrung der Polioviren	36
1.1.14.1.	Verlassen der Virushülle	36
1.1.14.2.	Transkription, Translation und Proteinspaltung	37
	a) Transkription	37
	b) Translation	40
	c) Die viralen Proteasen	40
	d) Funktionen weiterer Virusproteine	43
1.1.14.3.	Die Morphogenese von Polioviren	43
1.1.15.	Die Proteinstruktur des Antigens Poliovirus	44
1.2.	<b>Antikörper</b>	50
1.2. 1.	Die Struktur von Antikörpern	53
1.2. 2.	Antigen-Antikörper-Wechselwirkung (mit Beispielen)	57
1.2. 3.	Welche Aminosäuren erkennt ein Antikörper?	62
1.3.	<b>Andere Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen</b>	64
1.4.	<b>Die Antigenität der Polioviren</b>	68



2.	<b>EINLEITUNG ZUM EXPERIMENTELLEN TEIL</b>	77
2.1.	<b>Ist Neutralisation von Polioviren Strukturänderung der Viren oder Aggregation?</b>	77
2.2.	<b>Wo liegen die antigenen Regionen von Polioviruspartikeln?</b>	77
2.3.	<b>Wie sieht eine antigene Region von Polioviruspartikeln aus?</b>	78
3.	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	79
3.1.	<b>Puffer</b>	79
3.2.	<b>Viren</b>	80
3.3.	<b>Seren und Antikörper</b>	80
3.3. 1.	Seren und Antikörper für Aggregationsversuche	80
3.3. 2.	Seren und Antikörper für Peptidtests	81
3.4.	<b>Methoden</b>	81
3.4. 1.	Virusproduktion und Virusaufarbeitung	82
3.4. 2.	Aufarbeitung von Seren und Antikörpern	82
3.4. 3.	Plaque-Test	82
3.4. 4.	pH-Titration	82
3.4. 5.	Spektrumauswertung: Trennung von Streuung und Absorption	82
3.4. 6.	Serumtitration	85
3.4. 7.	Auftrennung der Poliovirus-Strukturproteine	85
3.4. 8.	Herstellung tryptischer Peptide von VP2	86
3.4. 9.	Identifizierung der VP2-Peptide	86
3.4.10.	Bestimmung kleinster Aminosäuremengen durch OPA-Mercaptopropionsäure	87
3.4.11.	Dot-Test	89
3.4.12.	DAB-Ni-Methode	91
3.4.13.	Hauptsächlich verwendete Computerprogramme	93
3.4.13.0.	Verwendete Daten	93
3.4.13.1.	Programme zur Auswertung der optischen Dichte	93
3.4.13.2.	Programme zur Struktur- bzw. Antigenitätsuntersuchung	93
3.4.13.3.	Programme zur Homologiesuche	95
3.4.13.4.	Programm zur Darstellung räumlicher Strukturen	95
4.	<b>ERGEBNISSE</b>	96
4.1.	<b>Optische Untersuchungen von Virussuspensionen</b>	96
4.1.1.	Direkte Auswertung der Spektren von Virussuspensionen nach pH-Änderungen	96
4.1.1.1.	Säuretitration	96
4.1.1.2.	Base-Rücktitration	99
4.1.1.3.	Infektiosität in Abhängigkeit vom pH-Wert	100
4.1.1.4.	Hemmung der pH-Aggregation durch $\text{Ca}^{2+}$	101
4.1.1.5.	Hemmung der pH-Aggregation durch $\text{Mg}^{2+}$	103
4.1.1.6.	Die Wirkung von SDS, Saccharose und EDTA auf die pH-Aggregation	104
4.1.2.	Direkte Auswertung der Spektren von Virussuspensionen nach Serumzugabe	105
4.1.3.	Trennung von Streuung und Absorption in Spektren nach pH-Titrationen	107

4.1.3.1.	Streuung und Absorption bei Säuretitation _____	107
4.1.3.2.	Hemmung der Aggregation und Absorptionsänderung durch $\text{Ca}^{2+}$ _____	110
4.1.3.3.	Hemmung der Aggregation und Absorptionsänderung durch $\text{Mg}^{2+}$ _____	110
4.1.3.4.	Saccharose hemmt die Änderung der Absorption _____	110
4.1.4.	Trennung von Streuung und Absorption in Spektren nach Antikörperzugabe _____	111
4.1.4.1.	Streuung und Absorption nach Serumzugabe _____	111
4.1.4.2.	Streuung und Absorption nach Zugabe monoklonaler Antikörper _____	113
4.1.4.3.	Der Antikörper 7J6 _____	114
4.1.5.	Versuch einer Gegenüberstellung der aggregationsbedingten Anstiege der optischen Dichte mit den von anderen bestimmten Neutralisationstern _____	116
4.2.	<b>Einordnung der bekannten Epitope in die durch Computerdaten und Programme zu erhaltenden Daten (auch zur Suche neuer Epitope)</b> _____	117
4.2.1.	Epitope und Sequenzanalysen von Poliovirusproteinen _____	117
4.2.1.1.	Strukturdaten _____	117
4.2.1.2.	Antigenitätsdaten aus Antikörperbindungstests _____	118
4.2.1.3.	Peptide und ihre Immunreaktion _____	118
4.2.1.4.	Sequenzanalysen durch Computerprogramme _____	118
4.2.1.5.	Programme zur Erkennung von B-Zell-Epitopen _____	119
4.2.1.6.	Programme zur Erkennung von T-Zell-Epitopen _____	120
4.2.2.	Lage der als antigen bekannten Aminosäuren auf der Virusober- fläche _____	129
4.3.	<b>Versuche mit tryptischen Peptiden von VP2</b> _____	141
4.3.0.	Isolierung der tryptischen Peptide des Oberflächenproteins, VP2, von Poliovirus-wt 1 _____	141
4.3.1.	Wieviele Mole Peptid werden aufgetragen? _____	142
4.3.2.	Welche Peptide binden homologe Seren? _____	144
4.3.3.	Welche Peptide binden heterologe Seren? _____	146
4.3.4.	Welche Peptide binden monoklonale Antikörper mit unbekanntem Epitop? _____	147
4.3.5.	Auswertung der Peptidversuche _____	150
4.3.5.1.	Hinweise auf eventuelle Kreuzreaktionen _____	150
4.3.5.2.	Lage der antigenen Peptide auf VP2 _____	151
4.3.5.3.	Analyse der immunreaktiven Peptide _____	155
4.3.5.4.	Die Kreuzreaktion von Peptid 4 mit heterologem Typ-2-Serum _____	158
4.3.5.5.	Homologie der stark reagierenden Peptide 4 und 12 _____	158
4.3.5.6.	Auswertung der Bindung monoklonaler Antikörper an die VP2-Peptide _____	158
4.3.5.7.	Übersicht über die Peptidbindung der monoklonalen Antikörper _____	161
5.	<b>DISKUSSION</b> _____	163
5.1.	<b>Der Mechanismus der Neutralisation</b> _____	163
5.2.	<b>Untersuchungen der Aggregation und Virusstrukturänderung</b> _____	166
5.2.1.	Wirkungen der pH-Titration _____	166
5.2.2.	Wirkung der Serumtitration _____	167
5.2.3.	Wirkungen monoklonaler Antikörper _____	168
5.3.	<b>Computervorhersagen</b> _____	170

5.3.1.	B-Zell-Vorhersage _____	171
5.3.2.	T-Zell-Vorhersage _____	171
5.4.	<b>Die Lage der antigenen Aminosäuren auf dem Virion</b> _____	172
5.4.1.	Die antigene Region 1 _____	172
5.4.2.	Die antigene Region 2 _____	173
5.4.3.	Die antigene Region 3 _____	174
5.5.	<b>Die Immunreaktion von Peptiden</b> _____	178
5.6.	<b>Die Eigenschaften einer antigenen Region</b> _____	179
5.6.1.	Die Rolle des Prolins _____	180
5.7.	<b>Ausblick auf die Poliovirusimpfung</b> _____	182
6.	LITERATURVERZEICHNIS _____	184
7.	ANHANG _____	211
7.1.	Scatter, Programm zur Auftrennung von Streuung und Absorption	211
7.2.	Stereobilder _____	216

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

## Zusammenfassung

Durch verschiedene Untersuchungsmethoden sollte in dieser Arbeit die Bindung von Antikörpern an Polioviren untersucht werden.

### 1. Optische Untersuchungen der Aggregation und Struktur von Polioviren:

#### a) Aggregation und Struktur bei Änderungen des pH-Wertes:

Säuretitrationen von Poliovirus suspensionen zeigen, daß alle drei Virustypen auf verschiedene Art durch pH-Werte <4,5 aggregieren.

Die Poliovirusaggregation durch niedrigen pH-Wert ist vollständig reversibel bis pH2. Die Partikel verlieren ihre Infektiosität nicht.

Bei den Typen 1 und 2 greift das saure Milieu in die Struktur der Virionen ein. Die Poliovirus-RNS wird deutlich hypochrom.

Saccharose schützt Polioviren im Säuren vor Aggregation und Absorptionsänderung ( $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  schützen nicht).

#### b) Aggregation und Struktur bei Zugabe von Seren und Antikörpern:

Anders als bei pH-Wertänderungen führt die Aggregation durch Seren nicht zu einer Absorptions-(Struktur-)änderung der Viren. Die Änderung der optischen Dichte bei Serumzugabe beruht **allein** auf der Zunahme der **Streuung durch größere Aggregate**.

Die Kurven der optischen Versuche mit monoklonalen Antikörpern gleichen denen mit Seren. IgM und IgG aggregieren Polioviren, ändern nicht die Virusstruktur. Eine Ausnahme zeigt der Antikörper 7J6.

Die Serummenge zum Erreichen der Neutralisation entspricht der Menge, die zum Auslösen der Aggregation nötig ist.

### 2. Einordnung der bekannten antigenen Aminosäuren in bekannte Poliovirusdaten:

a) Die Strukturdaten und Ergebnisse verschiedener Vorhersageprogramme zur Antigenität wurden entlang der Poliovirussequenzen angeordnet.

b) Die Lage der antigenen Aminosäuren auf dem Virion wurde durch Strukturzeichenprogramme geklärt.

Beide Darstellungsweisen konnten zur Interpretation alter und neuer Ergebnisse benutzt werden und können als Hinweis für weitere Untersuchungen dienen.

Manche durch Resistenzmutanten gefundene "antigenen" Aminosäuren liegen **nicht an der Oberfläche**.

Starke Antigenität ist mit **Hydrophilie, Knickwahrscheinlichkeit und hoher Beweglichkeit** korreliert.

### 3. Bindungsversuche mit tryptischen Peptiden von Virusprotein 2:

a) Die Lage antigener Peptide wurde geklärt.

b) Die antigene Bindungsregion für einige Antikörper wurde vorbestimmt.

Im Test mit aufgetropften Peptiden können durch meine **DAB-Nickel-Färbung** weniger als 10pmole nachgewiesen werden.

In polyklonalen Seren sind Antikörper gegen Peptide des Proteins enthalten, die vollständig **innen** liegen.

Computerprogramme finden eine große Anzahl von **Homologien von mehr als drei Aminosäuren** zwischen den relativ kurzen VP2-Peptiden, so ist mit Kreuzreaktionen zu rechnen.

Die Reaktivität der Peptide läßt sich durch die Vergleiche mit mehreren **Vorhersageprogrammen** erklären. Stark antigene Regionen benötigen **Hydrophilie, Flexibilität und eine durch Knicke präsentierte Struktur**.

Die antigenen Regionen aller verwendeten Antikörper konnte vorbestimmt werden. Bei anderen Antikörpern mit "bekannter Region" konnte das Epitop erweitert werden. Eine strenge Aufteilung der Epitope nach anderen Eigenschaften der Antikörper gibt es nicht. **Monoklonale Antikörper, die nicht neutralisieren, können die gleiche Stelle binden wie neutralisierende Antikörper; andere nicht neutralisierende Antikörper erkennen aber auch andere Sequenzen.** Ein virusbindender, nicht neutralisierender Antikörper bindet aber auch ein Epitop, das dem eines neutralisierenden Antikörpers entspricht.

DARAUS FOLGT:

**I. Der größte Teil der Antikörper in Seren verändert nicht die Struktur der Polioviruspartikel, sondern aggregiert sie.**

**II. Die Auflistung von Eigenschaften entlang der Poliosequenz kann zur Erklärung der Antigenität genutzt werden, ebenso die Lage der antigenen Aminosäuren auf der Struktur.**

**III. Nicht neutralisierende Antikörper erkennen dieselben Sequenzen wie neutralisierende (und zusätzliche).**

**IV. Auch Sequenzen im Virusinneren werden von Antikörpern erkannt.**

## Abkürzungen

Ag	Antigen
AIDS	erworbene Immunschwäche
Ak (Ab)	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
BCA	Bicinchonic Acid
BSA	bovines Serumalbumin
C-antigen	Antigenität leerer Poliovirus Kapside (coreless)
Cap	proteingebundene 5'-Struktur eukaryotischer RNS mit methyliertem Guanosin
cDNS (cDNA)	zu Versuchszwecken kopierte Deoxyribonukleinsäure
CDR	complement determining region (Region des Antikörpers, der das Antigen berührt)
CPE	zytopatischer Effekt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
D-antigen	Antigenität dichter Polioviren (dense, meist synonym zu N benutzt)
DESY	Deutsche Elektronen-Synchrotron-Anlage
DI	defective interfering particles (Polioviren, denen Teile der Strukturregion fehlen)
DNS (DNA)	Deoxyribonucleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.coli	Escherichia coli (Darmbakterium, zur Genvermehrung benutzt)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Elongations-Initiationsfaktor
eIPV	verstärkter (enhanced) Poliovirus-Totimpfstoff
ELISA	enzymgebundener Immuntest auf Mikrotiterplatten
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FE	Fluoreszenzeinheiten
h	Stunde(n)
H-antigen	Antigenität von Polioviren nach Hitzebehandlung (heated)
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	wahrscheinlicher Erreger der humanen erworbenen Immunschwäche (AIDS)
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRV	humanes Schnupfenvirus (Rhinovirus)
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgA (G, M...)	Immunglobulin A (G, M...)
IPV	inaktivierte Poliovakzine (Totimpfstoff, der gespritzt wird, nach Salk)
kD	Kilodalton(s)
KLH	(keyhole limpet hemocyanin) Trägerprotein für Peptide

LamB	Protein der äußeren Zellmembran von Escherichia coli
$\lambda$	Wellenlänge
mAk	monoklonale(r) Antikörper
Mah	Mahoney (Poliovirus-Typ-1-Wildstamm)
MEF-1 (MEF <sub>1</sub> )	Poliovirus-Typ-2-Wildstamm
Mgew	Molekulargewicht
MHC-1	Gewebeverträglichkeitsfaktor 1, auf allen Zellen
MHC-2	Gewebeverträglichkeitsfaktor 2, auf Zellen des Immunsystems
min	Minute(n)
MKS	Maul- und Klauenseuche-Virus (engl. FMDV)
MNt	Mikroneutralisation (vollständige Neutralisation, Endpunktbest. auf Mikrotiterplatten)
mRNS	Botennukleinsäure (messenger)
N-antigen	Antigenität nativer Polioviren
NC	Nitrozellulose (-folie)
NCR	nichtkodierende Region
nd	nicht bestimmt
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NS	Nukleinsäure(n)
Nt-Titer	Neutralisationstiter (50% Neutralisation)
OD	optische Dichte
ODE	normierte Einheiten der optischen Dichte
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
OPV	orale Poliovirusvakzine (Schluck-, Lebendimpfstoff, aus abgeschwächten Viren nach Sabin)
PCR	Polymerasekettenreaktion (zur Nukleinsäurevermehrung)
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
Plaque	Loch im Zellrasen durch Virusvermehrung
PBE	plaquesbildende Einheiten
PBS	phosphatgepufferte isotone Salzlösung
PV	Poliovirus
PVR	Poliovirusrezeptor
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RGD	Rezeptorbindungsstelle des MKS
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNase	Ribonuklease
RNS (RNA)	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge (Svedberg-Einheit)
Sab	Sabinstamm
SDS	Natrium(Sodium)-Dodecylsulfat

SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIgA	sekretorisches IgA
SIV	Simian Immundefizienz Virus (Affenvirus, dem HIV ähnlich)
SV40	Simianvirus 40
TFA	Trifluoressigsäure
TCA	Trichloressigsäure
TCID <sub>50</sub>	Dosis an Virus, die die Hälfte aller Zellen tötet
TMV	Tabakmosaikvirus
TOPV	trivalente orale Poliovakzine
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
V	Virus
VP(s)	Virusprotein(e)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Poliovirus-Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
14S	subvirales Partikel aus fünf Pentameren



## 1. Einblick in die Literatur von Koch & Koch (1985) bis 1993

### 1.0. "Neue" Viruserkrankungen

Immer wieder treten neue Viruskrankheiten auf, die viele Todesopfer fordern (Morse 1991). Deshalb ist es wichtig, Grundlagenforschung an den Viren durchzuführen, die schon bekannter sind, damit die Erkenntnisse über die erforschten Viren auf neue übertragen und für die Entwicklung von Impfungen und Medikamenten genutzt werden können; damit die Verbreitung neuer Viren gestoppt werden kann; damit der Eingriff des Menschen in Natur, Landwirtschaft und Verkehr nicht weitere Epidemien zur Folge hat, wie z.B. die Schweine-Enten-Fisch-Kultur bei Influenza, die Injektionsnadel bei HIV, die Entwaldung für mückenübertragbare Viren und viele andere mehr (Morse 1991). Es kommt vor, daß Viren den Wirt wechseln. Sie gleichen sich dann ihrem neuen Wirt an; das kann schnell geschehen, wie bei Influenza, kann aber auch Jahrzehnte oder unbestimmte Zeit dauern. Sehr häufig sind menschliche Aktivitäten wichtiger Grund für eine neue Verbreitung, die dann sehr rapide fortschreiten kann. "Wenigstens über die Zeitspanne der menschlichen Geschichte haben sich neue Pathogene wahrscheinlich nicht neu entwickelt, sondern sie sind existierende Agentien, die neues Territorium erobern." (Morse 1991) Die Pest war ursprünglich eine bakterielle Infektion von Nagern. Masern- und andere Viren sollen, bevor sie den Menschen infizieren konnten, Krankheiten von Haustieren gewesen sein.

### 1.1.0. Poliovirus

#### 1.1.1. Die Krankheit Kinderlähmung

Kinderlähmung, auch Poliomyelitis oder Polio, plagte die Menschheit schon im antiken Ägypten, wie die Darstellung auf einer ägyptischen Stele von etwa 1300 v. Chr. zeigt (Minor 1992). "polios" heißt grau, "myelos" Mark. Am Ende des 19ten Jahrhunderts (industrielle Revolution) wurde aus der vorwiegend endemischen Krankheit eine nun sehr dramatisch verlaufende Epidemief orm. Diese gehörte zu den gefürchtetsten infektiösen Krankheiten der ersten Hälfte unseres Jahrhunderts. Viele Bewohner der Industriestaaten glauben, Polio sei durch die Impfung besiegt, doch die Viren sind noch lange nicht ausgerottet. Paradoxerweise werden heute durch Impfviren hervorgerufene Fälle registriert (1 Fall pro 530 000 Erstimpfungen) (Minor 1992), und aus den Entwicklungsländern werden Wildtypviren zu uns importiert. In der 3. Welt erreichen die Krankheits- und Todesraten teilweise heute noch die Höhe, die bei uns zur Zeit der höchsten Ansteckung üblich war. Die Weltgesundheits Organisation (WHO) zählte 1990 etwa 116 000 Fälle. Nicht alle werden gemeldet (Aleksandrov 1990). Vier von tausend Schulkindern in den Entwicklungsländern bekommen heute noch paralytische Poliomyelitis. (Rotbart 1991, Wright et al. 1991, Schoub et al. 1988, Doerr & Maass 1991) Die Geschichte der Krankheit ist gut beschrieben (Koch & Koch 1985, Uhlig 1991, McKusick 1992).

Der Erreger der Kinderlähmung ist das Poliovirus (PV)(Semler & Ehrenfeld 1989; Rossmann & Johnson 1989; Stanway 1990), das meist Kinder infiziert. Es gibt drei Poliovirustypen (PV1,

PV2, PV3). Die Inkubationszeit schwankt zwischen den Poliosträmmen. Sie dauert 10-14 Tage. Zuerst sieht die Krankheit aus wie eine Erkältung. Polioviren vermehren sich klinisch und subklinisch 1-2 Wochen (Borzakian et al. 1992) im Hals-Nasen-Ohren-Trakt. Nachdem sie den Darmtrakt besiedelt haben, wandern sie in die Peyerschen Plaques und mesenchymale Lymphknoten. Nach Aussaat in weitere Lymphknoten vermehren sie sich stark, so daß es zur Virämie kommt. Jetzt befallen die Viren das Nervensystem. Die Wirkung der Viren auf Nervenzellen reicht von leichten Veränderungen bis zur vollständigen Zerstörung. Leicht betroffene Zellen können sich vollständig erholen. Am stärksten vermehren sich Polioviren in Motoneuronen des Rückenmarks (Vorderhornzellen). Das Gewebe erscheint durch die Infektion grau, daher der Name Polio. In schweren Fällen werden auch große Teile des Gehirns befallen. Zwischen der Infektion und dem Beginn von Lähmungen vergehen etwa elf Tage. In etwa 1% aller Infektionen (Nathanson & Horn 1992) treten unsymmetrische, schlaffe Lähmungen der Arme und Beine und der Atemmuskulatur auf. In den meisten Fällen folgt der Infektion eine fieberhafte Erkrankung wie bei anderen Enteroviren mit Übelkeit, Erbrechen, Benommenheit, Kopfweh oder einfach Halsschmerzen. (Almond 1987) Die Viren bleiben für einige Wochen im Darm (Borzakian et al. 1992). Eine maximale Heilung von Patienten mit paralytischer Poliomyelitis tritt etwa 1-2 Jahre nach der Krankheit durch ausdauerndes Trainieren der Muskulatur ein (Ramlow et al. 1992).

Die Infektion führt zu lebenslangem Schutz. Bei erkrankten Erwachsenen verläuft die Krankheit drastischer. Der Ausgang einer Infektion durch Polioviren hängt vom Alter, Geschlecht, der genetischen Veranlagung, dem humoralen und zellulären Immunstatus und anderem mehr ab. (Contreras et al. 1992) Amyotrophische laterale Sklerose tritt unter Poliopatienten statistisch seltener auf als in der übrigen Bevölkerung (Armon et al. 1990); PV scheint vor dieser Krankheit zu schützen. Cross (1989) schildert, wie es den paralytischen Poliopatienten von 1945 auf St. Helena 40 Jahre nach der Epidemie geht. 78% aller Kinderlähmungspatienten entwickeln späte funktionelle Verschlechterungen, bei Atmungsbeschwerden sogar 99%. Es kommt zu nächtlicher Hypoventilation, manchmal mit progressiver Skoliose; einige brauchen wieder Atmungshilfe. Die Muskelschwäche nimmt zu. Ein Patient bekam zum zweiten Mal Paralyse nach einer Polioimpfung. Sowohl die Verkrüppelungs- als auch die Todesfälle entwickeln sich häufiger bei Kinderlähmung im Erwachsenenalter. Atmungsschwierigkeiten sind bei den bis Zwanzigjährigen häufiger. Fortschreitende Skoliose entwickelt sich vor allem bei Patienten, die vor einem Wuchsspur, in einer Wachstumsphase standen. (Howard et al. 1988)

Die Annahme, daß paralytische Polio durch eine Mandeloperation begünstigt wird, beruht wahrscheinlich nicht auf Viruseintritt nach Schädigung von Nervenfasern, sondern weil die Patienten weniger IgA haben, was auch die erhöhte Poliorate Jahre nach einer Mandelentnahme erklärt. Ein Zusammenhang zwischen Mandeloperationen und paralytischer Poliomyelitis ist jedoch nachweisbar. Körperliche Anstrengung scheint die Infektion sehr zu begünstigen. (Wyatt 1990, Aycock 1992)

Polioviren sind nur für Primaten infektiös. Affen, denen virulente Viren ins Bein geimpft werden, zeigen an diesem Bein auch Paralyse. Die Viren wandern mit 2,4mm/Stunde an den Nerven entlang und zerstören die entsprechenden Motoneuronen. (Wyatt 1990)

Moderne virologische Methoden (Dernick 1989a, Dernick 1989b, Dernick & Heukeshoven 1989, Dernick & Rziha 1989, Dernick et al. 1989) haben in den letzten Jahren zu einer rasanten Zunahme der Information über Polioviren geführt.

Für Typ 2 PV gibt es ein Mausmodell. Die Tiere können durch Injektionen von Lansingviren direkt ins Gehirn infiziert werden. Ihre Immunreaktion ist untersucht worden. Erst nach zwei Monaten bildeten die Tiere neutralisierende Ak, aber schon nach einem Tag bildeten sich in gelähmten und ungelähmten Mäusen IgG- und IgM-Ak gegen Kapsidproteine, Proteinvorstufen und Nichtstrukturprotein. (Jubelt & Lipton 1987, Jubelt et al. 1991) Die Erkrankungen der Maus durch Typ 2 sehen je nach Mausstamm sehr verschieden aus (Contreras et al. 1992).

Wie Stuhlproben von Patienten zeigen, zirkulierte Typ 2 wt trotz flächendeckender Impfungen noch nach 25 Jahren in der Natur (Couderc et al. 1989b). Aus Stuhl von gesunden Kindern und Kläranlagen lassen sich sowohl hoch neurovirulente Prototypenstämme wie Mahoney- und Saukettstämme isolieren als auch Impfstämme und Stämme mit allen möglichen Übergängen in der Neurovirulenz (Verlinde & Wilterdink 1970, Patriarca et al. 1988).

### 1.1.2. Umstrittene Folgen einer Poliovirusinfektion und eventuelle Persistenz

Es wird spekuliert, ob Polioviren (wie Röteln, Masern, Keuchhusten und Diphtherie auch) ein Grund für Schizophrenie sind. Auffallend ist eine höhere Schizophrenierate bei Personen, die im Winter geboren wurden. Die Jahreszeiten der Polioinfektion sind Sommer und Herbst (Koch & Koch 1985). Es wird eine prenatale Polioinfektion als Ursache angenommen, der eine weitere Infektion eines anderen Types später folgt. Dies betrifft z.B. indische Immigranten in Großbritannien. (Eagles 1992)

In den letzten Jahren erscheinen in steigendem Maße Artikel über Spätfolgen von Poliovirusinfektionen (Post Polio Syndrom, PPS). Ehemalige Patienten klagen 30-40 Jahre nach der Infektion über auffällige Müdigkeit, Schläpheit, Schlafstörungen, Empfindungsstörungen, orthopädische Deformationen, fortschreitende Atembeschwerden durch Brustkorbdeformationen, reduzierte Ausdauer, Kälteempfindlichkeit, Gelenkschmerzen, Muskelkrämpfe, Verlust der normalen Rumpfbeugung, Schwierigkeiten beim Treppensteigen, Essen und Sprechen, Schläpheit der Muskeln und Beeinträchtigung von Husten und Schlucken. Das Syndrom kann gut von anderen degenerativen Krankheiten unterschieden werden, unter denen Polioüberlebende leiden. Die Patienten weisen elektromyographische Veränderungen auf (Held et al. 1991). Beim PPS soll der IgM-Spiegel der intrathecalen Immunantwort gegen Polioviren erhöht sein, und die Cerebrospinalflüssigkeit enthält mehr Interleukin-2 und löslichen Interleukinrezeptor (Sharief et al. 1991, Rosenberg & Hamparian 1992). IgM-Antikörper ohne begleitende IgG-Antwort sind in chronischen viralen Infektionen des Nervensystems nachgewiesen worden (Sharief 1992). Andere Autoren bestreiten diese Daten und weisen durch PCR auch keine PV-RNS in Biopsiematerial nach (Melchers et al. 1992). - Häufig brauchten die Betroffenen während der akuten Kinderlähmung künstliche Beatmung und waren älter als zehn. Das Bild der PPS ist nicht einheitlich, zumindest gibt es zwei verschiedene Arten. Die erste betrifft Patienten, die auf Grund von Behinderungen durch die ursprüngliche Erkrankung geschwächt

sind, so daß die Folgen fortschreiten. Die zweite Gruppe zeigt ein heterogenes Bild, oft mit langsam fortschreitender einseitiger amyotropher Sklerose. Bei ihnen scheint der Prozess der wechselnden Denervation und Reinnervation der Muskelfasern zu ungunsten der Versorgung zu laufen. Es bestehen Anzeichen für eine aktiv fortschreitende Muskelentnervung. Der Prozess erinnert an ein zu frühes "Ausbrennen" in der Antwort auf normale Alterungsprozesse. Die Erkrankung tritt lange nach der Poliomyelitis auf und hängt von der individuellen Veranlagung ab. Es ist schwer, die Symptome der PPS von normalen Alterserscheinungen abzugrenzen. Poliopatienten, die Lähmungen im Oberkörper hatten oder an einer Skoliose leiden, zeigen jedoch einen erhöhten  $\text{CO}_2$ -Gehalt im arteriellen Blut, ihre Vitalkapazität ist reduziert; der Druck von Ein- und Ausatmung ist verringert (Dolmage et al. 1992). Die Aktionspotentiale der Motoneuronen dauern bei PPS länger. Die Zeit der Anspannung ist kürzer. Poliopatienten bekommen ihre volle Muskelkraft nach Anstrengung wesentlich langsamer wieder als Vergleichspersonen. Ihr Stoffwechsel ist deshalb leichter erschöpft, und sie erholen sich schlechter von Anstrengungen. Die Muskelfasern, die sonst nur für schnelle, plötzliche Bewegungen eingesetzt werden, müssen bei Poliopatienten mit die Funktion normaler Muskelbewegungen übernehmen (Borg et al. 1989). Bei vielen beträgt die Muskelkraft nur noch 50% der normalen. Duchenne entwickelte im letzten Jahrhundert Methoden zur elektrischen Messung von neuromuskulären Erkrankungen wie Polio. Bis heute reichen die Methoden jedoch nicht aus, um PPS eindeutig von anderen Muskelkrankungen zu trennen. Die Übertragung von Impulsen vom Nerv auf den Muskel ist bei Patienten gestört, die Poliomyelitis hatten, bevor sie zehn Jahre alt wurden. Ein Zusammenhang mit neu auftretendem PPS läßt sich jedoch nicht zeigen, weil alle Patienten diese Anomalie haben. Die Untersuchung ergibt jedoch eindeutig Hinweise auf die überstandene Poliomyelitis, so können andere Muskelkrankheiten ausgeschlossen werden. "Viele Polioüberlebende empfinden die normalen Aktivitäten des Lebens als einen schrecklichen Job. Dies ist nicht die Erfindung ihrer Einbildungskraft... Wir haben ein Problem größter Ordnung für tausende von nun älter werdenden Post-Polio-Patienten." Es ist noch offen, ob es zusätzlich eine verzögerte PV-Infektion des ZNS nach Jahren gibt (Martyn et al. 1988). (Jones 1991, Reincke & Nelson 1990, Rodriguez & Agre 1991, Dean et al. 1991, Sonies & Dalakas 1991, Maselli et al. 1992, Miranda-Pfeilsticker et al. 1992, Dalakas & Illa, Windebank et al. 1991, Martyn 1990, Raymond 1986, Ramlow et al. 1992, Birk 1993)

Offensichtlich gibt es eine ganze Menge von Müdigkeitserscheinungen, die durch Viruserkrankungen hervorgerufen werden, u. a. wird auch Cocksackie B als Erreger diskutiert (Jamal & Miller 1991, Komaroff 1988).

Persistente Infektionen (Oldstone 1989) sind mit allen drei PV-Typen möglich (Sharief 1992). Persistente PV-Infektionen durch die Wildtypen 1 und 2, nicht durch die Sabinstämme, können in menschlichen Neuroblastomazellen etabliert werden (Agol et al. 1989). In diesen Neuralzellen mutiert das Virus stark, es wird 1 Mutation bei 210 Nukleotiden gefunden. Die mutierten Stämme infizieren dann auch andere Zellen persistent; diese Zellen weisen viele Mutationen auf, die nicht oder falsch in Protein übersetzt werden, d.h. die wahrscheinlich die Struktur der RNS betreffen (Borzakian et al. 1993). Eine dieser sekundär persistent infizierten Zelllinien zeigte kein oder wenig Abschalten des Zellstoffwechsels (Lloyd & Bovee 1993). Persistente Infektion scheint ein Gleichgewicht zwischen abortiver und lytischer Infektion zu sein. Alle drei Typen

änderten dabei ihre antigene Region 1 (Im Englischen wird der Begriff "site" = Stelle verwendet) (Colbère-Garapin et al. 1989). Die Untersuchungen an Neuroblastomazellen sind wichtig, weil attenuierte PV-Stämme in immundefizienten Kindern eine chronische, progressive Infektion des ZNS hervorrufen können. (Pelletier et al. 1991) - Ein spätes Post-Polio-Syndrom oder neue Verschlechterung der Motoneuronen erscheint etwa 30 Jahre nach der Infektion. Eine der Hypothesen für dieses Syndrom ist auch die persistente Infektion. Es gibt eine intrathecale Immunantwort beim PPS, deshalb ist es wichtig zu wissen, ob PV in Neuronen oder anderen Zellen persistieren kann. Die Persistenz von Typ 1 hängt *in vitro* von der Stärke der Infektion ab; außerdem tritt sie bevorzugt in Zellen auf, bei denen die Virusvermehrung eingeschränkt ist. Eine persistente Infektion verhindert nicht eine Zweitinfektion durch einen anderen wt- oder Sabinstamm, samt Lyse. Ist die Persistenz jedoch über lange Zeit etabliert, so schützt sie die Trägerzelle vor Lyse. Entnimmt man jedoch Viren der Trägerzelle, so sind sie wieder für andere uninfizierte Zellen infektiös. Einige Trägerzellen scheinen die Infektion abzuschütteln, bei anderen geht der PV-Rezeptor verloren, was auch ohne PV in Zellkulturen passieren kann (Kaplan & Racaniello 1991). Es scheint einen intrazellulären Block für die Lyse zu geben. (Borzakian et al. 1992)

Colbère-Garapin et al. 1992 verfaßten einen Übersichtsartikel zur PV-Persistenz.

### 1.1.3. Bestimmung von Poliovirusstämmen

Durch zweidimensionale Auftrennung von Nukleinsäure-Bruchstücken (fingerprints)(Rico-Hesse et al. 1987), direkte Bindung an komplementäre Oligonukleotidproben (Auvinen 1990) und Sequenzierung nach PCR mit stammsspezifischen Primern (der RNS komplementären DNS-Stücken) kann heute die Herkunft eines Polio Stammes bei einem Patienten bestimmt werden. Zur Sequenzierung mit PCR reichen etwa 2,5 Genome PV in einer Probe. Eine Zellkultur braucht hundertmal so viel. Meistens ist nur die Sequenzierung eines kurzen Stückes wie des N-Terminus von VP1 nötig. (Yang et al. 1992, Yang et al. 1991, Abraham et al. 1993)

Mit einer Palette von monoklonalen (m) Antikörpern (Ak) können Isolate der drei Typen verschiedenster Herkunft untersucht und auch innerhalb der Typen in Gruppen unterteilt werden. So wurde der Stamm der Finnlandepidemie als Typ 3 erkannt, der verschieden von wt3 und Sab3 ist (Ren et al. 1987). Die Typisierung durch mAk erweist sich jedoch oft als unzulänglich, weil zwei virale Antigene, die durch eine sehr große Anzahl von monoklonalen Antikörpern als gleich erscheinen, schließlich durch einen neuen mAk als verschieden erkannt werden können (van Regenmortel 1990). Auch bei PV gab es Schwierigkeiten mit Kreuzreaktionen, besonders für Typ 2 (Payment et al. 1989). Außerdem haben Oberflächencharakteristika wie Immunogenität und Antigenität keine Korrelation zur Neurovirulenz (Omata et al. 1986). Für schnelle Bestimmungen in großen Gruppen werden immer noch zweckmäßigerweise mAk benutzt (Sanekata et al. 1992). Zur Bestimmung genauer Ak-Titer hat die WHO Standardbedingungen herausgegeben (WHO 1992).

### 1.1.4. Chemotherapie gegen Polio

Eine beim Menschen anwendbare Chemotherapie gegen die Kinderlähmung gibt es noch nicht.

Einige antivirale Substanzen stabilisieren PV - z.B. Arildon, WIN 51711 -, dabei geht die Vermehrungsfähigkeit verloren (Rombaut et al. 1991a, Mosser & Rueckert 1993). Brefeldin A aus Pilzen verhindert die Bildung von polioviruspezifischen Vesikeln (Maynell et al. 1992).

Gegen die den Polioviren verwandten Schnupfenviren wurden eine Reihe antiviraler Stoffe synthetisiert (Badger et al. 1988, Ninomiya et al. 1990). Die sog. WIN-Verbindungen waren bei Testpersonen jedoch nur dann wirksam, wenn das Medikament vor Einsetzen der Erkältung verabreicht wurde. (McKinlay et al. 1992, Boeyé & Rombaut 1992)

Heute kann per Computer untersucht werden, ob eine antivirale Substanz zu einem Virus paßt oder nicht. Mutationen zur Resistenz sind schon durch Computeranalysen zu verstehen. (Wade & McCammon) In der Röntgenstruktur zeigte sich, daß z.B. R61837 (Chapman et al. 1991), ein antiviraler Stoff, dieselbe Stelle wie die WIN-Substanzen bindet (Rossmann et al. 1989a). (Rossmann & McKinlay 1992) Da Picornaviren RNS-Viren sind, sind auch von der Entwicklung veränderter, stabiler Oligonukleotide mit Antisensecharakter, die von Zellen aufgenommen werden, neue Medikamente gegen Polio zu erwarten. (Cohen 1991) Solche stabilen Oligonukleotide sollten auch die sehr beeinträchtigende Behandlung von HIV-Patienten mit Mononukleotiden ersetzen (De Clerq 1990).

Kaplan et al. (1990a) erwägten, löslichen PVR aus Baculoviren (Kaplan et al. 1990b) als Medikament gegen PV-Infektion zu benutzen. Es traten jedoch PV-Mutanten auf, die nicht mehr mit dem löslichen Rezeptor, wohl aber mit dem zellständigen reagierten und sich normal vermehrten.

### 1.1.5. Klassifizierung der Polioviren

Polioviren gehören zur Gattung der Enteroviren. Zur gleichen Gattung gehören auch Coxsackie- und Echoviren. Enteroviren zählen ihrerseits mit Aphotoviren (Maul- und Klauenseuche, MKS), Rhinoviren (Schnupfen, HRV), Hepatoviren und Cardioviren der Maus zur Familie der Picornaviren (d.h. Viren mit kleiner RNS).

Viren, besonders Einzelstrang-RNS-Viren wie Polioviren, mutieren sehr stark. Die meisten Isolate bestehen aus einer Reihe von Varianten. Der Selektionsdruck des Wirtsorganismus bestimmt in der Natur die Stabilität der Virusstämme, bei Polio der drei Typen. (Morse 1991) Zu den Enteroviren zählen eine ganze Reihe von verschiedenen Viren, die keinen eigenen Namen, sondern nur eine Nummer haben. Hepatitis A war als Enterovirus 72 klassifiziert, heute bildet es eher einen eigenen Genus. Es werden zwar nur die drei bekannten Virustypen der Polio als "Polioviren" bezeichnet, aber Enterovirus 71 z.B. löst auch Poliomyelitis aus. (Boeyé & Rombaut 1992)

In den USA allein sollen jährlich 5-10 Millionen symptomatischer Infektionen durch nichtpolio Enteroviren auftreten. Das Bild dieser Erkrankungen ist sehr uneinheitlich, fiebrige Erkrankung mit und ohne Ausschlag, besonders unter Kindern, Sommererkältung, aber auch aseptische Meningitis. Tausende von Kindern kommen in Krankenhäuser und werden unnötigerweise mit Antibiotika und Antiherpesmitteln behandelt. (Rotbart 1991)



Akute klinische Picornavirusinfektionen sind Gehirnentzündung, Kinderlähmung, Myokarditis durch Coxsackie-B-Viren, hämorrhagische Bindehautentzündung durch Coxsackieviren, das Maul- und Klauenseuche-Syndrom, die Bornholmkrankheit, das "Dreitagesfieber" durch Cardioviren (Rueckert 1976) und die Neugeborenenrose durch Echoviren oder Coxsackievirus B. Die meisten Erkrankungen gehen wie die "Sommergrippe" mit Erbrechen und Durchfall einher. Nur Hepatitis A ruft ausschließlich Gelbsucht hervor. (Rotbart 1991) Die humanen Schnupfenviren (HRV) wachsen sehr gut bei 32-35°C und neutralem pH. Sie sind besonders spezifisch für embryonale Lungenzellen. Es gibt auch Pferderhinoviren, die Menschen, Affen, Meerschweinchen und Kaninchen infizieren. (Rueckert 1976)

Chronische Krankheiten durch Enteroviren sind der juvenile Diabetes mellitus (Reimann et al. 1991), das chronische Müdigkeitssyndrom, Dermatomyositis, angeborener Wasserkopf, amyotrophische seitliche Verhärtung (Sklerose). (Rotbart 1991)

Auch Pflanzen- und Insektenpicornaviren (Comoviren, Nepoviren und Potyviren) sind tierischen Picornaviren verwandt (Koonin & Gorbalenya 1992). All diese Viren besitzen ein kleines Protein an ihrer RNS, einen 3'poly(A)-Schwanz, Homologien in Proteasen und Polymerasen, eine Membranbindungsstelle und eine Nukleotidbindungsstelle in ihrem Protein 2C (Pincus et al. 1987). Como- und Polioviren besitzen die gleiche Kapsidstruktur, obwohl sie aus verschiedenen vielen Proteinen gebildet wird. Das Genom ist ähnlich organisiert, bei Comoviren jedoch gespalten.

Auch auf immunologischer Ebene gibt es erstaunliche Übereinstimmungen. So besitzen ein Virus der Bohne (BPMV) und ein Virus der Maus (CVB3) in ihrem Protein 2C das gemeinsame T-Zell-Epitop LEEKGI (Beck et al. 1992). Die Aufspaltung zwischen pflanzlichen und animalen Viren fand eventuell vor  $1,2 \times 10^9$  Jahren statt bei der Aufteilung in Pflanzen- und Tierreich. Aber auch heute noch dürften Viren zwischen den Reichen wechseln z.B. beim Übertragen durch Insekten von Pflanzen auf Tiere und umgekehrt. "Der Wirtsbereich von Pflanzen- und Tierviren überschneidet sich in Insekten." (Goldbach & Wellink 1988)

Picornaviren sind möglicherweise aus zellulärer NS entstanden. (Auch Influenzaviren besitzen in ihrem Hämagglutinin ein Stück aus 28S ribosomaler RNS.) (Stanway 1990)

### 1.1.6. Eigenschaften der Polioviren

Während Rhinoviren (HRV)  $< \text{pH } 6$  und Aphotoviren  $< \text{pH } 7$  labil sind - von HRV lassen sich durch Mutationen stabilere Stämme herstellen (Skern et al. 1991) -, halten Enteroviren und Polioviren pH-Werte zwischen 2,9 und 8,5 aus. In hypotonem 20mM Tris-HCl-Puffer bei pH7,5 und 37°C sinkt die PV-Infektiosität, und aus 156S-Virionen werden 80S-Partikel. Auch in hypotonem Phosphatpuffer bei 37°C wird Virus abgebaut. Bei Raumtemperatur ist PV jedoch selbst in hypotonem Phosphatpuffer stabil. (Wetz & Kucinski 1991) Polioviren sind löslich in Äther und Chloroform. Sie überstehen 45°C in isotoner Salzlösung, 60°C in hypertoner Salzlösung und das saure Milieu des Magens. Auch die proteolytischen Enzyme des Darmtraktes können ihm kaum schaden. Durch Inkubation in 3% Formaldehyd oder bei  $\text{pH} > 11$  verlieren Polioviren ihre Infektiosität; sie zerfallen in 70% Ameisensäure oder nach 1h Inkubation in 8M

Harnstoff bei 25°C oder durch 5min Kochen in 1% SDS.

Polioviren haben ein Molekulargewicht von  $8,25 \times 10^6$  Dalton, die RNS hat  $2,58 \times 10^6$  Dalton. Der Sedimentationskoeffizient ist 150-160 S. Ein Viruspartikel wiegt  $1,5 \times 10^{-17}$  g;  $7,07 \times 10^{13}$  Viruspartikel sind in einem mg enthalten. In dieser Arbeit ist oft die Rede von Optischen Dichte Einheiten (ODE). Eine ODE ist die Menge, die in einem ml eine optische Dichte von 1 ergeben würde. (Das Verhältnis der optischen Dichten bei 260nm / 280nm beträgt für PV-RNS 2.06-2.2 (Bienz et al. 1990)) Das Verhältnis der Extinktionen 260nm / 280nm ergibt bei ganzen Polioviren 1,69-1,74. Eine ODE<sub>260nm</sub> entspricht  $9,4 \times 10^{12}$  Viren (Rueckert 1985) (rund  $10^{13}$ ) oder  $10^{11}$  pfu. Eine ODE enthält  $1,4 \times 10^{-4}$  g Viren; das sind 98µg Protein und 42 µg RNS. Eine ODE entspricht 17nMol. Eine ODE enthält nur unter Standardbedingungen bei pH7 diese RNS-Menge, weil die optische Dichte sich mit der Struktur der RNS ändert (Aida 1988).

Die isoelektrischen Punkte der PV-Kapsidproteine aller drei Typen (8,1; 6,4; 6,0 und 7,3 bei Typ 1) wurden bestimmt (Hamann et al. 1977, Hamann et al. 1978, Hamann & Drzeniek 1978). Typ 3 dissoziiert sehr langsam bei 25°C in 9M Harnstoff, Typ 2 dissoziiert schneller als Typ 1 Mahoney (Drzeniek et al. 1979-1980). Die Dissoziation von PV in 7,2M Harnstoff soll über Zwischenstufen erfolgen (Cooper 1962, Vanden Berghe & Boeyé 1973). In isotonischem Phosphatpuffer bei pH7,2 sollen Polioviren rekonstituiert werden, allerdings mit sehr niedriger Ausbeute (Drzeniek & Bilello 1972). Polioviren dissoziieren auch bei alkalischen pH-Werten (Rombaut et al. 1987). Mit  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  können Polioviren 1-3 Stunden gegen Dissoziation geschützt werden (Wallis & Melnick 1962).

Mandel beschreibt 1962 die Wirkung von SDS bei sinkenden pH-Werten. Die Infektiosität von Typ 1 sinkt ab pH 4,5, die von Typ 2 ab pH 5 und die von Typ 3 in zwei Stufen bei pH 4,5 und 4. Die Wirkung von Detergentien auf Enteroviren ist pH-abhängig (Ward & Ashley 1979).

Behandelt man PV mit spezifischen Seren, so erscheinen sie nicht infektiös. Durch Zugabe von 1M  $MgCl_2$  oder  $CaCl_2$  und Inkubation bei 50°C für 15min lassen sich jedoch alle Viren wieder infektiös isolieren. "Ein Virus, das nicht infektiös erscheint, ist nicht notwendigerweise tot." Hepatitis A übersteht in 1M  $MgCl_2$  60min bei 60°C. Allgemein steigern Viren mit kubischer Symmetrie ihre Hitzeresistenz in hohen Konzentrationen divalenter Ionen. (Melnick 1991)

"Poliovirus ist eines der am meisten thermolabilen Viren". Bei -20°C gehen durchschnittlich  $0,47 \log TCID_{50}$  im Jahr verloren. (Sokhey et al. 1988) Die Infektiosität von Pool 47 in unserem Labor sank auch 33% pro Jahr. Polioviren haben ein absolutes Bedürfnis für Hydratation, deshalb können sie nicht gefriergetrocknet werden (Lemon & Robertson 1991). Die Impfstoffe werden mit 1M  $MgCl_2$  oder Saccharose stabilisiert. Es wird nach besseren Wegen gesucht (Dorval et al. 1989). Einige Fettsäuren, Salze, Diamine, auch Lysin stabilisieren PV z.T. stärker als  $MgCl_2$  (Dorval et al. 1990).

### 1.1.7. Die Impfung gegen Kinderlähmung

Immunisierungen durch Kontakt mit Krankheitskeimen wurden schon im alten Indien und China unternommen. Variolation ist eine alte Methode, bei der durch Einritzen der Haut und Auflegen von Borke eines abheilenden leichten Pockenfalles eine aktive Pockenimmunisierung durchgeführt wurde.



Kinderlähmung gehört zu den Kinderkrankheiten, die durch Impfungen zu vermeiden sind: Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Tuberkulose, Masern, Mumps und Polio. Die WHO (Alexandrov 1990) schätzt 2,8 Millionen Tote durch Krankheiten, die jährlich durch diese Impfungen verhindert werden könnten. Heute gibt es zwei Arten von Impfstoff gegen Polio, IPV und OPV. IPV ist ein inaktivierter Impfstoff nach Salk, OPV ein abgeschwächter (attenuierter), oraler Impfstoff nach Sabin. Meistens wird trivalenter Impfstoff verabreicht. Die OPV-Impfstämme wurden durch Mutationen in Zellkultur von Wildtypen abgeleitet (Sab1 von Mahoney Typ 1, Sab2 von Lansing Typ 2 und Sab3 von Leon Typ 3). Typ 1 und 2 wurden aus Stuhl von gesunden Kindern, Typ 3 von einem paralytischen Fall isoliert. Alle drei Typen wurden über eine ganze Reihe von *in vivo* und *in vitro* Passagen in Affen und Affenzellen vermehrt und zwischendurch aus Plaques isoliert. Die Replikation aller drei Sabinstämmen ist bei 40°C in Zellkultur verringert, temperatursensitiv. (Almond 1987, Macadam et al. 1992)

IPV wurde zuerst in den dreißiger Jahren verwendet. Da trotz Formalinaktivierung ein kleiner Anteil virulenter Viren erhalten blieb, mußte der Impfstoff wieder vom Markt genommen werden. Er kam 1955 wieder, als Viren in großen Mengen in Zellkulturen gewonnen und getestet werden konnten. Aber schon einen Monat später zeigte sich durch 204 Poliofälle mit 11 Toten, daß immer noch aktives Virus übersehen wurde. Bei der Inaktivierung müssen die Konzentration der Viren, pH, Temperatur, Fremdproteine und Partikel sowie die Virusaggregation berücksichtigt werden. Seit 1962 gibt es einen IPV-Standard bei der WHO (Cockburn et al. 1992). Aber bis heute sind die gebräuchlichen Tests für PV je nach Laboratorium verschieden (Minor 1990). Es war ein Handicap, daß die Viren der noch unsicheren Impfstoffe nur durch Injektion in Affen und nicht durch Zellkultur nachgewiesen werden konnten. (Melnick 1991)

Ab 1987 wurde eIPV (e=enhanced) in Fermentationstanks mit Zellkulturen gezogen. Impfviren können aus verschiedenen Zellen gewonnen werden, aus primären, diploiden Zellen (die nur eine begrenzte Zahl von Zellzyklen überleben) und aus kontinuierlichen (die ewig leben und potentiell onkogen sind). Polioviren wurden aus primären Affennierenzellen hergestellt, s.o.. In den ersten Jahren gelang es nicht, die Präparate ohne Fremdkeime herzustellen. So wurden Millionen von Impfungen mit der Impfung SV40 und Affenretroviren übertragen. Erkrankungen wurden bislang nicht gezeigt. Von Affen aus der Wildbahn müssen etwa 80% verworfen werden. Infektionen des Personals, das mit den Zellen umgeht, haben zu Todesfällen z.B. durch Affenherpes B geführt. (Magrath 1991) Heutiger PV-Impfstoff aus Verozellen (Nierenzellen von afrikanischen grünen Meerkatzen), die in 500l-Tanks auf Mikroträgern kultiviert werden, ist genauso wirksam wie der von Viren, die aus primären Affenzellen isoliert werden (Lahrech & Caudrelier 1990). (Melnick 1991)

Vor der Formalinbehandlung werden die Viren nun gereinigt. Heute ist diese eIPV-Produktion so standardisiert, daß keine Affentests mehr nötig sind, sondern nur noch der zytopathische Effekt der Virus-Charge in Zellkultur überprüft wird. In sog. RACINA-Tests werden HeLa-Zellen mit <sup>51</sup>Cr und radioaktivem Leucin und Uridin gleichzeitig markiert, wodurch der zytopathische Effekt von Virus-Chargen schon nach 8-10 Stunden abgelesen werden kann (Hovi & Roivainen 1989). Auch ELISA-Tests sind zur Kontrolle von IPV so abgeändert worden, daß lange und teure Affenversuche gespart werden (Singer et al. 1989). Durch eine Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 50°C bei der Formalinbehandlung in 1M MgCl<sub>2</sub> werden im Präparat vorhandene

Viren wie SV40 heute zerstört. (Melnick 1991) Aber auch die ausgefeiltesten heutigen Methoden wie PCR garantieren nicht, daß in Viruspräparationen keine Verunreinigungen durch andere Viren sind (Budowsky 1991).

Auch in Insektenzellen (durch Einbau in Baculoviren) können PV-Partikel hergestellt werden, die immunogen sind, infektiös sind sie bislang noch nicht (Urakawa et al. 1989). Erstaunlicherweise ergeben sich sogar dann PV-ähnliche Partikel in niedriger Menge, wenn VP0, VP3 und VP1 in separaten Peptidvektoren in Baculoviren vermehrt werden (Bräutigam et al. 1993). PV sind unterdessen auch im "zellfreien" System synthetisiert worden. Das System enthält jedoch noch eine große Menge verschiedener Zellsubstanzen, so daß die Vorstellung einer Riesensynzytie im Reagenzglas nicht abwegig erscheint. Es enthält Zellplasma ohne Kerne, ohne Mitochondrien, keine natürlichen Salze, aber Zellmembranen und andere Zellorganellen wie ER, Golgi, Mikrosomen. Auch die Existenz einiger weniger intakter Zellen könnte ausreichen, die erhaltenen Virustiter zu erklären. (Molla et al. 1991) Auch andere Gruppen konnten in *in vitro* Systemen mit Zellextrakten Polioviren synthetisieren (Barton & Flanagan 1993).

In den letzten 20 Jahren werden auch Masern-, Röteln- und Polioimpfstoffe in diploiden menschlichen Zellen hergestellt (jetzt auch Tollwut, Mumps und Varizella). Reaktionen auf potentiell onkogene Viren oder transformierende Agentien werden bislang nicht beobachtet. Es wird sogar überlegt, in immortalisierten Zellen Impfstoff anzuziehen. (Magrath 1991)

In den meisten Ländern hat sich OPV durchgesetzt. IPV ist hitzestabiler, aber 30mal so teuer wie OPV (Hinman et al. 1987).

Eine einzelne PV-Impfung reicht nicht aus, um vor PV-Infektion zu schützen (Selvakumar & John 1989, Roberts 1988). Bei eIPV-Impfungen sollen zwei statt drei Gaben reichen, wenn von den Typen (Typ 1: Typ 2: Typ 3) 40:8:32 D-antigene Dosen verabreicht werden (Simoes & John 1986). OPV-Impfungen sollten im Abstand von 6-8 Wochen zweimal wiederholt werden. Dabei werden  $10^5$ - $10^7$  TCID<sub>50</sub> pro Dosis verabreicht, 0,1ml trivalenter OPV-Impfstoff in 2-3 Tropfen. In den entwickelten Ländern ist ein Verhältnis der Typen(1,2,3) von 10:1:3 erfolgreich. In der 3. Welt stören Typ 2 selbst und andere Enteroviren die Impfung. Es gibt immer noch große Epidemien auch in Gebieten mit 70-85% Impfung. Säuglinge besitzen einen Schutz gegen PV durch die Mutter, der die Impfung beeinflusst. Die Serokonversion nach trivalentem OPV-Impfstoff ist umgekehrt proportional zum Titer der mütterlichen Antikörper. Der passive Schutz, Titer der Ak, von der Mutter ist etwas größer oder gleich 1:128 (Faden et al. 1990). Wegen des geringeren Proteingehaltes von Muttermilch im Vergleich zu Kuhmilchpräparaten wird Polioimpfstoff von gestillten Kindern besser aufgenommen als von Flaschenkindern (Hahn-Zoric et al. 1990). Nach Exposition der Mütter mit wt-Polioviren, enthält Muttermilch mehr IgA und IgM (Zaman et al. 1933). OPV hat auf Schwangerschaften keinen nachteiligen Effekt (Ornoy et al. 1990, Ornoy & Ishai 1993), dennoch sollten unnötige Streßsituationen durch Lebendkeime vermieden werden. Bei vielen Virusinfektionen sind Embryopathien und spätere Autoimmundefekte möglich. Im Gegensatz zu Keuchhusten- oder Masernimpfstoff gibt es bei trivalentem OPV keinen Hinweis, daß früher im Leben verabreichte Dosen die Immunantwort auf spätere Dosen herabsetzen. Kinder in Uganda haben eine unbekannte Substanz im Speichel, die das Wachsen von Polioviren verhindert. (Patriarca et al. 1991, Lemon & Roberts-

on 1991, Schoub et al. 1988, Modlin et al. 1990) Nach PV-Impfung werden vor allem IgG gegen die Virusproteine (VP) 1 und 3 gebildet und Serum-IgA gegen VP1 und VP2 (nicht VP3) (Zhaori et al. 1988). Familien sollten gemeinsam geimpft werden, weil Viren, die ausgeschieden werden, virulenter sind als Impfstämme; das würde Kontaktpoliofälle vermeiden (Melnick 1988). Die Ausscheidung von Impfviren und ihren Rekombinanten ist eingehend untersucht (Minor 1992).

Polioimpfstoffe sind als unspezifische Stimulantien für das Immunsystem benutzt worden. Homosexuelle haben Poliovakzine in hohen Konzentrationen auf Herpesläsionen aufgetragen. Zur Zeit wird an Restchargen dieser Impfstoffe untersucht, ob sie mit Retroviren aus Affen verunreinigt waren. In den 50er Jahren wurde entdeckt, daß SV-40 in den originalen Sabinstämmen enthalten war. Später war es Lederle noch erlaubt "100 Organismen / ml" im Impfstoff zu haben. Viele dieser Viren hatten Reverse-Transkriptaseaktivität. (Kyle 1992, Redaktionsbeitrag Lancet) - Bei AIDS-Infizierten stellt sich die Frage, ob die Impfung nicht ein Risiko für AIDS-Positive ist (Mathisen & Allen 1992). Auf jeden Fall sollten HIV-infizierte Personen oder ihre Kontaktpersonen aus Sicherheitsgründen mit eIPV geimpft werden (Barbi et al. 1992).

Weltweit sind heute 85% aller Kinder unter einem Jahr geimpft. (Wright et al. 1991) Intensiver OPV-Einsatz (z.B. in Chile und Brasilien) führte zur Reduktion der Sterblichkeit an Diarrhoe (Arya 1990). In Brasilien werden die PV-Isolate von Patienten durch Oligodeoxynukleotidproben untersucht, die komplementär sind zum 5'-Ende von VP1 der Wildtypen 1 und 3, die dort zur Zeit endemisch sind (da Silva et al. 1991). Mehrfache, massive Gaben von OPV führen statistisch zu signifikanter Erniedrigung der Kindersterblichkeit an Durchfällen. In der 3. Welt gibt es jedes Jahr  $5-10 \times 10^6$  Diarrhoe-tote. Etwa jedes zweite Kind, das dort zwischen dem 6ten und 24ten Monat ins Krankenhaus kommt, hat durch Viren verursachten Durchfall. Durch die PV-Impfung werde andere pathogene Keime für einige Wochen verdrängt. Eine Impfung mit Rotaviren wird jedoch durch OPV gestört. (Contreras 1989, Giammanco et al. 1988) In den Entwicklungsländern verhindern falsche Lagerung und mangelnde Qualitätskontrolle des Impfstoffes, Hunger und andere Enterovirusinfektionen die flächendeckende Durchimpfung (Hovi 1986).

Bei Impfungen, die keinen Kontakt zu wt-Viren hatten vor einer OPV-Impfung, scheint die Immunität nach etwa sieben Jahren aufzuhören, deshalb sind Auffrischungsimpfungen dringend zu empfehlen (Green et al. 1993).

### 1.1.8. Poliovirus-Neurovirulenz

Der Nachweis von virulenten Viren in OPV-Präparaten ist eine schwierige Aufgabe, wenn nicht zu viele Affen dabei ihr Leben lassen sollen. Obwohl Typ 1 im Affen-Neurovirulenztest für Impfstoffe (Lederle) virulenter erscheint als Typ 3, sind im Menschen Typ 3 Viren leichter neurovirulent als Typ 1-Viren. (Nathanson & Horn 1992) Auf eine Million Geimpfte kommen 0,84 Paralysefälle durch den Impfstoff. Während Typ 1 zur Zeit einer der sichersten Impfstoffe für den Menschen ist - die 57 geänderten Basen, bzw. 21 AS-Austausche (Minor et al. 1982, No-

moto 1993) gegenüber dem Wildtyp mutieren nicht gleichzeitig zurück - , reichen die zehn Mutationen bzw. nur 3 AS-Austausche bei Typ 3 (Minor et al. 1986c) nicht befriedigend. Allein das Nukleotid 472 (Westrop et al. 1989) entscheidet hier über die Neurovirulenz (Minor et al. 1989). AS91 von VP3 (Nukleotid 2034), die temperatursensitiv macht bei Mutation von Ser bei Leon zu Phe beim Sabinstamm (Almond et al. 1987b), unterstützt die Attenuation. Auch Nukleotid 2493 (Chumakov et al. 1992) und der Austausch Ile zu Thr in AS1006 sollen Attenuation bewirken (Tatem et al. 1992). Phe3091 (bei anderen Sab-Stämmen ein Ala) behindert die Bildung von 14S Pentameren aus Protomeren. (Macadam et al. 1991a, Almond 1987, Svitkin et al. 1990) Impfpolio wird meist durch Typ 3 verursacht, seltener durch Typ 2 (Lemon & Robertson 1991, Macadam et al. 1989). Eltern sollten über das Impfrisiko informiert werden, so daß die Kinder eventuell IPV vorgeimpft werden können (Querfurth & Swanson 1990). (Minor 1992)

Nukleotid 472, ein C, ist mit G 537 gepaart. Mutiert C 472 zu U, so kann eine Mutation von G 537 zu A die Struktur wieder stabilisieren. Die zweifache Wasserstoffbrücke ist jedoch nicht so stabil wie die dreifache zwischen C und G. (Macadam et al. 1992) Nukleotid 472 entspricht Nukleotid 480 von Typ 1 (Christodoulou et al. 1990, Kawamura et al. 1989) und 481 von Typ 2 (Equestre et al. 1991, Macadam et al. 1991b, Pollard et al. 1989). Auch bei diesen gibt es Basenpaarungen. (Muzychenko et al. 1991) Mit monoklonalen Antikörpern, gegen Wildtyp oder Impfstämme, stammspezifische oder kreuzreagierende, läßt sich zeigen, daß nach Impfungen ausgeschiedene Polioviren ihre Virulenz verändern. Die Sabinepitope gehen mit der Zeit verloren, Wildtypen treten auf. Ein Epitop blieb erhalten, wurde aber nicht mehr neutralisiert. (Crainic 1983)

50% der Impflinge scheiden Typ 3 Virus aus, bei dem Nukleotid 472 zur Neurovirulenz zurückmutiert ist. Aber allein diese Rückmutation macht Typ 3 nicht wieder pathogen. Es gibt Isolate mit sabinähnlichem 472 U, die neurovirulent im Affen sind. (Tatem et al. 1991) Die Sequenzen um die Nukleotide 480, 481 und 472 besitzen Homologien zwischen allen drei Typen. Im Darm herrscht offensichtlich ein starker Druck, der attenuierte Polioviren zum wt rückmutieren läßt (Minor et al. 1986c, Contreras et al. 1992). (Minor & Dunn 1988) Im Retikulozytenlysat wird RNS von virulenten Polioviren besser translatiert als die von attenuierten (Svitkin et al. 1985). (Racaniello 1986)

#### Wichtige Veränderungen, die zu Attenuation führen:

Typ	5'NCR-Base	komplementäre Base	zusätzliche Änderungen
1	480	525	AS73 von 3D und v.a. (Kawamura et al. 1989)
2	481 (437)		AS1143 (angeblich Maus + Homo) (Macadam et al. 1993)
3	472	537	AS3091 (ev. AS1006) (Minor 1992)

Die Mausneurovirulenz von Typ 2 ist durch antigene Varianten der antigenen Region 1 untersucht worden. Diese Untersuchungen haben für die Neurovirulenz beim Menschen jedoch keine Aussagekraft, weil diese Region die Bindungsregion für einen mausspezifischen Rezeptor ist. (La Monica et al. 1987a, Minor 1992) In diesem Modell konnte jedoch die Funktion vom Lansing Nukleotid 472 untersucht werden (La Monica et al. 1987b). Eine Mutation in Nukleotid 6203 der 3D-Polymerase führt in der Maus auch zu Attenuation (Tardy-Panit et al. 1993).

Nukleotid 472 sitzt an einer für die RNS-Struktur empfindlichen Stelle. Nur bei Erhalten dieser Struktur ist PV neurovirulent. - Dies entspricht den Verhältnissen beim Bacteriophagen MS2, in dem die Sekundärstruktur einer RNS darüber entscheidet, ob der Phage lysiert oder nicht. (Schmidt et al. 1987, Berkhout et al. 1987) - *In vitro* Versuche haben gezeigt, daß ein Teil der übrigen die Attenuation beeinflussenden Mutationen von Typ 3, die AS-Austausche bewirken, den Raum zwischen den Protomeren betreffen, die Einlagerung der C<sub>16</sub>-Fettsäure verhindern oder die Interaktion der Pentamere stören. Über Mutationen an AS1132 kann ein Optimum des Wuchses bei 37°C oder 40°C eingestellt werden. So wichtig es ist, möglichst stark attenuierte Viren für die Impfungen herzustellen, ist doch zu beachten, daß die Mutationen das Impfvirus nicht so verändern, daß es im Darm verstärkt zu Rückmutationen kommen muß, weil die Viren sonst nicht vermehrungsfähig wären. (Minor 1992)

Durch PCR mit entsprechendem Primer ist es heute möglich, Rückmutationen der Neurovirulenz in Nukleotid 472 von Typ 3 direkt nachzuweisen in OPV. So kann z.T. auf Affentests verzichtet werden. (Chumakov et al. 1991)

Restriktionsfragmentanalysen haben ergeben, daß PV-Wildstämme, die vor Einführung der Impfung gesammelt wurden, sehr starke Unterschiede aufweisen, während die wt-Stämme aus epidemischen Regionen heute sehr einheitliche Profile zeigen (Balanant et al. 1991).

### 1.1.9. Verbesserung der Poliovakzine

Die Impfung mit ganzen Viren birgt immer ein geringes Infektionsrisiko, sei es durch Rückmutationen zum wt bei OPV oder durch nicht abgetötete Viren in IPV, deshalb werden verstärkt Alternativen gesucht. Peptide können in großer Menge hergestellt werden. Die Immunreaktion auf Impfung mit PV-Peptiden und Rhinoviruspeptiden ist bislang noch schlecht (Ferguson et al. 1985, Palmenberg 1987). Peptide denaturieren leicht, deshalb empfiehlt es sich, z.B. das Gewebe vor Impfungen mit den empfindlichen Peptiden gegen denaturierende Säuren vorzubehandeln. Andere Impfstoffe lassen sich durch Einschluß in Mikropartikel aus Polyacrylamid z.B. vor Proteolyse schützen. Liposomen werden von M-Zellen im Darm aufgenommen, aber ihre Herstellung denaturiert Antigen (auch Peptide) häufig. Als Adjuvantien können Aluminiumhydroxid, Saponine, Polymere mit Mineralöl, abgetötete Mykobakterien in Mineralöl, Produkte aus Bakterien wie Lipopolysaccharide oder Muramyl-Dipeptide, Liposomen... dienen. Die meisten dieser Stoffe sind jedoch beim Menschen nicht verwendbar. Mit komplettem Freundschens Adjuvant kann man die immunologische Toleranz so überlisten, daß selbst Kaninchenalbumin im Kaninchen immunogen ist (van Regenmortel 1989).

Iizuka et al.(1989) versuchen die Herstellung stabiler PV-Mutanten durch die Einführung von

Deletionen. Am 5'-Ende werden dafür bei Mahoney und Sab1-Viren die Nukleotide 564-726 aus infektiöser cDNS (Kohara et al 1986, Sarnow 1989) ausgeschnitten. So wird der attenuierte Phänotyp über viele Passagen stabil. Weil die Anzahl der Zellen mit zytopatischem Effekt im Affentest aber noch zu hoch ist, wird nach besser attenuierten Mutanten gesucht. In VP1 von PV lassen sich stabile Insertionen von drei Kodons einführen (Christodoulou et al. 1989). Durch die Verwendung von cDNS können heute praktisch beliebige Mutationen in Polioviren eingeführt werden (Kirkegaard & Nelsen 1989)

Sehr intensiv wird auch an Hybridimpfstoffen gearbeitet, z.B. PV-Sequenzen in *Escherichia coli* (Hoatlin et al. 1987) oder *Salmonella*. (Gilligan & Po 1991, O'Callaghan et al. 1990) Aber selbst die Präsentation von antigenen Regionen von PV in homologen Stellen eines anderen Stammes machen noch Schwierigkeiten, weil ausgeschnittene und eingebaute Sequenzen unterschiedlichen Raum einnehmen, z.B. Region 1 Sab3 in Sab1. (Minor et al. 1990, Nomoto et al. 1988) Das Epitop "C3" (PV1 VP1 93-103) konnte in zwei verschiedene Schlaufen von *E. coli* LamB eingebaut werden und im Kaninchen Antipeptid-Ak und antivirale Ak hervorrufen (Charbit et al. 1988). In Tierversuchen zeigen an BSA oder KLH gebundene Peptide gute Immunantworten (Emini et al. 1984a). Es werden zur Zeit Überlegungen angestellt, ob nicht ein Virus wie das Pockenvirus (*Vaccinia*) eine Fähre sein könnte für eine ganze Reihe verschiedener Impfstoffe, exprimiert auf seiner Oberfläche (Tartaglia & Paoletti 1990).

Die Herstellung von Untereinheitenimpfstoffen, wie bei Hepatitis B schon üblich, scheint aus nativen Prokapsiden oder 14S-Untereinheiten von PV (Onodera et al. 1986) möglich zu werden (Rombaut et al. 1989, Rombaut et al. 1990a). 14S Partikel können isoliert werden (Rombaut et al. 1990b). Subvirale Partikel können durch HPLC aufgetrennt werden (Foiriers et al. 1990). Die Bildung solcher Impfstoffe durch Transkription und Translation von geklonter Strukturproteinvorstufe (P1) scheint möglich zu sein. (Boeyé & Rombaut 1992) Infiziert man HeLa-Zellen sowohl mit einem Vacciniavirus zur Expression von P1 (dem Hüllproteinvorläufer) als auch einem zweiten Vacciniavirus zur Expression von 3CD (dem Enzym, das die Einzelproteine ausschneidet), so erhält man Strukturen, die leeren PV-Kapsiden gleichen; diese könnten als Impfstoff geeignet sein. (Ansardi et al. 1991) Beim LCMV (lymphozytischen Choriomeningitisvirus) ist es gelungen, durch ein synthetisches Peptid von 15 AS eine T-Zell-Vakzine herzustellen, die CD8<sup>+</sup>-, zytotoxische T-Zellen aktiviert. (Schulz et al. 1991) Bei Influenza konnten zytotoxische T-Zellen *in vivo* durch lipidgebundenes Peptid geprägt werden (Deres et al. 1989) Auch die Herstellung von anti-idiotypischen Antikörpern (solchen Ak, die an ihrem Paratop dieselbe Struktur haben wie das Virus) als Impfstoff wird erwogen (Zhou et al. 1987, UytdeHaag et al. 1986).

Bei Untersuchungen an Humanseren in Japan stellte sich heraus, daß Erwachsene, die als Kind mit Wildtypen Kontakt hatten, auch Seren hatten, die mit wt besser reagierten als mit den Sabinstämmen. Kinderseren von Kindern ohne wt-Kontakt reagierten dagegen besser mit Sab-Stämmen. (Miyamura et al. 1990) Dies zeigt, wie empfindlich die Immunantwort ist. Eine Beschränkung auf weniger Epitope bei Untereinheitenimpfstoffen könnte deshalb gefährlich werden in Situationen, in denen die betreffenden Epitope ausfallen.

OPV-Impfstoffe, die aus der sichereren Sab1-Sequenz bestehen aber die Hüllproteine von Sab2



oder Sab3 besitzen sind hergestellt. Ebenso gibt es weniger neurovirulente Stämme mit langen Deletionen in der nicht kodierenden Region. Diese Impfstoffe müssen jetzt im Menschen getestet werden. (Nomoto 1993)

#### 1.1.10. Poliofälle nach Einführung der Impfung

1978 kam es in den Niederlanden zu einer Epidemie durch eine religiöse Sekte, die Impfungen abgelehnt hatte. - In Japan gab es 1980/81 eine Epidemie mit einem in der Antigenität veränderten Typ 1 Sabinstamm. Betroffen waren Personen kurz nach der Impfung und Kontaktpersonen. (Hara et al. 1987) - Eine Epidemie in Transvaal 1982 zeigte, daß bei der Übertragung des PV mit 1-2 Nukleotidänderungen proWoche gerechnet werden muß (Tsilimigras et al. 1989). (Hovi 1991)

Der Grund für die Polioepidemie in Finnland: Poliovirus Typ 3 hat eine immundominante Schlaufe in VP1; diese ist gleichzeitig die einzige trypsinspaltbare Stelle. Ein harmloser Typ-3-Stamm zirkulierte in den Mittelmeerländern. Er konnte die OPV-geimpfte Bevölkerung nicht befallen. Als der Stamm 1984-1985 nach Finnland gelangte, traf er dort auf eine IPV geimpfte Gesellschaft. Bei oraler Gabe wird der Sab3-Stamm in Site1 durch Trypsin im menschlichen Darm gespalten. Hierdurch wird die Immundominanz dieser Region gestört; die Impflinge bilden nun Antikörper gegen andere Epitope. Bei der IPV findet keine Spaltung statt, so enthalten Seren von IPV-Geimpften fast ausschließlich Antikörper gegen Site1. Es wurde gezeigt, daß Seren von IPV-geimpften Kindern trypsingespaltenes Sab3-Virus nicht neutralisieren. Diese Epidemie hat deutlich gezeigt, daß OPV der IPV überlegen ist. IPV könnte durch die Verwendung von trypsingespaltenem PV3 verbessert werden. (Boeyé & Rombaut 1992) Der Finnlandstamm entspricht Sab3 bis auf die Positionen 96, 98, 99 und 105 von VP1 (Minor et al. 1986c). Der Selektionsvorteil des Finnlandstammes bestand schon in der Tatsache, daß keine Ak gegen den Stamm in der Bevölkerung vorhanden waren. Im Laufe der Zeit könnte es immer wieder zu solchen impfesistenten Stämmen kommen. Der Finnlandstamm hatte eine veränderte Antigenität (Magrath et al. 1986, Kew & Nottay 1984), nicht Sab3 oder Saukett verwandt. Zehn schlecht geimpfte IPV-Impflinge und Ungeimpfte, die keinen Kontakt zueinander hatten, erkrankten. Monoklonale Antikörper gegen Sab oder Saukett konnten den Stamm nicht neutralisieren, umgekehrt auch nicht. Viren eines Isolates wurden sequenziert. Der Stamm enthält eine große Anzahl von Mutationen über das gesamte Genom verteilt. Die antigene Region 1 enthält drei AS-Austausche, Region 3 sechs. (Hughes et al. 1986) Ein Fall von etwa 300 Infizierten führte zu Paralyse. Es gab aber auch Polio unter voll immunisierten Erwachsenen. Personen, die älter als 40 waren, hatten Seren, die keinen Unterschied zwischen Saukett und dem Finnlandstamm machten, durch Immunität aus der Zeit vor den Impfungen. OPV wurde in Finnland nie verwendet wegen der Impfpoliofälle. So ist die Immunität der Schleimhäute niedriger als in Ländern mit OPV-Impfung. Eine große Anzahl von Kindern bildet außerdem keine Antikörper gegen Typ 3 nach IPV, sondern erst nach Auffrischungsimpfungen nach 11-16 Jahren. Die erkrankten Kinder hatten Antikörper, die trypsingespaltenes PV3 neutralisierten (Roivainen & Hovi 1987). Während der Finnlandepidemie haben sich verschiedene Typ-3-Linien gebildet. Oligonukleotidproben von 17 Basen einer hoch variablen Region des Virus zeigen, daß der

Stamm, der Poliomyelitis in Finnland auslöste, aus der Mittelmeerregion kam und dort in den 70er Jahren kursierte (Pöyry et al. 1990, Pöyry et al. 1989) Der immunologische Druck schien erheblich zu sein. Die Veränderungen des Virus während der Infektion in einer einzelnen Person sind schon groß. (Kinnunen et al. 1991) Seren von OPV(Moskau Typ 3)-geimpften Kindern enthalten auch ausreichend Ak gegen den Finnlandstamm (Böthig et al. 1990). Die meisten Typ 3-wt-Stämme sind trypsinspaltbar. Der Finnlandstamm war nicht trypsinspaltbar, mutierte aber zur Spaltbarkeit im Laufe der Epidemie. Auch nach der Spaltung bleiben die Viren infektiös. Seren von IPV-Impfungen neutralisieren trypsingespaltenes Virus schlechter. Auch eine anschließende OPV-Gabe ändert daran nicht mehr viel. (Roivainen & Hovi 1988). Die Schwierigkeiten der IPV von Typ 3 bestehen in der Spaltbarkeit der Region 1; Region 2 ist wenig immunogen und Region 3 variiert zu stark. (Hovi 1989) Für die IPV-Impfungen könnten spaltbare PV3-Stämme eingeführt werden. Trypsingespaltenes PV3 ist wahrscheinlich dem Kontakt mit wt3-Viren ähnlicher als Viren aus Zellkulturen ohne Proteasebehandlung (Lemon & Robertson 1991, Roivainen & Hovi 1987). Mäuse, die mit trypsingespaltenem Typ 3, Saukett, geimpft sind, bilden nicht nur Ak gegen intaktes und gespaltenes PV, sondern es wird auch die intakte BC-Schleife erkannt, die im Immunogen gespalten war (Roivainen et al. 1990). (Hovi 1991)

In Israel bekamen 1988 OPV-Geimpfte von Typ 1 Polio, weil zu wenig Sab1 im Impfstoff vorhanden war. In einem anderen Distrikt löste ein Typ 1, der sich von Mahoney und Sab1 unterschied, Polio in ausschließlicher IPV geimpften Bevölkerungsgruppen aus (Slater et al. 1990, Vonsover et al. 1993). In den 70er Jahren gelang es in Israel nur die paralytischen Fälle von Polio in geimpften Patienten unter Kontrolle zu bringen, indem die Anzahl der Impfdosen drastisch (IPV + OPV + 4xOPV) erhöht wurde; anscheinend störte das häufige Auftreten von Durchfällen die Impfung, und IPV-Geimpfte wurden zu Trägern und Dauerausscheidern von Polioviren (Tulchinsky et al. 1989). - In Oman gab es 1988 10 000 infizierte Kinder, obwohl 90% aller Kinder drei oder mehr Dosen Impfstoff erhalten hatten; woraus sich die Frage ergab, ob die heutigen PV-Vakzine immunogen genug sind (Lemon & Robertson 1991, Sutter et al. 1991). - Größere Epidemien (z.B. Taiwan 1982) machten klar, daß mindestens 80% Durchimpfung der Bevölkerung notwendig ist (Hinman et al. 1987). - In Indien (Deshpande & Dave 1991) gibt es etwa die Hälfte aller Poliofälle der Erde, aber in Indochina und dem tropischen Afrika sind die Raten auch noch sehr hoch. Diese Länder brauchen höhere Dosen pro Impfung in anderen Typzusammensetzungen. In Indien versagen die Impfungen auch bei 98% Durchimpfung der Bevölkerung und trotz Vierfachimpfung (Samuel et al. 1993). Die indischen Poliofälle werden hauptsächlich durch PV1 wt verursacht. Die aufgenommene Dosis an Polioviren bei Epidemien in den Slums scheint dabei so hoch zu sein, daß die Immunität durch die Impfung überrannt wird (Deshpande & Dave 1993). In den Tropen ist die Immunantwort laut (WHO 1990) auf Sab1 und Sab3 schlechter und es gibt Konkurrenz zwischen den Sab-Stämmen. Die Immunität einer gegebenen antigenen Region schwankt zwischen einzelnen Impfungen. - In Brasilien stören Enterovirusinfektionen und schlechter Ernährungszustand die Impfungen, so daß es alle 2-5 Jahre zu Epidemien kommt, trotz 75-80% Durchimpfung. Die Konzentrationen an Typ 1 und Typ 3 in der TOPV scheinen zu niedrig zu sein. (Patriarca et al. 1988) - Als sehr sicher erweist sich die Impfung in Dänemark, wo 2-3mal IPV geimpft wird und anschließend mit OPV geboostert wird. Mit Rücksicht auf Kinder mit unerkannten Immundefekten müßten OPV-Impfungen erst nach einem Alter von zwölf Monaten begonnen werden.



(Hovi 1991)

### 1.1.11. IPV oder OPV?

Die sekretorische IgA-Antwort gegen OPV hält kürzer an als die Bildung von IgG-Antikörpern (Nishio et al. 1990). Die Impfung mit IPV führt jedoch nicht zur Schleimhautimmunität (Mueller et al. 1990, Roivainen & Hovi), und bei der Herstellung von IPV aus PV2 und PV3 wird die antigene Region 1 zerstört (Ferguson et al. 1993). Impfungen mit OPV sind der durch IPV deshalb deutlich überlegen. Die meisten durch OPV-assoziierten Poliomyelitisfälle betreffen Erstimpflinge und ihre Haushaltskontaktpersonen. 15% von diesen sind immundefiziente Personen. Mit einer Erstimpfung durch verbesserte IPV würde das Problem der akuten Ansteckung umgangen. Wie Untersuchungen zeigen, reagieren Neugeborene gut auf die neuen eIPV-Impfstoffe (Adenyi-Jones et al. 1992). Die Erstimpfung mit IPV scheint jedoch die Rückmutationsrate zum wt bei nachfolgenden OPV-Impfungen zu erhöhen (Ogra et al. 1991). Die Immunantwort im Darm ist schlechter, wenn mit IPV vorgeimpft wurde (Onorato et al. 1991). In Staaten der 3. Welt wird eine zusätzliche Impfung durch trivalente OPV bei der Geburt erwogen (Schoub et al. 1988, Aleksandrov 1990), um alle Kinder zu erreichen (Swartz et al. 1989) und den Titer gegen Typ 3 zu verbessern. (Weckx et al. 1992, Faden et al. 1990)

Durch OPV-Impfungen werden nicht nur die Impflinge geimpft, sondern auch ihre Kontaktpersonen mitgeimpft. Für die Abwehr von Epidemien ist das von Vorteil; wenige Impflinge oder Kontaktpersonen können jedoch auch Impfpolio bekommen. In den Industrienationen stellt sich deshalb die Frage: "Ist das Risiko der Paralyse für ein Individuum, das OPV nimmt, gerechtfertigt durch die Vorteile eines ungeimpften Mitglieds der Gesellschaft, das gratis (ohne Impfung) OPV-immunisiert wird...(Weiss 1988)?" 91% aller Poliofälle in den USA sind impfungassoziiert; es werden epidemische, endemische, importierte und immundefiziente Fälle unterschieden (Sutter et al. 1989, Morrison & Embil). Auch in der Bundesrepublik hat es nach Einführung der TOPV noch verschiedenartige Poliofälle gegeben (Maass & Quast 1987).

Es hat sich eingebürgert, die Wirksamkeit der Impfungen daran zu messen, wieviel IgG im Blut des Impflings ist. Einige Wissenschaftler befürchten, daß die mit der Impfung assoziierten Fälle viel häufiger sind als angenommen und wünschen z.B. für Indien die Messung von IgA, was ihrer Meinung nach die wirkliche Immunität anzeigt. (Arya 1988)

Salk (1990) warnt vor unnötigen Impfungen. "...ein immunologisches Gedächtnis könnte sogar vorhanden sein, wenn der Antikörpertiter unter der Nachweisgrenze liegt." Der Schutz Neugeborener durch Ak der Mutter geht mit etwa sechs Monaten verloren. Es sollte auch untersucht werden, ob Boosterimpfungen gegen Polio nötig sind. Nach Jones et al. (1989) reichen drei Impfungen aus. Nach Salk (1988) ist die Ausbreitung von OPV-Viren gewollt, "unfreiwillige Impfung". Salk zitiert Thomas Francis: Zum ersten Mal wird ein infektiöses Agens zur Prophylaxe eingesetzt, ohne daß es Agenzien gibt, eine Verbreitung zu kontrollieren.

Nach Sabin (1991) gibt es jedoch noch einiges zu bedenken: "Der Hauptteil des Erfolges gegen Poliomyelitis kam nicht durch WHO-Programme... , sondern separat organisierte, nationale, jährliche Impftage. Es gibt jährlich viele tausende von 'eventuellen Poliomyelitiserkrankungen'",

die kein Virus als Ursache haben. "Akute transverse Myelitis" oder "Guillain-Barré-Syndrom" (demyelinisierende Neuropathie mit symmetrischen Lähmungen, wie sie aber auch nach OPV-Impfungen auftreten können) (Kinnunen et al. 1989, Yohannan et al. 1991) werden gelegentlich als Poliomyelitis fehldiagnostiziert. - Eine Schwierigkeit bei der PV-Ausrottung ist, daß nicht wie bei Pocken jede Infektion eine Erkrankung ergibt. 99% aller PV-Infektionen bleiben un bemerkt. Impfstoffähnliche Viren sind auch vor der Einführung der OPV isoliert worden. Außerdem kann die akute paralytische Poliomyelitis nicht nur von den drei Typen hervorgerufen werden, sondern durch 18 andere Enteroviren, auch durch einige Typen von Coxsackie- und Echoviren. Auch bei Maserninfektionen fand man nach der schnellen Ausrottung der Masernviren "Masernerkrankungen", die nicht durch Masernviren verursacht waren. "Das alte Dogma, daß Poliomyelitis durch Nachweis von Polioviren - oder schlechter noch durch Antikörper gegen Polioviren - abgesichert werden kann, stimmt nicht mehr." Nach Sabins Ansicht ist paralytische Polio durch Polioviren in Brasilien bereits ausgerottet. Deshalb greifen Impfkampagnen nicht mehr. Sabin hält deshalb den Kampf gegen Mangelernährung, schlechte Wohnbedingungen, unzureichendes Wasser, schlechte sanitäre Bedingungen und schlechte Bildung für wichtige Schwachpunkte in der PV-Bekämpfung bevor die ökonomische Entwicklung allein bessere Bedingungen schafft. - Die Verteilung des Impfstoffes bis in die Häuser der Impflinge muß sichergestellt werden. "Die hunderte von Millionen Dollars, die für die Forschung für neue und bessere Impfstoffe ausgegeben werden, sind ein Witz, wenn solche Impfstoffe nur bei einem Bruchteil von denen ankommen, die sie brauchen." (Sabin 1991, Sabin 1986b)

#### 1.1.12. Die Struktur des Poliovirus

Weil Polioviren sehr klein sind, wurde ihre Proteinstruktur als eine der ersten durch Röntgenstruktur-Analyse (Rossmann et al. 1985) aufgeklärt, Typ 1, Mahoney (Hogle et al. 1985; Hogle et al. 1987a; Hogle et al. 1987b), Typ 3, Sabin (Filman et al. 1989). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen PV-Stämmen liegen vor allem in den Schlaufen der Proteine und an den Enden der Proteine (Filman et al. 1989). Auch die Struktur anderer Picornaviren ist bekannt, Mengo (Krishnaswamy & Rossmann 1990, Arnold & Rossmann 1990), MKS (Acharya et al. 1989). Diese Daten können heute als Grundlage für immunologische Untersuchungen benutzt werden.

Das Viruspartikel besteht aus einer Proteinhohlkugel (Boublik & Drzeniek 1976, Boublik & Drzeniek 1977) und einer darin geschützten einsträngigen RNS, die die gesamte Information des Genoms (Sarnow et al. 1990) enthält. Die Proteinhülle enthält weder Kohlenhydrate (Drzeniek & Bilello 1974) noch Disulfidbrücken (Heukeshoven & Dernick 1981). "Protein-Protein-Interaktionen bei Supramolekül-Zusammensetzung enthalten nur sehr selten kovalente Bindungen ... . Meist sind es schwache Bindungen, besonders hydrophobe. Ungefähr zehn solcher schwachen Interaktionen sind nötig, um so stark zu sein wie eine kovalente Bindung." Am Beispiel der gradzahligen T-Phagen zeigt Kellenberger (1990), wie aus in der geschlossenen Fläche mit in Wabenmuster angeordneten Proteinen durch Ausschneiden jeweils eines Sechstels jeder Wabe die Kugelform der Viren entsteht.

Der Proteinanteil eines Polioartikels beträgt etwa 70% der  $8,25 \times 10^6$  Dalton, der Rest ist die

RNS mit fast 7500 Nukleotiden. 25-30% des nativen Virions sind Wasser. Polioviren enthalten etwa 4900  $K^+$ -Ionen, 900  $Na^+$ -Ionen, 110  $Mg^{++}$ -Ionen und ungefähr 50 Polyamine (kein  $Ca^{++}$ ). Die positiven Ladungen neutralisieren z.T. die negativen Ladungen der Phosphatgruppen der 35S PV-RNS. (Koch & Koch 1985)

Die Funktionen des Proteinkapsids sind: 1. Schutz der RNS vor Abbau, 2. Bindung an einen Rezeptor, der Aufnahme bedingt, 3. gezielte Verpackung von +-Strang-RNS und 4. eventuelle Funktionen beim Verlassen der Zellen. (Hellen & Wimmer 1992a) Die Proteine vieler Viren regulieren Translation und Replikation. Für PV-Proteine wurden solche Funktionen noch nicht gezeigt. (Liljas 1986)

An der PV-Oberfläche liegen drei bisher unterschiedene antigene Regionen (s.u.)

### 1.1.12.1. Die Struktur des Poliovirusgenoms

Polioviren besitzen eine polycistronische RNS. Alle drei PV-Typen sind vollständig sequenziert worden (PV1, Mahoney: Racaniello & Baltimore 1981a; PV1: Kitamura et al. 1981 enthält auch Racaniellosequenz - Da die ursprüngliche PV1-Sequenz nach Kitamura, POLG\$POL1M, Fehler enthält, wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Sequenz von Baltimore verwendet. Das in dieser Sequenz im VP3 liegende F463 ist wahrscheinlich ein S. - ; PV2, Lansing: La Monica et al. 1986; PV3, Leon: Stanway et al. 1984; Sab1: Nomoto et al. 1982; Sab1-3: Toyoda et al. 1984). Stanway veröffentlichte 1990 eine Liste der bis dahin sequenzierten Picornavirussequenzen, darunter allein zehn PV-Sequenzen. Nomoto et al. machten 1982 eine Gegenüberstellung von Mahoney und Sab1.

Die hier abgebildete Liste enthält die Mahoney-Aminosäuresequenz des PV1 nach Baltimore (1M), eine Sabin-1-Aminosäuresequenz (1S) und die Aminosäuresequenzen von Lansing PV2 (2L) und Leon PV3 (3L). Alle Daten sind der Swiss Protein Bank entnommen und so aufgearbeitet, daß sie der Gegenüberstellung der Sabinstämmen im Buch von Koch und Koch (1985) entsprechen. Die Homologie der Stämme wurde mit dem Programm MACAW gesucht. Dabei wurde bewußt nur ein grobes Alignment gewählt, um keine unnötige Verwirrung in der Numerierung zu erzeugen, die grundsätzlich unveränderbar ist. So können in hier als nicht homolog abgebildeten Regionen (siehe besonders am C-terminalen Ende) noch weitere kurze Homologien auftreten; diese sind jedoch gut mit dem Auge zu erkennen. Typ 1 wurde als Grundsequenz angegeben, weil dieser Typ der bei uns im Labor meist verwendete ist. Beim Vergleich der Sequenzen erscheint es jedoch an manchen Stellen so, als sei Typ 1 der von den anderen Typen abweichende Typ. Bei VP1 mußte unter diesen Bedingungen ab AS 15 eine neue Numerierungsleiste für Typ 3 unten eingeführt werden, um 2 AS verzögert. Bei AS219 (VP1) überspringt die obere Numerierungsleiste eine AS der Typ-3-Sequenz. In den VP2-Sequenzen wird ab AS137 für Typ 2 und Typ 3 eine neue Leiste eingeführt. Die durchgehende Linie soll verhindern, daß der Anwender dieser Listen eine falsche Numerierung abliest. In der komplementären Sequenz fehlende AS sind mit "\*" angegeben, homologe mit "-".

## Aminosäuresequenzen des VP1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
1MVP1  GLGQMLESMIDNTVRETVGAATSRDALPNTTEASGPTHSKEIPALTAVETGATNPLVPSDTVQTRHVQHRSRSESSIESFFARGACVTIMTVDNPASTTN
1SVP1  -----A-----A-I-S-K-
2LVP1  ---DLI-GVVEGVT-NALTPL-PANN--D-QS---A---T-----I-K-T---TV-----A-IE---D-P-KR

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
      .      .      .      .      .      .      .      .      .
3LVP1  -IEDLISEVAQGAL**--LSLPKQQ-S--D-K---A---V-----A-----R---T-----A-IE---EQP--R

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
KDKLFAVWKITYKDTVQLRRKLEFFTYSRFDMELTFVVTANFTETNNGHALNQVYQIMYVPPGAPVPEKWDYTWQTSNPSIFITYGTAPARISVFPYVG
-----T-----F-----
AS--S-----F---S-Y-DA---I---I-G--N-----V---AP-----

      100     110     120     130     140     150     160     170     180     190
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
AQ---M-R-----F-----NA-----I---T-KS-----A-----

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
ISNAYSHFYDGFYSKVPK*DAQSAALGDSLGAASLNDFGILAVRVVNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPRAVAYYGPVVDYKDGTLTLPSTKDLTTY
-----*-----S---L---M---V-----P-----APLPGKGLT-Y

      200     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
LA-----A---T-ANDQI---S-MTVD---V-----V-I-M---V-----P-----NNLDPLSEKGLT-Y
|

```

## Aminosäuresequenzen des VP2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
1MVP2  SPNIEACGYSRDLVQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYLRDSEANPVDQPTPEPVAACRFYTLDTVSWTKESRGWVWKLDPALRDMGLFGQNMYYHY
1SVP2  -----

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
2LVP2  -----M-----IK-----T-R-----K-----F---
3LVP2  ---V-----FI-D-----T-----M-G---K-----

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
LGRSGYTVHVQCNAKFKHQALGVFAVPEMCLAGDSNTTMMHTSYQNANPGEKGGTFTGTFTPDNNQTSPPARRFCVDYLLGNGTLLGNAPVFPHQIINL
-----D-----F-----

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
      .      .      .      .      .      .      .      .      .
---A-----*--H-F-K-E-----E-K-S--L-T-A-N--N-----F-S-V-A---Y-----
-----I--Y-----*DKQRY--A-----R--K-YSQ-NK--AV---K-E-----C-V-----Y-----

      210     220     230     240     250     260     270
      .      .      .      .      .      .      .
RTNNCATLVLPPVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPLNFASSESP EIPITLTIAPMCCEFNGLRNITLPRLQ
-----

      200     210     220     230     240     250     260     270
      .      .      .      .      .      .      .      .
-----T-----D--T--T-----V--T-
---S-I-----A-A-----S--D--QD--V-----V-----S-----V-A-KF-
|

```

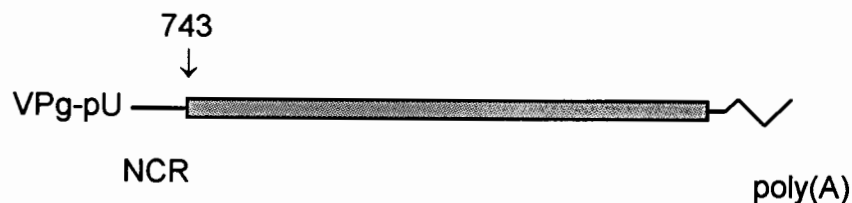
## Aminosäuresequenzen des VP3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1MVP3	GLPVMNTPGSNQYL	TADNFQSPCALPEFDV	TPPIDIPGEVKNMELAE	IDTMIPFDLSATKKN	TMEMYRVRLSDKPHT	DDPILCLSLSPASDP	RLSHTML			
1SVP3	-----K-----									
2LVP3	-----Y-----I-----R-----LN-TNQR-----D-----E-N-AA-S-T-----A-----									
3LVP3	---L-----S--H-----I-----LN-ES--R---D---T---SADLSQ-----									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
	GEILNYYTHWAGSLKFTFLFCGFMATGKLLVSYAPPGADPPKKRKEAMLGTHVIWDIGLQSSCTMVVFWISNTTYRQTIDDSFTEGGYISVFYQTRIVV									
	-----EA--S-----N-----M-----V-----									
	--V-----I--A-----Q--TS-----L-----V-----TQ-----M-----									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
	210	220	230							
	PLSTPREMDILGFVSACNDFSVRLLRDTHIEQKALAQ									
	-----M-----									
	-----K-----S-E-MP-									
	-----KS-SM-----S-S--P-									
	210	220	230							

## Aminosäuresequenzen des VP4

	10	20	30	40	50	60
1MVP4	MGAQVSSQKVG	AHENSNRAYGG	STINYTTIN	YRDSASNAASK	QDFSQDPSK	FTEPIKDVLIKTAPMLN
1SVP4	-----S-----					
2LVP4	-----A-----T-----					
3LVP4	-----K-----Y-----L-----A-----					
	10	20	30	40	50	60

Die Information für die Bildung von Virusproteinen ist durchgehend auf der viralen RNS angeordnet, sie wird als ein zusammenhängendes Polypeptid abgelesen.



Die drei PV-Typen haben fast 90% Sequenzhomologie; in der dritten Kodonposition jedoch nur 32% (Koch & Koch 1985, Le & Zuker 1990). Die viralen Proteine werden in drei Gruppen P1, P2 und P3 eingeteilt. Diese Gruppen enthalten 4, 3 bzw 4 Proteine. (Daher auch der Ausdruck "434"-Nomenklatur. (Boeyé & Rombaut 1992))

P1				P2			P3				
1 A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	3 A	3 B	3C		3D

P1:

- 1A = VP4
- 1B = VP2
- 1C = VP3
- 1D = VP1

P2:

- 2A = Protease
- 2B = ?
- 2C = Protein mit Nukleotidbindungsregion

P3:

- 3A = mit 3B ev. Verankerung (Giachetti 1992)?
- 3B = VPg
- 3C = Protease
- 3D = Polymerase

VP0 = VP4-VP2

3CD = 3C-3D

3C' = alternatives Spaltprodukt von 3CD

3D' = alternatives Spaltprodukt von 3CD

VP-Proteine sind die Strukturproteine des PV. Sie bilden gemeinsam die P1-Region. Diese wird schon während der Translation vom übrigen Polypeptid abgetrennt und myristyliert (Hellen & Wimmer 1992a, Paul et al. 1987). Die Proteine der P2- und P3-Region sind Nichtstrukturproteine. Auf die Reihenfolge der Spaltung in Einzelproteine wird in diesem Zusammenhang nicht eingegangen, weil die Ergebnisse durch Klonierung einzelner Peptide in Fluß geraten sind (Giachetti et al. 1992).

Die AS der Strukturproteine werden durch eine vierstellige Zahl angegeben. Die erste Ziffer ist die Nummer des VPs, die drei folgenden die AS in laufender Folge vom N-Terminus angefangen. z.B. Die AS76, ein Ser in VP1, ist S1076.

Die Virushülle besteht aus 60 VP1 und 60 VP3, 58-59 VP4 und 58-59 VP2 sowie 1-2 ungespaltenen VP0. Die antigene Region 1 besteht aus VP1-Sequenzen, Region 2 aus VP1- und VP2-Stücken und Region 3 aus VP2- und VP3-Teilen.

Schon aus der Nukleotidsequenz läßt sich ein Teil der Proteineigenschaft ablesen, so kodieren XUX für hydrophobe (F,L,I,M,V), XAX für hydrophile AS (E,N,Q,H,K,Y), dabei ist X ein beliebiges Nukleotid. Die Folgen PuPuPy und PyPyPu deuten einen  $\beta$ -Turn (Kurve) an. (Wolfen-

den et al. 1981; Brack & Orgel 1975)

Zur PV-Vermehrung wird der +-Strang in einen --Strang übersetzt. Durch PCR ließ sich unabhängig von der PV-Lebensfähigkeit zeigen, daß eine hohe Rekombinationsrate zwischen homologen Stämmen besteht,  $2 \times 10^{-3}$ . Dabei wechselt die virale Polymerase von einem zum anderen --Strang. Rekombination zwischen heterologen Stämmen ist hundertmal niedriger. (Jarvis & Kirkegaard 1992) Die Rekombination bei Picornaviren ist meistens homolog, d.h. es bleibt immer eine RNS in voller Länge ohne Lücke oder Zusatz erhalten. Bei DNS ist heterologische Rekombination häufiger. PV- Rekombination kann auf der ganzen Länge des Genoms stattfinden. Es sind sogar Polioviren isoliert worden, die Stücke von allen drei Typen enthalten. Die meisten Rekombinanten entstehen im 3'-Nichtstrukturbereich. Es ist unklar, wieso die verschiedenen Typen *in vivo* erhalten bleiben, obwohl eine sehr hohe Rekombinationsrate bei PV besteht. (Lai 1992) Untersuchungen von Rekombinationsstellen zeigen, daß 3' von der Stelle jeweils größere Homologien auftreten. Der Wechsel von einem --Strang zum anderen findet bei der +-Strangsynthese gleich nach der Synthese von UU statt. Nach solchen AA-Stellen auf der --Strang-RNS sind Wechsel 20mal so häufig. (King 1988) Alle OPV-geimpften gesunden Babies scheiden Typ 3 Rekombinanten aus, die ab 2C oder 3D aus den Typen 1 oder 2 bestehen (Cammack et al. 1988, Minor et al. 1986b). Der Anteil von intertypischen Rekombinanten unter Isolaten von Patienten ist hoch (Lipskaya et al. 1991). Mit geklonter cDNS von Polioviren in pBR322 Plasmiden oder SV40 konnte mutationsstabile PV-DNS produziert werden, die in Säugerzellen infektiöses Virus repliziert (Racaniello & Baltimore 1981b, Kean et al. 1986). cDNS aus dem Bakteriophagen SP6 ergab PV-RNS doppelter Länge (Lubinski et al. 1986).

Viele PV-Mutanten sind temperatursensitiv (ts). ts-Mutationen können an ganz verschiedenen Stellen des Genoms liegen. Als Beispiele seien die Insertion eines Kodons in 3A=VPg genannt (Bernstein & Baltimore 1988), zwei verschiedene Insertionen in 2C, denen 2C in trans bei Doppelinfektion helfen kann (Li & Baltimore 1988), eine Punktmutation in 3D (Agut et al. 1989) und ts-Mutanten in der 5'NCR (Dildine & Semler 1989). (Bellocq et al 1987, Drescher-Lincoln et al. 1983, Sarnow et al. 1986, Nomoto & Wimmer 1987)

Bei einem Impfling können im Stuhl etliche verschiedene PV-Mutanten auftreten. Fast alle großen RNS-Viruspopulationen sind Quasispezieskollektionen verschiedener, verwandter Genome. Durch chemische Mutagene kann die Mutationsrate von Polioviren nur wenig erhöht werde (Holland et al. 1990). Kommt ein Virus in einen Wirt, treten erst viele Mutanten auf; ist dann eine stabile Population erreicht, bleibt sie lange Zeit erhalten ohne sich zu ändern, solange sich an den Bedingungen nichts ändert. Bei Polio sind sehr stabile Situationen aber auch instabile bei Epidemien beobachtet worden. Die Resistenz gegen Antikörper variiert sehr stark um einen Mittelwert von  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ . RNS-Genome sind so flexibel, daß ständig mit ihrer genetischen Plastizität gerechnet werden muß. Es besteht immer die Gefahr, daß kleine oder große Veränderungen den Tropismus und / oder die Krankheitseigenschaften beeinflussen. (Steinhauer & Holland 1987) Die Gefahr durch wirtswechselbedingte Variabilität zeigt sich heute besonders bei der Entstehung von immer neuen Influenzavirusstämmen in der "blaue Revolution" genannten Haltung verschiedener Nutztiere, die z. T. von den Exkrementen anderer Arten leben. (Scholtissek & Naylor 1988) Die Mutationsrate des Typ 3 in Finnland lag bei wenigstens 20 Mutationen pro Genom pro Woche. Der Unterschied der Sequenzen von Isolaten verschie-

dener Personen lag zwischen 0,8 und 2%. (Kinnunen et al. 1990) 875 Die PV-Mutationsrate liegt bei  $2,1 \times 10^{-6}$  Mutationen pro Nukleotid bei einem Vermehrungszyklus (Parvin et al. 1986); das sind 0,016 Mutationen pro Genom von 7500 Basen; d.h. von 100 Viren sind 1,6% mutiert nach nur einem Zyklus.

Die Variabilität von Virusgenomen *in vivo* bedingt, daß Impfungen z. B. gegen Rhinoviren oder Influenzaviren oft nicht wirksam sind. Auch die reverse Transkriptase, die zur Vermehrung viraler RNS *in vitro* benutzt wird, besitzt eine Fehlerquote von  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ , so daß viele "Mutationen" erst bei der Herstellung von cDNS eingeführt werden. Einheitliche Varianten können deshalb nur nach vielen Runden der Selektion isoliert werden. (Smith & Inglis 1987)

Es gibt unvollständige Polioviren (DI-Partikel, defective interfering particles (Hagino-Yamagishi & Nomoto 1989)), denen ein Teil der Strukturregion fehlt. Diese Mutanten (mit Deletionen) entstehen spontan (Rueckert 1976), indem die virale Polymerase Schlaufen überspringt, die durch RNS-Doppelstrangbildung entstehen. Die Funktion der DI-Partikel kann heute durch genmanipulierte PV-Genomstücke mit dem angehängten Genom für Chloramphenicol-Acetyltransferase untersucht werden. (Kuge et al. 1986, Percy et al. 1992)

Defekte Genome (z.B. DI-Partikel) können als Helferviren große Teile des Genoms verändert haben und bei einer Rekombination stark veränderte Stücke auf ein intaktes, lebensfähiges Virus übertragen, das dann plötzlich weitreichende phänotypische Änderungen aufweist. DI-Partikel modulieren die Letalität der Zellen und erlauben dadurch Persistenz. (Steinhauer & Holland 1987) Durch rekombinante Vakziniaviren kann reines PV-Hüllprotein gewonnen werden, so daß heute DI-Partikel-Viren ohne verunreinigende wt-Viren hergestellt werden können (Ansardi et al. 1993).

Vor Einführung der Impfung waren 85% aller PV-Infektionen PV1-Brunnhilde-wt-Stämme. Während einer Epidemie ändert sich das PV-Genom zwischen dem ersten und letzten Isolat oder etwa während eines Jahres leicht um hundert Nukleotide, d.h. um 1-2% der Basen. Wahrscheinlich sind alle drei Typen aus einer gemeinsamen Vorstufe hervorgegangen. Die natürlich kursierenden PV-Wildtypen sind heute bei den meisten Menschen durch Impfviren ersetzt. (Koch & Koch 1985, Steinhauer & Holland 1987)

### 1.1.12.2. Chimären des Poliovirusgenoms

(Zur Struktur siehe eventuell erst 1.1.15.)

Einbau von PV-Sequenzen in PV: Die Möglichkeit, PV-Sequenzen als cDNS in pBR322-Plasmiden zu vermehren, hat die Anzahl der Arbeiten mit PV-Chimären stark angestiegen lassen. Vollständige PV-cDNS besitzt etwa 5% der Infektiosität von viraler RNS. (van der Werf et al. 1986) Insertionen von Nukleotiden, die das Leseraster erhalten, führen oft zu lebensfähigen Mutanten, z.B. 3 oder 6 AS bei AS1100 von Sab3 (Colbère-Garapin et al. 1988). Die antigene Region 1 von PV1 läßt sich durch die von PV2 ersetzen (Martin et al. 1988a). Die antigene Region 1 von PV3 an Stelle der gleichen Region von PV1 führt in mit Typ 3 geimpften Primaten zur Neutralisation der Chimäre. Im Kaninchen entstehen Antiseren gegen Typ 1 und 3. (Murray



et al. 1988, Burke et al. 1988) Die antigenen Regionen 2, 3 und "4" von Sab1 wurden durch die homologen Epitope von Sab3 ersetzt (Kohara et al. 1988, Minor et al. 1991). Noch sind die Ergebnisse solcher Versuche ein buntes Durcheinander von Reaktionen mit Antikörpern oder Nichtreaktion, weil die Struktur zu wenig beachtet wird. - Einbau der EF-Schleife vom VP2 des PV2 (Lansing) in die EF-Schleife vom VP2 des PV1 (Mahoney) führte zur Neutralisation des chimären PV1 mit PV2-spezifischen Seren, Einbau derselben Sequenz in die BC-Schleife erst nach Verlängerung der Sequenz (Murdin et al. 1991b, Murdin & Wimmer 1989). Das VP2-Stück 164-175, ein Teil der antigenen Region 2, hat "linearen Charakter". Der Einbau der homologen PV2- und PV3-Sequenzen in PV1 führte trotz vermeintlicher Ähnlichkeit der Regionen nicht zur Neutralisation der PV1-Chimäre durch typ-2- oder typ-3-spezifische Seren. (Burke et al. 1991)

Einbau von PV-Sequenzen in Nicht-PV-Sequenzen: Epitope von HBV und PV sind an verschiedenen Stellen des Maltosebindungsproteins von *E. coli* eingebaut worden. In Mäusen wurden Seren erzeugt, die die entsprechenden synthetischen Peptide erkannten. Für die Herstellung von Impfstoffen brauchen die immunogenen Peptide von PV nicht auf der Bakterien-Oberfläche zu liegen. Allerdings ist die Immunantwort sehr unterschiedlich je nach Art der Immunisierung. Die Neutralisationsaktivität scheint an IgG2 und IgG3 gebunden zu sein. (Martineau et al. 1992, Leclerc et al. 1990) Die antigene Region 1 ist als Hilfsmittel zur Strukturanalyse anderer Proteine (z.B. LamB) benutzt worden. Durch Einbau an verschiedenen Stellen eines Membranproteins kann geklärt werden, welche Teile des Membranproteins außen oder innen liegen. Bis zu 60AS von PV können in LamB eingebaut werden. (Charbit et al. 1991, Charbit et al. 1986) Ähnliche Versuche zur Herstellung von Seren zeigten noch wenig Erfolg (van der Werf et al. 1990) Einbau der AS 1093-1103 von PV1 und PV2, als "linearer Teil" von Region 1, in Oberflächenmoleküle von Hepatitis B zeigen, wie wichtig die Form des Trägerproteins ist. Die eingebauten Peptide rufen Ak hervor, aber nicht die richtigen. ("Die Ergebnisse zeigen, daß Antikörperbindung allein nicht ausreicht, um Viren zu neutralisieren.") (Delpeyroux et al. 1990) Auch die Funktion von Virusteilen kann in Chimären studiert werden. So wurde VP4 von PV1 statt des eigenen VP4s in HAV eingebaut (Wychowski et al. 1990)

Einbau fremder Sequenzen in PV: Der Einbau von Epitopen in die BC-Schleife von PV ist besonders interessant, weil diese Region sowohl zytotoxische T-Lymphozyten induziert und antikörperabhängige-zellvermittelte Zytotoxizität als auch neutralisierende Ak. Crabbe et al. (1990) stellten zum ersten Mal Computerüberlegungen über Größe und Form des eingebauten Stücks in die Chimäre an. Teile der BC-Schleife von PV1 wurden durch HIV-Sequenzen ersetzt. Die eingefügten Stücke sollten lebensfähige Viren ergeben, deshalb mußte das Volumen im Raum dem des ausgeschnittenen Stückes ähnlich sein, die Peptidbindungswinkel mußten übereinstimmen, und der Abstand an der Spitze des  $\beta$ -Fasses mußte gleich sein. In die BC-Schleife ist die Hauptneutralisationsdomäne, PND, von HIV-1 (gp120 von gp160), einer disulfidgebundenen Schleife eingebaut worden. Aus lebensunfähigen Chimären entstanden spontan durch Mutation lebensfähige Polioviren. Diese erzeugten im Kaninchen immunpräzipitierende Ak gegen HIV-1 in großer Zahl. Eine Chimäre produzierte eine schwache aber signifikant neutralisierende Antwort. Es wird vermutet, daß die Struktur zur Bildung neutralisierender Ak noch nicht genug der in HIV-1 entsprach. (Dedieu et al. 1992) - Nach Deletion von etwa AS75

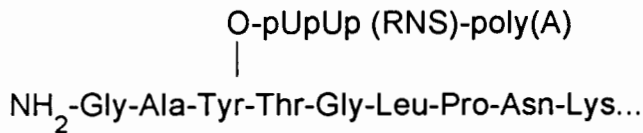
des VP2 bis AS157 des VP1 von PV1 und Einbau von HIV-1 Proteinen in diesem Bereich kam es zur Expression von Fusionsproteinen in HeLa- Zellen (Choi et al. 1991). - Der Einbau von 18AS des gp41 von HIV-1 statt der AS1091-1102 in Sab1 führte in Kaninchen zu Antiseren, die eine große Menge von amerikanischen und afrikanischen HIV-Isolaten neutralisieren und die virusinduzierte Zellfusion verhinderten. (Evans et al. 1989) - Stücke der antigenen GH-Schleife des VP1 von MKS-Virus wurden auch in die BC- Schleife von PV-VP1 eingebaut. Einige der Chimären bildeten neutralisierende Ak. Diese Experimente gehören zu dem Versuch, ein für Klauentiere nichtpathogenes, aber antikörperbildendes und selbstreplizierendes Picornavirus herzustellen. (Kitson et al. 1991) - Der Einbau von 16AS des humanen Papillomavirus (HPV) Typ 16, das bei Gebärmutterkrebs auftritt, in PV1 kann zur Produktion von Antikörpern in Kaninchen benutzt werden. Diese Ak haben sich als nützlich bei der Immunfärbung von HPV-16 in Biopsiematerial erwiesen. (Jenkins et al. 1990)

Viele Hybride zeigen schlechtes Wachstum (Murdin et al. 1991a, Burke et al. 1991). Die Immunantwort auf Peptide, selbst wenn sie in fremde Träger eingebaut sind, scheint daran zu krankem, daß durch diese Peptide die Antikörperbildung stimuliert wird und nicht die T-Zell-Antwort. So versuchen verschiedene Autoren zusätzlich in die antigenträgenden Chimären (z.B. E.coli und Salmonellen) T-Zell-Epitope einzubauen. Ein Beispiel ist ein Stück vom VP1 vom MKS-Virus. AS 141-160 scheint selbst ein T-Zell-Epitop zu enthalten. Ein anderes Epitop AS 200-207 muß verlängert werden. Generell erhält man bessere Ergebnisse, wenn die Peptide doppelt hintereinandergelegt oder wenn zwei verschiedene Epitope kombiniert werden. (Agterberg & Tommassen 1991) Die Einführung von künstlichen Schnittstellen in cDNS, z.B. von Sab1, zur Herstellung von Kassettenvektoren hat die Herstellung gezielter Chimären erleichtert (Burke et al. 1989), das Problem der Strukturstörung bleibt jedoch erhalten. Weil Typ 2 und 3 instabiler sind als Typ 1 PV, arbeitet eine Reihe von Gruppen an Chimären von PV1, die Epitope anderer Typen enthalten (Hogle 1988).

PV kann auch als Indikator benutzt werden. So wurde die gesammte cDNS von PV in ein Plasmid von E.coli eingebaut. Nachdem menschliche Zellen mit diesen Bakterien inkubiert wurden, zeigten sie einen zytopathischen Effekt. So wurde gezeigt, daß der Übergang von bakterieller Plasmid-DNS auf humane Zellen ein häufiger Austausch ist. (Heitmann & Lopez-Pila 1993)

### 1.1.12.3. Die Struktur der Poliovirus-RNS

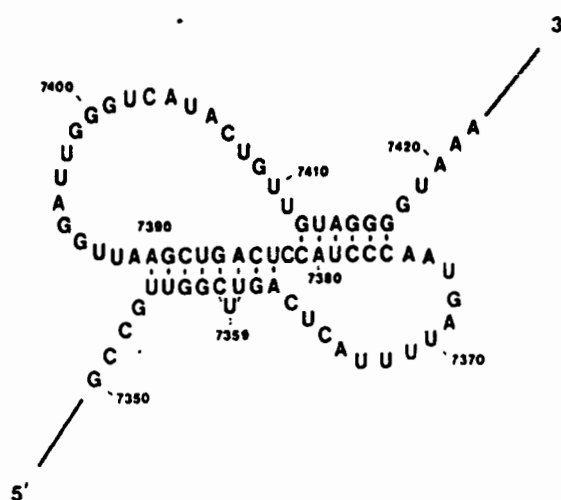
Die RNS des Poliovirus (PV) ist länger als die durchschnittliche Zell-RNS (Sonenberg & Meerovitch 1990). Die einsträngige RNS hat +-Strangcharakter; sie ist gleichzeitig Boten-RNS. Nach der Eigen-Shuster-Hypothese gehört +-RNS zu den Verwandten der ersten selbst replizierenden Moleküle (Gorbalenya et al. 1986). Am 5'Ende der +-RNS von PV sitzt statt des bei Zellen üblichen Methylguanosins ein kleines Polypeptid von 22AS, kovalent über eine Phosphodiesterbrücke gebunden. Es heißt VPg. Seine Bindung an die RNS zeigt die Abbildung. VPg bindet die RNS mit Tyr3; wie Versuche mit Mutationskassetten (cartridge= austauschbarer Behälter) vom 5'-Ende von PV1 Mahoney zeigen, darf die Bindung nicht auf das vierte Nukleotid verschoben werden (Kuhn et al. 1988b). Auch Arg 17 ist nicht austauschbar. In den Versuchen von Kuhn et al. (1988a) waren alle Insertionen letal.



(Rueckert 1985)

Innerhalb der RNS sind Basen mit komplementären Sequenzen gepaart; zusätzlich gibt es die in RNS übliche GC-Paarung (Wada & Suyama 1986). Dadurch bekommt die NS eine komplizierte räumliche Struktur. Schleifen aus vier oder fünf Nukleotiden sind die stabilsten (Deshalb sind die häufigsten Schleifen in 16S RNS vier Nukleotide groß) (Groebe & Uhlenbeck 1988). Die Struktur der PV-RNS ist erst grob aufgeklärt, weshalb die meisten Schleifen noch größer erscheinen. Mutationsanalysen zeigen, daß es ausgleichende "Rückmutationen" in entfernten Regionen gibt. So ist zu erwarten, daß die PV-RNS eine Superstruktur mit Scheinknoten (pseudoknots (Puglisi et al. 1991, Delarue & Moras 1989, Schimmel 1989, Clarke et al. 1987, Tinoco et al. 1987)) besitzt, mit Basenpaarung in weiter Entfernung auf der Sequenz. (Sonenberg & Meerovitch 1990, Currey et al. 1986) Alle +-Strang RNS Viren haben gemeinsame Vorfahren (Strauss & Strauss 1988). Rekombination scheint bevorzugt an den Schleifen stattzufinden, die an ihrer Basis durch Doppelbindungen stabilisiert sind. (Jarvis & Kirkegaard 1992) Pro Replikationszyklus treten 1-3% Rekombinanten auf. Die Fehlerfrequenz bei der Replikation der PV-RNS beträgt  $10^{-4}$  pro Base. Nur 0,1-2% aller PV-Partikel können sich vermehren. (Rueckert 1985)

An beiden Enden der RNS gibt es eine Region, die nicht für Protein kodiert (NCR). Die 3'NCR enthält 73 nicht kodierende Nukleotide und einen reinen Poly(A)-Schwanz. Die Sequenz hat kein AAUAA, wie eukaryotische RNS als Signal zur Polyadenylierung, sondern das Poly(A) wird in Poly(U) übersetzt und umgekehrt. Nach Computerdaten wird vermutet, daß die 3'NCR eine t-RNS-ähnliche Struktur haben könnte (Pilipenko et al. 1992b, Jacobson et al. 1993).

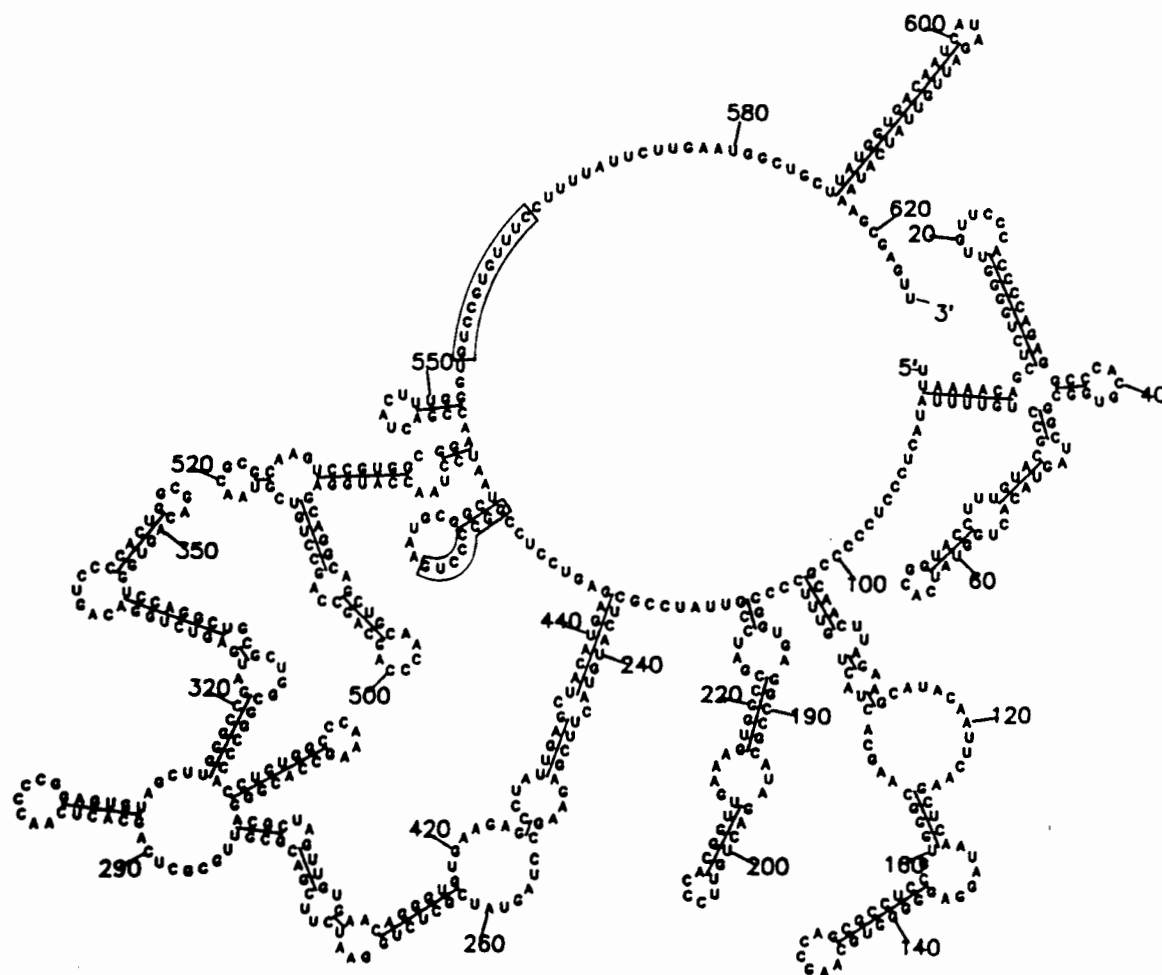


Die 5'NCR ist eine sehr kompliziert gebaute Struktur, die der Regulation der viralen Funktionen dient. Sie besitzt 742 (PV1) bis 747 Nukleotide, im Gegensatz zur NCR von Wirbeltier-RNS, die nur 20-100 Nukleotide hat. Die Anzahl der AUG-Kodons schwankt zwischen fünf und 15 (Pöyry et al. 1992, Sonenberg & Meerovitch 1990). Meistens sind es jedoch sieben. Die ersten

sechs können ohne Wirkung auf den Wuchs mutiert werden. Eine Mutation des siebten AUGs führt zu kleineren Plaques. (Pelletier et al. 1988a) Das Initiationskodon AUG beginnt mit A<sub>743</sub>. Alle PV-Stämme besitzen um das Initiationskodon die Konsensussequenz A(C,U)(A,U)AUGG. (Diese Sequenz unterscheidet sich von der Konsensussequenz der Wirbeltier-RNS, (GCC)GCC(A,G)CCAUGG.) Die NCR enthält 29 Terminationskodons in allen drei Leserahmen, auch dicht hinter allen AUGs. Stromaufwärts liegende AUGs findet man in mRNA sonst nur in 10% der Fälle oder bei Oncogenen. (Koch & Koch 1985, Agol 1991, Kozak 1987, Clarke et al. 1987)

Ein großer Teil der durch Computerprogramme (Turner & Sugimoto 1988, Freier et al. 1986) gefundenen Strukturelemente der NCR (Pilipenko & Agol 1989) wurde unterdessen durch chemische Analysen und Proteinbindungsstudien bestätigt (Skinner et al. 1989, Kuge et al. 1989a, Kuge et al. 1989b). Moderne Computerprogramme kombinieren gewöhnliche Basenpaar-Suchmechanismen mit phylogenetischen und thermodynamischen Methoden (Le & Zuker 1991). Eigene Versuche mit solchen Programmen auf entsprechendem Computer zeigten sehr von den Veröffentlichungen abweichende Strukturen. Auch Zuker et al. (1991) bestätigen, daß Vorhersage von RNS-Struktur noch unsicher ist. Scheinknoten können nicht bearbeitet werden (Jaeger et al. 1989).

Durch Einführung von Mutationen und Verwendung komplementärer Oligodeoxyribonukleotide zur Blockierung konnten die Stellen auf der RNS bestimmt werden, die für die Translation wichtig sind (Haller & Semler 1992, Dildine et al. 1991, Pestova et al. 1989, Kuge & Nomoto 1987, Pelletier et al. 1988b, Trono et al. 1988a). Eine Haarnadelstruktur ganz am Anfang der PV-RNS ab Nukleotid 9 beeinflusst die Effektivität der Translation. Eine Insertion von sechs Nukleotiden in diesem Bereich stört die Replikation nicht. (Simoes & Sarnow 1991) Es gibt Sequenzen in der NCR von PV, die wiederholt werden (Pilipenko et al. 1990). Die Sequenzen der NCR von Entero- und Rhinoviren weisen gemeinsame konservierte Nukleotidfolgen auf, die auf eine einheitliche Tertiärstruktur deuten (Le et al. 1992). Der Vergleich von 33 verschiedenen wt PV3-Stämmen zeigt konservierte und variable Regionen der NCR. Eine Reihe zellulärer Proteine und 3C und 3D (Andino et al. 1990a) binden in der 5'NCR-Region, was sich durch die Abnahme der Beweglichkeit in der SDS-Elektrophorese zeigen läßt. Die Bindungsstellen sind für nahverwandte Picornaviren sehr konservativ erhalten, was ihre Wichtigkeit betont. Die Sequenz U<sub>562</sub> UUCC UUUU (PV3), komplementär zur Shine-Dalgarno-Sequenz der 18S rRNS, soll wichtig sein für die Bindung der Ribosomen. (Dildine & Semler 1992, Pestova et al. 1991, Jang et al. 1990, Pilipenko et al. 1992a, Le et al. 1992). Die Basen 5075-5250 am Übergang von 2C zu 3A binden spezifisch 28S rRNS (1097-1200)(McClure 1985). Die Bindungsstellen einiger Initiationsfaktoren und Proteine unbekannter Funktion (Najita & Sarnow 1990) sind bekannt. Attenuierung könnte Folge eines veränderten Translationsverhaltens sein. (Pöyry et al. 1992, Sonenberg & Meerovitch 1990)



Die Abbildung zeigt die 5'NCR von PV3 nach Le and Zuker (1990).

In Plasmiden führt die 5'NCR von PV zu hoher Expression von Reportergenen. (Trono et al. 1988b)

Durch Röntgenstrukturanalyse kann die PV-RNS nicht erfaßt werden, weil sie gegenüber der Hülle in 60 verschiedenen Positionen vorliegt. Die RNS ist im Virus wesentlich dichter verpackt als in Lösung. NMR-Daten sagen, daß weder Protein noch RNS viel Beweglichkeit haben. (Liljas 1986) Herausstehende Nukleotide sollen für die Bindung an Proteine geeignet sein. Das sind einzelne ungepaarte Nukleotide, die in einer vollständig gepaarten Region liegen. PV besitzt nach meinen Untersuchungen mehr als 40 Möglichkeiten für solche Stellen. Für R17-Bakteriophagen ist eine konkrete RNS-Struktur zur Bindung von R17-Protein bestimmt worden. Sie besteht aus einer Schlaufe mit einem Stamm aus Doppelbindungen, der ein einzelnes ungepaartes Nukleotid enthält. (Uhlenbeck et al. 1987) Beim TMV ist die RNS-Protein-Interaktion nicht basenspezifisch, es besteht jedoch eine Präferenz von AAG und besonders für G in der dritten Position. (Namba et al. 1989) Für RNS-Protein-Interaktionen sind Übereinstimmungssequenzen erarbeitet worden (Wickens & Dahlberg 1987).

NS-Protein-Interaktionen bestehen aus Wasserstoffbindungen und van-der-Waals-Interaktio-

nen. Bielsamkeit und Verformbarkeit der NS sind Voraussetzungen. "Proteine binden oft Konformationen der NS, die eine veränderte Form haben gegenüber ihrer Konformation in Lösung." Zur Erkennung der Bindungsstelle auf der NS dienen dem Protein markante Stellen, wie Helix-Knick-Helix,  $\alpha$ -Helices oder Zinkfinger. Ein Protein ist in der Lage ein einzelnes RNS-Nukleotid zu erkennen, indem es eine Tasche bildet, in die die spezifische Base paßt. (Steitz 1990) Es wurden Konsensussequenzen des Proteins erarbeitet, die nötig sind, um NS zu binden. Auch Picornaviren weisen diese Sequenzen auf. (Gorbalenya & Koonin 1989)

Bei Comoviren konnte die Lage der RNS durch Röntgenstrukturanalyse teilweise geklärt werden. Ein Teil der NS-Sequenzen liegt doppelsträngig, als dreiarmer Stern an der 3er-Symmetrieachse. (Chen et al. 1989) Beim Bohnenschotenfleck-Virus (BPMV) wurde durch Laserramanspektren die Lage der RNS zur Symmetrie des Virus untersucht. (Li et al. 1992)

Durch UV-induzierte Bindung in ganzen Viren konnte gezeigt werden, daß VP4 am meisten Kontakt zur RNS hat, VP2 und VP1 weniger, VP3 nur in Spuren (Wetz & Habermehl 1982).

### **1.1.13. Infektion der Zelle durch Polioviren**

#### **1.1.13.1 Bindung von Polioviren an die Zelle**

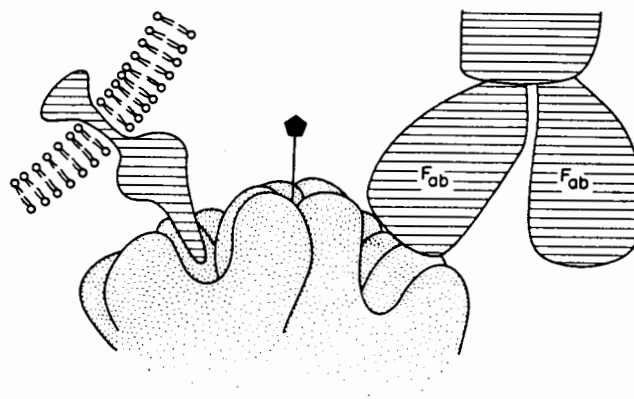
Polioviren können humane Darmzellen (Cacozyellen) und Affennierenzellen (Verozellen) sowohl über die apikale als auch über die basale Plasmamembran infizieren. (Tucker et al. 1993)

MKS-Virus kann auch über den Fc-Teil der an die Viren gebundenen Ak aufgenommen werden und Zellen infizieren. Polioviren können auf diesem Weg nicht infizieren, auch dann nicht, wenn die Zellen durch Transfektion infizierbar sind. Der PV-Rezeptor scheint also an Polioviren zusätzlich zur Bindung eine konformationelle Änderung zu bewirken, die für die Infektion notwendig ist. (Mason et al. 1993)

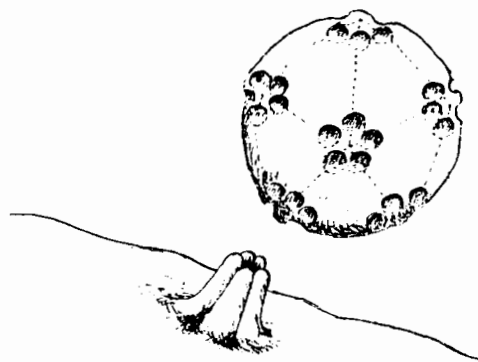
#### **a) Der humane Rezeptor:**

Polioviren werden durch rezeptorvermittelte Endozytose in die infizierbare Zelle aufgenommen (Zeichhardt et al. 1987, Willingmann et al. 1989). Endozytose geschieht in allen tierischen Zellen. Die Rezeptoren sind sehr spezifisch. In allen Fällen geschieht die Aufnahme über coated pits (verkleidete Vesikel). Diese sind umhüllt von 108 Molekülen Clathrin, einem Molekül von 180 000 Daltons. Die Clathrinmoleküle lagern sich spontan zu Kugeln zusammen, bestehend aus zwei Ringen von je sechs Fünfecken, in deren Mitte je ein Sechseck liegt. Die äußeren Seiten der Fünfecke sind durch sechs Sechsecke zur Kugel verbunden. (Goldstein et al. 1979)

Das Gen für den Poliovirusrezeptor (PVR) sitzt auf Chromosom 19 (Rueckert 1985). Es wird vermutet, daß der Rezeptor wie bei HRV ein Pentamer ist, das der fünfzähligen Symmetrie des Viruspartikels entspricht (Crowell 1987); dabei paßt der Rezeptor wie ein Schlüssel ins Loch in Vertiefungen der Virusoberfläche (Schluchthypothese) (Rossmann 1989b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben die Hypothese bestätigt (Olson et al. 1993)



Der Rezeptor der Zelle auf der linken Seite ist schmäler als die Fab-Arme der Antikörper, deshalb paßt er in die Vertiefung der Schlucht auf der Virusoberfläche. In der Mitte ist die fünfzählige Achse eingezeichnet. (Rossmann & Rueckert 1987)



Ein PVR ist isoliert worden. Er ist im humanen Gehirn, Rückenmark und Darm zu finden (Almond 1987) und gehört seiner Struktur nach zur Immunglobulin-Superfamilie. Es gibt vier PVR-Isoformen; zwei haben keinen transmembranen Teil, einer ist löslich (Koike et al. 1990). Das Lektin Concanavalin A hat den gleichen Rezeptor wie PV (Rossmann & Rueckert 1987). PV-Rezeptoren sind gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt, nicht an bestimmte Strukturen gebunden. In kleinen Gebieten von 90-110 nm Durchmesser treten sie gehäuft auf und binden pro solcher Region etwa ein PV-Partikel. (Mannweiler et al. 1990) Die N-Glykosylierung des PV-Rezeptors ist nicht für die Aufnahme von PV notwendig (Zibert & Wimmer 1992, Koike et al. 1992). Es gibt monoklonale Antikörper, die den Rezeptor von PV auf der Zelloberfläche blockieren, so daß Polioviren nicht mehr binden können (Minor et al. 1984). Picornaviren haben einen stark konservierten Rezeptorbindungsbereich (Rossmann & Palmenberg 1988).

Es ist gelungen, den humanen PVR in Mauszellen zu transformieren (Mendelsohn et al. 1986). Für eine PV-Infektion scheinen nur die äußeren Regionen des PV-Rezeptors notwendig zu sein. Manipuliert man die äußeren drei PVR-Domänen an einen verkürzten CD4-Rezeptor, so exprimieren Mauszellen das chimäre Molekül und nehmen PV auf. (Selinka et al. 1992) Deletionsmutanten in PVR-cDNS zeigen in transgenen Mäusen, daß nur Domäne 1 als Rezeptor nötig ist. (Koike et al. 1991a, Freistadt & Racaniello 1991) Diese Domäne reicht sogar dann noch zur In-

fektion durch PV aus, wenn sie statt der ersten beiden Rhinovirusrezeptordomänen an den Rhinovirusrezeptor gebunden ist. Dies zeigt, daß Polioviren über denselben Weg wie Rhinoviren in Mausfibroblasten aufgenommen werden können. (Selinka et al. 1991)

Transgene PV-Rezeptor<sup>+</sup> Mäuse bekommen paralytische Poliomyelitis nach Injektion von Mahoneyviren ins Gehirn. Auf natürlichem Weg, durch orale Infektion, werden die Tiere nicht krank. Der Rezeptor ist also nicht die einzige Voraussetzung für eine Infektion. (Bass & Greenberg 1992, Ren et al. 1990)

Die Anzahl der Bindungsstellen für den Ak D171 gegen PVR beträgt etwa 100 000 pro Zelle; die Zahl der Bindungsstellen für PV auf einer HeLa-Zelle ist etwa 3000. (Nobis et al. 1985, Mendelsohn et al. 1989) Das bedeutet, daß 30 Ak-Bindungsstellen pro PV-Bindung an einer Zelle vorhanden sind, bzw. daß etwa 60 Rezeptoren pro PV-Partikel für die Bindung auf der Zelloberfläche zur Verfügung stehen. An HRV können 60 Rezeptormoleküle gebunden werden; dort bewirken lösliche Rezeptoren *in vitro* spontanes Enthüllen der Rhinoviren, das dem *in vivo* ähnlich ist (Hoover-Litty & Greve 1993).

Das Gen des PV-Rezeptors mit angehängter  $\beta$ -Galaktosidase wurde als cDNS vermehrt. Die *in vitro* Transkription ergab ein Protein von 46kD für den PVR. Durch Zugabe von mikrosomalen Membranen erhielt man ein Glykoprotein von 67kD, das ausreichte, Mauszellen infizierbar zu machen. (Zibert et al. 1991) Andere haben den Rezeptor über spezifische Ak isoliert und seine Größe auf 100kD bestimmt (Shepley et al. 1988). Wie Versuche mit Antirezeptorseren zeigen, gibt es auf sehr vielen Zellen PVR-Sequenzen. Der für die Infektion wirksame PVR scheint nur in bestimmten Zellen durch eine besonders geschnittene RNS (splicing) oder durch posttranslationale Veränderung oder beides gebildet zu werden. (Freistadt et al. 1990) Beim Menschen tritt PVR-RNS und -Protein in vielen Zellarten auf. Es gibt anscheinend zusätzliche Faktoren, die darüber entscheiden, daß die Infektion dann hauptsächlich neurale Zellen trifft. Polioviren binden beim Menschen vorwiegend neurale Gewebe und Darm, gelegentlich aber auch Niere und Leber. (Ren & Racaniello 1992)

Polioviren, die durch Streptavidin oder Concanavalin A über Disulfidbrücken an Maus L-Zellen, ohne Rezeptor, gebunden werden, infizieren nicht (Aarnes et al. 1987).

### **b) Der Mausrezeptor:**

Die Bindung von PV an Zellen scheint komplexer zu sein, als zur Zeit nach der Entdeckung des Rezeptors angenommen. Es gibt nichtinfizierbare Zellen z.B. im Kaninchen, die trotzdem PV binden können. Mit hohen Dosen findet PV-Vermehrung in diesen Zellen statt (auch in Hühnerembryo-Fibroblasten und Hamsterzellen). Für die Größe dieser Rezeptoren werden verschiedene Werte angegeben, eventuell arbeiten einige von ihnen zusammen. (Barnert et al. 1992) Zur weiteren Untersuchung der Proteine, die an der Adsorption von PV beteiligt sind, wurde eine ELISA-Screeningmethode entwickelt, die Hybridomas auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Membranproteine testet (Barnert et al. 1991).

Typ 2 ist für die Maus neurovirulent; die Aufnahme in Mauszellen erfolgt jedoch über einen an-



deren Rezeptor als beim Menschen. Der Mausezeptor bindet AS 93-105 von VP1 von Typ 2. Überträgt man diese Region in die entsprechende von Typ 1, so wird auch Typ 1 mausneurovirulent. Punktmutationen zwischen AS 93 und 105 attenuieren mausvirulente Viren für die Maus. (Couderc et al. 1991, Martin et al. 1991)

Ersetzt man die Rezeptorbindungsregion von PV2 durch die entsprechende BC-Schleife von VP1 vom mausavirulenten PV1, so wird auch PV2 für die Maus avirulent. Dieser Stamm läßt sich verblüffenderweise jedoch durch Mutationen am N-Terminus von VP1 wieder virulent machen. (Moss & Racaniello 1991)

Der humane PVR in der transgenen Maus sitzt auf allen Zellen und bindet PV. Mit einer Ausnahme (Hippocampus) vermehrt sich PV bei der Maus jedoch in den bei Menschen entsprechenden Geweben, Sab1 schlechter als Mahoney (Koike et al 1991b). (Ren & Racaniello 1992)

### 1.1.13.2. Die Aufnahme von Polioviren in die Zelle

Da die Aufnahme von Virionen wegen ihres schnellen Abbaus schlecht verfolgt werden kann, werden für solche Versuche meistens stabilisierte Viruspartikel verwendet. Disoxaril (WIN 51711)(Badger et al. 1989) stabilisiert PV (Rombaut et al. 1991a). Es verhindert das Zerfallen der PV-Hülle, indem es innen im VP1- $\beta$ -Faß die hydrophoben Regionen stabilisiert (Rossmann & Rueckert 1987, Rossmann 1989a). An derselben Stelle wie Disoxaril liegt auch normalerweise eine unbekannte C<sub>16</sub>-Fettsäure in PV (Minor 1992). Win 51711 stabilisiertes PV wird von HeLa-Zellen aufgenommen. Zehn Minuten nach der Infektion befinden sich die Poliovirionen in den Clathrinpartikeln, nach 20-30 min in Endosomen. Dort sind sie noch immer 156S Partikel mit VP4, N-antigen und infektiös, während sie ohne Disoxaril VP4 verlieren. (Zeichhardt et al. 1987, Willingmann et al. 1989) Auch 14S-Pentamere können durch Disoxaril so stabilisiert werden, daß daraus N-antigene leere Kapside gebildet werden können (Rombaut & Boeyé 1991).

Da nur 1-3%, etwa jedes sechzigste, der Viren nach Aufnahme in eine Zelle zur Vermehrung kommt, könnte es sein, daß man im EM hauptsächlich die Aufnahme von Viren betrachtet, die nicht zur Infektion führt. (Bass & Greenberg 1992) Es ist umstritten, an welcher Stelle das Verlassen der viralen RNS aus der Virushülle stattfindet, ob infektiöse Partikel Lysosomen passieren oder nicht. Versuche, in denen gleichzeitig mit Polioviren Toxine als Markierung aufgenommen werden, zeigen, daß diese Stoffe mit PV ins Zytoplasma gelangen. Bei zusätzlicher Gabe des Poliohemmstoffes WIN 51711 werden die PV-enthaltenden Partikel nicht geöffnet, wie die Toxinmarkierung zeigt. (Almela et al. 1991) Das Aufbrechen der Virushülle bzw. das Freisetzen der Polio-RNS ist nicht von einem niedrigen pH-Wert im Endosom abhängig (Gromeier & Wetz 1990, Pérez & Carrasco 1993). Pflanzliche Picornaviren schwellen und schrumpfen in Abhängigkeit von der Konzentration zweiwertiger Ionen. Auch bei Rhinoviren wird die Rolle von Kalziumionen beim Freisetzen der RNS diskutiert, aber wie bei PV ist der Mechanismus nicht bekannt. (Liljas 1986) Bei der Bindung an den Rezeptor -oder nur an seine zwei N-terminalen Domänen (Zibert et al. 1992)- verlieren Polioviren ihr innen liegendes VP4, was auf größere Veränderungen der Hülle schließen läßt. So wird z.B. das 5'Ende von VP1 nach außen gestülpt. Dies scheint nicht nur bei PV der Fall zu sein, denn die Seren gegen verschiedenste Enteroviren zeigen Bindungsreaktionen (auch Kreuzreaktionen) mit Peptiden dieser

VP1-Region, die bei Enteroviren sehr konserviert ist (Cello et al. 1993). Bei Pflanzenviren dringt der N-Terminus zwischen den Protomeren durch. (Hellen & Wimmer 1992). Bei niedrigem pH-Wert exponiert das Hämagglutinin von Influenza ein hydrophobes Segment, das zur Fusion mit der Zellmembran benötigt wird (Stegmann et al. 1987). "Nichtpoliopermissive Wirte (Kaninchen und Maus) machen keine Antikörper, die spezifisch den exponierten N-Terminus von VP1 erkennen." (Hogle & Filman 1989)

Antikörper (Ak) gegen Rhinovirusrezeptor blockieren die Bindung von Rhinoviren an HeLa-Zellen (Condra et al. 1990). Ebenso stören Ak gegen die Bindungsstelle auf dem Virus. Auch Ak gegen andere Regionen können die Rezeptorbindung verhindern, so z.B. Ak gegen die Region 1 von HRV. Ersetzt man ein Stück PV1 Region 1 durch das homologe Stück von HRV14 (Schnupfenvirus), so blockieren die mAk gegen diese Region in HRV nun auch die Bindung der veränderten Polioviren an den PV-Rezeptor. (Altmeyer et al. 1991)

Mit gebundenen Antikörpern scheint die Aufnahme der PV-Partikel über endozytotische Vesikel in Lysosomen zu führen, was ihren Abbau bewirkt. (Koch & Koch 1985)

MKS-Viren mit Antikörpern werden verstärkt aufgenommen. (McCullough et al. 1992)

Auch ohne Rezeptoren ist Infektion von Zellen durch isolierte PV-RNS in hypertonem Medium möglich. Diese Infektionsart funktioniert auch bei Zellen, die nicht von Primaten stammen, sogar in Bakterien. Je nach Zellart bricht die weitere Entwicklung jedoch bald ab. -Auch bei sehr hohen Viruskonzentrationen lassen sich Zellen ohne Rezeptor infizieren. Unter 20°C geht PV nicht in Zellen. (Koch & Koch 1985) S.301ff

### 1.1.13.3. Veränderungen der Wirtszelle

Viren zeigen eine "überraschende" Vielfalt an Mechanismen zum Abschalten der Wirtszelle. Viele Viren vertragen im Gegensatz zur Wirtszelle hohe NaCl-Konzentrationen. (Schneider & Shenk 1987) Eine PV-Infektion führt zu tiefgreifenden Veränderungen von Zellstoffwechsel und Zellaufbau. Der Stoffwechsel wird auf die Produktion von Polioviren umgestellt. Die Struktur des Zytoskeletts wird zerstört (Joachims & Etchison 1992). Das Ionenmilieu der infizierten Zelle wird geändert; trotzdem ändern sich die intrazellulären pH-Werte nicht (Lopez-Rivas et al. 1987). Die äußere Kernmembran trennt sich von der inneren und stülpt sich so aus, daß sie Teile des Zytoplasmas umgibt und schluckt. Daraus bilden sich große, für die PV-Infektion typische Vesikel. Andere kleinere Vesikel entstehen aus dem Trans-Golgi. Diese wandern über das rauhe zum glatten ER. An ihnen findet die PV-RNS-Synthese statt. PV-Vesikel scheinen in Gruppen zusammenzukleben. Vesikelbildungen findet man auch in uninfizierten Zellen, wenn Führungs-(leader)peptide zellulärer Proteine in der Wand des ERs akkumulieren. - Eine PV-Infektion hemmt die Synthese der zellulären mRNS; Wirts-mRNS bindet die 40S-Untereinheiten der Ribosomen nicht mehr (Schneider & Shenk 1987). PV1 und PV2 reduzieren die Membranviskosität, so daß andere Viren aufgenommen werden können (Lee et al. 1990). Poliovirusinfizierte HeLa-Zellen enthalten eine 10-14fache Proteinkinaseaktivität. Je nach der Anwesenheit von divalenten Ionen werden verschiedene Proteine phosphoryliert, zelleigene (Black et al. 1993) und auch Virusproteine, was die Stabilität der Polioviren verändert. (Koch & Koch

1985, Ransone & Dasgupta 1987). Die virale Protease 3C spaltet direkt das TATA-Bindungsprotein, eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID der Polymerase II (Clark et al. 1993), an ähnlichen Stellen wie das virale Polypeptid (Das & Dasgupta 1993). Auch die Aktivität der Lipasen wird verschoben (Guinea et al. 1989). Die Veränderung der Zellproteine aus HeLa-Zellen ist in 2D-Gelelektrophoresen gezeigt worden (Urzainqui & Carrasco 1989a, Urzainqui & Carrasco 1988b)

Als zytopathischer Effekt (CPE) werden angesehen: 1. In der ersten Stunde nach der Infektion wird das Chromatin aus seiner gleichmäßigen Verteilung im Kern an den Rand des Kerns verdrängt. 2. Nach 2,5-3 Stunden entstehen im Zytoplasma, am Kern beginnend, die Membranvesikel. 3. Änderung der Plasmamembranpermeabilität. 4. Nachweis von Viruskristallen.

PV-RNS wird hauptsächlich in Motoneuronen und ihren Fortsätzen, in polymorphonuclearen Zellen und kleinen Neuralzellen gefunden. Der Tod der Motoneuronen scheint auf die Replikation der Viren in diesen Zellen zurückzuführen zu sein. Auch abgeschwächte Polioviren, Sabl, bewirken in Affen Läsionen, aber lokal und in wenigen Zellen. (Couderc et al. 1989a)

Die Infektion einer Zelle mit PV muß nicht immer zum Zelltod führen. Infiziert man Monolayerkulturen von Neuroblastomazellen mit PV, so kann man die Zellen durch Zugabe von spezifischen Antikörpern vor dem Zelltod retten. Die Ak werden wahrscheinlich erst sehr spät im Infektionszyklus von den Zellen aufgenommen, führen aber dennoch zu Zellen, die sich trotz PV-Produktion teilen. Später gesunden die Zellen unter weiterer Serumzugabe; ohne Serum kommt es zu persistenten Infektionen. (Tolskaya et al. 1992)

Es gibt drei Typen der persistenten Infektion: 1. chronische (langzeitig nach Infektion), 2. latent (ohne Virusproduktion), 3. "slow virus" (lange Inkubation über Monate bis Jahre). Persistenz wird durch eine hohe Mutationsrate beeinflusst, die zur Selektion von Mutanten führt, die einen Vorteil in der Wirtszelle haben. Auch die Herstellung von DI-Partikeln (unvollständigen Viren), die die Menge an Standardvirus vermindern und so die Virusproduktion regulieren, sorgt dafür, daß weniger Zellschädigungen entstehen. Immunabwehr, die entsteht, bevor sich die Infektion voll entwickelt hat, begünstigt Viruspersistenz. Auch die virusspezifische Immunantwort selbst kann von Vorteil sein für die Persistenz, indem die Virusverbreitung begrenzt wird. Der Verlauf der Immunreaktion hängt u.a. von den Gewebefaktoren der menschlichen Zellen ab. So kann die Persistenz Folge einer ineffektiven Immunantwort sein. Es ist unbekannt, ob Latenz ein statischer Zustand oder eine kontinuierliche, unmeßbar kleine Virusproduktion ist. Bei der EBV-Latenz sind Antigen und RNS in geringer Menge nachweisbar. (Rapp & Cory 1988)

Infiziert man HeLa-Zellen gleichzeitig mit ganzer PV-RNS und RNS ohne Kapsidregion, so erhält man Zellen, die überleben. Nimmt man diese in Kultur, so treten von Zeit zu Zeit Zyklen von Lyse auf. Ein Teil der überlebenden Zellen besitzt keinen Rezeptor mehr oder enthält andere Blockierungen des Zellstoffwechsels, die keine PV-Vermehrung mehr erlauben. (Kaplan et al. 1989)

### 1.1.14. Vermehrung der Polioviren

#### 1.1.14.1. Verlassen der Virushülle

Bislang ist es unbekannt, wie Polioviren ihre Hülle verlassen. Da PV kein  $\text{Ca}^{2+}$  enthält, scheiden Mechanismen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Zellwandbindungsproteine wie bei anderen Viren aus (Ludlow & Consigli 1987). Über die Rolle des pH-Wertes bei der Auflösung der Virushülle wird noch spekuliert. Ein Unterbrechen der Interaktionen von Histidinen mit Arg oder Lys im Raum zwischen den Proteinen, wie bei Rhinoviren möglich, erscheint bei Polioviren wegen der pH-Stabilität nicht möglich. (Warwicker 1992) Bei Rhinoviren wird die Struktur der GH-Schleife von VP1 durch Säure verändert, wie Röntgenstrukturdaten zeigen (Giranda et al. 1992). Einige EDTA-empfindliche Pflanzenvirenhüllen gehen nicht bei Eintritt in die Zelle auseinander, sondern schützen die RNS, bis sie die Ribosomen erreicht hat. Bei PV wird der N-Terminus von VP1 nach außen verlegt und das Virion scheint sich an der 5er-Achse zu öffnen. (Liljas 1991)

Sowohl bei der Einkapselung (AS1001-1004) als auch bei der Freisetzung (AS1008+1009) der RNS soll der N-Terminus von VP1 eine Rolle spielen (Kirkegaard 1989).

Der nach außen verlegte Aminoterminus von VP1 könnte der Verankerung des Virions in der endosomalen Membran dienen. Bei umhüllten Viren übernehmen AS-Sequenzen, die amphipatische Helices bilden können, diese Rolle bei der Aufnahme in die Zelle. Die ersten 30 AS von VP1 wären für eine solche Funktion nötig. Die Sequenz des N-Terminus von VP2 kann auch wie eine amphipatische Helix gefaltet werden. (Fricks & Hogle 1990)

Es könnte sein, daß ribosomale Translation Energie freisetzt, die PV-RNS aus dem Kapsid "saugen" kann, wie bei Phagen oder einigen pflanzlichen +-Strang-Viren (Savithri et al. 1989). Virale Proteine könnten bei diesem Vorgang helfen. Ein Teil der parenteralen PV-Proteine wird an virusspezifischen, extrem großen Polysomen gebunden. PV-induzierte Polysomen enthalten bis zu 35 Ribosomen. (Koch & Koch 1985; Cantero-Aguilar et al. 1987)

Nach Harnstoffdissoziation von Polioviren sollen sich spontan VP1-Proteine an die virale RNS lagern (Wiegers et al. 1976).

Auch andere Versuche deuten an, daß es einen engen Kontakt zwischen PV-RNS und PV-Protein gibt. Durch UV-Bestrahlung werden solche Kontaktstellen vernetzt. Nach UV-Bestrahlung können Viren in ihre Einzelproteine zerlegt werden. Nach daran anschließender Verdauung der RNS bleiben kurze, durch das Protein geschützte RNS-Stücke an den Proteinen hängen. Die Verzögerung von VP1 in der Elektrophorese zeigt, daß VP1 RNS gebunden hat. Ohne UV ist keine Bindung sichtbar. (Bienz et al. 1990)

Das Pflanzenvirus SBMV dissoziiert erst bei Beginn der Translation (Liljas 1986).

Trennt man HeLa-Zellfraktionen durch isoosmotische Nycodenzgradienten, so kann der Verbleib radioaktiver Viren nach der Infektion verfolgt werden. Kurz nach der Aufnahme werden keine Polioviren in Lysosomen oder Endosomen gefunden, aber in der Plasmamembranfraktion und eventuell in "Lipidvesikeln". (Kronenberger et al. 1992)

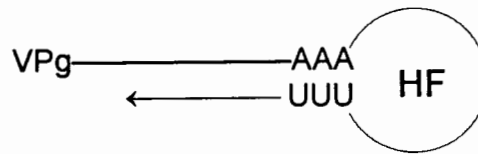
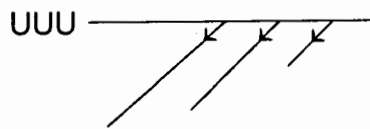
### 1.1.14.2. Transkription, Translation und Proteinspaltung

Die Initiationsfaktoren (eIF-4E und eIF-4F) helfen die gefaltete mRNS zu entwinden (Sonenberg & Meerovitch 1990). Der Hauptunterschied zwischen der cap-abhängigen eukaryotischen und der cap-unabhängigen Initiation der Translation bei PV ist, daß eIF-4F (aus: 24kD = cap-bindendes Protein, 46kD, 73kD und 220kD (Schneider & Shenk 1987)), der sonst die Cap-Struktur bindet, an viraler RNS direkt bindet und auch direkt andere Faktoren stimuliert. (Scheper et al. 1992) Die Spaltung des Proteins von 220kD durch PV kann nicht allein für die Hemmung der Proteinsynthese verantwortlich sein, weil dadurch nur 55-77% der Zell-Proteinsynthese unterdrückt werden (Bonneau & Sonnenberg 1987). Alle zellulären, eukaryotischen mRNS besitzen eine Cap-Struktur ( $m^7GpppXXX...$ ), außer der RNS der Organellen. Bei Typ 2, Lansing, wird diskutiert, ob eventuell p52, das eine stark strukturierte Region der NCR bindet (Meerovitch et al. 1989), den Ribosomen bei der Bindung an die virale RNS hilft. (Sonenberg & Pelletier 1989, Sonenberg & Meerovitch 1990) Auf noch unbekannt Art wird auch durch die Protease 2A PV-RNS mit 5'NCR effektiver translatiert in der frühen Infektion, in der die zelluläre Translation noch nicht abgeschaltet ist (Hambidge & Sarnow 1992).

Ein zelluläres Protein spaltet die Tyrosin-Phosphat-Bindung zwischen VPg und der viralen RNS (Boeyé & Rombaut 1992, Jang et al. 1990). Die RNS aus den Viruspartikeln wird dann am rauhen Endoplasmatischen Retikulum von der Zelle in die ersten viralen Proteine übersetzt. Die Translation von Picornaviren ist auffallend effizient bei hohen Salzkonzentrationen. Neu gebildete Virusproteine bleiben auch nach dem Zerschneiden des Polypeptides mit der Membran assoziiert. (Koch & Koch 1985). Versuche mit cDNS von PV1, die in frame Deletionen (ohne Verschiebung des Leserahmens für die Nukleotidtripletts) enthalten, zeigen, daß die Kapsidpolypeptide nicht zur Replikation der RNS *in vivo* nötig sind (Kaplan & Racaniello 1987).

#### a) Transkription

Während für die Bildung der doppelsträngigen replikativen Form (RF) bei der Synthese von --RNS *in vitro* keine zelluläre Komponente oder Struktur nötig ist, verlangt die replikative Zwischenform (RI) bei der Synthese von +-RNS einen Replikationskomplex (Modell siehe Koch und Koch 1985, S.261 Abb.D), der sich in einer Rosette von virusinduzierten, zytoplasmatischen Vesikeln ausdehnt. (Bienz et al. 1992). Die Transkription der viralen RNS ist membranengebunden (Takeda et al. 1986). Sie ist nur möglich, wenn P2 die räumliche Organisation des Replikationskomplexes auf der Vesikelmembran erhält. Der Gesamtkomplex ist 1000-1500 nm lang, ausgestreckt zwischen mehreren Vesikeln. Die RNS mit 2700-2800 nm könnte ausgestreckt in diesem Komplex liegen. 2C könnte die Nachkommen-RNS so an ein Vesikel binden, daß sie nicht mit dem Ausgangsstrang hybridisiert. (Bienz et al. 1990, Bienz et al. 1987) Die Synthese des --Strangs beginnt mit VPg-pUpU (Toyoda et al. 1987, Takeda et al. 1987). Zusätzlich wird die Existenz eines Wirtsfaktors, einer Uridylyltransferase vermutet (Hey et al. 1986, Young et al. 1986, Andrews & Baltimore 1986b). Die Aminosäuren direkt vor VPg scheinen nötig zu sein, um VPg an der Membran zu befestigen. P2-3AB, 2C-3AB und 3AB binden an Membran aus polioinfizierten Zellen. (Giachetti & Semler 1991)

– *RNS-Synthese:**RF (replicative form)*+ *RNS-Synthese:**RI (replicative intermediate)*

Nach Sequenzanalysen und Mutationsversuchen besitzt 2C eine Nucleotidbindungsstelle (Gorbalenya et al. 1990, Pincus et al. 1986). Auch 2C, 2BC und P2 aus UV-bestrahlten Zellen zeigen Verlangsamung in der SDS-Elektrophorese. Es treten mehrere Banden auf, die auf mehrere Bindungsstellen deuten. (Bienz et al. 1990) Eventuell sind auch die gebundenen RNS-Stücke verschieden groß. Sie könnten durch direkte RNS-Sequenzierung mit 5'Endmarkierung bestimmt werden (Larsen et al. 1981). Bei einem Pockenvirus der Pflaume besitzt 2C Helikaseaktivität (Lain et al. 1990). PV-2C soll auch Nucleosid-Triphosphataseaktivität haben (Rodriguez & Carrasco 1993).

Es ist gelungen, einen aktiven Replikationskomplex von Vesikeln mit glatter Membran zu isolieren. In dem Komplex befestigt die 2C enthaltende Vorstufe P2 virale RNS an der Membran. Der Replikationskomplex sitzt außen auf den aus dem rauhen ER knospenden Vesikeln. 2BC und 2C sitzen ausschließlich auf der Vesikelmembran. 2BC induziert die Bildung von Vesikeln. Zwischen den Vesikeln konnte die Lage der viralen +-Strang-RNS durch RNS-Proben bestimmt werden (Troxler et al. 1992). 2C bindet Membran und RNS. Guanidin blockt die Synthese der viralen RNS (Pincus et al. 1987); gleichzeitig liegen die AS-Änderungen guanidinresistenter Mutanten in 2C (Baltera & Tershak 1989, de la Torre et al. 1990, Tershak 1985). Wird Guanidin erst nach einer Zeit gegeben, die Transkription erlaubt hat, treten Ansammlungen leerer Kapside auf, die Proteinsynthese sinkt allmählich und die Spaltung der viralen Proteine läuft bis auf die VP0-Spaltung normal (Rueckert 1976). Durch UV-Licht kann man die virale RNS an P2

binden (cross-linking). Durch diese Bindung wird die Struktur jedoch so verändert, daß der Replikationskomplex nicht mehr an Vesikel bindet. (Bienz et al. 1990, Lee & Chow 1992) Die Struktur des Komplexes und die Anwesenheit von 2C sind notwendig, damit überhaupt +-Strang-RNS gebildet wird. Ein zweites Membransystem ist erforderlich für die Produktion und Freisetzung der viralen RNS (mit 36S). Beide Membransysteme lassen sich bei verschiedenen Saccharosekonzentrationen durch Gradientenzentrifugation isolieren. (Bienz et al. 1992)

Die Nukleotidbindungsregion des Proteins 2C von PV1 Mah besitzt Homologien zu denen anderer Picornaviren. Die übereinstimmende Sequenz ist G/AXXGXGXGKS/T und DD/E. Sie entspricht den AS 129-136 und 176-177. 1mM Guanidin-Hydrochlorid verhindert die Bindung von RNS an diese Sequenz. Mutationen innerhalb des Motifs stören die RNS-Replikation und Virusproduktion; Mutationen außerhalb der Region werden toleriert. (Mirzayan & Wimmer 1992)

Da alle zelluläre RNS von DNS abgelesen wird, müssen RNS-Viren ihre Polymerase selbst mitbringen. Die Viruspolymerase (3D) übersetzt den +-Strang in einen oder mehrere komplementäre --Stränge, an denen darauf gleichzeitig mehrere neue +-Stränge synthetisiert werden. Diese dienen entweder als Boten-RNS oder werden mit angehängtem VPg in neue Viren eingebaut. 3D besitzt die Fähigkeit, bei der Elongation der Transkription doppelsträngige RNS zu entwinden (Cho et al. 1933). Von 40 000 Viren baut eins falsch eine --RNS ein, in der infizierten Zelle kommen auf ein -Strangmolekül 40-70 +-RNS-Moleküle (Novak & Kirkegaard 1991). Die Zellart der infizierten Zelle bestimmt das Verhältnis, in dem +- oder --Strang gebildet werden (Lopez-Guerrero et al. 1991).

3D (Rothstein et al. 1988, Richards et al. 1987, Morrow et al. 1987) besitzt eine Nukleotidbindungsstelle an einem Lysin zwischen Met-189 und Lys-228, an dieser können alle Nukleotide gebunden werden. Gebundene Nukleotide schützen die Polymerase drastisch vor Hitzedenaturierung. Im Filterbindungstest wird Poliovirus-RNS etwas besser als nicht virale RNS gebunden. Die konservierte Region YGDD (AS 325-328) der Polymerase ist essentiell für die Enzymaktivität. (Richards et al. 1992, Jablonski et al. 1991) Für die --RNS-Synthese benötigt das Enzym einen Oligo(U)-Primer und einen Wirtsfaktor (Lubinski et al. 1987, Hey et al. 1987) ("snapback structure" siehe Ishihama & Nagata 1988). Es hat sowohl poly(A)-abhängige, poly(U)-geprimte Polymeraseaktivität als auch unabhängige Polymeraseaktivität (Plotch et al. 1989). Über Chromatographie auf Hydroxylapatit gereinigte 3D synthetisiert doppelt lange RNS; Reinigung auf Poly(U)-Sephrose führt zu genomlanger RNS mit Poly(U) als Primer, ohne VPg (Young et al. 1987). Nach Protein-RNS-Bindungstests auf Nitrozellulose bindet gereinigte Polymerase 3D <sup>32</sup>P markierte PV-RNS, besonders am 3'-Ende. 3D bindet Poly(G)>>> Poly(U) > Poly(C) > Poly(A). (Oberste & Flanagan 1988) Ob VPg zur viralen RNS-Synthese benötigt wird, ist noch umstritten, seine Funktion hängt jedoch mit der Replikation zusammen (Andrews & Baltimore 1986a, Reuer et al. 1990). Es gibt temperatursensitive PV-Mutanten, die in 3D mutiert sind (Burns et al. 1992). PV-3D hat eine Fehlerfrequenz von 10<sup>-3</sup>-10<sup>-4</sup>. Die niedrigere Mutationsrate in Zellkultur im Vergleich zu der im natürlichen Wirt hängt möglicherweise vom Selektionsdruck der Umgebung ab. (Ward & Flanagan 1992) Während Guanidin und Flavone selektiv die Synthese von +-Strang blockieren, hemmt Gliotoxin +-und --Strangsynthese (Rodriguez & Carrasco 1992). Kurze Insertionen in 3D haben sehr unterschiedliche Effekte



(Burns et al. 1989). Durch Insertion funktionsunfähig gemachte 3D kann in trans von anderen Viren ersetzt werden (Charini et al. 1991). PV-3D liegt nach der Infektion in der Zelle in verschieden stark phosphorylierten Formen vor (Ransone & Dasgupta 1989).

## b) Translation

Schon während die +-Strang-RNS am --Strang gebildet wird, entsteht an ihr am rauhen ER das in einem Stück abgelesene Polyprotein von 247 000 Dalton (Nomoto 1993). Sobald die PV-RNS an Ribosomen bindet, wird VPg abgespalten (Sonenberg & Meero vitch 1990). Die zellulären Ribosomen sollen zur Initiation einen inneren "Landungsplatz" in der viralen RNS benutzen (Pelletier & Sonenberg 1989). Die Existenz eines internen Ribosomenlandungsplatzes (Nukleotid 556-585 (Bienkowska-Szewczyk & Ehrenfeld 1988, Nicholson et al. 1991, Meero vitch et al. 1991, Jackson et al. 1990)) soll wichtig sein, weil Polioviren damit die Translation ohne eigene Polypeptide in der Zelle beginnen können. Der Mechanismus ist in der uninfizierten Zelle vorhanden, ob er auch sonst genutzt wird, ist noch offen. Er würde von der normalen am 5'Ende initiierten Translation abweichen und ist nun wegen experimenteller Mängel angezweifelt worden (Kozak 1992). Die Sequenz der NCR konnte auch in retroviralen Vektoren die Translation initiieren (Adam et al. 1991). Die Ergebnisse aus *in vitro* Translationsversuchen müssen mit Vorsicht interpretiert werden. So zeigte sich, daß die Translation im Retikulozytenlysat (Phillips & Emmert 1986) an der falschen Stelle beginnt. (Svitkin et al. 1988) In HeLa-Zellen werden bei alkalischem pH und NaCl-Mangel nur P2 und P3 übersetzt (Castrillo et al. 1988). (Cap s.o.)

## c) Die viralen Proteasen

Strukturproteine können von Polioviren in trans benutzt werden. So kann Mutanten in 2A oder 3A durch wt-Doppelinfection geholfen werden. Die Funktionen von 2B, 3D oder der 3'NCR konnten nicht durch wt ersetzt werden. (Bernstein et al. 1986)

Die viralen Proteasen 2A und 3C spalten das Polyprotein über Zwischenstufen zu den funktionellen Virusproteinen. Das Processing kann heute *in vitro* verfolgt werden (Ypma-Wong & Semler 1987b, Kay & Dunn 1990).

Es wird nach Proteinaseinhibitoren der viralen Proteasen gesucht, um sie als Chemotherapeutika einzusetzen. Da die viralen Proteasen hoch spezifisch sind, hofft man solche Inhibitoren zu finden, die nicht mit den normalen zellulären proteolytischen Prozessen konkurrieren. (Hellen et al. 1989)

Die Proteasen von animalen Picornaviren und Pflanzencomo- und -potyviren ähneln in ihrer Struktur den Trypsinproteasen (Serinproteasen); das Serin der katalysierenden Triade ist jedoch bei den Viren durch ein Cystein ersetzt. (Bazan & Fletterick 1988) Dies trifft sowohl auf 2A als auch auf 3C zu.

Die Protease 2A (König & Rosenwirth 1987) wurde lange Zeit für ein zelluläres Protein gehalten, weil sie zwischen Tyr und Gly schon bei der Translation spaltet; die Sequenz dieser Stellen

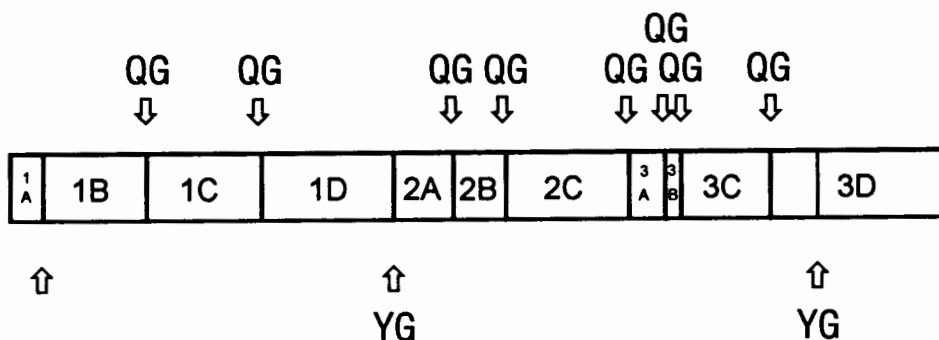


lautet LXTY-G (X= beliebige AS)(Hellen et al. 1989). 2A soll außerdem indirekt bewirken, daß p220, ein Teil des Cap-bindenden Komplexes, gespalten wird; Ak gegen 2A verhindern dies (Rueckert 1985, Schneider & Shenk 1987, O'Neill & Racaniello 1989, Kräusslich et al. 1987, Etchison & Etchison 1987, Lloyd et al. 1987). 2A spaltet in HeLa-Zellen p220. Dies funktioniert sogar dann, wenn 2A in ein HIV-Plasmid unter tat-Kontrolle eingebaut ist, mit dem die Zellen infiziert werden (Sun & Baltimore 1989). PV-cDNS in Vacciniavirus verhindert die Translation von Vacciniavirus wegen 2A (Turner et al. 1989, Jewell et al. 1990). Im Gegensatz dazu kann PV die Translation später mRNS von Adenoviren trotz Cap-Struktur nicht abschalten (Castrillo & Carrasco 1987). 2A spaltet das Viruspolypeptid cis zwischen P1 und P2, also direkt vor dem 5'-Ende der Protease selbst (Kräusslich et al. 1987, Nicklin et al. 1987), und trans an der alternativen Spaltstelle zwischen 3C' und 3D' (Toyoda et al. 1986, Arnold et al. 1987, Yu & Lloyd 1991). Die alternative Spaltung 3C'/3D' ist nicht für die Virusreplikation notwendig (Lee & Wimmer 1988). Die Spaltaktivität von 2A wird nicht nur von den AS direkt an der Spaltstelle, sondern auch von denen in der Nähe bestimmt. Spaltet 2A die zusätzliche Spaltstelle zwischen 3C' und 3D' in trans, so sind die Bedingungen für die Struktur der Spaltstelle wesentlich stringenter als für in cis Spaltung. (Hellen et al. 1992) 2A hat die Struktur einer Serinprotease, deren katalytisches Zentrum jedoch ein Cys ist. Alle Enteroviren- und Rhinoviren-2A-Proteasen (nicht bei anderen Serinproteasen) haben gemeinsam die Sequenz: Cys55-X-Cys57-XXXX...-Cys115-X-His117. Die Cys bilden keine Disulfidbrücken, trotzdem sind diese drei Cys und Cys109 nötig, um die Struktur und das katalytische Zentrum zu erhalten. (Yu & Lloyd 1992) Mit anderen Cysteinproteasen hat 2A die Sequenz PGDC<sub>109</sub>GGXLXC<sub>115</sub>XH<sub>117</sub>G gemeinsam. His20, Asp38 und Cys109 sind essentiell, die katalytische Triade (Yu & Lloyd 1991). (Das Cys109 entspricht dem Ser z.B. in Trypsin.) Wird das Cys109 durch ein Ser in 2A ersetzt, bleibt sogar ein Teil der autokatalytischen Aktivität erhalten. (Hellen & Wimmer 1992a) 2A wird durch Inhibitoren sowohl von Serin- als auch von Cysteinproteasen blockiert. (Yu & Lloyd 1991)

Die Protease 3C spaltet Gln-Gly-Bindungen (Semler et al. 1987, Kean et al. 1990). Im PV-Protein sind 13 solcher Bindungen vorhanden, nur acht oder neun werden gespalten. Für die Spaltungen zwischen den Strukturproteinen wird die noch ungespaltene Protease 3CD benötigt (Jore et al. 1988). (*In vitro* reicht 3C. (Takahara et al. 1989, Nicklin et al. 1988)) Für Spaltungen innerhalb von P2 reicht 3C allein. (Ypma-Wong & Semler 1987a) Durch *in vitro* Translation von P1 und Protease 3CD wurde gezeigt, daß allein 3CD notwendig ist, um aus P1 14S Untereinheiten und leere Kapside zu machen (Jore et al. 1991, Ypma-Wong et al. 1988b). Zelluläre Faktoren erhöhen die Effizienz der Spaltungsreaktion (Blair et al. 1993). 3CD und 3C spalten QG-Paare in P2 und P3 gleich gut (Ypma-Wong et al. 1988b). (Harris et al. 1992) Ohne den 3D-Teil wird VP0-VP3 gar nicht gespalten (Boeyé & Rombaut 1992). AS 2074E ist Teil einer antigenen Region (site 3B) von PV. Wird diese AS mutiert, so ist das Virion thermostabiler und resistent gegen die entsprechenden mAk. Gleichzeitig kommt es zur Anreicherung von P1, was andeutet, daß Protease 3CD inhibiert wird. (Reynolds et al. 1992) Wenigstens zwei der viralen Strukturproteine müssen schon richtig gefaltet sein ( $\beta$ -Faßstruktur), damit 3C schneiden kann. VP3/VP1 muß nicht vor VP0/VP3 gespalten werden. 2A muß P1 von P2+3 getrennt haben, damit 3C P1 spalten kann. (Ypma-Wong et al. 1988a) 3C hat auch die Struktur einer Serinprotease wie Trypsin; das katalytische Zentrum ist ein Cys am C-Terminus wie bei Cysteinprotea-

sen wie Kathepsin H. 3C besitzt Sequenzähnlichkeit zu Kathepsin; diese reicht bis ins Gen der im Genom folgenden 3D-Polymerase hinein (Gorbalenya et al. 1986). Die katalytische Triade bilden His40, Glu71 und Cys147 (Hämmerle et al. 1991, Kean et al. 1993). Gorbalenya et al. (1989) zeigen einen Vergleich zwischen 3C und Serinproteasen sowie Cysteinproteasen der +-Strang-RNS-Viren. 3C zerstört gleich nach Infektion von HeLa-Zellen einen DNS-Proteinkomplex, der am Promoter der RNS-Polymerase I sitzt. Dadurch wird die Transkription von rRNS inhibiert. Die Synthese der t-RNS wird gehemmt, indem ein Faktor von 3C selbst oder indirekt gespalten wird, den Polymerase III benötigt (Clark et al. 1991). 3C kann (wie auch 3CD) in den Zellkern eintreten und alle drei Polymerasearten hemmen. PV-3C kann in Gegensatz zu anderen Picornaviren keine Histone spalten. Die Spaltung von Polymerase I, II und III -Transkriptionsfaktoren ist der erste Hinweis darauf, daß PV-Protease 3C zelluläre Proteine spalten kann. (Rubinstein et al. 1992, Baum et al. 1991) Baut man die Spaltstelle für 3C in die BC-Schleufe von VP1 ein, so ist diese Sequenz auch in der neuen Umgebung spaltbar, solange das Stück (GTAKVQGPG) groß genug ist. QGPG allein wird nicht gespalten. (Mirzayan et al. 1991) Durch eine Serie von synthetischen Oligopeptiden als Substrat wurde die Aktivität von 3C untersucht und eine Liste von Inhibitoren gefunden und eine Präferenz des Enzyms für Spaltung an Stellen mit einem P nach dem G ( $P_2'$ -Position) (Q-GP)(Weidner & Dunn 1991) oder einem A drei Stellen vor dem Q (Position  $P_4$ ) (Pallai et al. 1989). Auch die Schnittstelle für 3CD kann verändert werden (Blair et al. 1990). Mutationen in 3C können auch Einfluß auf die Bildung von 3D haben (Dewalt et al. 1990). Eine Mutation in Nukleotid 70 der 5'NCR konnte durch eine Suppressorrevertante in 3C ausgeglichen werden. So scheint 3C nicht nur mit Protein zu interagieren, sondern auch mit dem 5'-Ende der RNS. Vielleicht spielt 3C aber auch nur eine indirekte Rolle in der RNS-Replikation über 3D oder VPg. (Andino et al. 1990b) In Mutanten, die kein 3C und 3D bilden können, übernehmen 3C' und 3D' deren Funktion, so daß die Viren fast so gut wie wt wachsen (Dewalt & Semler 1987).

Die AS-Sequenz an den Schnittstellen ist sehr verschieden. Bei allen Picornaviren ist jedoch  $P_1'$  bei 2A immer ein G; und für 3C muß  $P_4$  aliphatisch sein und  $P_2'$  ein P. (Hellen & Wimmer 1992b) (Abb. nach Kräusslich & Wimmer 1988)



#### d) Funktionen weiterer Virusproteine

Auch die Funktion der anderen Nichtstrukturproteine kann nun untersucht werden, weil es gelungen ist, sie in *Escherichia coli* zu klonieren. Einige der Proteine sind für die Bakterien zytotoxisch. Das Problem konnte jedoch durch einen induzierbaren Vektor gelöst werden. (Lama et al. 1992) 2B, 3A und 3AB wurden mit T7-Phagen in *E. coli* vermehrt. Alle drei Peptide sind bei Induktion toxisch für die Bakterien. Eventuell lysieren ihre hydrophoben Domänen, die nach Computeranalysen amphipatisch angeordnet sein können, die Bakterienwand. (Lama & Carrasco 1992a, Lama & Carrasco 1992b) 2B-Mutanten sind dominant über 2B-Wildtyp, sie können nicht in trans komplementiert werden. Die Funktion ist noch ungeklärt. 2BC ist eine Vorstufe von 2B, sie wird im membrangebundenen Replikationskomplex gefunden. 2B scheint die Funktion von 2C zu beeinflussen. Mutanten in 2C haben kleinere Plaques mit nur 10% der Virenproduktion verglichen mit wt. Die RNS-Synthese ist defekt, Translation und Proteinspaltung sind normal. (Johnson & Sarnow 1991) 3B, VPg, und funktionstüchtige 3C und 3D können im Baculovirus-Expressionssystem vermehrt werden (Neufeld et al. 1991). Bei temperatursensitiven Mutationen von 3AB zeigte sich das merkwürdige Phänomen, daß 4AS immer gleichzeitig zum Wildtyp revertierten (de la Torre et al. 1992).

#### 1.1.14.3. Die Morphogenese von Polioviren

Bei der viralen Morphogenese lagern sich die VPs zu Protomeren von 5S zusammen. Fünf Protomere bilden je ein 14S-Partikel, die einzige Vorstufe, die in allen infizierten Zellen gefunden wird (Rombaut et al. 1986). Aus fünf oder sechs 14S-Partikeln entstehen die von Koch & Koch (1985) postulierten Virushalbschalen, die nun (Pfister et al. 1992) erstmals nachgewiesen werden konnten. Danach verhindern die Vesikel das Zusammenlagern der 14S zu leeren Kapsiden. Dies könnte notwendig sein, um die RNS richtig einzulagern. Nach Rombaut et al. (1991b) ist *in vitro* Zusammensetzung von 14S zu Kapsiden spontan nur bei sehr hohen Konzentrationen möglich, geht aber sogar bei Chimären aus 14S verschiedener Typen. Vollständige leere Kapside sind nicht im Replikationskomplex enthalten; deshalb wird vermutet, daß leere Kapside Aufarbeitungsartefakte oder Pentamerreservoirs sind. *In vitro* lagern sich 14S-Partikel bei Zusatz von Zellextrakt aus infizierten HeLa-Zellen zu leeren N-antigenen Kapsiden zusammen (Rombaut et al. 1984). Ohne Extrakt spontan zusammengesetzte Kapside sind H-antigen (Putnak & Phillips 1982, Onodera & Phillips 1987, Rombaut et al. 1986). Auf bisher unbekannt Weise verschmelzen die Virushalbschalen bei Einlagerung der RNS zu fertigen Poliopartikeln von 160S. Mehrere Partikel anderer S-Werte werden als Abbauprodukte oder Vorstufen diskutiert. (Boublik & Drzeniek 1977, Dernick 1981, Everaert et al. 1989, Corrias et al. 1987, Rombaut et al. 1982a)

Die Spaltung zwischen VP4 und VP2 (Asn/Ser) findet erst bei Einlagerung der RNS statt. Eine Zeitlang wurde eine autokatalytische Reaktion mit Hilfe der RNS vermutet. Die zu dieser Reaktion benötigte AS 2010S ließ sich jedoch ohne Änderung der Virusbildung austauschen (Harber et al. 1991). Im reifen Viruspartikel sind 58 oder 59 der VP0s gespalten. Spaltungen von Proteinen erst bei der Virusreifung, wie die von VP0, gibt es auch bei anderen Viren (Hellen & Wimmer 1992a). Bei VP2-Mutanten, die VP0 nicht spalten können, gibt es provirionähnliche

Partikel mit RNS; d.h. die Verpackung der RNS kann von der VP0-Spaltung entkoppelt werden (Compton et al. 1990) Bei HRV führt die Mutation des C-terminalen Asparagins zur Bildung provirionähnlicher Partikel, die aber keine Infektion beginnen können. Es wird vermutet, daß diese Virionen die RNS nicht ins Zytoplasma entlassen können. (Lee et al. 1993)

Schon 2,5-4 Stunden nach PV-Infektion sind die ersten PV-Partikel im EM zu erkennen. Anfangs werden Polioviren durch Vakuolen freigesetzt, die mit der Zellmembran verschmelzen; später werden Viren durch Platzen der Wirtszelle freigesetzt. (Koch & Koch 1985) Pro infizierter Zelle entstehen 25 000 - 100 000 neue PV (Rueckert 1985).

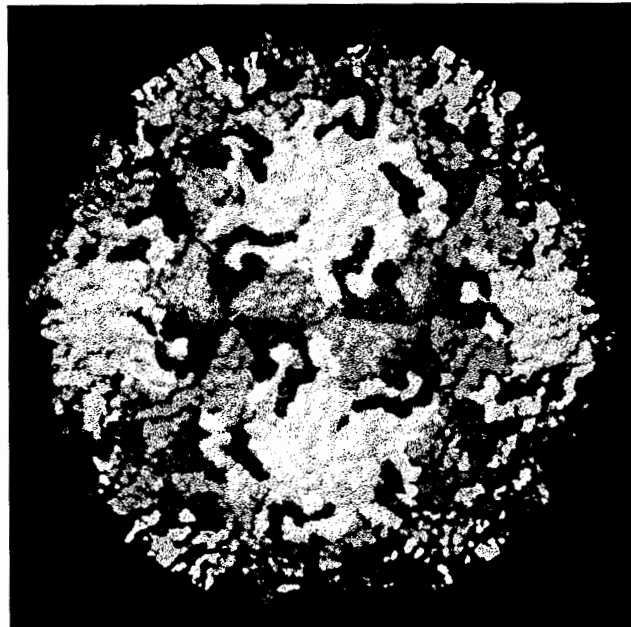
### 1.1.15. Die Proteinstruktur des Antigens Poliovirus

Legt man Kreise in eine Reihe und die darunter folgenden Reihen von Kreisen so, daß immer die nächsten Kreise auf Lücke liegen, so entsteht ein typisches Wabenmuster. Weil Polioviren in erster Näherung kugelförmig sind, erscheinen ihre zusammengelagerten Partikel im EM in einem Wabenmuster (hexagonale Kugelpackung). Da der Querschnitt eines Ikosaeders (20-Flächner) ein Sechseck ist, wurde angenommen, daß Poliopartikel Ikosaeder sind. Später stellte sich heraus, daß die Oberflächenproteine so verteilt sind, daß sie sowohl in einem Ikosaeder als auch in einem Dodekaeder (12-Flächner) angeordnet werden können. (Caspar & Klug 1962)

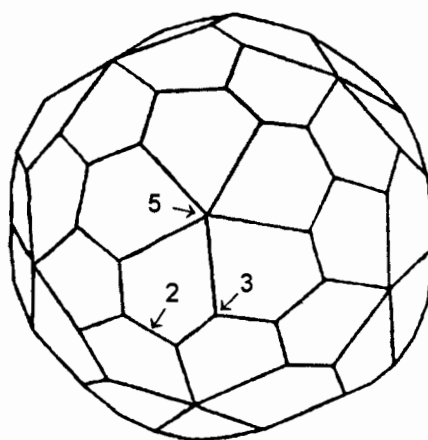
Kapsidstrukturen dieser Art haben sich aus einfachsten Vorstufen entwickelt unter Reduzierung auf das Wichtigste. Gleiche Proteine, auch wie Waben in einer Fläche angeordnet, stoßen an sechs Nachbarproteine und brauchen sechs verschiedene Bindungen, um eindeutig plaziert zu sein. Solche Anordnungen sind auf Ikosaedern und Dodekaedern möglich. (Caspar & Klug 1962)

Ikosahedrale Viren wie PV bestehen aus 60 Dreiecken. Im einfachsten Fall besteht jedes Dreieck aus einem Protein, Anzahl der verschiedenen Proteine gleich 1 und Anzahl der Proteine pro Dreieck (= Triangulation = T) auch 1. Um die Bedingungen eines Ikosaeders zu erfüllen muß  $T=1, 3, 4, 7...$  sein. Bei PV bilden drei verschiedene Proteine die äußere Oberfläche:  $T=3$ . Die drei sind jedoch so ähnlich, daß sie oft als Pseudo  $T=3, P=3$ , bezeichnet werden. Da die AS-Sequenz der Strukturproteine jedoch verschieden ist, muß bei der Röntgenstrukturbestimmung so gearbeitet werden, als handele es sich um ein  $T=1$ -Virus. Das Protomer ist hier eine Einheit. (Rossmann & Rueckert 1987) Savithri et al. (1989) geben eine alternative Erklärung für Triangulation, danach gibt T die Anzahl von gleichen Flächen an, in die die Ikosaederfläche aufgeteilt werden kann, für PV auch  $T=3$ .

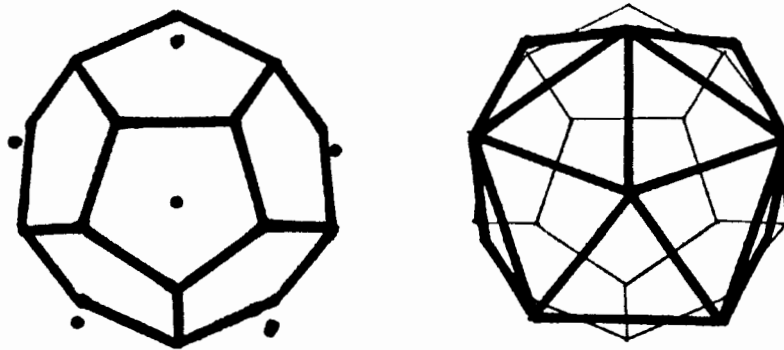
Diese symmetrischen Strukturen sind typisch für viele kleine Viren wie Picornaviren und die Struktur der innersten Kernhüllen von umhüllten Viren. Auch die Sequenzen sehr verschiedener Viren weisen Homologien auf, z.B. p24 von SIV mit VP2 von MKS (Argos 1989). p24 von HIV hat eine ähnliche Struktur wie Picornaviren-Kapsidproteine (Rossmann 1988). Polioviren sind Hohlkugeln mit 28nm Durchmesser und einer Hülle von etwa 5nm Dicke. Die N-Termini der Proteine liegen beim intakten Virion innen.



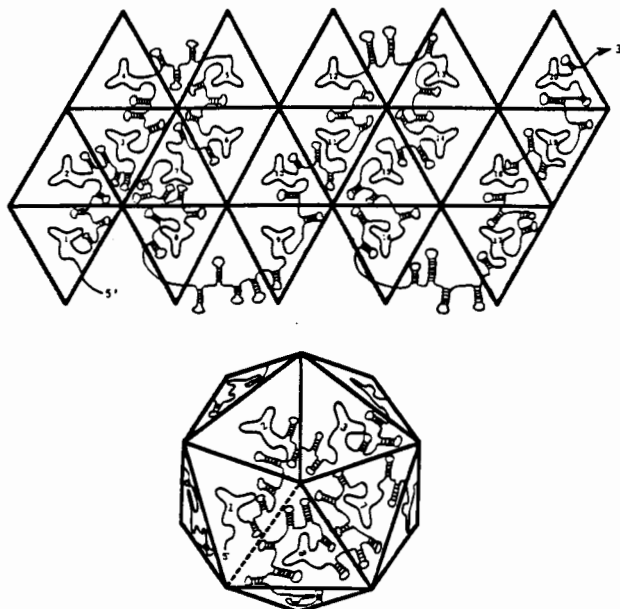
Die Abbildung nach Hogle et al (1985) zeigt VP1 in weiß, VP2 in grau und VP3 in schwarz. Schon in dieser Darstellung sind deutlich die Symmetrien der Viruspartikel zu erkennen.



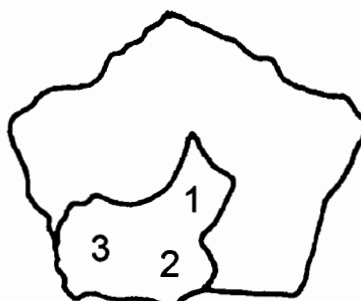
Fünf PV-Protomere sind um die fünfzählige Achse zu einem Fünfeck angeordnet, dessen Mitte stark erhaben ist und dadurch die Spitze eines Ikosaeders darstellt. Wie die folgende Abbildung zeigt, sind Polioviren eher pentagonale Dodekaeder als Ikosaeder. Beide Polyeder besitzen jedoch dieselben Symmetrien.



Die Lage der RNS zum Protein ist für PV noch nicht bekannt. Die nächste Abbildung zeigt deshalb die Lage der RNS bei einem PV verwandten Pflanzenvirus, BPMV, im Verhältnis zur Symmetrie des Icosaeders (Li et al. 1992). Die Lage der BPMV-RNS wurde durch Raman- und Röntgenstrukturdaten bestimmt.

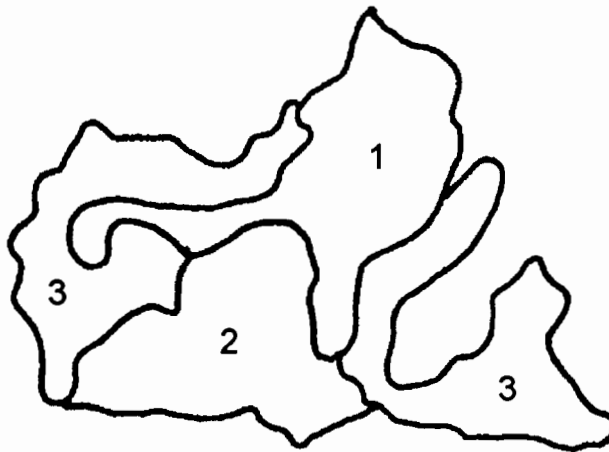


Durch Dissoziation zerfallen Polioviren in 14S-Partikel; diese entsprechen einer Fläche des Dodekaeders.

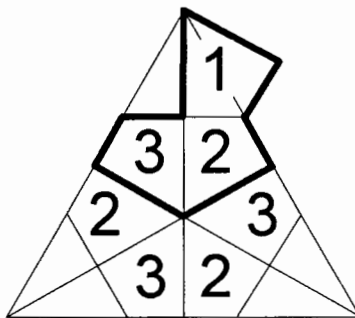


14S-Partikel sind fünfeckige Pentamere, die deshalb so heißen, weil sie aus fünf Untereinheiten, den Protomeren, zusammengesetzt sind. Pentamere  $(VP_0+VP_1+VP_3)_5$  können aus infizierten Zellen isoliert werden; ob freie Protomere vorkommen, ist noch umstritten (Boeyé & Rombaut 1992). Unter Bedingungen, die eventuell nicht denen in der intakten Zelle entsprechen, lagern sich auch in nanomolaren Konzentrationen 14S zu leeren Kapsiden zusammen (Boeyé & Rombaut 1992).

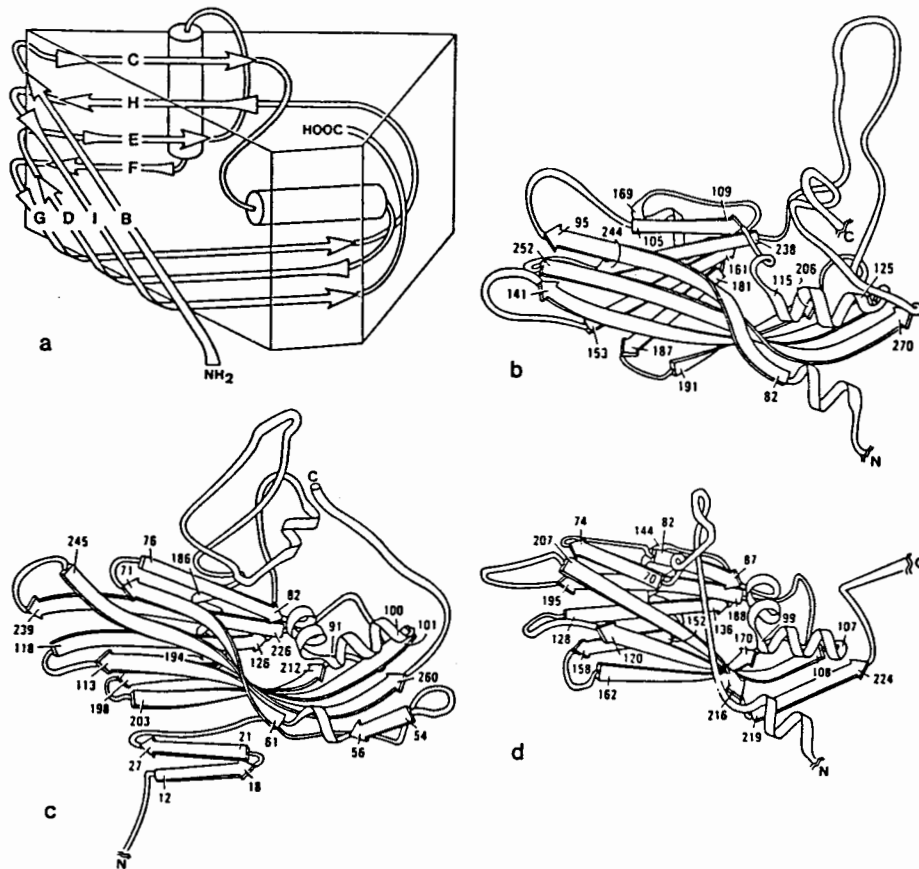
Die Abbildung zeigt ein Protomer mit einem zusätzlichen VP3 rechts. Unten links ist die Spitze zu erkennen an der je drei VP2 und VP3 zusammen die dreizählige Achse bilden. Die fünfzählige Achse ist der oberste Zipfel von VP1. Die zweizählige Achse liegt in dem geraden Stück von VP2. (An dieser Stelle grenzt VP2 an ein anderes VP2.) Das rechte VP3 ist eingezeichnet, weil diese Lage oft gezeigt wird; sie entspricht dem Blick auf die zweizählige Achse, wobei die Ikosaederkante genau senkrecht in der Mitte des Bildes liegt.



Die nächste Abbildung zeigt die Lage der Protomere im Dreieck der Ikosaederfläche.



Durch Röntgenstruktur-Analyse ist auch die Struktur der vier viralen Proteine bekannt. Drei von ihnen, VP1 (b), VP2 (c) und VP3 (d), erreichen die Oberfläche. Das kleinere VP4 liegt der inneren Oberfläche auf. (Abb. aus Hogle et al. 1985)



VP Nr.	Anzahl der AS	Molekulargewicht
VP1	302	33521
VP2	272	29985
VP3	238	26410
VP4	69	7385

Die Angaben der Tabelle beziehen sich auf wt1 Mahoney.

Alle drei großen VPs sind relativ hydrophob (Heukeshoven & Dernick 1982) und haben eine gemeinsame keilförmige Grundstruktur (a), die sie auch mit der anderer Viren teilen. Diese sog. Faßstruktur ist typisch für alle Strukturproteine aus ikosahedralen Viren; gemeinsam ist ihnen

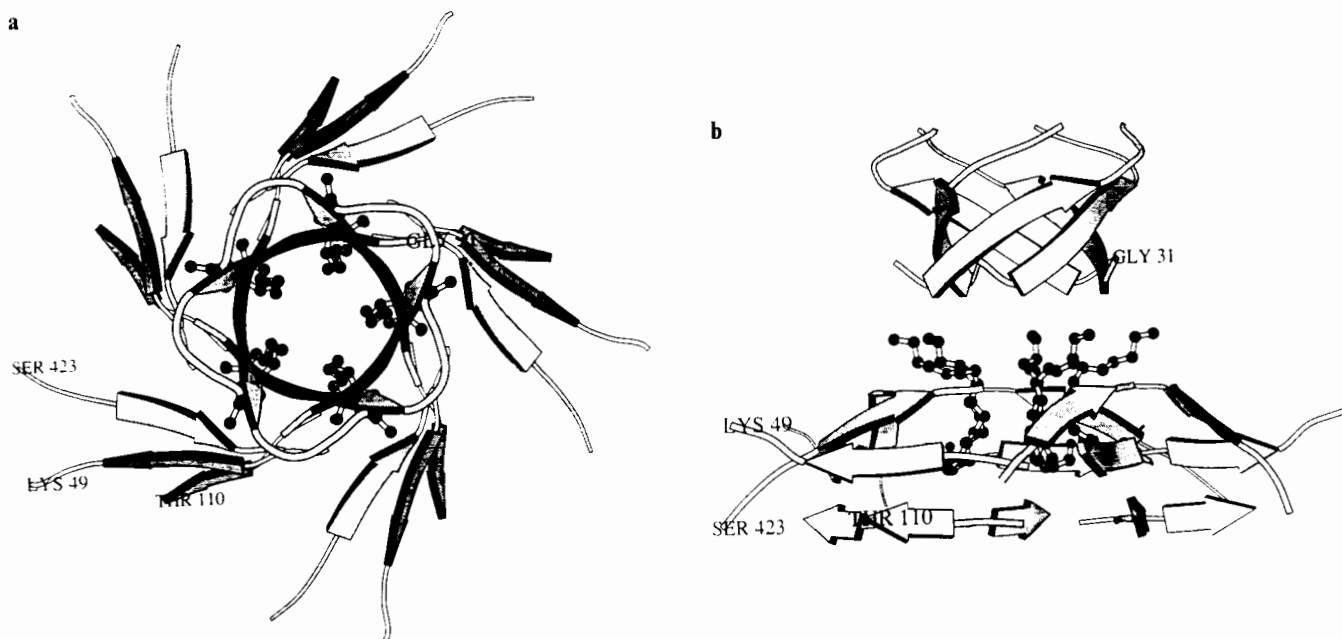


das "Faß" aus zwei Lagen von je 4  $\beta$ -Strängen und zwei  $\alpha$ -Helices, insgesamt die Form eines Keils.

Die fünf Spitzen der VP1-Keile liegen an der Achse der fünfzähligen Punktsymmetrie und sind nach außen gebogen, so daß sie an der Oberfläche eine Art Hochplateau bilden, die Spitzen des Ikosaeders. Je drei Spitzen von VP2 und VP3 liegen abwechselnd um die Achse der dreizähligen Punktsymmetrie, sie sind nicht so stark nach außen gebogen, bilden jedoch auch eine erhobene Region. Außer den Keilspitzen liegen noch die großen Schlaufen der VPs sehr erhaben; dies sind besonders die Schlaufe zwischen G- und H-Strang in VP1 (die sog. MKS-Schlaufe, Hauptantigen und Rezeptorbindungsstelle des Maul-und-Klauenseuche-Virus) und die Schlaufe zwischen E- und F-Strang von VP2. Um die 5-zählige Achse herum liegt eine ringförmige Vertiefung (canyon), sie soll Bindungsstelle des Rezeptors sein und enthält auf ihrem Boden hydrophobe Taschen. (Filman et al. 1989) Während bei Rhinovirus14 in diese Taschen stabilisierende Substanzen eingelagert werden können, ist die entsprechende Stelle bei PV wahrscheinlich durch ein Lipid ausgefüllt (Liljas 1991). In einer PV1-Chimäre, der in die BC-Schlaufe das entsprechende Stück von Typ 2 eingebaut wurde, weil diese Sequenz PV für das Mäusegehirn virulent macht, wurde in der Tasche ein Palmitin gefunden (Yeates et al. 1991).

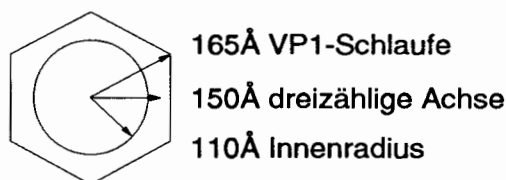
Vom N-Terminus des VP4 (bzw. P1 oder VP0) wird während der Translation die erste AS, das Methionin, abgespalten; danach wird durch Amidbindung eine Fettsäure (Myristinsäure,  $C_{14}$ ) (Myristin = Muskat) gebunden. Die Myristinsäure vermittelt zwischen den N-Termini von VP3 und VP4 und deckt die hydrophobe Seitenkette (Leu2 und Pro3) von VP3 ab. (Filman et al. 1989) Im fertigen Virion liegen fünf Tetradekansäuren im Zentrum der 5er-Symmetrieachse. Wird Gly1 zu Ala mutiert, so replizieren sich Polioviren in infizierten Zellen, werden aber nicht zusammengesetzt, weil die Myristinsäure für die Interaktion der Protomere zu Pentameren beim Zusammensetzen des Viruspartikels gebraucht wird (Ansardi et al. 1992, Marc et al. 1991, Marc et al. 1989). Die Carboxylgruppe der Myristinsäure bindet Thr28 vom VP4 des benachbarten Protomers im Pentamer (Moscufo & Chow 1992) Bei der Bildung von Pentameren werden myristylierte Proteine bevorzugt; bei Einlagerung der RNS und der Bildung von reifen Partikeln sind sie notwendig. (Moscufo et al. 1991, Marc et al. 1990) Die Konsensussequenz der Picornaviren für Myristylierung ist Gly-XXX-Ser/Thr (X= beliebige AS) (Chow et al. 1987). (Lee & Chow 1992)

Für Sab3 wurden zwei Stellen am Protomer gefunden, die wahrscheinlich Lipide binden; an weiteren zwei Stellen sollen Nukleotidpositionen zu erkennen sein. Die N-Termini von VP1 und VP4 bilden eine  $\beta$ -Faltblattstruktur auf der Innenseite der Virushülle. Die umeinander um die fünfzählige Achse gewundenen fünf N-Termini von VP3 bilden ein gedrehtes Rohr, das von fünfmal zwei kurzen  $\beta$ -Strängen des VP4 (AS 3-8 und 25-29) flankiert wird. (Filman et al. 1989, Fricks & Hogle 1990) (Abb. aus Liljas 1991)



Nur die  $\text{NH}_2$ -Enden der VPs können nicht durch Röntgenstruktur bestimmt werden, weil ihre Lage wie die der RNS ungeordnet ist, bezogen auf die Symmetrie der Proteinhülle (Hogle et al 1985).

Polioviren besitzen einen Durchmesser von 30nm; die Bindungsstelle eines Antikörpers überdeckt 2-4nm, also etwa ein Zehntel des Virus. Das ist etwa die Strecke einmal quer über ein einzelnes Protein.



## 1.2. Antikörper

Vor hundert Jahren vermutete Sternberg (1892), daß "das Blut von Individuen Antitoxine" enthält, die die infektiöse Kapazität eines Erregers zunichte machen können. 1939 wurde von Tiselius und Kabat gezeigt, daß Antikörper (Ak) Gammaglobuline sind, "Immunglobuline" (Ig). (Mandel 1979) Unterdessen ist es gelungen, immunreaktive Moleküle im Milliattombereich nachzuweisen (Hashida & Ishikawa 1990). Ein Milliattomol entspricht 600 Molekülen.

Es gibt mehrere Immunglobulinklassen (G, M, A, E, D). Auch die Immunglobulinklassen werden noch einmal in Unterklassen, Isotypen, unterteilt, z.B.  $\text{IgG}_{2 \text{ oder } 3}$ . Die Ergebnisse von Neutralisationstests und Bindungstests (ELISA) mit Seren unterscheiden sich um einen Faktor 50-500, weil die Menge der neutralisierenden Ak eine Untermenge der bindenden Ak ist. (McCullough 1989)

Patienten, die keine Antikörper machen können, bekommen persistente Infektionen durch Enteroviren. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Antikörperbildung für Enteroviren im Gegensatz zu anderen Viren, die durch die zelluläre Immunabwehr des Körpers abgewehrt werden. Polioviren lassen sich aber aus dem Blut persistent infizierter Patienten nicht dauerhaft durch Immunglobulingaben gegen PV entfernen. T-Zellen oder andere Immunmechanismen scheinen für die Entfernung von PV und anderen Enteroviren aus dem ZNS verantwortlich zu sein. (Jubelt et al. 1989)

Untersuchungen mit tierischen und bakteriellen Viren als Immunogen in nicht empfänglichen Tieren haben gezeigt, daß die Immunreaktion von der Konzentration des Immunogens abhängt. Bei niedrigen Konzentrationen wird nur IgM gebildet, bei hohen auch IgG. IgM geht immer IgG voraus. Während die IgM-Synthese bald aufhört, hält die von IgG lange Zeit an. Frühe IgG haben wenig Affinität und sind irrelevant für die Neutralisation. (Mandel 1979)

Im Verlauf des Reifens der Immunantwort treten neue somatische Mutationen in scheinbar endloser Vielfalt auf. 1. Stufe: Ak aus dem großen Repertoire von Kombinationen der ererbten Gene werden ausgewählt. 2. Stufe: Die passenden Ak werden proliferiert, und besser passende Mutationen kommen auf. 3. Stufe: Zusätzliche neue Kombinationen der ererbten Gene finden statt und werden ebenfalls vermehrt. (Milstein 1986)

Ak können verschiedene Funktionen haben, Komplement fixieren, präzipitieren, agglutinieren..., ja sogar Enzymaktivität besitzen. Es gibt Virus-Ak-Komplexe, die infektiös bleiben; erst z.B. Komplement (Kilian 1988) inaktiviert oder aggregiert (Wallis & Melnick 1971) die Viren. Die Primärreaktion der Neutralisation ist die Bindung einer minimalen Anzahl von Antikörpern an ein Virus. Diese Reaktion allein braucht noch nicht per se Neutralisation zu erzeugen, sondern kann der Anfangsschritt eines multiphasischen Phänomens sein. Vermittelte Neutralisation entsteht durch Zufügen einer dritten Komponente wie Komplement zum Virus-Antikörper-Komplex (Rheumafaktor, ein bestimmtes IgM; Protein A)(für PV siehe Vrijzen et al. 1993). Manchmal sind für die Neutralisation weitere Ak nötig. "Extrinsische" Neutralisation wird erst durch äußere Bedingungen möglich. Bei "sterischer" Neutralisation sind Ak dem natürlichen Verlauf der Infektion so im Weg, das diese nicht stattfinden kann. Bei Influenzaviren mit Serum-IgA oder IgM findet Bindung an die Zelle statt, aber die Penetration wird verhindert (Dimmock 1987). Umhüllte Viren enthalten oft Zellwandbestandteile und können durch Ak zur Virolyse gebracht werden. (Mandel 1979)

Bei bestimmten Virus-Antikörper-Konzentrationen kommt es zur Aggregation. Im Aggregat sind Viren nicht per se neutralisiert, deshalb nennt Mandel diese Art der Neutralisation, bei der aus vielen infektiösen Partikeln nur eine infektiöse Einheit wird, "Pseudoneutralisation". Durch saure pH-Werte können Viruspartikel aus Aggregaten mit Antikörpern wieder infektiös gemacht werden. (Mandel 1979) Polioviren aggregieren auch bei saurem pH-Wert. Diese Art der Aggregation wurde in dieser Arbeit mit der durch Ak verglichen.

Influenzaviren als Beispiel für Interaktion mit Antikörpern: Bei Influenza bewirken alle Isotypen von IgG, IgA und IgM Aggregation. Bei größter Aggregation sind 65-80% der Infektiosität verschwunden. Bei weiterer Zugabe von IgG wird fast vollständige Neutralisation erreicht, die Aggregate werden wieder kleiner, bis schließlich antikörperkomplexierte Viruspartikel einzeln

vorliegen. Trotzdem kommt die Infektiosität nicht zurück. Daraus folgt, Neutralisation ist nicht Aggregation allein. Viren mit Antikörpern und Aggregate werden auch bei Influenzaviren genauso gut in Zellen aufgenommen wie Viren ohne Ak. Einige Ak (besonders IgM und IgA) wirken, indem sie das Attachement (die Bindung an die Zelle) verhindern. Da Influenzaviren mit IgG gut aufgenommen werden, müssen IgG einen späteren Schritt behindern. Bei Influenza sind 4-5 Ak nötig, um ein Virion zu neutralisieren. Weil neutralisierte Viren an die Zelle binden können und normal aufgenommen werden, muß die eigentliche Neutralisation intrazellulär geschehen. (Outlaw 1991, Kilian et al. 1988) Antivirale Ak der IgG-Isotypen sind hauptsächlich die Unterklassen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub>. (Mueller et al. 1990)

Die Halbwertszeit von IgG *in vivo* beträgt 21 Tage (McCullough 1989). Im Blutserum gibt es fünfmal soviel IgG wie IgA, weil IgA fünfmal so schnell abgebaut wird; aber im Schleim der Mukosae wird mehr IgA ausgeschieden als an allen anderen Immunglobulinen an Menge zusammen produziert wird. IgA beeinflusst das Komplementsystem, Phagozytose, Chemotaxis und antikörperabhängige, zelluläre Zytotoxizität. IgA-Mangel ist häufig. Bei einigen Krankheiten (Rheuma, Autoimmunerkrankungen, persistenter Infektion...) herrscht ein IgA-Überschuß. (Kerr 1990, Kilian et al. 1988)

Die Anzahl verschiedener Ak, die ein Immunsystem bilden kann, wird auf  $10^7$  geschätzt. (Getzoff et al. 1991) Es gibt xenotypische Ak, die Arten unterscheiden können, und allotypische, die Stämme unterscheiden; sie werden zur Bestimmung der Verwandtschaft und in der Diagnostik genutzt. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Viren (Beispiel: Arboviren, Dengue virus, Gelbfieber) lassen sich mit einer Palette kreuzreagierender Ak (auch nicht neutralisierender) bestimmen. (Kimura-Kuroda & Yasui 1983) Mit Antiseren gegen PV-Strukturproteine lassen sich auch Virusvorstufen unterscheiden (Wieggers & Dernick 1985).

Die Arbeit von Heinz (1986) zeigt, wie schwierig es ist, Gruppierungen durch Ak gegen Viren festzulegen. Ein einzelner mAk gibt nur eine Zufallsaussage. Eine große Menge mAk wäre notwendig. Bindungstests überschätzen die physikalische Nähe von Epitopen, weil die Bindung Konformationsänderungen hervorrufen könnte und die Ak selbst sich sterisch behindern. Deshalb müssen Kompetitionstests durch solche mit Mutanten in Anwesenheit von monoklonalen Antikörpern ergänzt werden. Es gibt Viren, wie die des Afrikanischen Schweinefiebers, die nicht neutralisiert werden durch Ak, obwohl sie eine Immunantwort mit Antikörpern hervorrufen (Dimmock 1987).

Einige Ak neutralisieren (setzen die Zahl der infektiösen Partikel herab), andere binden nur Antigen. Sowohl neutralisierende als auch nichtneutralisierende Ak schützen Mäuse vor Gelbfieber. Der Schutz durch nichtneutralisierende Ak ist unabhängig von der Komplementreaktion, hängt nicht von der Avidität ab und nicht von der Nähe eines kritischen neutralisierenden Epitops. (Brandriss et al. 1986) Der Schutz wird auch durch Ak erreicht, die gegen Nichtstrukturproteine gerichtet sind. (Gould et al. 1989)

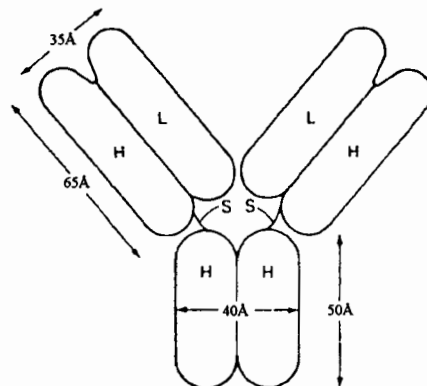
Neutralisation und passiver Schutz betreffen nicht notwendigerweise dieselben Epitope; Kreuzschutz wurde auch in Abwesenheit von kreuzneutralisierenden Ak gefunden. Nichtneutralisierende Ak können z.T. stärker binden als neutralisierende. Nichtneutralisierende Ak spielen nicht nur bei der Krankheit eine Rolle, sondern auch bei der Gesundheit. Beim Mäusebrusttumor gibt

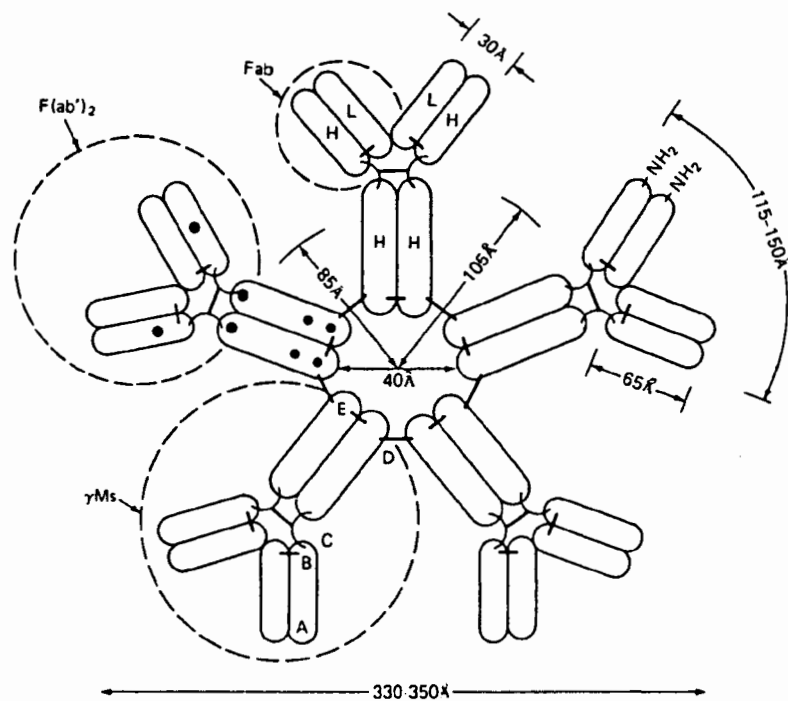
es "nichtfunktionale" Ak, die neutralisierende und schützende Ak an der Bindung hindern. Ebenso gibt es Ak, die mit anderen Haptinen reagieren, als dem, gegen das sie gemacht wurden. Einige mAk reagieren paradoxerweise nur mit heterologen Viren. Andere Ak erhöhen die Aufnahme von Viren in der Zielzelle. Diese wurden bei einer Vielzahl von Viren nachgewiesen. Bekanntestes Beispiel sind durch Dengueviren infizierte Kinder, bei denen die von der Mutter erhaltenen Ak Voraussetzung für den schweren Krankheitsverlauf (Halstead 1988) der durch Mücken übertragenen Infektion sind. Die Aufnahme von Virus-Antikörperkomplexen geht über Rezeptoren für den Fc-Teil der Ak und über Komplementrezeptoren. (Heinz 1986)

Antikörper werden in der Zukunft als Mittel zur Therapie für Krankheiten wie Krebs genutzt werden können, indem wirksame Substanzen an die gegen spezifische Stellen gerichteten Ak angehängt werden (Nolan & O'Kennedy 1990). So werden toxische Agentien gegen Bakterien, Viren und Krebszellen, an Ak gebunden, Keime und entartete Zellen abtöten (Devanathan 1990).

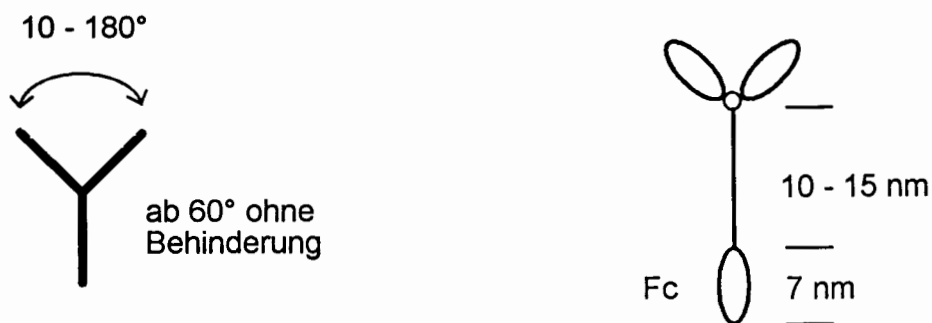
### 1.2.1. Die Struktur von Antikörpern

Die Abbildungen zeigen die Größe und Beweglichkeit von Antikörpern. Die IgG-Darstellung stammt von Green (1969), die des IgMs von Metzger (1970)





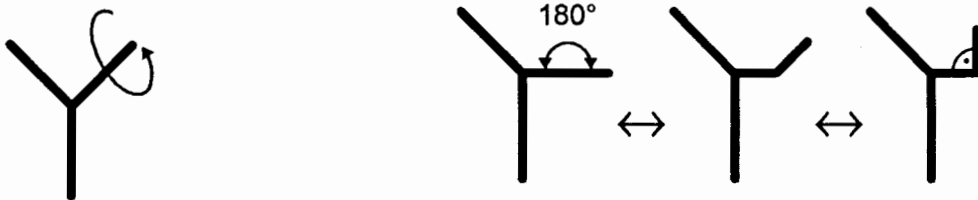
Durch bivalente kurze Haptene konnte im EM die Beweglichkeit von Antikörpern gezeigt werden. So bilden z.B. drei Ak mit drei Haptenen ein Dreieck mit Winkeln von  $60^\circ$ . Dimere (2 Ak + 2 Haptene) zeigten, daß die Kaninchen-IgG beweglich genug sind, daß beide Fab-Arme parallel ( $0^\circ$ ) gelegt werden können. Tetramere bilden Quadrate oder Rauten. Bei Pentameren ist der Winkel etwa  $108^\circ$ . Bei einigen Antikörpern sind  $180^\circ$  gesehen worden, aber es wird geschätzt, daß selbst  $220^\circ$  für den Gelenkwinkel zwischen den Fab-Armen möglich sind. (Schumaker et al. 1984, Schumaker et al. 1991)



*Beweglichkeit der Fab-Arme*

Die Gelenkregion zwischen Fab-Armen und Fc-Teil ist bei humanem IgG<sub>3</sub> 50 AS lang (Bild rechts), bei humanem IgD 60 AS, bei IgE und IgM sind extra Domänen eingefügt. Die Fab-Ar-

me können zwar einen Winkel von 10-180° bilden, aber bei Winkeln unter etwa 60° ist die Bewegung sterisch gehindert durch die Arme selbst. Bei größeren Winkeln ist sie jedoch frei flexibel. (Burton 1990) Wie Fluoreszenzlichtuntersuchungen mit Blitzen von Nanosekunden zeigen, können die Fab-Arme sich um ihre eigene Achse drehen (Schumaker et al. 1984, Schumaker et al. 1991). Auch zwischen der konstanten und der variablen Region liegt ein beweglicher "Ellenbogen", der Winkel zwischen 90° (130°, Schumaker et al. 1991) und 180° einnehmen kann.



*Beweglichkeit des Ak-Ellenbogenwinkels*

Die Ak mit den kürzesten Gelenkregionen zum Fc-Teil sind die am wenigsten beweglichen. Bei humanem IgG<sub>3</sub> ist die Gelenkregion 10-15 nm lang, der Fc-Teil ist im Vergleich dazu mit 7 nm kurz. Je flexibler ein Ak ist, desto größer ist seine Fähigkeit, Komplement zu aktivieren. - IgM ist als Pentamer bekannt, es kommt aber auch beim Menschen als Hexamer vor. Die Polymere nehmen entweder eine sternförmige, gestreckte Form ein oder eine zusammengefaltete ("staple") Form.



IgM (sternförmig)



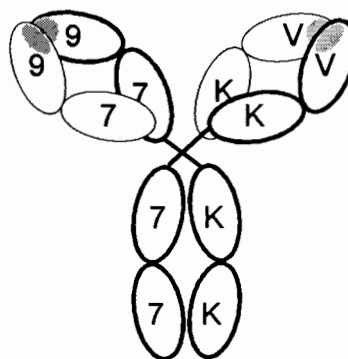
IgM ("staple")

80% des Serum-IgAs ist Monomer, der Rest Dimer oder Trimer. Es gibt zwei Untergruppen: IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>. IgA<sub>1</sub> macht 80-90% des IgAs im Serum aus. Sekretorisches IgA besteht aus 2 IgA-Molekülen, die durch eine Kette aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen und einer sog. J-Kette verbunden sind. Menschliches IgD hat eine enorm lange Gelenkregion von 70 AS. (Burton 1990, Schumaker et al. 1991)

Die Struktur der Stelle, die den Kontakt zum Antigen herstellt, ist bei einigen Antikörpern bekannt. Zur "Kontaktregion" (CDR) gehören alle AS, die nach Röntgenstruktur zur Fläche zwischen Ak und Antigen gehören. "Kritische Regionen" können dagegen nur mit Kompetition und

anderen biochemischen Methoden bestimmt werden. Sie können allerdings auch AS sein, die aus dem Inneren die Konformation der Region aufrecht erhalten. (Getzoff et al. 1991). Die CDR besteht aus drei Schlaufen der leichten Immunoglobulinkette und drei der schweren. Diese Schlaufen können sich leicht einer Struktur anpassen, "induzierte Komplementarität". (Getzoff et al. 1991) Sie tragen zur Variabilität der Bindung bei. Das Immunsystem muß verhindern, daß dabei pathologische Ak, z.B. autoantigene Ak, gebildet werden. (Williams et al. 1990)

Antikörper bestehen aus zwei schweren Proteinketten (dicke Linie) und zwei leichten (dünne Linie). Die Immunglobulindomänen der Ak haben  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus sieben antiparallelen Strängen in den konstanten Regionen und neun in den variablen (Davies et al. 1988).



Während die Struktur der konstanten Domänen (K) aus zwei Schichten von drei und vier  $\beta$ -Strängen besteht, enthält die variable Domäne (V) zwei Schichten aus fünf und vier Strängen. (Chothia et al. 1985) Variable und konstante Regionen zeigen große Homologien. Die hypervariablen Regionen (grau) liegen dicht nebeneinander. Der zwischen ihnen liegende Raum ist mit Umgebungslösung ausgefüllt. In der Mitte zwischen H- und L-Kette liegt bei Antikörpern gegen Vitamin K eine Kuhle von etwa  $15\text{\AA} \times 6\text{\AA}$ , die  $6\text{\AA}$  tief ist. (Poljak 1991) Der Zwischenraum der variablen Domänen zwischen der leichten und schweren Kette ist nun aber nicht nur, wie zu erwarten, der Raum zwischen zwei gleichen Proteinschichten, sondern die inneren Oberflächen bilden eine gemeinsame Schicht, in die vor allem aromatische AS eingelagert werden. So entsteht eine dreilagige Gesamtstruktur. (Chothia et al. 1985)

Die Bindung des Fc-Teils an einen Fc-Rezeptor löst Phagozytose, Zytotoxizität und die Absonderung von wichtigen Übertragungstoffen aus. Fast alle Fc-Rezeptoren gehören zur Immunglobulinfamilie. Fc-Rezeptoren haben geringe Bindungsaktivität für Monomere, können aber Immunkomplexe sehr effektiv binden durch multiple Rezeptor-Ligand-Interaktion. Der hochaffine IgE-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle in der Allergie. Wird eine Zelle gebunden, die diesen Rezeptor besitzt und IgE produziert, so platzt sie explosionsartig. Die Aggregation der Fc-Rezeptoren ist ein sehr wichtiges Signal für die Zellaktivierung. (Kinet 1989)

Die Tatsache, daß das Immunsystem auf einzelne Epitope (Haptene) nur reagiert, wenn sie an größere Moleküle gebunden sind, deutet darauf hin, daß es geeignet ist, mit großen Multi-Epitopkomplexen zu interagieren. Wahrscheinlich spielt sogar das zeitliche Aufeinanderfolgen verschiedener Epitope eine Rolle bei der Immunabwehr. (Vertosick et al. 1991)



Die Ak des Immunsystems bilden durch Anti-Antikörper ein hoch kompliziertes Regulationssystem, ein Netzwerk. Viele Ak stehen zueinander in Gleichgewichten. Wird nur eine einzelne Konzentration verändert, so werden viele andere wieder neu eingestellt. Man beginnt gerade erst das Ausmaß der Kompliziertheit zu verstehen. (Jerne 1985, Ollier et al. 1985) Es ist damit zu rechnen, daß es zu Interaktionen verschiedener Viren auch im Menschen kommt. Die meisten Säuger enthalten heute eine Vielzahl von Retroviren. Eine Neuinfektion mit einem Virus bedeutet dann eventuell auch eine Veränderung im Gleichgewicht der schon vorher vorhandenen persistenten Infektionen, die dann akut werden können. (Contag et al. 1989)

### 1.2.2. Antigen-Antikörper-Wechselwirkung

Antikörper können eine große Menge chemisch verschiedener Substanzen binden: Proteine, Kohlenhydrate und bestimmte Lipide, von großen Biopolymere bis zu kleinen Haptenen. (Williams et al. 1990)

Die Wechselwirkung eines Virus mit Antikörpern beginnt immer mit dem Kontakt eines Virus mit Antikörpervorstufen auf einer B-Zell-Oberfläche. Die passende Plasmazelle produziert dann die Ak. (van Regenmortel 1992)

Ak wechseln relativ schnell von Antigen zu Antigen, deshalb lassen sie sich auch mit sehr kleinen Mengen von Antigenen von trägergebundenem Antigen trennen (Hammarback & Vallee 1990).

Die Selbstorganisation der lebenden Materie wird zum großen Teil durch schwache nicht kovalente Kräfte bewirkt. Bekannte Beispiele sind die Bindungen von Repressoren an DNS oder von Inhibitoren an Enzyme. Auch die Bindungen von Antigenen an Ak gehören zu dieser Gruppe. Es sind van der Waals-Kräfte, Hydrophobizität beider Teile und Wasserstoffbrücken. Diese Kräfte wirken nur 2-4Å weit. Die grubenartigen Strukturen der betroffenen Oberflächen bewirken jedoch eine Fokussierung der Kräfte, so daß die Diffusion gegenüber einer flachen Fläche deutlich reduziert wird. Eine absolute Komplementarität der beteiligten Flächen ist für die Bindung nicht nötig. (Novotny & Sharp 1992) Die Gesamtaffinität einer multivalenten Antigen-Ak-Bindung entsteht aus: 1. Assoziationskonstante, 2. der Anzahl der Epitope des Antigens, 3. der Geometrie der interagierenden Regionen (sites) und 4. der Beweglichkeit der interagierenden Strukturen. (Mandel 1979) Es gibt mAk gegen Polioviren, die nur mit nativen Viren ("D" oder "N") (dense bzw. native) reagieren, solche, die nur mit denaturierten Teilen z.B. leeren Kapsiden ("C" oder "H") (coreless bzw. heated) reagieren und solche, die N- und H-Antigen binden (Rueckert 1976). Je nach Epitop können verschiedene Gruppen von monoklonalen Antikörpern auftreten (Ferguson & Minor 1990).

Ein "Epitop" ist eine Region auf der Oberfläche eines Antigens, die betroffen ist bei der Vereinigung mit dem Antikörpermolekül (gezeigt durch Röntgenstruktur; Lenstra et al. 1990); es kann Neutralisationsepitop genannt werden, wenn der Antikörper neutralisierende Eigenschaften hat. (Boeyé & Rombaut 1992) Ein Epitop ist die Stelle des Antigens, die von B-Zelle oder Antikörper erkannt wird. Das "Paratop" ist die entsprechende Bindungsregion des Antigens auf der Antikörperoberfläche. "T-Zell-Epitop" ist ein Peptidfragment, das vom T-Zell-Rezeptor er-

kannt wird. Da keine Sequenz von AS unabhängig von ihrer Struktur erkannt werden kann, sollten sequenzielle (=lineare (Lenstra et al. 1990)) Epitope nicht mit konformationsunabhängigen Epitopen gleichgesetzt werden. Die meisten Ak binden konformationsabhängige Epitope; deshalb binden sie auch Peptide schlecht. Untersuchungen der Struktur vieler Proteine zeigen, daß eine gleiche Sequenz von sechs oder sieben AS in anderer Umgebungssequenz eine völlig andere dreidimensionale Struktur einnehmen kann. (Getzoff et al. 1991) Sehr verschiedene Sequenzen können trotzdem sehr ähnliche Strukturen bilden, ähnliche Sequenzen können andererseits sehr verschiedene Strukturen bilden. Eine einzelne unterschiedliche AS kann zu ganz anderer Peptidfaltung führen. (Lesk 1985)

Viele Epitope ändern ihre Konformation, wenn sie an eine Kunststoffoberfläche gebunden werden. "Im ELISA gibt es eine hohe Wahrscheinlichkeit für die komplette oder teilweise Entfaltung von Proteinantigenen" (Laver et al. 1990). Die in dieser Arbeit verwendete Nitrozellulose scheint die Struktur weniger zu beeinträchtigen. Ak, die gegen natives Protein und seine komplexen diskontinuierlichen Epitope gebildet werden, können schwach kreuzreagieren mit Epitopfragmenten aus linearen Peptiden. (van Regenmortel 1990) So konnten z.B. neutralisierende Ak gegen MKS-Viruspeptid 137-162 von VP1 in  $\beta$ -Galaktosidase von *Escherichia coli* in Kaninchen erzeugt werden (Broekhuijsen et al. 1986a, Broekhuijsen et al. 1986b). MKSV-Peptide an KLH als Trägerprotein führten nur zu niedrigen Ak-Titern, schienen aber einen Teil der Tiere zu schützen (DiMarchi et al. 1986). Seren gegen zwei Peptide des Hüllproteins von HIV (aus gp120 und gp41), an KLH gebunden, neutralisierten (Chanh et al. 1986). Stark neutralisierende Ak gegen VP1-Peptide, eingebaut in *E. coli*, wurden in Kaninchen erhalten (Hoatlin et al. 1987).

Es gibt "Kryptotope", Epitope, die in der nativen Form im Molekül verborgen sind. "Neotope" sind Epitope, die spezifisch für die Quartärstruktur sind (van Regenmortel 1990)

Eine antigene Region (oder Determinante) ist eine Stelle auf dem Antigen, die Ak induziert. Escapemutationen (Virusmutanten, die der Bindung an Ak durch Änderung ihrer Oberfläche entkommen) können an verschiedenen Stellen der antigenen Regionen liegen. Ak reagieren jeweils nur mit einem Teil der antigenen Determinante. Einige Antikörper stören die Bindung anderer Ak, indem sie zum Teil gleiche AS binden. Mutationen an solchen Stellen bewirken die Kreuzresistenzen der Escapemutanten. Eine antigene Region ist aus lauter überlappenden Epitopen verschiedener Ak zusammengesetzt. Virusmutanten sind resistent gegen viele oder alle der Ak, die gegen diese Stelle gerichtet sind. (Boeyé & Rombaut 1992, Lenstra et al. 1990) Die Epitope einer antigenen Region können ihrer Reaktion nach in Gruppen eingeteilt werden (Wieggers et al. 1988). Da Ak das Antigen teilweise vor Verdauung schützen, kann auch auf diesem Weg die ungefähre Lage einer antigenen Region bestimmt werden (Yuan & Low 1992).

Wenn ein Ak sehr spezifisch für ein Antigen ist, hat er eine sehr ausgefeilte Struktur mit mehreren Merkmalen, die zum Antigen passen. Teile dieser Struktur können auch andere Antigene binden. Das bedeutet, daß ein spezifischer Ak (ohne Berücksichtigung der Affinität) sehr kreuzreaktiv ist (McCullough 1986). Die Kontaktstelle des Antikörpers besitzt eine ganze Reihe Teilstrukturen, die zu Teilen anderer Antigene passen. Ein weniger spezifischer Ak zeigt demgegenüber weniger Kreuzreaktion. Auf der anderen Seite binden spezifische Ak in der Kreuzreaktion mit sehr viel geringerer Affinität.

Eine ganze Reihe von Fab-Fragmenten ist schon röntgenologisch untersucht worden, wenigstens acht mit gebundenen Liganden. Darus folgt, wichtig für den Kontakt sind:

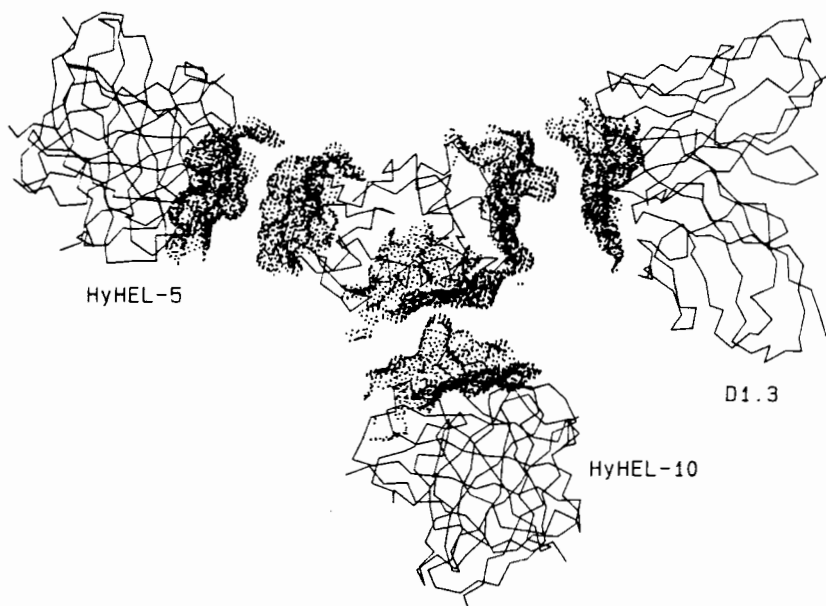
1. Ladungsneutralisation
2. van der Waals-Kontakte
3. Salzbrücken
4. Wasserstoffbrücken
5. hydrophobe Gruppen (besonders Tyrosin)

Die  $C_{\alpha}$ -Beweglichkeit bei Antigen- Antikörperkontakt beträgt höchstens 1,7 Å. Ein Indolring kann dabei um 180° rotieren. Fast alles Wasser wird aus der Kontaktfläche ausgeschlossen. (Davies et al. 1990)

### Beispiele:

Lysozym:

Die Bindung des Lysozyms an seine Antikörper ist eingehend auch röntgenkristallographisch untersucht worden (Sheriff et al. 1987). Je 5-6 AS scheinen für den Kontakt besonders wichtig zu sein (Amit et al. 1985, Amit et al. 1986, Novotny 1991). Die Kontaktfläche des Lysozymantikörpers (FabD1.3) ist 600-700Å<sup>2</sup> groß und betrifft 14 AS. Das Antigen zeigt keine Konformationsänderung. Die AS Gln 121 des Hühnereiweißlysozyms berührt den Ak. Bei anderen Lysozymen wird diese Position von einem His eingenommen. Das His allein reicht aus, den mAk D1.3 gegen Hühnereiweiß sterisch so zu hindern, daß andere Lysozyme nicht gebunden werden. Die antigene Oberfläche ist diskontinuierlich. (Poljak 1991) Antigene Determinanten sind "gewöhnlich geformt aus räumlicher Zusammenlagerung sequenzieller entfernter Regionen." (Vajda et al. 1990) Die Abbildung zeigt Lysozym mit den variablen Regionen dreier seiner Ak (Davies et al. 1990)



Die Epitope des Lysozyms sind konformationsabhängig und zusammengesetzt. Die drei gezeigten haben Überschneidungen und bedecken etwa die Hälfte der Enzymoberfläche. Bei einem der Ak gruppieren sich die AS um ein kritisches Arg des Epitops; ein anderer Ak erkennt ein  $\alpha$ -Helixepitop, der Ak besitzt einen großen Vorsprung, d.h. eine Wölbung nach außen ins Medium. Zwischen Ak und Lysozym ist praktisch kein Freiraum für Wasser. Die Ladungen der Oberflächen passen zueinander. Wasserstoffbrücken scheinen wichtig für die Interaktion zu sein. Keiner der Ak bindet eine einzige zusammenhängende Proteinsequenz. Ein Epitop besteht aus etwa 15 AS. Die Struktur ist wichtig. Beim Lysozym gibt es keine Kreuzreaktion zwischen nativem und denaturiertem Protein. Das C $_{\alpha}$  von Pro 70 des Lysozyms hat sich durch die Ak-Bindung um 1,7 Å ins Innere des Moleküls verlagert. Ein Trp des Fab-Fragmentes hat sich um 180° gedreht. Mit einem anderen Ak hat sich der Carbonyl-Sauerstoff des Asp101 um 2,5 Å bewegt. Die Bindung zwischen Antikörpern und Lysozym ist eine Mischung aus "lock-and-key" Modell und "induced fit" (Schloß und Schlüssel bzw. induziertem Passen, nach wenig Bewegung). Als Beispiel seien hier die bindenden AS des Lysozyms mit dem Ak HyHEL-5 angegeben : 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 53; 67, 68, 69, 70; 84. (Davies et al. 1990, Davies et al. 1988) Die Röntgenstrukturanalyse hat eine Erweiterung bekommen, mit der Bewegungen im Kristall gemessen werden können. Mit Lysozymkristallen laufen zur Zeit am DESY-Speicherung Versuche. (Hajdu & Johnson 1990)

Kasein:

Ein lineares Epitop konnte bislang nicht durch Röntgenkristallographie gezeigt werden.  $\beta$ -Kasein ist ein sehr bewegliches Molekül, so daß kaum zusammengesetzte Epitope zu erwarten sind. Ein Ak gegen  $\beta$ -Kasein ließ sich deshalb schon durch ein Peptid von 7 AS kompetitieren. (Kobayashi et al. 1991)

CPMV:

Für CPMV (cowpea mosaic virus), ein den Polioviren verwandtes Pflanzenvirus, wurde kürzlich die Interaktion des Viruskapsids mit dem Fab-Fragment eines seiner Ak röntgenchromatographisch gezeigt. Dabei handelt es sich um eine ellipsoide Kontaktstelle von 40Åx20Å an der 3er Symmetrieachse. Ungefähr 30 AS des Virus liegen unter der Kontaktregion, dem "Fußabdruck" des Antikörpers. Die Region entspricht dem VP2 und VP3 von PV. (Wang et al. 1992)

Influenza:

Ak gegen Influenzavirusneuraminidase überdecken in der Röntgenstruktur 15-22 AS einiger Oberflächenschlaufen. Das Epitop ist absolut konformationsabhängig. Die Fläche beträgt 650-900Å<sup>2</sup>. Außer 75-120 Wasserstoffbindungen sind Salzbrücken und hydrophobe Interaktionen an der Bindung beteiligt. 5-6 AS tragen vermutlich den Hauptteil der Bindungsenergie. "Bis heute ist keine Mutation einer AS in einem Epitop bekannt, die nicht die Bindung verändert." (Laver et al. 1990) Einige Ak reagieren schon nicht mehr, wenn das Epitop reduziert oder alkyliert wird (Lenstra et al. 1990).

HRV:

Auch die Kristallisation von Rhinoviren mit den Fab-Fragmenten neutralisierender monoklonaler Ak ist gelungen (Smith & Chase 1992). Kryoelektronenmikroskopie und anschließende Rekonstitutionsprogramme zeigen, daß die Kontaktstelle des HRV-Fab-Komplexes nierenförmig ist. Sie überdeckt etwa  $5\text{nm}^2$ . Der verwendete Ak richtet sich gegen Region 1. Wie die Aufnahmen zeigen, deckt der Fußabdruck des Antikörpers jedoch eine viel größere Region ab, die über die Rezeptorbindungsschlucht herüberreicht und die Region 2 berührt. (Smith et al. 1993)

Laver et al. faßten 1990 nach Betrachtung verschiedener Epitope, die mit Röntgenstrahlen untersucht wurden, zusammen:

15-22 AS von 2-5 Oberflächenschlaufen sind an der Bindung zum Ak beteiligt, Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophobe Interaktionen. Die Kontaktfläche ist etwa  $700 \text{ \AA}^2$  groß, d.h.  $26,5 \text{ \AA}$  im Durchmesser (van Regenmortel 1989) oder  $3\text{nm} \times 3\text{nm}$  (Laver et al. 1990). (Die Seitenlänge eines Quadrates dieser Flächengröße entspricht einem Zehntel des PV-Durchmessers.) Es gibt kaum Oberflächenregionen mit einem Durchmesser von  $2\text{nm}$ , die nur AS aus einem durchgehenden Strang enthalten (van Regenmortel 1989). Der Abstand zwischen Fußabdrücken von Antikörpern beträgt  $9\text{-}15\text{nm}$  (Icenogle et al. 1983).

Es gibt monoklonale Antikörper (mAk), die lineare (sequenzielle) Epitope oder Teilepitope erkennen. Nicht jede AS der fortlaufenden Sequenz ist jedoch dann an der Bindung an den Antikörper (Ak) beteiligt, sondern die bindenden AS liegen nur sehr dicht auf der Sequenz des Antigens zusammen ohne größere Unterbrechungen anderer Strukturteile. Die sog. "kontinuierlichen" Epitope sind in Wirklichkeit diskontinuierlich. Kein Epitop enthält nur Atome eines kontinuierlichen Abschnitts. (van Regenmortel 1990) Da also auch in einem sequenziellen Epitop einige nicht antigene AS liegen, ist die Einteilung in kontinuierlich und diskontinuierlich sehr willkürlich (Lenstra et al. 1990). Auch lineare Epitope besitzen eine Struktur. Weil Übergänge zwischen zwei verschiedenen Strukturteilen besonders viele Strukturbesonderheiten aufweisen, eignen sie sich auch als lineare Epitope oder Teilepitope. Wie Versuche mit Peptiden zeigen, ist die Struktur kurzer AS-Stränge meist so flexibel, daß sie sich dem Ak angleichen kann.

Die bivalente Bindung zwischen Antigen und Ak ist um Größenordnungen stärker als die monovalente und findet deshalb schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen statt. Beweglichkeit ist dabei ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems. (Schumaker et al. 1984) Ak, die dasselbe Epitop erkennen, müssen nicht gleich sein; sie hindern sich sterisch. Selbst gleiche Ak können sich sterisch hindern. Die Anzahl der Ak, die ein Virion gleichzeitig binden kann, ist kleiner als die Anzahl der Proteinuntereinheiten. (van Regenmortel 1990)

Verschiedene Tiere antworten nicht notwendigerweise auf alle Epitope eines gegebenen Antigens. Sie werden auch nicht nur mit ganzen Viren konfrontiert, sondern auch mit Untereinheiten und eventuell mit freien viralen Proteinen. Viele Ak nach Immunisation mit intaktem Virus werden gegen Epitope gebildet, die ganz oder teilweise denaturiert sind. (Geysen et al. 1984) Außerdem hängt die Antigenität davon ab, welchen Homologiegrad eventuell Proteine des antwortenden Organismus haben (Getzoff et al. 1988).

Leukozyten phagozytieren Virus-Antikörper-Komplexe *in vivo*, dabei muß der Ak nicht neutra-

lisieren, um effektiv zu sein (sei denn, das Virus kann sich im Leukozyten vermehren). (McCullough 1986)

Die Wirkung von Antikörpern auf PV ist bislang unbekannt. Werden die Virionen in Lysosomen oder an Proteasomen abgebaut? Werden sie in verschiedener Weise aufgenommen?...

Es besteht noch immer eine große Diskussion, ob die Bindung von Antikörpern an das Antigen einfach nur dazu führt, das Antigen zu aggregieren und dadurch die Keimzahl (bei Viren die Anzahl infektiöser Partikel) zu reduzieren, oder ob es Mechanismen gibt, die das Antigen so verändern, daß es außer Kraft gesetzt wird. Wahrscheinlich sind verschiedene Reaktionsmöglichkeiten unter verschiedenen Bedingungen möglich.

### 1.2.3. Welche Aminosäuren erkennt ein Antikörper?

Getzoff et al. (1987) bestimmten die wichtigsten AS für die Bindung des Myohämerythrins an einen Ak durch Ersetzen jeder AS des Bindungsbereiches durch alle 19 anderen AS in Peptiden des Proteins. Schon daraus ergab sich, daß bei einigen AS der Mechanismus einer beweglichen Struktur angenommen werden mußte.

Sitzen Cys, Leu oder Val auf der Oberfläche eines Antigens, dann oft in antigenen Stellen. Auch Ser, Lys, Thr, Glu und Ala liegen oft in diesen Regionen (Kolaskar & Tongaonkar 1990). Möglicherweise ist die Ansammlung von aromatischen AS (His, Phe, Tyr, Trp) eine Eigenart des Antigen-Antikörper-Komplexes. Durch sie werden van der Waals-Interaktionen begünstigt. (Poljak 1991)

Was ist antigen?

1. außen ("Die gesamte Oberfläche ist antigen" *in vivo* (Getzoff et al. 1988))
2. Zugänglichkeit
3. geringe Packungsdichte
4. dreidimensionale nicht sequenzielle Ansammlungen von AS (cluster)
5. Beweglichkeit auf beiden Seiten (Ak und Antigen) 0.1-1 nm (Getzoff et al. 1988)
6. besondere Struktur

z.B. Knicke ( $\beta$ -turns (Ball et al. 1990)), Drehungen, Schlaufen, Enden von  $\beta$ -Strängen und N-Termini; gebogene, elektrisch nicht neutrale Oberflächen; in Peptidtests auch Helices. Das "Schlüssel- und Lochmodell" von Ehrlich gilt für die Struktur zwar immer noch, muß jedoch durch eine regionale Beweglichkeit ergänzt werden. (Getzoff et al. 1988) Das absolute Passen von Paratop und Epitop ist sicher unmöglich (van Regenmortel 1989).

7. Ladung (Getzoff et al. 1988)
8. Ansammlung bestimmter AS

a) besonders hydrophobe AS außen, Cys, Leu, Val (Kolaskar & Tongaonkar 1990) (z.B. XXLqXL<sub>a</sub> in der MKS-Schleife, s.u. (Geysen et al. 1984))

b) Es lassen sich Matrices herstellen, die Antwort auf die Fragen geben: Welche AS ist häufig in antigenen Regionen? Welche AS ist durch wieviele andere AS ersetzbar? Statistisch ausgewertet sind C, P, G, N, Y, H sehr häufig und wenig ersetzbar in antigenen Regionen, M, A, T, S, Q und R sehr wenig antigen. (Getzoff et al. 1988)

Beweglichkeit ist eine Voraussetzung für Antigenität: Proteine sind nicht so feste Gebilde, daß die einzelnen AS sich nicht bewegen könnten. Sogar die einzelnen Atome bewegen sich im Laufe der Zeit. In Bruchteilen von Picosekunden nehmen sie Positionen innerhalb eines elipsoiden Raumes ein. (McCammon & Karplus 1983) Im Inneren besitzen Proteine Höhlen von 10-180 Å<sup>3</sup>, in denen sich die AS stärker bewegen können (Rashin et al. 1986). Lokale Beweglichkeit ist an Biegungen, Knicks und Schlaufen gebunden. Schlaufen sind in ihrer Mitte, β-Stränge an den Enden am beweglichsten. N- und C-Termini sind so beweglich wie Schlaufen und oft antigen. Die Beweglichkeit liegt zwischen 1-10Å. Ein starrer "Schloß- und Schlüssel-Mechanismus" (s.o.) würde unmöglich viele Ak verlangen. (Getzoff et al. 1988)

Man kann jetzt Peptide eines Proteins so an Plastikstäbchen synthetisieren, daß die Peptide immer gleich lang sind und immer um eine konstante Anzahl von AS verschoben (zyklisch permutiert)(pepscan), so daß die ganze Sequenz überschneidend dicht bedeckt ist (Geysen et al. 1987). Solche Peptide können zur Suche nach linearen Stücken von Epitopen genutzt werden. Ein ganzes zusammengesetztes Epitop können sie nicht erkennen (Lenstra et al. 1990). Aus polyklonalen Seren sind auf diesem Weg über ELISA Antikörper isoliert worden, die Kreuzreaktionen zu Stücken verschiedener Potyviren zeigten. (Tribbick et al. 1991)

Vom VP1 vom MKS-Virus wurden überschneidende Hexapeptide über die gesamte Sequenz gebildet. Die Antigenität der sog. MKS-Schleife wurde dabei mit Kaninchenseren gegen ganze Viren bestätigt. Von der antigenen Region wurden Austauschpeptide gebildet, so daß jede AS einzeln gegen jede AS ausgetauscht wurde. Daraus ergibt sich eine Konsensussequenz, die von Seren erkannt wird, XXLqXL<sub>a</sub>. X ist eine beliebige AS, L ist Leucin, q Glutamin, a Alanin. Die beiden hydrophoben Leucine sind ausgesprochen wichtig für die Reaktion, weniger wichtig sind q und a. Die restlichen Positionen können von beliebigen AS eingenommen werden. (Geysen et al. 1984)

Im fd-Phagen lassen sich Zufallssequenzen von Hexapeptiden in riesiger Anzahl herstellen. Bindet man diese dann an bestimmte Antikörper (Ak), z.B. gegen β-Endorphin, so zeigt sich bei Analyse der Ak, daß nur solche mit gewissen Übereinstimmungen stark binden, z.B. an erster Stelle ein Tyr, an zweiter ein Gly. Auffallend wenige AS sind für die Bindung notwendig. Für jeden Ak läßt sich eine Konsensussequenz herstellen. (Cwirla et al. 1990) Zum großen Erstaunen der Wissenschaftler werden bei solchen Versuchen aber auch einzelne Sequenzen gebunden, die total abweichen und keine Homologie zu haben scheinen. Es ist nicht auszuschließen, daß die abweichende Sequenz eine ähnliche Oberfläche ergibt. (Scott & Smith 1990)

Eine Arbeitsgruppe hat chemische Substanzen synthetisiert, die die gleiche Oberfläche wie die CDR eines bestimmten Antikörpers besitzen. Dabei wurden keine AS verwendet. (Saragovi et



al. 1991)

Durch eine neue Methode sind jetzt weitere Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Antigenen zu erwarten. Sie benötigt keinen Einsatz von Chemikalien zur Detektion der Antigen-Ak-Bindung. Antigen (oder Ak) werden an einen dextranschichteten "Sensorchip" gebunden. Nach Zugabe von Ak (oder Antigen) kann mit einem Gerät zur Messung des Brechungsindex an der Oberfläche die Bindung der antigenen Komponenten direkt gemessen werden. (Dubs et al. 1992)

Die Arbeit mit polyklonalen Seren - wie auch in dieser Arbeit durchgeführt - vermeidet ungewöhnliche Spezifitäten von monoklonalen Ak, die nicht *in vivo* von Bedeutung sind. (Getzoff et al. 1988)

Sicher ist, daß T-Zell-Epitope einen Einfluß auf B-Zell-Epitope haben. T-Zell-Epitope von Proteinantigenen haben erstaunliche Einheitlichkeit in allen Organismen. Während die entsprechenden Sequenzen im vollständigen Molekül alle möglichen Strukturformen einnehmen können, verwandeln sich dieselben Peptidstücke als an der Zelloberfläche präsentiertes T-Zell-Epitop oft in amphipatische Helices. Ein solches T-Zell-Epitop ist auch die Sequenz KVAR nur wenige AS hinter der RGD-Bindungsstelle in der hochantigenen VP1-Schleife (145-160) vom Maul- und Klauenseuche-Virus. (Rothbard & Taylor 1988, Acharya et al. 1989) (Keine der von mir bearbeiteten PV-Sequenzen enthält RGD.)

"In wässriger Lösung scheinen Peptide ein Ensemble aus einer großen Anzahl vorübergehender Konformationen in einem dynamischen Gleichgewicht zu sein." Trotzdem können Ak, die gegen freie Peptide hergestellt und selektioniert werden, zu 25-100% intaktes Protein binden. Ein Peptid von 13 AS hat genug Strukturinformation, um mit hoher Frequenz erkannt zu werden. Oft reichen zur Erlangung von Immunität schon sehr kurze Peptidsequenzen, so bei einer Impfung gegen Malaria. Die Sequenz Asn-Ala-Asn-Pro aus dem immunogenen Oberflächenprotein des Sporozoiten von *Plasmodium falciparum* wurde in ein synthetisches Peptid in mehrfacher Kopie eingebaut. Ein Teil der Impflinge wird dadurch gegen Malaria geschützt. (Niman et al. 1983, Satterthwait et al. 1989)

### 1.3. Andere Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen

Durch das künstliche Einführen von Defekten in Gene konnte gezeigt werden, daß viele Funktionen des Immunsystems redundant sind. Fehlt z.B. Interleukin-4, so übernehmen andere Botenstoffe seine Rolle; Mäuse ohne IgD zeigen keine Auffälligkeit. Schaltet man jedoch ein Kontaktmolekül für IgM auf Knochenmarkszellen aus, so entstehen keine reifen B-Lymphozyten, also auch keine anderen Ak. (Hobom 1992) Interferon- $\alpha$  stimuliert die Neutralisationsaktivität von monoklonalen Antikörpern gegenüber Polioviren (Langford et al. 1991). Die Proteine vieler Viren können direkt die Immunantwort und entzündliche Prozesse verändern, indem sie direkt die verschiedensten immunologischen Prozesse regulieren, z.B. durch Beeinflussen von Zellfaktoren. (Gooding 1992)

Es hängt von der Wirtszelle ab, ob sie einen Virus-Ak-Komplex als neutralisiert erkennt oder



nicht. (Mandel 1979, Grady & Kinch 1985, van Regenmortel 1990) Bei Zugabe eines bestimmten Antikörpers (3G8) gegen La Crosse Bunyavirus neutralisiert der Ak die Viren für Hamsterzellen, nicht aber für Mückenzenen; beim mAk (2B9) gegen das gleiche Virus ist es genau umgekehrt. Auch Enterovirus 71 zeigt starke Abhängigkeit von Wirtszellen. Die Beweglichkeit der Zellmembran (z.B. auch an Zellfortsätzen im Darm) spielt eine Rolle. (Dimmock 1987) Gibt man vor Beginn einer PV-Infektion Ölsäure zu HeLa-Zellen, so wird die Dichte der Membran so verändert, daß keine PV-Vermehrung stattfindet (Guinea & Carrasco 1991). PV1 wt und alle drei Sabinstämme wachsen in Verozellen weniger effektiv als in HeLa-Zellen (Tershak & Makkar 1988). Obwohl PV eigentlich nur Zellen des Nervensystems befällt, werden in Zellkulturen auch Endothelzellen permissiv für PV, weil sie beginnen, Rezeptor zu exprimieren (Couderc & Crainic 1990).

Die größte Menge aller Virusinfektionen des Menschen verläuft nicht klinisch. "Natürliche" Immunität ist beteiligt, wenn eine Infektion nicht anwachsen kann, weil z.B. spezifische Rezeptoren oder kompetente Zellen fehlen, oder die Infektion so langsam verläuft, daß der Körper Zeit hat, eine spezifische Immunantwort aufzubauen, die stark genug ist, die Infektion zu kontrollieren. Außerdem hängt eine Infektion vom emotionalen und physiologischen Status des Menschen ab. (Welsh 1986) Die Immunantwort wird über die Zusammensetzung des Fettes der Nahrung beeinflusst, weil die Fettzusammensetzung der Zellwände ihre Beweglichkeit bestimmt. (Erickson 1986)

Auch Pflanzenzellen werden durch Inokulation mit milden Stämmen von Viren gegen virulente Stämme geschützt. Da bei ihnen bislang kein "Immunsystem" gefunden wurde, nimmt man an, daß die viralen Proteine der milden Stämme neu eintretende RNS binden und dadurch negativ regulieren. (Savithri et al. 1989)

Nichtumhüllte Viren, wie PV, werden durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Diese Art der Virusaufnahme kann zu Immunreaktionen führen, die beide MHC-Komplexe einschließt, den Abbau über Klasse I und die Präsentation über Klasse II. Jede kernhaltige Zellart exprimiert MHC-I und kann damit durch CD8-T-Zellen, zytolytische Zellen, lysiert werden, wenn neu synthetisierte Proteine eines Virus auf ihrer Oberfläche erscheinen. Eventuell kaschieren Nervenzellen diese Möglichkeit (s.u.). "Der erste Schritt der humoralen Immunantwort ist die Interaktion eines fremden Moleküls mit dem Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor auf der B-Zelloberfläche." Nach Bindung an den Rezeptor wird der Ak-Antigen-Komplex aufgenommen und proteolytisch verdaut. Teile des Antigens, typischerweise etwa 10-20 AS lang, werden zur Zelloberfläche geleitet, wo sie mit dem MHC-II assoziiert werden. (Vajda et al. 1990) Für eine Antwort durch CD4-T-Zellen müssen antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems infiziert werden, denn nur diese können aus einem Antigen "gerettete" Peptide in geänderter Struktur an die Oberfläche bringen. (Koszinowski et al. 1991, Unanue & Cerottini 1989) Als Rezeptoren dienen vor allem die Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, Integrine und Selektine. (Springer 1990)

Über Muttermilch werden Neugeborene mit Antikörpern passiv geimpft; sie bekommen auch Makrophagen und andere immunkompetente Zellen, ein komplettes passives Immunsystem. IgA<sup>+</sup>-B-Zellen wandern vorwiegend in Schleimschichten und Milz, während IgM<sup>+</sup>- oder

IgG<sup>+</sup>-B-Zellen in peripheren Lymphknoten sitzen. Reife ungeprägte B-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wandern in Schleimschichten ohne Antigenstimulation. - Außer HIV-1 bewirken auch Varicella-Zoster-Viren, Herpes simplex Viren und Rubellaviren immunologische Defekte bei Neugeborenen. Trotz der passiven Immunität von Neugeborenen gegen Polioviren stört diese die Impfung mit OPV nicht. (Mueller et al. 1990)

Bevor Polioviren das Immunsystem erreichen, werden sie der Säure des Magens und proteolytischen Enzymen ausgesetzt. Auch durch die Darmperistaltik, die darmeigene Mikroflora und Schleime versucht der Körper, Keime zu eliminieren. Die Immunantwort beginnt, wenn Infektionen das lymphatische Gewebe des Magendarmtraktes erreichen. Ein Teil dieses Gewebes sind die Peyerschen Plaques, Gewebe, reich an B- und T-Zellen (Mueller et al. 1990), in denen auch Polioviren nachzuweisen sind. Peyersche Plaques sind halbkugelförmige Vorsprünge der Darmwand ins Darminnere. Sie sitzen zwischen den zahlreichen Darmzotten. Ihre Oberfläche ist weniger schleimig und besser für die Aufnahme von Fremdstoffen geeignet als die Umgebung. Besondere Zellen (M-Zellen) nehmen gezielt Antigen auf. Diese M-Zellen bilden auch weniger Lysosomen aus als die Nachbarzellen. Auch PV1 (Sicinski et al. 1990) wird von M-Zellen endozytiert und an die Immunzellen im Inneren der Peyerschen Plaques weitergereicht. Die sekretorische IgA-Antwort wird eingeschaltet, sobald Polioviren in M-Zellen aufgenommen sind. Die Serum-IgA-Produktion beginnt nicht nur in dem Gewebe, in dem das Antigen aufgenommen wurde, sondern auch in anderen Sekretionsgeweben wie Bronchien, Brust... (Gilligan & Li Wan Po 1991)

Wichtig für den Organismus ist die Vernichtung infizierter Zellen. Eine zytotoxische T-Zelle tötet eine Zielzelle in nur zehn Minuten, dabei kann sie mehrere berührte Zielzellen gleichzeitig schädigen (Rao 1991). Das gilt auch für Zellen, die PV-Sequenzen an ihrer Oberfläche zeigen.

Eine weitere Möglichkeit, eine infizierte Zelle zu zerstören, besteht über das Komplementsystem. Es besteht aus einer Folge von Molekülkomplexen; allein die Untereinheit der ersten Komponente C1, C1q, ist ein Bund aus sechs gleichen Einheiten, die wie Blumen gebündelt sind, mit einem Molekulargewicht von 460 000. Dagegen ist ein aktivierender IgG-Ak von 150 000 Mgew. klein. (Feinstein et al. 1986) Komplement kann PV-mAk-Komplexe verkleinern, löslich machen. Frühes IgM ist sehr komplementabhängig, spätes IgM und frühes IgG weniger; spätes IgG ist oft komplementunabhängig. Während die Phagozytose von Virus-Ak-Komplexen über den Fc-Rezeptor läuft, wird die von Virus-Ak-Komplement-Komplexen durch den C3<sub>b</sub>-Rezeptor vermittelt. (McCullough 1986) Auch Ak gegen HIV führen dazu, daß HIV-Ak-Komplexe in Makrophagen über den Fc-Rezeptor aufgenommen werden. Anstatt dort vernichtet zu werden, vermehren sich die Viren jedoch in diesen Zellen. (Homsy et al. 1989)

Beim Lysozym nimmt eine im intakten Molekül aus zwei  $\beta$ -Strängen mit Knick bestehende Struktur in Lösung als Peptid eine  $\alpha$ -Helixstruktur an. "Immundominante Peptide (T-zellspezifische) sind in Lösung beweglich, nehmen zahllose Konformationen ein, aber jedes Peptid hat eine  $\alpha$ -Helix als Grundkonformation." D.h., obwohl das Peptid im Lysozym eine sehr markante Struktur einnimmt, kann es sich in Lösung frei verändern. Die helikale Struktur scheint am besten den MHC zu binden und dort stabilisiert zu werden. Kristalle des Peptides mit dem MHC zeigen den Kontakt von 15-20 AS. 5-8 AS reichen für die Stabilisierung. Die Beweglichkeit der

Monoklonale Ak sind wahrscheinlich nicht repräsentativ für Seren. Im Test nicht effektive mAk können *in vivo* doch eine Wirkung auf Neutralisation oder passiven Schutz haben. (McCullough 1989) Verschiedene Antikörper können bei Bindung und Neutralisation einander helfen oder behindern; z.B. binden bei der durch Mücken übertragenen Encephalitis weitere Antikörper stärker, wenn schon andere gebunden sind. (Heinz et al. 1984, van Regenmortel 1990)

Antikörper können in Nervenzellen eindringen und die Zellen von Viren befreien. Das ist wichtig, weil die langlebigen Nervenzellen sich vor Zerstörung schützen (s.o.), indem sie kein Antigen präsentieren. (Levine et al. 1991)

#### 1.4. Die Antigenität der Polioviren

Polioviren enthalten drei bekannte antigene Regionen (sites). Polyklonale Seren von Menschen, Pferden und Affen enthalten Ak gegen die antigenen Regionen 2 und 3 in hoher Konzentration und weniger gegen Region 1 bei allen drei PV-Typen. Der Mausinzuchtstamm Balb/c bildet hauptsächlich Ak gegen Region 1 (von PV2 und PV3) und Region 2 und 3 (von PV1); diese Ak-Verteilung ist eine Eigenart des Immunsystems der Maus, aber solche Besonderheiten sind auch bei anderen Säugetieren zu finden. (Nomoto & Wimmer 1987)

Nicht nur die Immunreaktion von Säugetieren auf PV ist verschieden. Die Antigenität der Polioviren schwankt. Bei Untersuchungen der Stämme der Finnlandepidemie zeigte sich, daß diese Mutationen an allen bekannten großen antigenen Regionen besitzen. Auch die im Labor benutzten "Saukett"-Viren stammen aus drei antigenverschiedenen amerikanischen Typ-3-Isolaten. (Kinnunen & Hovi 1989)

Während die mAk aus der Maus meistens nur den Virustyp neutralisieren, gegen den sie hergestellt werden, können Ak aus EBV-transformierten B-Zellen des Menschen z.T. zwei oder alle drei Typen neutralisieren (Uhlig & Dernick 1988).

Die antigene Struktur von Picornaviren wird eingehend untersucht. Minor veröffentlichte 1990 eine Übersicht über die bislang gefundenen PV-Epitope, z.T mit genauer Angabe der AS. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich mit der Bindung von PV an Ak; es soll aber nicht verschwiegen werden, daß es selbst bei der Maus, die PV nicht meßbar vermehrt, auch eine Immunantwort über den MHC-1 und zytolytische Lymphozyten gibt. Sowohl ganze Polioviren als auch VP1 oder Peptide, 1110-1120 oder 1202-1221, erzeugen in der Maus eine Antwort durch CD8<sup>+</sup>-Zellen. (Kutubuddin et al. 1992b) Die Immunantwort auf Polioimpfung ist T-zellabhängig. Impft man HIV-Infizierte mit eIPV, bilden sie nur Ak, wenn noch genügend T4-Zellen vorhanden sind. Die Ak-Bildung ist der Anzahl der T4-Zellen proportional. (Vardinon et al. 1990) - Maus-T-Zellen erkennen PV-T-Zell-Epitope auf allen vier Kapsidproteinen von PV (Mahon et al. 1992). Ebenso induzieren alle vier Kapsidproteine von PV in Kulturen aus Blut sabingeimpfter Menschen Zellvermehrung. Die isolierten Kapsidproteine stimulieren die Immunantwort. D.h. auf allen VPs gibt es auch humane T-Zell-Epitope. Für die Vermehrung der Lymphozyten sind stimulierte T-Helferzellen notwendig. Die Intensität der Proliferation gegen verschiedene VPs oder auch VP1-Peptide ist je nach Zellspender verschieden. (Simons et al. 1993a) Die T-Zell-Antwort und -Kreuzreaktivität der Picornaviren wird zur Zeit eingehend un-

tersucht. Die z.B. in PV3 gefundenen T-Zell-Epitope, nah an bekannten B-Zell-Epitopen des VP1 sollen eventuell dazu benutzt werden, um antigene Reaktionen sowohl von PV-Peptiden selbst als auch von fremden in PV eingebauten Peptiden zu verstärken. (Graham et al. 1993)

Eine Anzahl der Arbeiten unserer Abteilung beschäftigt sich mit der Erklärung des Bindungsmechanismus viraler Antigene an Antikörper (Uhlig 1986, Dernick et al. 1987, Wiegers & Dernick 1987, Uhlig & Dernick 1988a, Uhlig & Dernick 1988b, Wiegers et al. 1988a, Wiegers et al. 1988b, Wiegers et al. 1989, Wiegers & Dernick 1992, Ketterlinus et al. 1993). Ein großer Teil der Oberfläche von Polioviren ist antigen. Ob die antigenen Regionen eines Tages so ineinander übergehen wie bei kleineren Proteinen (z.B. Lysozym), werden zahlreiche Versuche in der Zukunft noch zeigen müssen. Viele Autoren sind jedoch der Meinung, daß jede zugängliche Oberfläche eines Proteins antigen ist (Williams et al. 1990, Laver et al. 1990, Lenstra et al. 1990, Getzoff et al. 1988). Es ist nicht ungewöhnlich, daß durch eine große Anzahl von mAk vorher unterscheidbare, antigene Regionen zu einer einheitlich zusammenhängenden Domäne werden (van Regenmortel 1990), so daß sich schließlich die gesamte Oberfläche als antigen herausstellt (Getzoff et al. 1988); dies könnte auch bei PV passieren. Erst kürzlich ist gezeigt worden, daß die vorher unterschiedenen Teile in der antigenen Region 3 doch in eine Fläche übergehen (Wiegers & Dernick 1992).

Biochemisch und immunologisch unterscheiden sich die Poliotypen am meisten in den Strukturproteinen. Aber es scheint Kreuzreaktionen in der Immunpräzipitation und in immunologischen Reaktionen isolierter VPs (im western blotting) zu geben. Es wird auch von Kreuzreaktionen zwischen Polioviren und anderen Picornaviren berichtet. (Minor et al. 1982) Obwohl viele Seren spezifisch sind, wenn man sie auf Neutralisation oder Komplementbindung gegen natives PV-Antigen untersucht, ist die Komplementbindung denaturierter Viren doch heterotypisch. H-spezifische Ak sind di- oder tritypisch. Monoklonale Ak können spezifisch sein für N-Antigen oder H-Antigen oder sogar isoliertes Protein. Sie können aber auch H- und N-Antigen binden (Emini et al. 1982). mAk gegen Sab3 aus Hybridomazellen binden N-Antigen oder H-Antigen, einige auch beides, einige binden VP1, einige neutralisieren auch Typ 1 (Brioen et al. 1982). Nach Vrijzen et al. (1984) soll die Immunpräzipitation (Bindung, nicht Neutralisation) mit H-Antigen bei allen Seren mit allen drei Serotypen stattfinden. Die Antigenität leerer Kapside von PV ist abhängig von der Art ihrer Isolierung. Kapside, die einmal bei pH 8,5 inkubiert waren, bleiben H-antigen. (Rombaut et al. 1982b)

Alle drei Oberflächen-VPs von PV (also auch VP2 und VP3) können neutralisierende Ak hervorrufen (Dernick et al. 1983, van der Marel et al. 1983). "Nur ein kleiner Anteil von Anti-VP-Ak bei PV neutralisiert; die Mehrzahl richtet sich gegen beides, D- und C-Antigen (s.o.), ist aber nicht direkt an der Virusneutralisation beteiligt." Die Neutralisationstiter (der Ratten- und Kaninchenserum) gegen VPs sind niedrig, zeigen aber, daß alle Anti-VP-Seren sowohl mit dem dazugehörigen Polypeptid der homologen als auch der heterologen Viren im Immunoblot reagieren. (van der Marel et al. 1983)

Durch die Angabe von durchgehenden AS-Sequenzen als "antigen" werden viele AS falsch der Antigenität zugerechnet. Manche "antigene Schlaufe" entpuppt sich bei näherem Untersuchen der Daten als eine oder wenige AS. Vergleiche dieser Regionen mit der Röntgenstruktur zeigen,

daß einige der AS innen liegen und daher keinen Zugang zum Ak haben. Wiegers & Dernick (1992) fanden die Mutation einer antigenen AS in PV1 (P2245), die zwischen zwei AS auf der Oberfläche liegt, aber selbst nicht die Oberfläche berührt. Die Wirkung dieser Mutation kann nur über Sekundärstrukturänderungen erfolgen. (siehe Diskussion)

Leider fehlen in vielen Veröffentlichungen über Punktmutationen Angaben zur Art der AS; allein durch die Numerierung lassen sich die AS jedoch nicht zweifelsfrei zuordnen. Bei der Übertragung von Numerierungen von einem Stamm auf den anderen entstehen Fehler. A2239 von PV2 entspricht z.B. A2240 von PV1, E2241 von PV2 entspricht E2242 von PV1, jeweils um eine AS verschoben (Uhlig 1990, Uhlig et al. 1990). Ich gebe deshalb im Folgenden nur die AS-Austausche an, die eindeutig sind. (Minor et al. 1986a, Minor et al. 1985, Diamond et al. 1985, Ferguson et al. 1985, Emini et al. 1984b, Patel et al. 1993, Ketterlinus et al. 1993, Minor 1990, Uhlig et al. 1990) Ein gefundenes Epitop am C-terminalen Ende von VP1 bei Sab3 AS 286-288 RNN entspricht der wt-Sequenz KNN (Minor et al. 1985), von der nicht bekannt ist, ob sie antigen ist.

Aminosäure-Art und -Nummer (wt), die sicher Einfluß auf die Antigenität haben

Typ 1	Typ 2	Typ 3
<b>S 1097</b>	D 1093	E 1089
<b>T 1099</b>	D 1095	D 1091
<b>N 1100</b>	A 1096"	E 1093
<b>K 1101</b>	P 1097"	P 1095
<b>E 1144</b>	K 1099"	T 1096
<b>S 1221*</b>	R 1100"	T 1097
A 1222	A 1101"	R 1098
<b>A 1223*</b>	F 1105	A 1099
L 1224	G 1219"	Q 1100
<b>D 1226*</b>	T 1223"	K 1166
<b>H 1248</b>	G 2158	T 1253
<b>T 2072</b>	T 2167	N 2164
<b>K 2073</b>	A 2239	V 2166
<b>H 2142</b>	T 2244	T 2167
D 2164	N 3056	E 2172
<b>N 2165</b>	R 3061	E 3058
<b>N 2166</b>	D 3066	S 3059
<b>Q 2167</b>	K 3207	D 3077
<b>T 2168</b>	<b>E 2241</b>	S 3079
S 2169		
P 2170		R 1286 (Sab3)
<b>P 2236</b>		N 1287 "
<b>A 2240</b>		N 1288 "
<b>E 2242</b>		
<b>P 2245</b>		
<b>R 2270*</b>		
S 3058		
A 3059		
<b>T 3060</b>		
<b>K 3062</b>		
<b>E 3066</b>		
<b>S 3073</b>		
<b>K 3075</b>		
P 3076		
<b>K 3144</b>		
S 3183		
<b>L 3202</b>		
<b>E 3207</b>		
<b>K 3234</b>		

\* persönliche Mitteilung, Klaus Wiegers

Fettdruck: Ergebnisse unserer Abteilung

" Numerierung wurde nach Sequenzvergleich gegenüber der Originalveröffentlichung geändert.

Durchgehende Sequenzangaben ohne Angaben der AS-Art wurden nicht aufgenommen!

Immunisiert man Mäuse oder Kaninchen mit Polioviren und boostert sie nach einiger Zeit, so erhält man Hyperimmunseren. Solche Seren lassen sich auch gegen auf verschiedene Art denaturierte Viren (Uhlig et al. 1983), Untereinheiten (Dernick 1981) oder Einzelproteine (Wiegers & Dernick 1983, Blondel et al. 1982, Chow & Baltimore 1982, Uhlig et al. 1985) gewinnen. Seren gegen Peptide sind zur Zeit noch schwach, weil Peptide besonderer Repräsentation bedürfen. Umgekehrt ist das Testen der Reaktion von Peptiden mit Seren gegen ganze Viren wie im experimentellen Teil dieser Arbeit möglich. Chow et al. (1985) immunisierten Kaninchen und Ratten mit synthetischen PV-Peptiden, die an KLH gebunden waren. Auf NC wurden die Bindungen der Seren an die Peptide durch sehr empfindliche Reaktionen mit  $^{125}\text{I}$  Staphylococcus aureus Protein A oder Avidin-Biotin-Antikörpern nachgewiesen. Dabei ergab sich: Jedes der Peptide, die zusammen fast das ganze VP1 überdeckten, wurde durch das entsprechende Serum erkannt. Ein Teil der Seren neutralisierte, ein anderer band nur, einige Seren banden auch andere Peptide. Alle Antipeptidseren reagierten mit VP1. Die Titer der Seren gegen Peptid an KLH waren niedriger als gegen ganze Viren, aber entsprachen ungefähr denen gegen isoliertes VP1.

Roivainen et al. (1991) stellten von allen VPs des Sab3 14 AS lange Peptide her, die über die ganze VP-Sequenz immer jeweils um 3 AS weiterschoben wurden (pepscan s.o.). Diese Peptide wurden mit humanen Seren gegen Sab3 untersucht. VP4 band keine Ak. Die antigenen Regionen 1 und 3 reagierten mäßig mit den Humanseren. Erstaunlicherweise banden die vier Schlaufen von VP1, 2 und 3 an den Keilspitzen der  $\beta$ -Fässer und die helikalen Anteile der Schlaufen zwischen den  $\beta$ -Strängen C und D mit hoher Reaktivität, gleich ob sie in der Kristallstruktur innen oder außen liegen. VP1-Peptide zeigten die stärkste Reaktion, gefolgt von VP3-Peptiden. Am schwächsten reagierten VP2-Peptide. Seren verschiedener Personen banden an Teilen verschiedener antigener Regionen. Auch der im ganzen PV-Partikel innen liegende N-Terminus von VP1 reagierte.

Heute können antigene Regionen mit einer Palette von monoklonalen Antikörpern untersucht werden, die in Zellen produziert werden (Köhler 1986). Chow & Baltimore (1982) erhielten Ak aus Ratten gegen VP1 aus SDS-Page, die Mahoney mit Titern von 1:2 bis 1:200 neutralisierten. Die immunologische Reaktion gegen Polioviren läßt sich in eine gewünschte Richtung vorprogrammieren, indem zunächst z.B. synthetische Peptide der gewünschten Region den Zellen angeboten werden und später mit ganzen Polioviren nachgeimpft wird. (Emini et al. 1983a) Durch *in vivo* Immunisierung der Maus mit VP1 bzw. VP2 und späterer *in vitro* Stimulierung der vorgeprägten Milzzellen mit PV1 Mahoney ließen sich auch mAk gegen isolierte Poliopeptide herstellen (Wiegers et al. 1986; Wiegers & Dernick 1987; Wiegers et al. 1990). Mit Hilfe dieser



Ak und Virusmutanten, die die Ak nicht mehr binden, wurden Epitope bestimmt, indem man die Sequenzen und Reaktionen von wt, Mutanten und Revertanten verglich. (Blondel et al. 1986).

Alle drei antigenen Regionen des PV bestehen aus mehreren Schlaufen (Page et al. 1988, Wiegers et al. 1989, Wiegers et al. 1990). Ein bekanntes Neutralisationsepitop liegt bei AS 92-100 von VP1 PV3 (Evans et al. 1983, Minor et al. 1983). Dieses Epitop ist bei allen PV-Typen außer PV1 wt trypsinspaltbar (Minor et al. 1987). Antikörper gegen diese Region in PV1 (89-104) konnten nach *in vitro*-Stimulierung durch VP1 hergestellt werden. Synthetische Peptide dieser Region konnten nur bei Kaninchen neutralisierende Ak hervorrufen; bei Mäusen und Meer-schweinchen nicht, obwohl alle Arten Antipeptid-Ak machten. (Wiegers & Dernick 1987)

Auf der Oberfläche von Polioviren gibt es praktisch keine Region, die groß genug wäre, Fußabdruck eines Antikörpers zu sein und gleichzeitig nur aus einer durchgehenden Sequenz zu bestehen. So erwies sich das Neutralisationsepitop des VP1 (93-103), das lange Zeit als "linear" angesehen wurde, doch mindestens als Teil einer zusammengesetzten antigenen Region, aus mindestens zwei Schlaufen (Wiegers et al. 1989), und das "sequenzielle" Epitop 164-170 von VP2 PV1 Mah ist Teilstück einer größeren zusammengesetzten, antigenen Region (Wiegers et al. 1990). Weil Mutationsanalysen nur Auskunft über einzelne AS in einem Epitop geben, können durch diese Versuche die Grenzen der Fußabdrücke nicht bestimmt werden. Es gibt Mutationen, die die Antikörperbindung verhindern, aber weit ab vom Epitop entfernt liegen (van Regenmortel 1990, Blondel et al. 1986).

Weiter werden durch diese Versuche nur solche Viren gefunden, die lebensfähig sind. Wie gezielte Mutationen des Neutralisationsepitops "3B" zeigen (AS E2074, S2243 und E2246), sind aber auch solche AS für die Neutralisation wichtig, deren Mutanten nicht mehr wachsen können oder so langsam wachsen, daß sie nicht mehr erkannt werden (Reynolds et al. 1991). Solche vermehrungsunfähigen Viren, z.B. Mahoneymutanten können über cDNS-Klonierung mit anschließender Transfektion durch Elektroporation Zellen infizieren. Dabei wurden bislang drei Gruppen von Mutanten entdeckt: 1) Solche, die das Myristylierungssignal AS 4002G verändern, sie können nur noch 5S bilden. 2) Mutationen in AS 4028T führten zu 14S-Pentameren und 150S-Virionen ohne Myristylierung, weil die Interaktion der Myristinsäure mit Protein gestört war. 3) Mutanten der antigenen Region "3B" (2074E, 2243S und 2246E) konnten nur noch 14S-Partikel bilden. (Simons et al. 1993b) Auch Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Antikörpern oder Hemmung durch synthetische Peptide können wegen sterischer Behinderung täuschen und zeigen die antigenen AS nicht genau an. Eindeutig wäre nur die Röntgenstrukturanalyse von Polioviren mit gebundenen variablen Regionen von Antikörpern (Lenstra et al. 1990).

Das Spiel mit Mutanten und Revertanten ist schier unendlich. Die antigenen Regionen können von Antikörpern in tausend verschiedenen Arten und Weisen erkannt werden. Bei Arbeiten mit einzelnen Antikörpern besteht die Gefahr, daß voreilige Schlüsse gezogen werden aus den Ergebnissen, weil nur mit Untergruppen gearbeitet wird. Selbst wenn bei neutralisationsresistenten Mutanten der Region 1 1093-1103 nur Revertanten in der Position 1100 gefunden wurden, könnten später noch andere gefunden werden, auch welche, die außerhalb des Epitopes liegen. (Blondel et al. 1986)



Für Polioviren wurde eine ganze Reihe zusammengesetzter Epitope beschrieben. Ein Epitop an der 3er-Achse kann als Epitop der Quartärstruktur, Neotop, bezeichnet werden, weil es erst entsteht, wenn Pentamere zum Polioviruspartikel zusammengelagert werden (Rombaut et al. 1990, Wiegers & Dernick 1992).

Ein interessanter Ak ist auch 7J6 (Uhlig et al. 1990), der sowohl PV Typ 1 als auch Typ 2 neutralisieren kann. Er entstand nach Infektion von Mäusen mit MEF-1 (PV2-Stamm). Mutationen in neutralisationsresistenten Varianten gegen diesen Ak zeigen, daß Regionen zwischen VP2 239 bis 245 und VP3 195 bis 207 am Epitop des Ak beteiligt sind.

AS 1103-1115 von PV1 rufen als Peptid in Mäusen eine T-Zell-Antwort hervor. Koppelt man dieses T-Zell-Epitop nur an ein Peptid des Neutralisationsepitops "C3" (AS1086-1102) so entwickeln die Mäuse neutralisierende Ak gegen ganze Polioviren. AS 1103-1115 ist das dominante T-Zell-Epitop von VP1. Immunisiert man Mäuse mit PV1, so werden spezifische CD4<sup>+</sup>-Zellen vermehrt. Auch bei anderen Viren werden dicht nebeneinander liegende B- und T-Epitope gefunden. Das könnte bedeuten, daß die Immundominanz des B-Zell-Epitops abhängt von der Anwesenheit eines starken T-Zell-Epitops in der Nachbarschaft. Die Aktivität des T-Zell-Epitops seinerseits ist unabhängig vom B-Zell-Epitop. Im Kaninchen ergaben die Peptide 1082-1116 und 1093-1115 hohe Neutralisationstiter. (Leclerc et al. 1991)

Die Immunreaktion von Mäusen ist stark von der Art der Verabreichung des Antigens abhängig. Der Schutz vor einer Krankheit kann auch vorhanden sein, wenn keine meßbaren Antikörper vorhanden sind. (Katrak et al. 1991) In der Maus entstehen nach PV-Infektion durch verschiedene PV-Typen Kreuzreaktionen. Die Kreuzreaktionen bei der Bildung von Antikörpern betreffen:

Infektionstyp	Kreuzreaktionstyp
1	2
2	1 und 3
3	2

Zwischen den Typen 1 und 3 werden keine kreuzreagierenden Ak gefunden.

Auch die T-Zell-Antwort der Maus ergibt Kreuzreaktionen:

Infektionstyp	Kreuzreaktionstyp
1	2 und 3
2	1 und 3
3	2

(Wang et al. 1989)

Polioviren können schwach auch durch bivalente Fab-Fragmente neutralisiert werden; bei Pepsinspaltung der Fab-Fragmente zu monomeren Fab-Armen gewinnen die Viren ihre Infektiosität zurück. Wenige Antikörper verhindern die Aufnahme von Polioviren in die Zelle nicht. In HeLa-

Zellen war ihre Aufnahme sogar erhöht. Weder irreversible Denaturierung des Antigens noch die Vermittlung von Unfähigkeit zu adsorbieren sind die einzigen Mechanismen der Neutralisation. Die Viren scheinen entweder falsch oder gar nicht ihre Hülle zu verlieren. (Mandel 1979, McCullough 1986) Mit IgG neutralisiertes Influenzavirus verliert seine Lipidhülle, akkumuliert im Kern und wird nicht transkribiert. Sein Genom ist mit Ak stabiler, da die Neutralisation durch Versagen des zweiten Enthüllens (uncoating) des Kerns (core) das Genom vor RNase schützt. (Dimmock 1987) Auch PV-Kapside könnten so stabilisiert werden. Neutralisierende Ak oder bivalent bindende Chemikalien stabilisieren PV vor Enthüllen in hypotonem Puffer bei 37°C. In beiden Fällen werden die Viren trotzdem von HeLa-Zellen aufgenommen und können aus ihnen wieder isoliert werden. Nach Spalten der Ak oder Reduzierung der Chemikalien sind die Polioviren wieder infektiös. (Wetz 1993) D.h., daß mit Antikörpern bzw. bivalent bindenden Chemikalien nur solange eine "Neutralisation" erreicht wird, wie die intrazelluläre Replikation gehemmt wird. Die Funktion wird gehemmt, während die Struktur erhalten bleibt. Erst wenn durch zellinduzierte Abbauvorgänge die virale RNS so geschädigt ist, daß keine Virusnachkommen mehr gebildet werden können, sind die Virionen wirklich neutralisiert. "Monoklonale Antikörper alleine können nicht als ein *in vivo* schützendes Agens betrachtet werden". (McCullough 1986) Beim Influenzavirus neutralisiert nur etwa jeder fünfzigste Ak, weil nur 20 der 980 gebundenen Virusfortsätze mit dem Kern verbunden sind. (Dimmock 1987) Ob es bei PV ähnliche für die Neutralisation wichtige Bindungsstellen gibt, ist unbekannt; bei der Infektion könnte jedoch eine gewisse Ungleichheit der Untereinheiten durch VP0 oder die RNS gegeben sein.

Selbst wenn die Poliopartikel schon an die Zelle gebunden sind, können einige Ak sie noch neutralisieren (Vrijzen et al. 1993).

Neutralisierende Antikörper setzen auf irgendeine Art und Weise die Infektiosität von Polioviren herab. Dies kann 1) durch eine Veränderung der Partikel selbst geschehen, indem z.B. ein bivalent gebundener Ak ein Virus verändert (Emini et al. 1983c, Icenogle et al. 1983). 2) durch sterische Hinderung seiner Aufnahme oder auch 3) durch Verklumpen (Aggregation) der Viruspartikel (Brioen et al. 1983). Verschiedene mAk aggregieren PV verschieden stark (Taniguchi & Urasawa 1987). Die Bildung von PV-Dimeren, -Trimeren und höheren -Polymeren ist mit der Abnahme der Infektiosität korreliert. (Brioen et al. 1983) Einige mAk können Monomere nicht bivalent binden; andere sollen bivalent neutralisieren (Wetz et al. 1986). Die Größe der Aggregate wird vom Ak/ Virus-Verhältnis bestimmt. Schon bei 0,7 Ak/Virus treten Aggregate auf. (Thomas et al. 1985) Statistisch müßte bei gleicher Ak- und Viruskonzentration die Infektion um 37% reduziert sein. Es zeigte sich aber, daß mehr als ein Ak pro Viruspartikel zur Neutralisation durch die meisten mAk notwendig ist. (Icenogle et al. 1983) Schon diese Überlegungen schließen einen von Mandel (1976) vorgeschlagenen "One Hit"- oder "Hit-and-Run"-Mechanismus, der das Virion schädigt, aus oder zeigen, daß dieser nicht die *in vivo* gebräuchlichste Form der Neutralisation sein kann. Brioen et al. (1985) zeigten, daß solch eine enzymähnliche Neutralisation eventuell bei sehr niedrigen, wahrscheinlich unphysiologischen Ionenstärken möglich sein könnte. Oft scheinen ein bis wenige mAk für die Neutralisation auszureichen. Mit Papain, pH2 oder Frieren und Tauen in Gegenwart zweiwertiger Ionen (Mandel 1973) wird die Infektiosität aus Aggregaten zurückgewonnen. Anschließende Zugabe von Anti-Immunglobulin-Antikörpern führt zur Reneutralisation. (Thomas et al. 1985) Bei sehr vielen Antikörpern

pro Virion erhält man auch bei PV, der Heidelbergerkurve entsprechend, weniger Aggregate; dennoch bleiben die Polioviren neutralisiert. Bei physiologischen Konzentrationen erscheint die Aggregation der Neutralisation proportional (Thomas et al. 1986). Die spontane Aggregation von PV ohne Ak ist abhängig von der Salzkonzentration. Polioviren aggregieren in destilliertem Wasser und in sauren isotonen Puffern. Es ist jedoch bei solchen Versuchen zu beachten, daß die Aggregation im Sauren in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  eventuell erst nach Stunden verspätet eintritt. (Floyd & Sharp 1978a) Aggregation von Polioviren hängt von Zeit, Temperatur und Partikelkonzentration ab, die in Versuchen konstant gehalten werden müssen (Floyd & Sharp 1978b).

Es wird die Änderung des isoelektrischen Punktes von PV nach Zugabe von Antikörpern diskutiert (Emini et al. 1983b, Mandel 1976). Danach soll die A-Form von PV bei pH4,5 in eine stabile B-Form übergehen (Rueckert 1976). Die Ergebnisse sind jedoch sehr widersprüchlich. Eine Abhängigkeit der Infektiosität vom isoelektrischen Punkt konnte nicht bestätigt werden (Brioen et al. 1987).

Es wäre deshalb sehr wichtig zu wissen, ob Polioviren sich bei der Aggregation verändern. Die RNS von Picornaviren ist *in situ* nicht so hypochrom wie in Lösung, was den formgebenden Einfluß des Proteins auf die RNS-Struktur betont (Frisby et al. 1977). Einflüsse von Proteinen auf die NS-Struktur anderer Viren sind bekannt, z.B. wird die einsträngige DNS von Adenovirus von dessen Protein gefaltet (van Amerongen et al. 1987). Innerhalb des Viruspartikels ist die PV-RNS hoch geordnet, wie ihre Hyperchromizität bei Dissoziation der Partikel zeigt (Drzeniek 1975). Grobe Strukturänderungen des Proteins sollten also an der Änderung der Absorption von Protein und RNS (Revzin et al. 1973) erkennbar sein. Der erste experimentelle Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Aggregation von Polioviren und den dabei gefundenen Veränderungen in Lichtstreuung und Absorption.

Neutralisierende Antikörper sind eine Untergruppe der bindenden Antikörper, deren Aufgaben z.T. in noch unbekanntenen Regulationen des Immunsystems liegen. Wichtig ist auf jeden Fall die Aufnahmeregulation von Partikeln auf verschiedenen Wegen in die Zelle. Die Art der Aufnahme kann z.B. über Infektiosität eines PV oder seinen Abbau entscheiden. Nicht neutralisierende Ak werden bisher als weniger spezifisch betrachtet., weil solche Ak z.B. mit allen 3 PV-Typen reagieren. Es ist eine offene Frage, mit welchen AS Ak reagieren und ob es Unterschiede in der Reaktion von neutralisierenden und nicht neutralisierenden Antikörpern gibt. Die Versuche dieser Arbeit sollen Auskunft über die Reaktionen verschiedener Ak geben. Es wurden die Reaktionen verschiedener Seren und mAk gegen tryptische Peptide des VP2 von PV untersucht.

## 2. Einleitung zum experimentellen Teil

Sehr verschiedene Viren weisen oft in ihrer Struktur oder Funktion überraschende Ähnlichkeiten auf. Deshalb ist es wichtig, gut erforschte Viren wie Polioviren noch besser zu verstehen. Die Ergebnisse können dann andere unbekanntere Viren erklären helfen.

### 2.1. Ist Neutralisation von Polioviren Strukturänderung der Viren oder Aggregation?

Es ist erstaunlich, daß so grundlegende Dinge wie die Neutralisation von Polioviren noch nicht endgültig geklärt sind. Diese Arbeit soll zeigen, ob Polioviren in Aggregaten, durch sauren pH oder Serumzugabe, verändert sind oder nicht. Änderungen der optischen Dichte (OD) der Viruspartikel verraten große, strukturelle Verschiebungen, besonders der RNS. Zur genauen Bestimmung der Absorption ist es notwendig, die gemessene OD von der Streuung der Partikel zu trennen.

Schon 1957 wurde von Engländer und Epstein (270) eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, in Virussuspensionen die wirkliche Absorption von der Streuung zu trennen; wahrscheinlich geriet diese Methode in Vergessenheit, weil der Rechenaufwand sehr groß war. Die Lichtstreuungen verschiedener Partikel unterscheiden sich sehr, z.B. Stäbchen von Kugeln, Monomere von Polymeren in Lösung (Doty & Steiner 1950, Pangonis et al. 1957). Durch doppellogarithmische Darstellung im Bereich von 437-546 nm als reiner Kontrolle der Streukurve können diese Probleme jedoch gelöst werden, weil für jede Kurve die individuelle Streuung errechnet werden kann. Durch die Bestimmung der Streuung können nun Protein- und NS-Konzentrationen genauer, ohne Streuung, bestimmt werden (Arnold & Jung 1986). Die Streuung  $E$  ändert sich mit der Potenz  $a$  (jenach Partikelgröße 2 oder 4) und kann verschiedene Steigungen  $b$  haben. Hieraus ergibt sich eine Hyperbel.

$$E = b \times \lambda^a$$

Durch Logarithmierung beider Seiten ergibt sich daraus eine lineare Gleichung, die in der Region des Spektrums ohne Absorption bestimmt werden kann.

$$\log E = \log b + a \log \lambda$$

Die Untersuchungen sollten klären, ob sich die Struktur im Inneren der Viren durch die Antikörper verändert, oder ob die Partikel nur aggregiert werden; d.h. ob die Absorption der RNS bei 260 nm verändert wird oder ob nur die Streuung erhöht wird. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit käufliche Programme verwendet, sowie ein selbsterstelltes (Bergmann & Bergmann 1988), siehe Anhang 1, das die Methode von Engländer und Epstein für den Computer bei allen Wellenlängen anwendbar macht. So konnte die Frage geklärt werden, ob Bindung von Antikörpern wirklich nur Pseudoneutralisation durch Verklumpen hervorruft.

### 2.2. Wo liegen die antigenen Regionen von Polioviruspartikeln?

Über Computerprogramme hergestellte Listen geben einen Überblick über die bei PV bislang eindeutig festgelegten antigenen AS. Zur Suche nach weiteren antigenen Regionen wurden

Antigenitäts- und Strukturvorhersageprogramme verwendet, die auch anderen bei der Bestätigung von oder Suche nach antigenen Regionen bei PV helfen mögen.

Mit Hilfe eines strukturdarstellenden Programms und den PV-Strukturdaten aus der Brookhaven Proteindatenbank konnten die antigenen Aminosäuren auf der Oberfläche von Poliovirus dargestellt werden. Auch diese Abbildungen erlauben eine konzentriertere Suche nach weiteren antigenen Aminosäuren.

### **2.3. Wie sieht eine antigene Region von Polioviruspartikeln aus?**

Zur näheren Charakterisierung der Struktur von Epitopen wurde die Antigenität von Peptiden des VP2 von PV1 im Dot-Test mit Seren und monoklonalen Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer Reihe von Computerprogrammen ausgewertet. So wurde versucht, die durch die empfindlichen Tests mit erfaßten Kreuzreaktionen (Sibbald & White 1987) auszuschließen und stark antigene Regionen zu erkennen.

VP2 besitzt eine stark immunogene Schlaufe zwischen  $\beta$ -Strang E und F. Das Peptid 2162 - 2173, an Träger gebunden, prägt Kaninchen für eine Immunantwort mit neutralisierenden Ak gegen diese Region nach Impfung mit Mahoneyviren (PV1-Stamm)(Emini et al. 1984b). Es wurde in dieser Arbeit versucht, eine Erklärung für die starke Reaktion dieser Region zu finden und eine Einordnung neutralisierender und nichtneutralisierender Antikörper nach der Art der erkannten Epitope vorzunehmen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Puffer

**PBS** (phosphate buffered saline, 0,15 M NaCl):

Lösung A :	3 M NaCl	175,32 g/l aqua bidest.
Lösung B :	0,5 M Phosphatpuffer	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	73,15 g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	12,28 g
		ad 1 l aqua bidest.

Mischung pro 1 aqua bidest.: 50 ml Lösung A + 30 ml Lösung B

Alle Lösungen werden autoklaviert.

**Cacodylatpuffer :**

99 mM NaCl	5,742 g
1 mM Na-Cacodylat	214 mg
0,2 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	40,7 mg

pH7 durch HCl einstellen und mit aqua bidest auf 1l auffüllen  
autoklavieren

bei 4°C aufheben

vor erstem Gebrauch pH bei 25°C kontrollieren

**MES** (20mM Morpholinoäthansulfonsäure):

Morpholinoäthansulfonsäure 0,39 g/100 ml

pH 6.6

Nach Bedarf wurden diesem Puffer verschiedene Konzentrationen an  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{MgCl}_2$  zugefügt.

(Good et al. 1966)

Die hier angeführten Puffer sind Standardpuffer, die für die Messungen der optischen Dichte vielfach verwendet wurden. Alle übrigen Puffer sind bei der betreffenden Methode aufgeführt.

### 3.2. Viren

Poliovirus Typ 1, Mahoney :

Pool 46,	$1,7 \times 10^{12}$ PBE/ml,	1,33 mg Virus/ml
Pool 47,	$7 \times 10^{11}$ PBE/ml,	1,94 mg Virus/ml
Pool 58,	$3 \times 10^{12}$ PBE/ml,	3,57 mg Virus/ml

Poliovirus Typ 2, MEF<sub>1</sub> :

Pool 122,	$7 \times 10^{11}$ PBE/ml,	3,40 mg Virus/ml
-----------	----------------------------	------------------

Poliovirus Typ 3, 1658 :

Pool 94,	$1,6 \times 10^{12}$ PBE/ml,	6,30 mg Virus/ml
----------	------------------------------	------------------

Für die Aufarbeitung von Peptiden wurden ausschließlich Mahoneyviren verwendet.

### 3.3. Seren und Antikörper

"+" bedeutet Serumgewinnung nach dem Töten des Tieres.

#### 3.3.1. Seren und Antikörper für Aggregationsversuche:

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 :

Kaninchenserum	155 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg 50% = 4,5
"	63 + gegen VP1, negatives Kontrollserum
"	64 + gegen VP2, " "
"	65 + gegen VP3, Nt-Titer lg 50% = 1

Ascites 19.9, monoklonaler IgM, MNt-Titer 3,5

Ascites 19.2, monoklonaler IgG, MNt-Titer 4,5

Der Ascites wurde in Mäusen hergestellt.

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 2 :

Kaninchenserum 54 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50% etwa 5

Hybridoma-Überstand 7J3 monoklonaler IgM gegen Typ 2, Maus, Nt-Titer lg50% >4

Hybridoma-Überstand 7J6 monoklonaler IgG gegen Typ 2, Maus, Nt-Titer lg50% = 3

Die Hybridomazellen stammten aus der Fusion von Mausplasmazytomzellen mit Mausmilzzellen.

Serum gegen Typ 3 :

Mausserum 107 + gegen ganzes Virus, MNt lg Verd. = 3

### 3.3.2. Seren und Antikörper für Peptidtests:

Seren und Antikörper gegen Poliovirus Typ 1:

Kanincheserum	28 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5
"	42 + gegen leere Kapside, Nt-Titer lg50%=4
"	43 + gegen leere Kapside, Nt-Titer lg50%=3,5
"	44 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5
"	45 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=5,5
"	153-157 + gegen ganzes Virus in 1:10 Verdünnungen, Nt-Titer lg50%= 5,5; 5,2; 5,3; 4,3; 2,1

Ascites monoklonaler Antikörper der Maus gegen VP2 von PV1:

Ak gegen bekannte Sequenzen:	Epitop nach K. Wiegers (persönliche Mitteilung)	Bindung (RIP)
IgG(1) 27.18	(AS 1-153)	2,1
IgG(1) 27.77	(AS 164-170)	3,6
IgG(1) 34.3	(AS 164-170)	2,2
Ak gegen unbekannte Sequenzen:		
IgG(1) 10.6		2,0
IgG(1) 27.9		3,5
IgG(1) 27.33A		1,8
IgG(1) 27.53		1,0
IgM 45.2		5,0

Nur mAk 34.3 neutralisierte; 27.77 und 34.3 binden Virionen; 27.53 bindet als einziger keine H-Partikel. Die Bindung der Ak an Viren wurde durch Radioimmunpräzipitation (RIP) bestimmt (Wiegers et al. 1990).

Serum gegen Poliovirus Typ 2:

Kanincheserum	54 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50% etwa 5
---------------	--

Serum gegen Poliovirus Typ 3:

Kanincheserum	55 + gegen ganzes Virus, Nt-Titer lg50%=4
---------------	---

### 3.4. Methoden

Ein großer Teil dieser Arbeit waren Verbesserungen der Methoden. Um den Umfang des Ergebnisteils nicht durch Methodisches zu sprengen, werden in kurzen Kommentaren zu den Versuchen nur die Ergebnisse der Veränderungen erwähnt.



### 3.4.1. Virusproduktion und Virusaufarbeitung

Die Polioviren wurden in HeLa-Zellen vermehrt und in CsCl-Gradienten gereinigt nach einer Methode von Drzeniek & Bilello (1974). Die Aufarbeitung der Viren erfolgte nach den in unserem Labor üblichen Methoden. (Tessmer & Dernick 1990, Harms 1988)

### 3.4.2. Aufarbeitung von Seren und Antikörpern

Antiseren wurden nach Dernick et al. (1983) hergestellt. Hybridomaüberstände wurden nach Uhlig et al. (1983) gewonnen. Ascites wurde nach Wiegers et al. (1986) produziert.

### 3.4.3. Plaque-Test

Die virale Neutralisation wurde mit Plaque-Tests nach Dernick et al. (1983) getestet.

### 3.4.4. pH - Titration

10-60  $\mu$ l große Proben von Poliovirus in PBS mit 3 M CsCl werden in 1 ml bzw 0,5 ml PBS, Cacodylatpuffer oder MES so verdünnt, daß die Optische Dichte (OD) bei 260 nm zwischen 0,4 und 0,8 liegt. Als Kontrolle dient der jeweilige Puffer ohne Virus. Der pH-Wert der Probe wird gemessen. (Koch 1984, Hopkins & Sinsheimer 1955, Müri 1987) In einer thermostatisierten Küvette (Eigenbau) wird die Probe auf 25°C gebracht und ein Spektrum der Probe zwischen 210 und 610 nm aufgenommen. Als Fotometer dient ein Ultrospec 4050 (LKB), dem ein Apple //e angeschlossen ist mit Software von LKB, die für die Thermoküvette und die pH-Titration bearbeitet wurde. Das aufgenommene Spektrum wird gespeichert und wahlweise ausgedruckt. Danach wird die gleiche Probe mit 0,05 - 0,5 n HCl angesäuert und ein neues Spektrum aufgenommen. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis keine Säuretitration mehr erwünscht ist. Ist der letzte pH-Wert nicht so niedrig gewählt, daß die Viren zerstört sind, läßt sich an dieser Stelle eine Basentitration mit 0,1 - 0,5 n NaOH anschließen, die wiederum in kleinen Schritten erfolgt.

### 3.4.5. Spektrenauswertung: Trennung von Streuung und Absorption

Die gespeicherten Spektren werden für die Weiterverarbeitung zum Teil gekürzt. Ein selbstgeschriebenes Spektrenauswertungsprogramm (listing in Anhang 1) bereitet die Spektren für eine Auswertung nach Englander und Epstein vor.

Das Maximum der Virusabsorption liegt bei 260 nm. Im sichtbaren Licht absorbieren die Viren nicht. Abb.3.1 zeigt das Spektrum einer Viruslösung bei pH 7 ohne Virusaggregation.

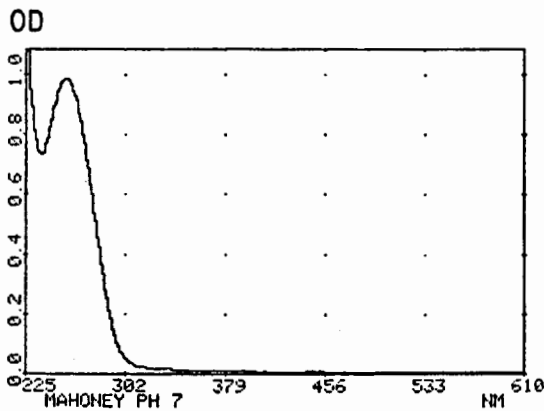


Abb.3.1 Spektrum einer Virus-suspension (Mahoney, Typ 1) bei pH 7

Der theoretische Verlauf einer Streulichtkurve in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist eine Hyperbel mit hohen Werten an Absorption im UV-Bereich und Werten, die sich der X-Achse (nm - Achse) nähern, je größer die Wellenlänge ist. Die Streuungsextinktion  $E$  hängt von der Wellenlänge  $W$  ab, die durch die Partikelgröße beeinflusst wird. Nach dem Rayleigh-Gesetz ist die Intensität des Streulichtes proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge. Da dieses Gesetz aber nur für bestimmte Partikelgrößen stimmt, wurde es von Engländer und Epstein durch die allgemeinere Form der Potenz  $a$  der Wellenlänge und die Konstante  $b$  erweitert:

$$E = b \times W^a$$

Logarithmiert man diese Gleichung mit dem Logarithmus zur Basis 10, so erhält man eine Geradengleichung:

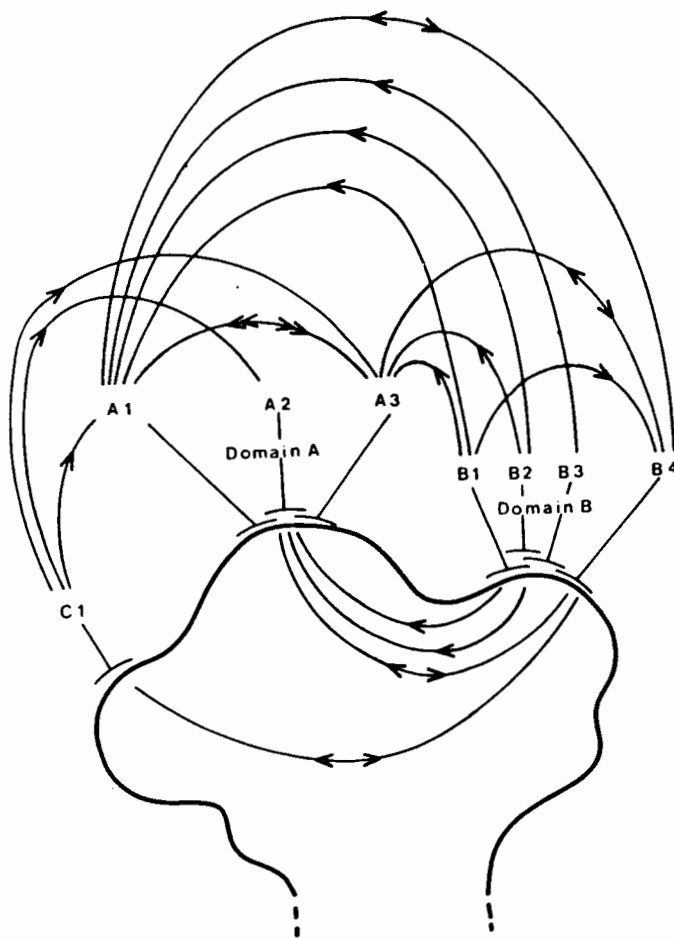
$$\lg E = \lg b + a \lg W$$

Da im sichtbaren Bereich keine Virusabsorption vorliegt, ist die Gerade, die allein durch Streuung entsteht, berechenbar. Zieht man die Werte dieser Geradengleichung von einem Virusspektrum mit Streuung ab, so erhält man das reine Absorptionsspektrum der Viruslösung unabhängig von der Größe der zur Zeit in der Lösung vorhandenen Partikel. (Abb.3.2)

Der größte Teil der Absorption einer Viruslösung entsteht durch die Basen der Nukleinsäure im Virusinneren. Etwa 95% einer optischen Dichte bei 260 nm entstehen durch die virale RNA, etwa 82% bei 280 nm. Diese Werte gelten aber nur unter Standardbedingungen, z.B. Poliovirus in PBS bei pH 7. Wird die RNA durch Hitze, pH oder andere Bedingungen denaturiert, so erhöht sich ihre optische Dichte durch das Auseinanderfallen der Basen (Aufheben des "basestackings"). Aus der Änderung der optischen Dichte kann also auf eine Änderung der RNA-Struktur (Konformation) geschlossen werden.

Peptide erklärt einerseits, warum ein Peptid verschiedene Gruppen von Immunzellen ansprechen kann (Es paßt sich dem MHC und den mit ihm wirkenden Komponenten an.), aber auch andererseits nur wenige MHC-Moleküle in einem Individuum nötig sind, um eine riesige Anzahl verschiedener, fremder Peptide zu binden (Verschiedene Peptide können von einem MHC-Molekül erkannt werden.). (Vajda et al. 1990)

Es gibt sowohl den Fall, daß ein Ak die Wirkung eines zweiten verstärkt, als auch, daß zwei Ak sich gegenseitig verstärken. Nichtneutralisierende Ak verstärken bei einigen von Mücken übertragenen Viren die Wirkung neutralisierender Ak z.B. zumindest um das 3- bis 10-Fache (Heinz 1986). Die Abbildung zeigt die äußerst komplizierten Abhängigkeiten der kooperativen Effekte von Antikörpern. Beim Lysozym sind die bislang gefundenen Antikörperwirkungen gegen verschiedene Regionen des Moleküls immer kooperativ, nicht reziprok. Wahrscheinlich wird die Effektivität eines polyklonalen Serums sehr stark durch kooperative Interaktionen zwischen Antikörpern gegen verschiedene Epitope bestimmt. (Heinz 1986)



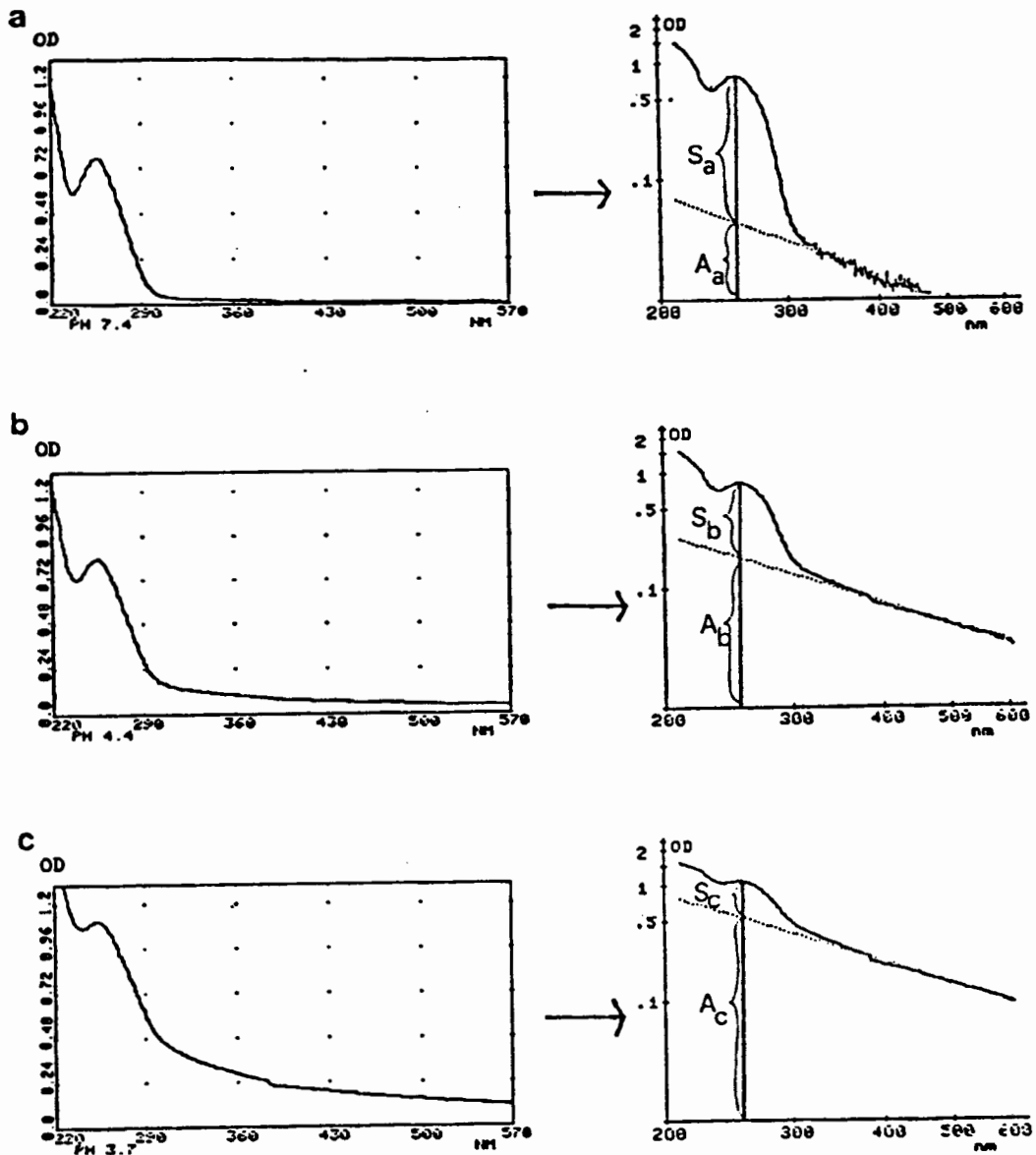


Abb.3.2 Graphische Darstellung der Auftrennung von Aggregation und Absorption: a bei pH 7,4, b bei pH 4,4 und c bei pH 3,7. Die jeweils linke Darstellung zeigt das registrierte Spektrum. Die rechte Darstellung enthält dieselben Werte in doppelt logarithmischer Darstellung. Für Wellenlängen >350 nm ergibt sich in dieser Darstellung eine Gerade, die in den UV-Bereich verlängert ist. Am Schnittpunkt dieser Gerade mit der Senkrechten bei 260 nm lassen sich der Aggregationsanteil A und der Absorptionsanteil S ablesen.  $A_a < A_b < A_c$ ,  $S_a > S_b > S_c$ .

### 3.4.6. Serumtitration

Proben der 3 Poliovirus Typen werden so eingestellt, daß sich in 0,5 ml PBS eine optische Dichte bei 260 nm zwischen 0,3 und 0,8 ergibt. Als Referenz dient eine zweite Küvette mit demselben Volumen an PBS. Die Küvetten werden bei 25°C thermostatisiert. Auf dieselbe Art wie bei der pH-Titration werden Spektren zwischen 240 und 500 nm aufgenommen.

In beide Küvetten wird nun die gleiche Menge an Serum, Hybridomaüberstand oder Ascites pipettiert und je ein Spektrum gegen die Referenzküvette aufgenommen. Der Computer verarbeitet die Daten so, daß die Daten der "Serumkontrolle" von denen der "Serum-Virus-Probe" abgezogen werden. Die OD der Viren und ihrer Aggregation ( Petersen 1986a,b) bleiben übrig und werden gespeichert. Nach und nach werden steigende Mengen an Serum zugegeben und weitere Spektren aufgenommen.

Die Auswertung nach Englander und Epstein erfolgt analog zur pH-Titration. Die OD<sub>260</sub> der Aggregation durch Antikörper wird berechnet. Die Differenz zur Gesamt-OD ergibt auch hier den Anteil, der durch die Struktur der viralen RNA hervorgerufen wird.

### 3.4.7. Auftrennung der Poliovirus-Strukturproteine

Die Auftrennung der viralen Strukturproteine erfolgte durch HPLC in Ameisensäure (Heukeshoven & Dernick 1982). Nach dieser Methode liegen die Proteine in Lösung vor und können zur Verwendung verschiedener Puffer eingedampft werden. Isolierungsschritte wie nach der SDS-PAGE (Dernick & Heukeshoven 1986, Tessmer & Dernick 1989) entfallen. Andere Gruppen haben die HPLC-Methode variiert (Itoh et al. 1991).

In meiner Arbeit habe ich mich weitgehend nach dem Protokoll von Harms (1988) gerichtet, deshalb seien hier nur die Abweichungen angeführt.

Zur Isolierung der Strukturproteine werden PV-Partikel TCA-gefällt. Diese Methode wurde gegenüber dem Protokoll von Harms (1988) wie folgt abgeändert: In 3M CsCl bei -20°C eingefrorene Viruspartikel werden aufgetaut; TCA wird bis zu 10% Endkonzentration hinzugefügt; das Ganze wird bei 4°C 30min inkubiert. Der Niederschlag wird 5min bei 12 000 Upm abzentrifugiert und dann mit Aceton gewaschen. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der Niederschlag wird wieder in Aceton aufgenommen und durch Rütteln und Ultraschall resuspendiert. Zentrifugation und Abpipettieren des Überstandes werden wiederholt. Danach wird das Sediment zum Trocknen liegen gelassen. Anschließend wird das Sediment in 6M Guanidinhydrochlorid in 0.2M Tris-HCl-Puffer pH8,3 mit 0,5% Dithioerythrit (DTE) aufgenommen und 30min bei 37°C inkubiert.

Die Trennung der VPs erfolgte auf einer C-18-Säule in 60% Ameisensäure mit einem Acetonitrilgradienten von 0-30% bei 100 bar. Die Detektion erfolgte bei 275nm. (Heukeshoven & Dernick 1985, Heukeshoven & Dernick 1982, Heukeshoven & Dernick 1983, Heukeshoven & Dernick 1988)

### 3.4.8. Herstellung tryptischer Peptide von VP2

Der größte Teil der Vorversuche wurde aus Kostengründen mit tryptischen Peptiden des Lysozymes durchgeführt, wie bei Harms (1988) beschrieben. Die Sequenz dieser Peptide ist bekannt.

Alkylierung durch Vinylpyridin: Die tryptische Spaltung von Proteinen wird durch freie SH-Gruppen gehemmt, deshalb wurde VP2 vor der Spaltung alkyliert. Dazu wurde das hydrophobe Polypeptid in 1% SDS in 0,2M Tris-HCl mit 0,5% DTE gelöst. Die Lösung wurde 5min gekocht und anschließend 30min bei Raumtemperatur stehengelassen. Zu 200µl VP2-Lösung wurden 10µl einer 8%-igen Vinylpyridinlösung in Isopropanol zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter TCA-Fällung wie oben wurde das Sediment für die Spaltung in einem Ammoniumacetatpuffer aufgenommen, der durch Mischen von 0,1N Essigsäure (99%) und 0,1N Ammoniaklösung (25%) bis zu einem pH von 8 entstand.

In dieser Lösung wurde die Trypsinspaltung wie bei Harms (1988) durchgeführt. Auch die Auftrennung der Peptide erfolgte nach diesem Protokoll. Zum Auftragen wurde die Peptidlösung in 1% TFA überführt. (Heukeshoven & Dernick 1986-1988, Heukeshoven & Dernick 1989, Heukeshoven & Dernick 1982, Hancock et al. 1978)

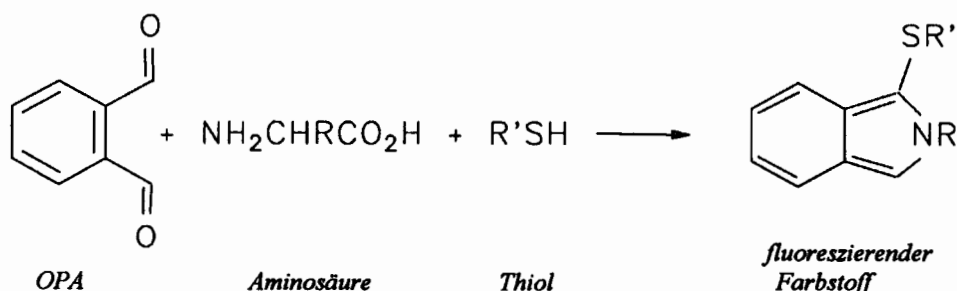
### 3.4.9. Identifizierung der VP2-Peptide

Nach der Trennung wurden die VP2-Peptide nicht durch Sequenzierung (Wittmann-Liebhold 1989, Bauw et al. 1989), sondern durch quantitative Bestimmung der AS durch Herrn Heukeshoven bestimmt (Dernick & Heukeshoven 1989)(Seite 207-238). Die tryptischen Peptide von VP2 (PV1) sind:

Nr.	Anzahl		Sequenz
	AS	Position	
1	12	1- 12	SPNIEACGYSDR
2	25	13- 37	VLQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGR
3	6	38- 43	WPEYLR
4	19	44- 62	DSEANPVDQPTEPDVAACR
5	11	63- 73	FYTLDTVSWTK
6	3	74- 76	ESR
7	5	77- 81	GWWWK
8	6	82- 87	LPDALR
9	16	88- 103	DMGLFGQNMYYHYLGR
10	13	104- 116	SGYTVHVQCNAASK
11	37	117- 153	FHQGALGVFAVPEMCLAGDSNTTTMHTSYQANPGEK
12	19	154- 172	GGTFTGTFTPDNNQTSPAR
	1	173	R
13	28	174- 201	FCPVDYLLGNGTLLGNAFVFPHQIINLR
14	22	202- 223	TNNCATLVLPYVNSLSIDSMVK
15	41	224- 264	HNNWGIAILPLAPLNFASSESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLR
16	6	265- 270	NITLPR
17	2	271- 272	LQ

### 3.4.10. Bestimmung kleinster Aminosäuremengen durch OPA-Mercaptopropionsäure

Da die gängigen Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Golddirektfärbung,  $OD_{280nm}$ , BCA- $Na_2$ , Amidoschwarz, India Ink, Silberfärbung und Fluorescamin) bei unseren geringen Mengen versagten (Damerval et al. 1987, Somerville & Wang 1981, Sutherland & Skerritt 1986, Smith et al. 1985), wurde eine sehr empfindliche Fluoreszenzmethode mit OPA (Ortho-Phthaldialdehyd) ausgearbeitet (Benson & Hare 1975, Roth 1971, Ishida et al. 1981, Abecassis et al. 1985, Qureshi et al. 1984, Cooper et al. 1984, Jones et al. 1981, Froehlich 1989).



Zur Bestimmung der Peptidmenge in einzelnen Tropfen von 1-2  $\mu\text{l}$  auf NC, wie sie in den immunologischen Reaktionen eingesetzt werden konnten, wurde die AS-Konzentration der Peptidlösungen gemessen.

Alle Flaschen, Lösungen und Geräte mußten staubfrei sein!

Dies setzte die Verwendung sauberer HCl (Schwabe & Catlin 1974) zur AS-Hydrolyse sowie das Waschen sämtlicher Gefäße mit 6N HCl, dreimal  $H_2O$  (Millipore, MilliQ-Anlage) und Methanol voraus. Zeigte eine Lösung schon vor Zugabe der Probe Fluoreszenz, wurde sie bzw. die ganze Charge verworfen. Bei der Verwendung des Milliporewassers mußte auf den Zustand der Anlage geachtet werden, ein anschließendes Filtrieren störte.

OPA-Stammlösung:

- 50 mg OPA (Ortho-Phthaldialdehyd)
- 4 ml Methanol
- 0,5 ml 1M K-Borat pH 10,4
- 50  $\mu\text{l}$  3-Mercaptopropionsäure

Diese Mischung ist bei 4°C eine Woche haltbar, sollte am ersten Tag wegen geringer, abklingender Eigenfluoreszenz durch minimale AS-Konzentrationen in der Lösung selbst noch nicht verwendet werden (Jones et al. 1981).

OPA-Reaktion:

Alle Handgriffe müssen im Dunklen ausgeführt werden, um Eigenfluoreszenz zu vermeiden.

1) In Eppendorfhütchen aus fabrikneuer Packung werden je 1 Teil OPA-Stammlösung und 2

Teile Boratpuffer, wie in der Stammlösung, abgefüllt.

2) Die Eppendorfhütchen werden für den Transport zum Fluoreszenzfotometer in der Dunkelkammer in schwarze Filmdosen verpackt.

3) 150µl der Verdünnung werden möglichst lichtfrei in die Küvette pipettiert und die Fluoreszenz kontrolliert.

4) 1µl Probe wird zugegeben.

5) Nach genau 3min wird die Fluoreszenz der Probe abgelesen.

zu OPA-Stammlösung: Das ursprüngliche Rezept enthielt Äthanol. Die Fluoreszenz in methanolischer Lösung erwies sich jedoch als wesentlich stabiler. Da die Fluoreszenz mit Mercaptoäthanol mit der Zeit sank, wurde stattdessen 3-Mercaptopropionsäure eingeführt (Godel et al. 1984). Die Fluoreszenz mit dieser Lösung steigt in den ersten 3min noch leicht an, um dann fast stabil zu bleiben über einen Zeitraum, in dem die Messungen sicher durchgeführt werden können.

zu 2: "UV-dichte" Eppendorfhütchen hielten die Wellenlängen, auf die OPA-Eigenfluoreszenz entsteht, nicht ab, deshalb wurden die Filmdosen verwendet.

zu 5: Ein Stabilisieren der Reaktion durch 0,1N Phosphatpuffer pH4, wie für das Originalrezept empfohlen, erwies sich bei der Verwendung von Mercaptopropionsäure als überflüssig.

Als Eichung der Reaktion wurden Kurven mit frisch verdünnten AS-Standardlösungen (Beckmann) hergestellt, mit und ohne Hydrolyse. Die Gültigkeit für Peptide wurde mit Insulin überprüft.

Die Messungen erfolgten in einem Perkin-Elmer-Fluoreszenzfotometer. Nach anfänglicher Benutzung eines ELISA-Platten-Lesers erwies sich die Verwendung von Einzelküvetten als wesentlich empfindlicher und gut reproduzierbar; z.B. wurden 160 eingewogene pMole Lysozym als 151pMole gemessen.

Die optimale Anregungsextinktion wurde bei 330nm ermittelt. Das Maximum der ausgesandten Emmission lag bei 450nm.

Die Mole der AS bzw Peptide wurden nach Abzug der Eigenfluoreszenz von den gemessenen Fluoreszenzeinheiten (FE) durch Division durch den Faktor 2,5 der Eichkurve bestimmt.

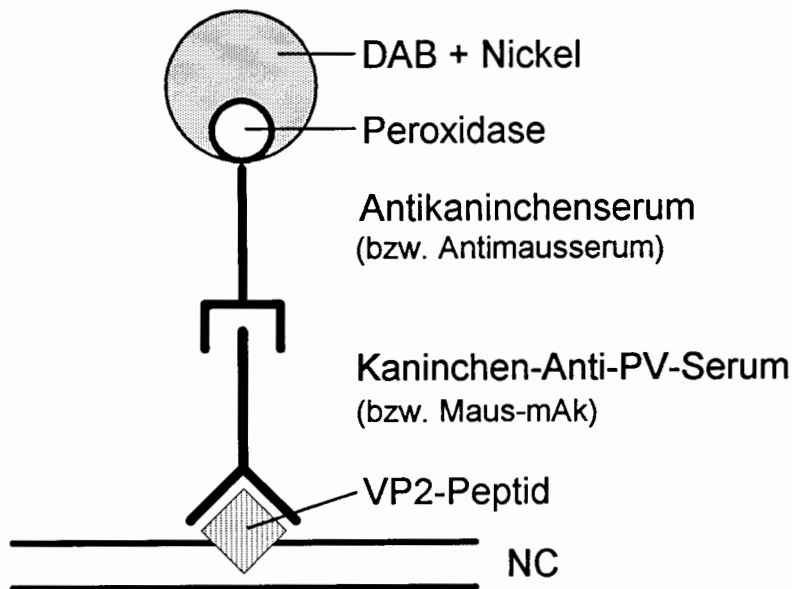
$$\text{pMole} = (\text{FE} - 70) : 2,5$$

Verdünnungen wurden extra berücksichtigt. Gute Kontrollen enthielten 70-90FE. Durch Licht entstanden leicht 110FE. Verunreinigte Proben zeigten Werte im nMol-Bereich. Unter Berücksichtigung der mit OPA reagierenden AS entsprachen die Mengen direkt bestimmter Peptide denen, die nach Hydrolyse bestimmt wurden. Die kleinste im Dot-Test verwendete Menge an Lysozympeptid war 216pmol. Sie reagierte in der Immunreaktion noch positiv. Auch die kleinste Menge Polio-VP2- Peptid, 9,4pmol T2, war positiv.



### 3.4.11. Dot-Test

Der Dot-Test dient dazu, die Antigenität kleiner Mengen von Proteinen oder Peptiden zu bestimmen, indem Tropfen von Proben auf fester Matrix gebunden und mit Antikörperlösungen inkubiert werden. Der hier verwendete Test wurde in jedem Schritt optimiert (siehe Kommentar).



- 1) Nitrozellulosestreifen (NC; 0,2µm) werden 30min bei 22°C in 0,2% BSA inkubiert.
- 2) Streifen heftig in H<sub>2</sub>O bidest abspülen.
- 3) 1h bei 22°C in 0,1% Glutaraldehyd in PBS schütteln.
- 4) NC leicht antrocknen lassen und Proben von 1-2µl auftragen.
- 5) Antrocknen lassen.
- 6) 1h bei 37°C in feuchter Kammer stehen lassen.
- 7) 1h in 1% Ethanolamin in 0,1% Tween 20 in PBS bei 22°C leicht schütteln.
- 8) 2 x waschen in PBS mit Tween (s.o.)
- 9) Inkubation mit Testserum oder monoklonalen Antikörpern (Konzentration je nach Lösung verschieden; Serum etwa 1:250, Ascites 1:100 verdünnt) in PBS mit Tween über Nacht bei 22°C
- 10) 5 x 2min in PBS mit Tween heftig schüttelnd waschen.
- 11) 2h bei 22°C in Antikaninchen- bzw. -mausserum mit Gold- oder Peroxidase-markierung leicht schüttelnd inkubieren. Verdünnung in PBS mit Tween: 1:500 für Peroxidaseseren; 1:1000, 1:2000 für Goldseren.

zu1: Die Bindung der Peptide an BSA war der Direktauftragung von Peptiden und der direkten Bindung von Peptiden an NC durch Glutaraldehyd in der Immunreaktion deutlich überlegen. Die BSA-gebundenen Peptide reagierten auch wesentlich besser als über Epoxy- oder Bisoxiranaktivierung (Porath et al. 1975) an regenerierte Zellulose gebundene Peptide. Auch die kovalente Bindung der Peptide konnte die Hintergrundfärbung nicht vermeiden helfen. - Die NC durfte nicht zu alt und der Luft ausgesetzt sein. Immobilon und andere Folien banden zwar z.T. höhere Proteinkonzentrationen, zeigten aber bei den verwendeten niedrigen Konzentrationen keinen Vorteil, sondern ergaben höhere Hintergrundfärbungen, und nicht alle der auf NC gefundenen Reaktionen wurden wiedergefunden. (Matsudaira 1987) Höhere BSA-Konzentrationen führten zu höherer Hintergrundfärbung, niedrigere zum Verschwinden einiger Reaktionen. Das Optimum lag bei 0,2% BSA. Außerdem war BSA anderen Beschichtungen, Phenylalanin, Threonin,  $\alpha$ -Amylase, Gelatine (van der Sluis et al. 1987, van der Sluis et al. 1988) und Laktalbumin, überlegen.

zu2: Das heftige Spülen mit Wasser entfernt überschüssiges BSA.

zu3: 0,1% Glutaraldehyd waren ausreichend, höhere Konzentrationen ergaben mehr Hintergrund. Formaldehydfixierung ergab einen helleren Hintergrund, einige Punkte fehlten jedoch in der Immunreaktion.

zu 4: Die deutlichsten Punkte wurden durch Probenauftrag auf leicht angetrockneter NC erzielt. Naß verliefen die Proben, mit untergelegtem Filterpapier wurden sie zu stark durchgesaugt, und Fönen konnte sie verwischen.

zu 5: Intensiveres Antrocknen, Anbacken für 30min bei 60°C konnte zumindest in meinen Händen die Reaktion nicht verbessern oder mehr Protein binden (Nachweis z.B. durch Amidoschwarz), sondern führte zu Schmutz im Hintergrund.

zu 6: Ursprünglich wurde dem Wasser der feuchten Kammer N-Ethylmorpholin zugegeben. Es erwies sich jedoch als wirkungslos und wurde deshalb weggelassen.

zu 7: Verkürzung der Inkubation in Ethanolamin ergab mehr Hintergrund, wahrscheinlich weil das freie Glutaraldehyd noch nicht abgesättigt war. Höhere Ethanolaminkonzentrationen verfärbten die NC gelb. Tris, Glycin, Lysinchlorid oder Borhydrid sowie Titration der Ethanolaminlösung auf pH 7,7 konnten die Glutaraldehydabsättigung nicht verbessern.

zu 8: 0,1% Tween 20 verhinderte eine Anfärbung des Hintergrundes. Es ist das Blockierungsmittel, das verhindert, daß noch weitere Proteine auf der NC binden. Verwendet man Blockierungsmittel mit höherem Molekulargewicht, wie Proteine, so besteht die Gefahr, daß ein Teil der Peptide überdeckt wird. Tween verhindert auch die Reaktion von Antikörpern mit der Matrix. (Mohammad & Esen 1989) SDS (Smith et al. 1989) führte genau wie höhere Tweenkonzentrationen zu weniger Hintergrund, aber auch zu weniger positiven Punkten. Triton und PEG eigneten sich nicht für die Methode. Durch BSA in allen Puffern wurde der Hintergrund verbessert, aber die Methode zu aufwendig (Hsu 1984). Kälberserum verdeckte einen Teil der positiven Punkte, Pferdeserum noch mehr; der Hintergrund blieb hell. Die Ergebnisse mit Schweineserum entsprachen denen mit Tween, aber Peptid T10<sub>Lysozym</sub> fehlte.

zu 9: Kürzere Inkubationszeiten mit dem primären Ak führten zu hellerem Hintergrund, aber auch weniger sichtbaren Reaktionen. Bei längeren Zeiten scheint Tween das BSA von der Folie zu lösen (Tovey et al. 1989).  $\text{NaN}_3$ , gegen Mikroorganismen, in längeren Inkubationen zerstört die Peroxidasereaktion.

zu 11: 2h waren die optimale Zeit zur Reaktion der sekundären Ak. Wegen der Peroxidase mußten die Streifen immer feucht gehalten werden, denn schon nach 5-10min im Trockenen ist die Peroxidaseaktivität stark verringert. Außerdem muß das Enzym frisch verdünnt werden, da es auch in Lösung im Laufe eines Tages deutlich abnimmt (Merril & Pratt 1986). Starkes Schütteln verschlechtert die Reaktion. DAB-Färbung nach Peroxidaseantikörpern ergab empfindlichere Färbungen als Phosphatasereaktionen. Man kann nicht grundsätzlich sagen, Färbung über Gold-Ak oder Phosphatase-Ak sei besser. So ist die Goldfärbung nach Moeremans et al. (1984) nur deshalb besser, weil als Vergleich das weniger sensible Peroxidasekit von Janssen Pharmaceutica verwendet wurde. Gold- und DAB-Färbung sind im großen und ganzen gleich sensibel. Das sekundäre Serum mußte in niedrigen Konzentrationen verwendet werden, um Hintergrundfärbung zu vermeiden. (Wu et al. 1989, Hyatt et al. 1988)

Zur Nachweisgrenze des Dot-Tests: Da immunbiologische Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper individuelle Reaktionen sind, die für jede einzelne Reaktion neu bestimmt werden müßten, ist eine Angabe eines allgemeinen Wertes der Nachweisgrenze unsinnig. Im folgenden sei jedoch versucht, die 4-Chloro-1-naphthol (CN)-reaktion in Abwesenheit von BSA mit der von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) mit BSA-Beschichtung zu vergleichen. Die Nachweisgrenzen sind für ganzes Lysozym (L) und Lysozympeptid 10 (T10) angegeben, in Klammern die Werte von Harms (1988).

	L	T10	L	T10
	ng	ng	pMol	nMol
-BSA/CN	3,3	36	0,23	16
+BSA/DAB	3,3 (1,1)	43 (128)	0,23 (0,8)	19 (56)

Wie die Tabelle zeigt, entsprechen sich die Methoden bis auf graduelle Unterschiede. Wichtig war jedoch, daß die Anzahl reagierender Peptide zunahm.

#### 3.4.12. DAB-Ni-Methode

Als empfindlichste Farbreaktion zum Nachweis der Ak erwies sich die DAB-Methode (3,3'Diaminobenzidin) von Gallyas (Gallyas et al. 1982, Gallyas 1988, Kobayashi & Tashima 1989, Young 1989). Diese Methode wurde wie folgt abgewandelt:

- 1) Seruminkubierte NC-Streifen 2 x gründlich in PBS mit Tween waschen
- 2) 3 x je 2min in 0.05M Tris-Puffer pH7,6 unter leichtem Schütteln waschen

DAB-Reaktionsmischung: in der angegebenen Reihenfolge zugeben

1. 7mg  $\text{NiCl}_2$
2. 9,6ml 0,05M Tris-HCl pH7,6
3. 2mg DAB in 0,4ml  $\text{H}_2\text{O}$
4. 7 $\mu$ l 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$

3) Streifen < 10min in DAB-Reaktionslösung bei 22°C inkubieren bis zur gewünschten Färbung. Vorsicht, die Reaktion ist lichtempfindlich! Dunkel halten.

4) Wiederholt mit  $\text{H}_2\text{O}$  waschen und wenn möglich feucht fotografieren.

Eigentlich enthält die Methode noch eine Silberverstärkung des Nickels; diese führte jedoch im Dot-Test - wie eine ganze Reihe anderer Verstärkungsmethoden auch - zur totalen Überfärbung des Hintergrundes. (Holgate et al. 1983, Hacker et al. 1988) Da die der Silberfärbung vorangehende Zugabe von  $\text{NiCl}_2$  allein eine Verbesserung der Färbung ergab, wurde sie trotz des Weglassens der Silberanlagerung beibehalten.

zu 2: Der Tris-Puffer allein zeigte die besten Ergebnisse. SDS oder pH4 schwächten die Färbung, und Tween erhöhte den Hintergrund drastisch.

zu DAB-Reaktionsmischung: Die Zutaten sollten der Reihe nach zugegeben werden, da es sonst zu Fällungsreaktionen kommen konnte, wie eigene Versuche bestätigten. Achtung! DAB ist krebserregend, deshalb sollte bei allen folgenden Schritten mit Handschuhen gearbeitet werden. DAB sollte immer frisch verwendet werden; d.h. die feste Substanz muß eingefroren aufbewahrt werden. Für die Versuche wurde eine DAB-Stammlösung angesetzt (s.o.), die in gebrauchsfertigen Portionen tiefgefroren aufgehoben wurden. (Nicht eingefrorenes DAB kann zwar durch Filtration gereinigt werden, die Lösung verträgt sich jedoch nicht mit Metall, und jedes unnötige Hantieren sollte vermieden werden (s.o.))

zu 3: Tween erniedrigte den Hintergrund der Farbreaktion, aber auch die Empfindlichkeit des Tests. (Thean & Toh 1989) Ebenso verhielt es sich mit einer Gelatineüberschichtung (Danscher & Nörngaarg 1983, Pohl et al. 1988).

### 3.4.13. Hauptsächlich verwendete Computerprogramme

#### 3.4.13.0. Verwendete Daten:

Die in dieser Arbeit verwendeten PV- Sequenzen sind der Swiss Protein Bank entnommen:

Abkürzung	Bankzitat	Typ	Bemerkung
1M	POLH\$POL1M	wt 1	Mahoney, Baltimoresequenz
1S	POLG\$POL1S	Sabin 1	
2L	POLG\$POL2L	wt 2	Lansing
3L	POLG\$POL3L	wt 3	Leon

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. 1987b, 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.

#### 3.4.13.1. Programme zur Auswertung der optischen Dichte:

- 1) Zur Erstellung der Spektren von Virussuspensionen bei pH-Titration und Zugabe von Ak-Lösungen wurde die zum Ultraspecfotometer von LKB mitgelieferte Software in leicht abgeänderter Version benutzt.
- 2) Die Auswertung zur Auftrennung von Streuung und Absorption erfolgte durch das Programm "Scatter". (Bergmann & Bergmann 1988)

#### 3.4.13.2. Programme zur Struktur bzw Antigenitätsuntersuchung:

B-Zell-Epitopsuche:

Alle Vorhersagekalkulationen benutzen Bewertungsskalen der 20 AS. (Ist eine AS oft von der Oberfläche zugänglich, so ist sie auch meist hydrophil und beweglich.) Viele Skalen enthalten Verteilungskoeffizienten zwischen zwei verschiedenen Phasen. Zugänglichkeit und Beweglichkeit kommen aus der dreidimensionalen Struktur; bei Zugänglichkeit wird die äußere Oberfläche gemessen, die Beweglichkeit wird durch den atomaren Temperaturfaktor (B-Wert) aus der Röntgenstrukturanalyse erhalten. Die Verteilung in Helices oder anderen Strukturen wird aus der Häufigkeit der AS in den betreffenden Strukturen bekannter Proteine bestimmt. Wenn Profile ausgegeben werden, sind die Werte nicht für eine einzelne AS angegeben, sondern es wird über ein "Fenster" aus mehreren AS (meist 5-7 bei Antigenitätsprogrammen) ein Mittelwert gebildet. Bei Karplus & Schulz (1985) wird das Fenster von 7AS gewichtet,

0,25/0,5/0,75/1/0,75/0,5/0,25, andere benutzen die Gaußsche Verteilungskurve. (Pellequer et al. 1991) So gelten die unter einer AS angegebenen Werte immer als Mittelwert, der etwa 5-7 AS in der Nachbarschaft einbezieht. Ich habe von allen PV-Proteinen durch ein Schreibprogramm Teilstücke der Sequenzen hergestellt, die klein genug waren, daß die Programme sie verarbeiten konnten. Die Teilstücke haben sich überlappt, um Ungenauigkeiten der Enden zu vermeiden. Nach Ansicht der Profile wurden Grenzwerte eingeführt, so daß aus den ausgedruckten Tabellen z.B. besonders hohe Hydrophilität abgelesen werden konnte. Die über den Grenzwerten liegenden Werte wurden in den Tabellen markiert. Sie sollen einen rauen Überblick über die große Menge an Daten ermöglichen. Die wenigen in dieser Arbeit angeführten Programme ergaben die markantesten Profile.

Da die atomare Struktur von PV bekannt ist, wurden zur näheren Charakterisierung aus einer großen Anzahl von Programmen zur Struktur solche ausgewählt, die weitere Angaben über die Art der AS enthalten. Einige dieser Programme stammen aus der Sammlung EPIPLOT (Menéndez-Arias & Rodriguez 1990) zur Vorhersage von B- und T-Zell-Epitopen.

1) Die verwendete Methode zur Bestimmung der Hydrophilität beruht auf einer Skala, die durch Untersuchung von 20 Modellpeptiden entstand. In diesen Peptiden wurden 2AS der Reihe nach durch sämtliche AS ersetzt und getestet. Außerdem berücksichtigt das Programm Flexibilität, Zugänglichkeit und das Hydrophilitätsprogramm von Hopp & Woods (1981). Das Programm erlaubt so bedingt eine Vorhersage der Antigenität. (Parker et al. 1985)

2) "Ungeordnete" Strukturen bieten besondere Merkmale, deshalb sind Kurven und Knicke besonders antigen. Aus diesem Grund wurde ein Programm zur Bestimmung der  $\beta$ -Turns mit in der Tabelle aufgeführt. (Chou & Fasman 1978)

3) Die Beweglichkeit der AS wurde nach Karplus & Schulz (1985) bestimmt (s.o.).

#### T-Zell-Epitopsuche:

Da immer deutlicher ein Zusammenhang in der Lage von B- und T-Zell-Epitopen gesehen wird, habe ich auch die möglichen T-Zell-Epitope bestimmt.

1) und 2) Die T-Zell-Epitope der verschiedensten Organismen weisen Ähnlichkeiten auf, die zur Suche neuer Epitope genutzt werden können. Im ersten Motif haben die 4 AS folgende Eigenschaften: geladen oder G, hydrophob, hydrophob, polar oder G. Im zweiten Motif sind 5 AS: geladen oder G, hydrophob, hydrophob, hydrophob, polar oder G. (Rothbard & Taylor 1988)

3) Das dritte Programm beruht auf der Bindung des Maus-MHC an Ovalbumin und der Wahrscheinlichkeit mit der AS in diesem Epitop ausgetauscht werden können. Die Motive werden in vielen Organismen wiedergefunden. (Sette et al. 1989)

4) Programm 4 gibt an, an welchen Stellen das "denaturierte" Protein die Möglichkeit hat, eine amphipatische Helix zu bilden, die vom MHC präsentiert werden kann. (Stille et al. 1987) Es sucht hydrophobe Streifen auf der Helix. Die hydrophoben AS nehmen dabei die Positionen n, n+4, n+7, n+11, n+14, n+18 ein, liegen also auf einer Seite der Helix.

Die ausgedruckten Tabellen sollten so verstanden werden, daß in ihnen nachgesehen werden kann, in welchen Regionen der Polioviren mit weiteren antigenen Regionen zu rechnen ist. Außerdem sollten sie bei der Wahl von Peptiden zur Induzierung von Antikörpern Verwendung finden.

#### **3.4.13.3. Programme zur Homologiesuche:**

1) Für das grobe Alignment der PV-Sequenzen wurde das Programm MACAW benutzt. Die Homologie wurde so dargestellt, daß möglichst wenig Lücken entstanden und die Numerierung wenig Änderungsstellen brauchte. Zusätzliche kurze Homologien in kleinen Bereichen können mit den Augen gesucht werden; meist sind es nur Verschiebungen um einzelne AS. Die Numerierung wurde strikt den Daten nach beibehalten. (Schuler et al. 1991)

2) Genaue Vergleiche der Sequenzen, besonders die Homologien zwischen den Peptiden von VP2 (PV1), wurden mit dem Programm psm von Gotoh (1990) durchgeführt.

#### **3.4.13.4. Programm zur Darstellung räumlicher Strukturen:**

Zur Darstellung der Struktur wurden die Daten der Brookhaven-Datenbank entnommen und mit dem Zeichenprogramm MOLSCRIPT von Kraulis (1991) bearbeitet.

## 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).

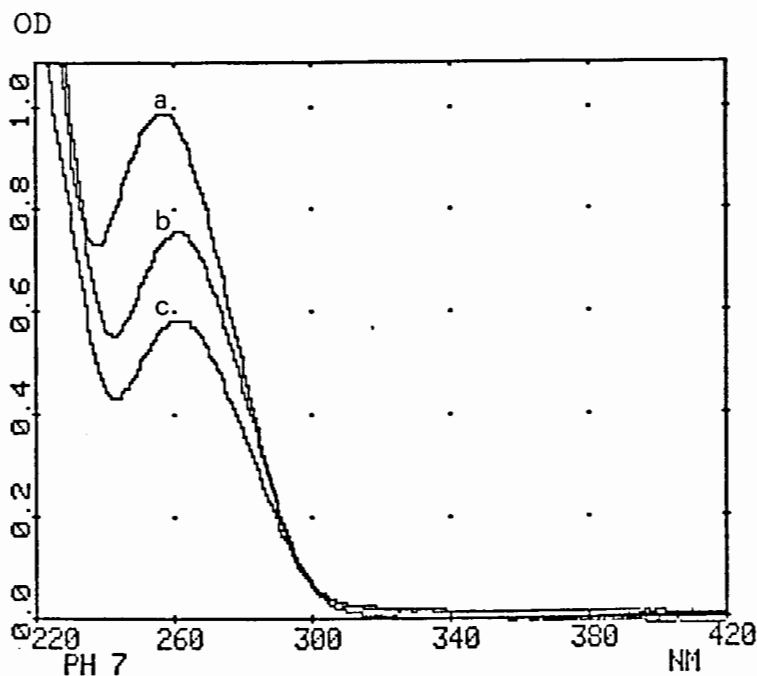


Abb.4.1 Vergleich der 3 Poliovirusstämme bei pH 7.

a = Mahoney (Typ 1), b = MEF<sub>1</sub> (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 Zentrifugationen 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.

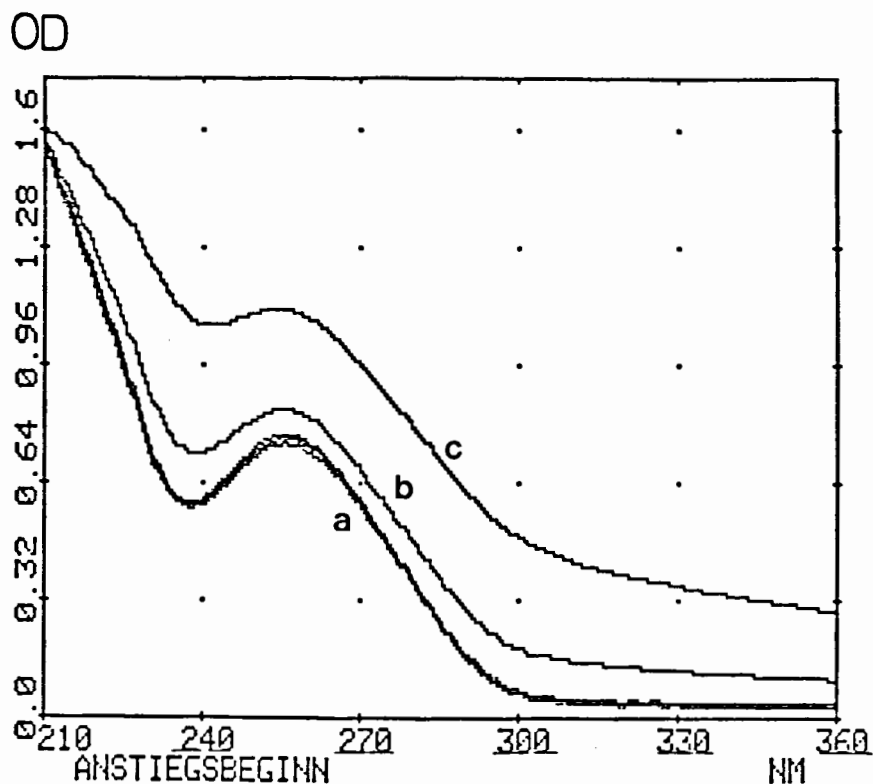


Abb.4.2 Anstiegsbeginn des Spektrums einer Mahoneyvirusprobe.

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.

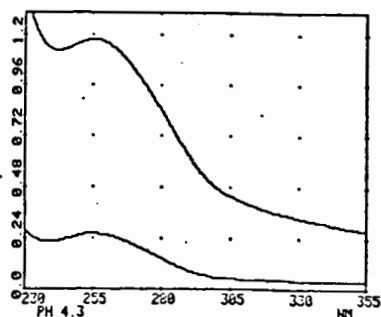
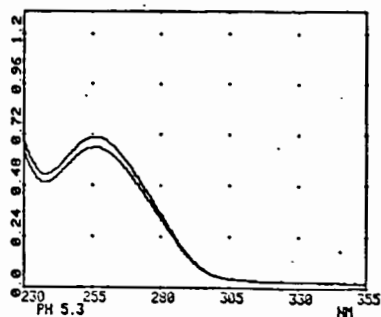
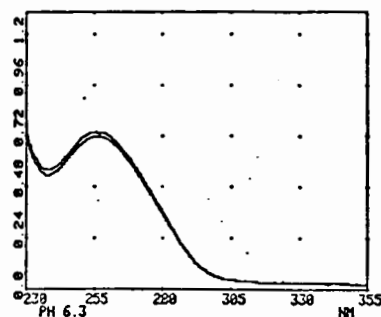
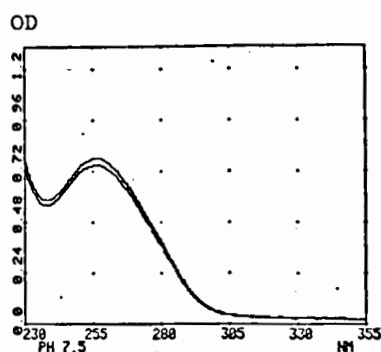
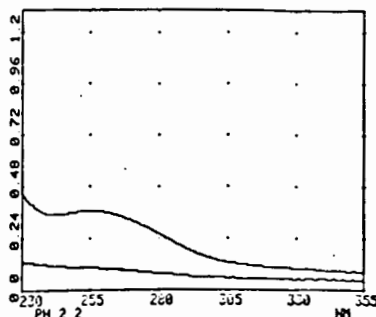


Abb.4.3 Abzentrifugation von Virus-Aggregaten bei verschiedenen pH-Werten.

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 MEF<sub>1</sub>-Viren (Typ 2) reduziert auf etwa das 1,2-fache der relativen OD. Außerdem scheinen MEF<sub>1</sub>-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)

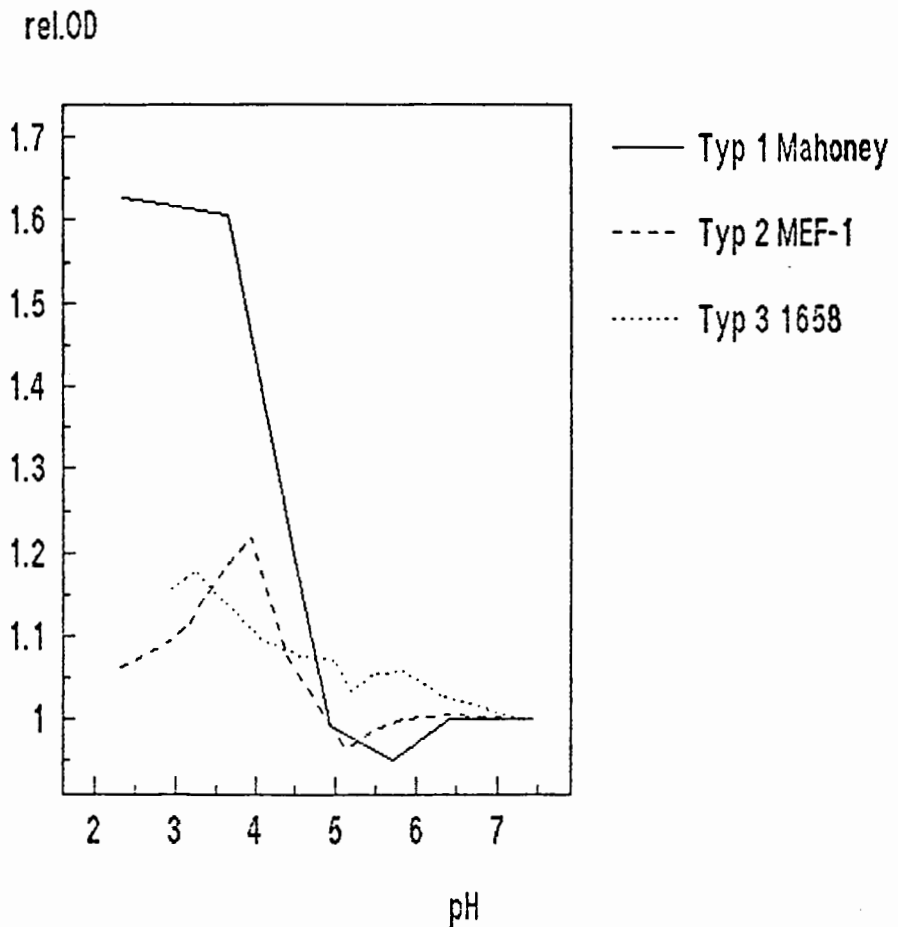


Abb.4.4 Veränderung der relativen OD<sub>260nm</sub> bei Säurezugabe

#### 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.

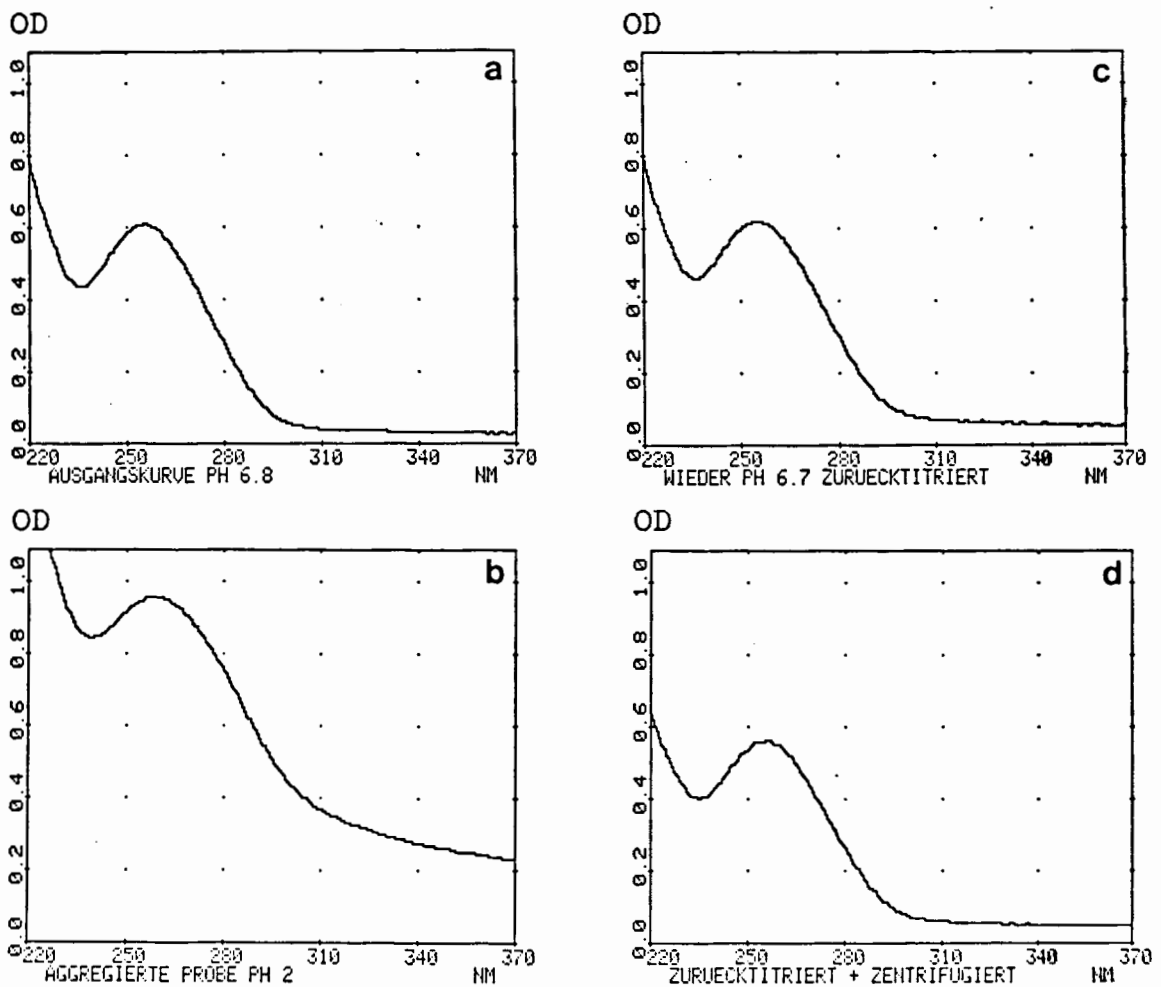


Abb.4.5 Rückgang der durch Säure erhöhten OD-Werte durch Base-Titration.

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.

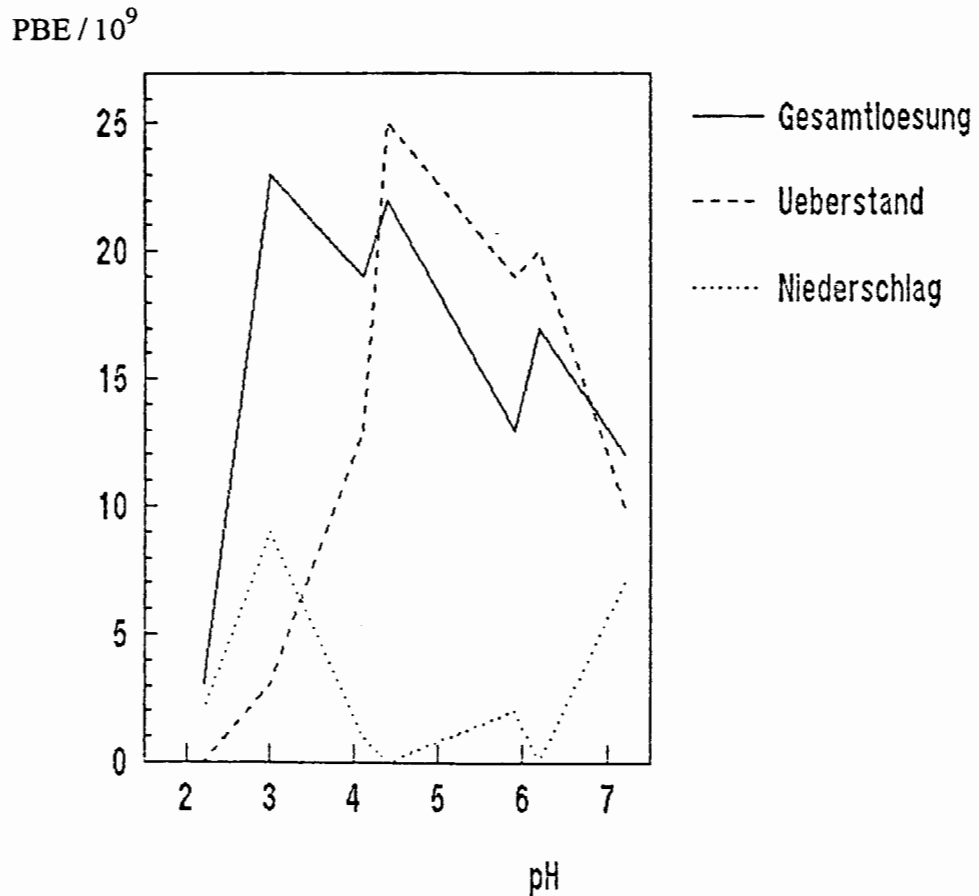


Abb.4.6 Verteilung der Infektiosität in Gesamtlösung, Überstand und Niederschlag bei einer Mahoneyvirussuspension in Abhängigkeit vom pH-Wert.

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 Ca<sup>2+</sup>

Wie Floyd und Sharp (1978) gezeigt haben, läßt sich die spontane Aggregation von Polioviren im Sauren durch Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> verhindern. Die minimale Hemmkonzentration beträgt 50 mM Ca<sup>2+</sup>. Proben von Poliovirus in 20 mM MES mit 50 mM Ca<sup>2+</sup> 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  $\text{Ca}^{2+}$  ein (Abb.4.7).

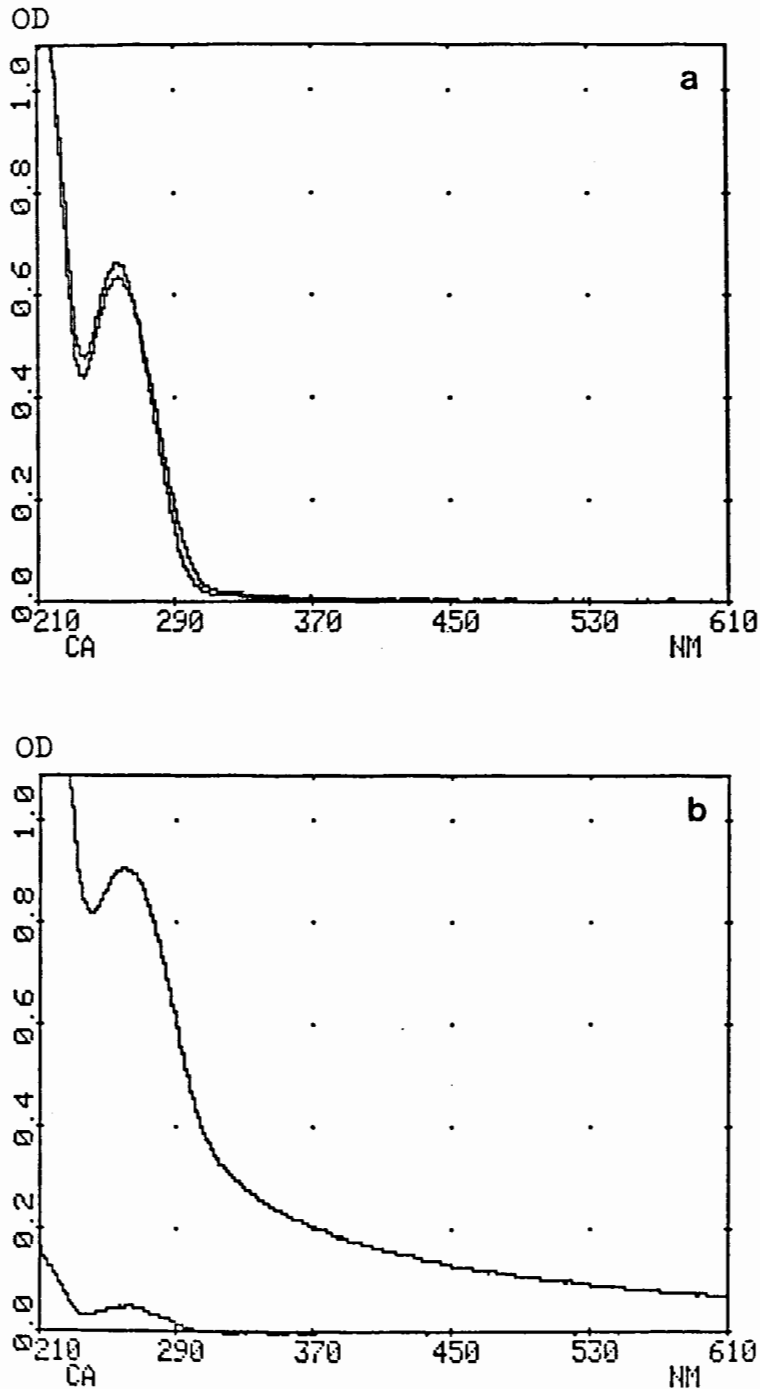


Abb.4.7 Verzögerung der Aggregation durch 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

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).

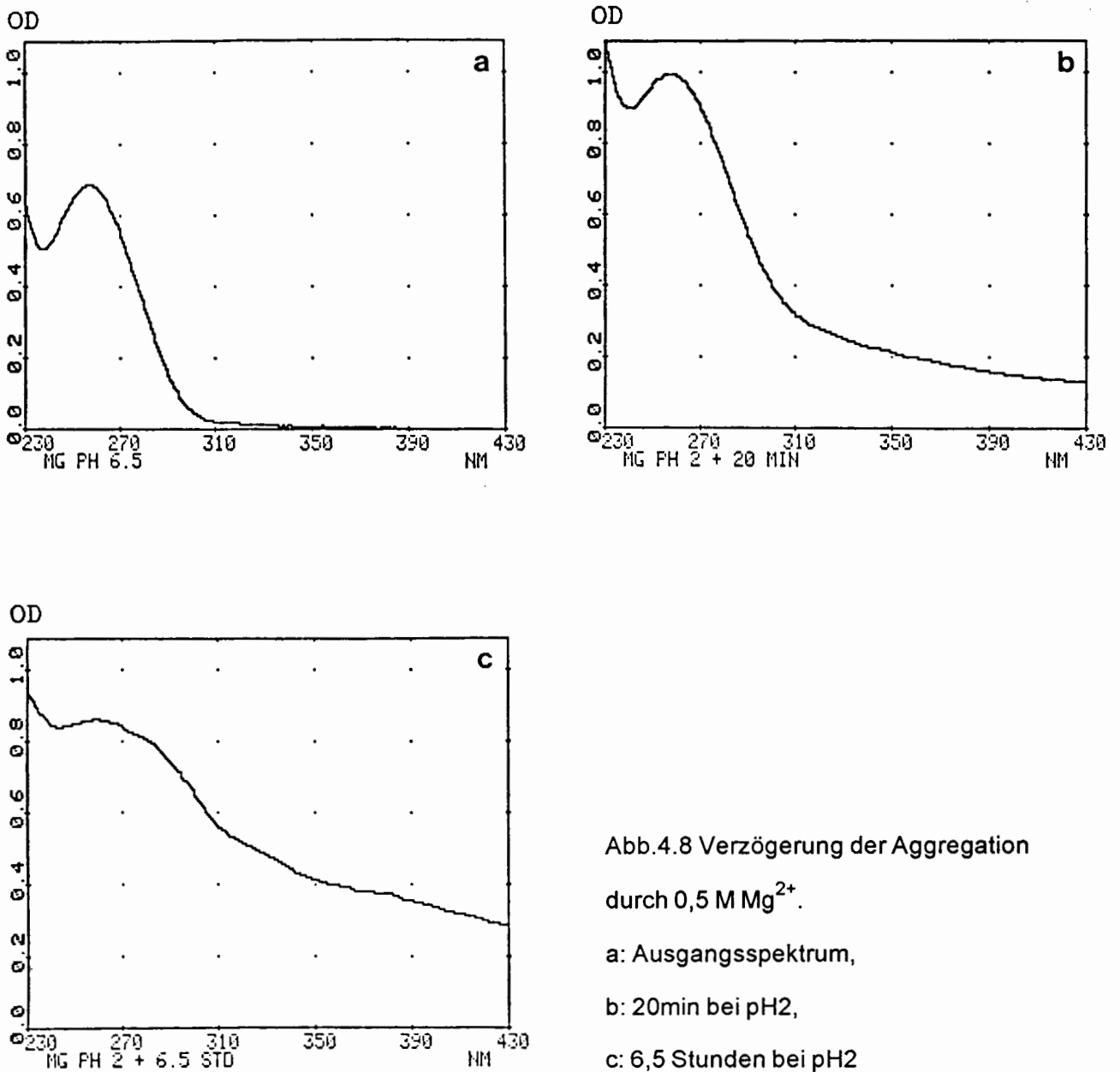


Abb.4.8 Verzögerung der Aggregation durch 0,5 M  $Mg^{2+}$ .

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 OD<sub>260</sub> 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 OD<sub>260</sub> bei pH 7, verhindern die Aggregation durch saure pH-Werte jedoch nicht.

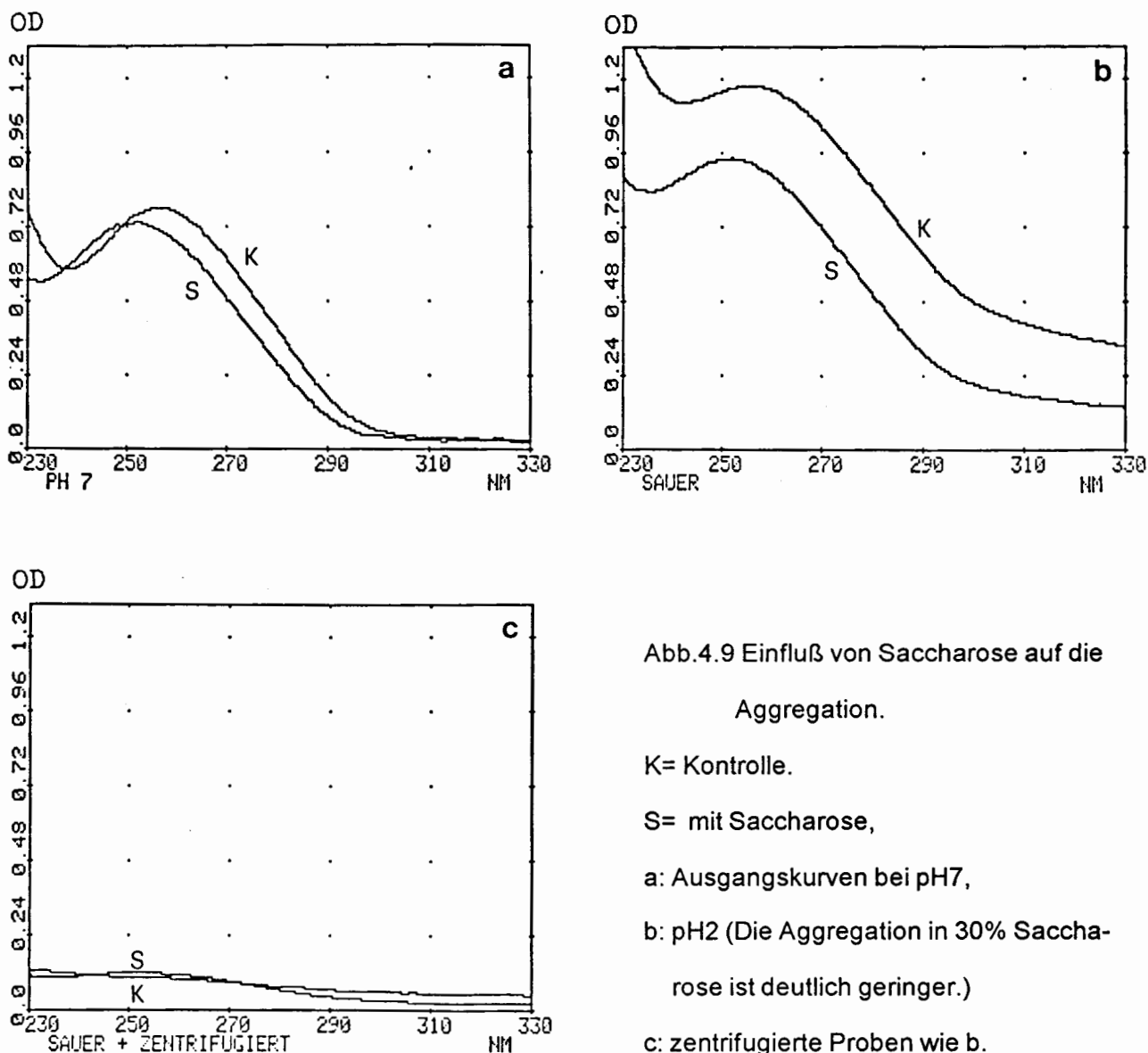


Abb.4.9 Einfluß von Saccharose auf die Aggregation.

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  $\mu$ 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.

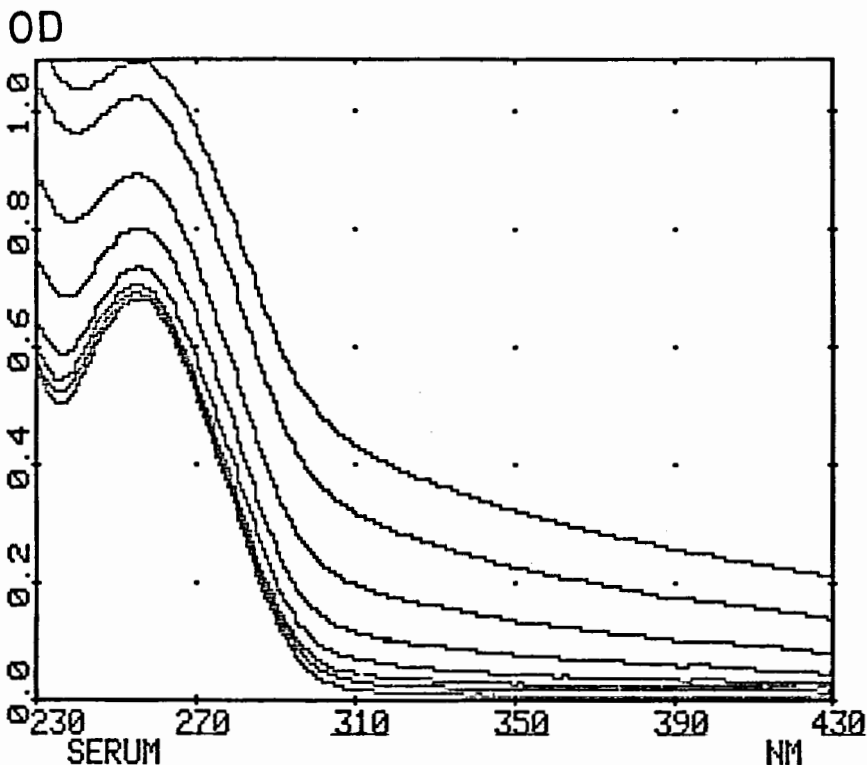


Abb.4.10 Anstieg von Mahoneyvirusspektren durch Serumzugabe.

Zugabe an Serum in  $\mu$ 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)

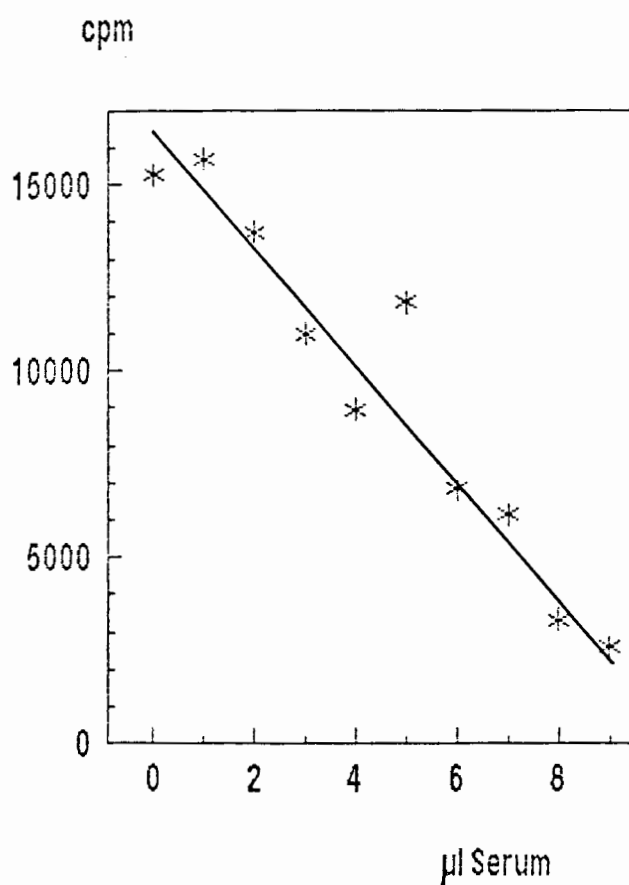


Abb.4.11 Absinken der Radioaktivität im Überstand ( $^{35}\text{S}$  Methionin-markierter Viren) nach Zugabe steigender Serummengen (155, 1:20 verd.) und anschließender Zentrifugation.

### 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 MEF<sub>1</sub>-Viren (Typ2) 40 % Zunahme der Ausgangs-OD, bei 1658 (Typ3) 20 %.

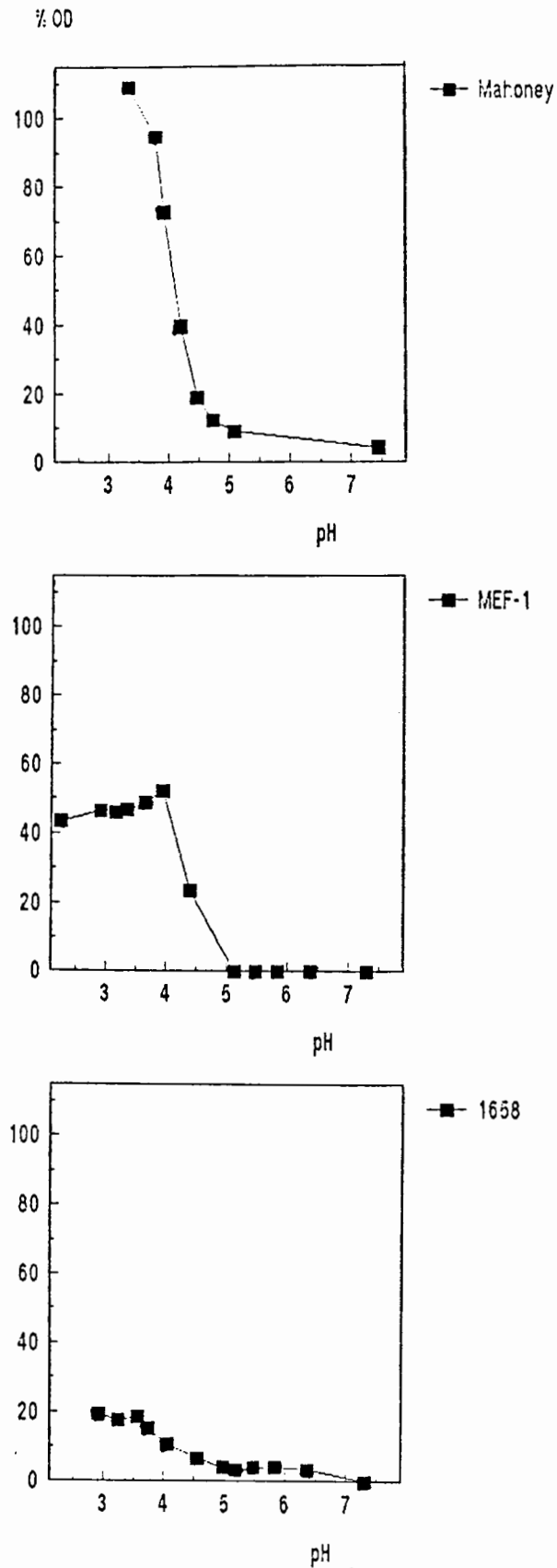


Abb.4.12 Anteil der Streuung durch Aggregation an der OD bei 260 nm.

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 MEF<sub>1</sub> 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)

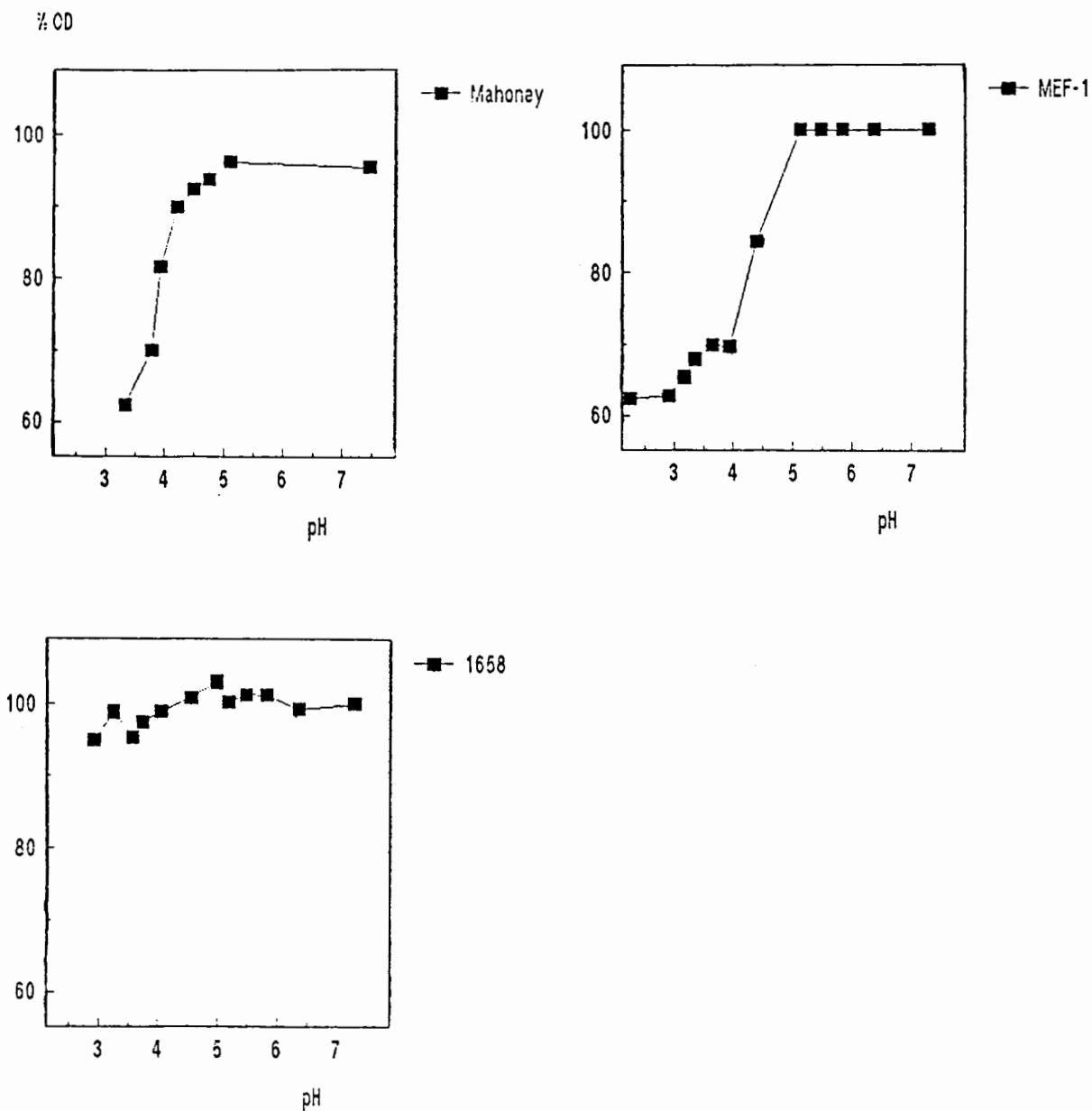


Abb.4.13 Abnahme der Virusabsorption bei 260 nm (nach Abzug des Streulichtanteils durch Aggregation von der Gesamt-OD) durch Zugabe von Säure.

% 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 MEF<sub>1</sub>-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 MEF<sub>1</sub>-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 MEF<sub>1</sub>-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 Ca<sup>2+</sup>**

Die mathematische Auswertung zeigte, daß nach 6,5 Stunden in 50 mM Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup> 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 Mg<sup>2+</sup>**

Durch die Auswertung nach Engländer 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 Mg<sup>2+</sup> 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.

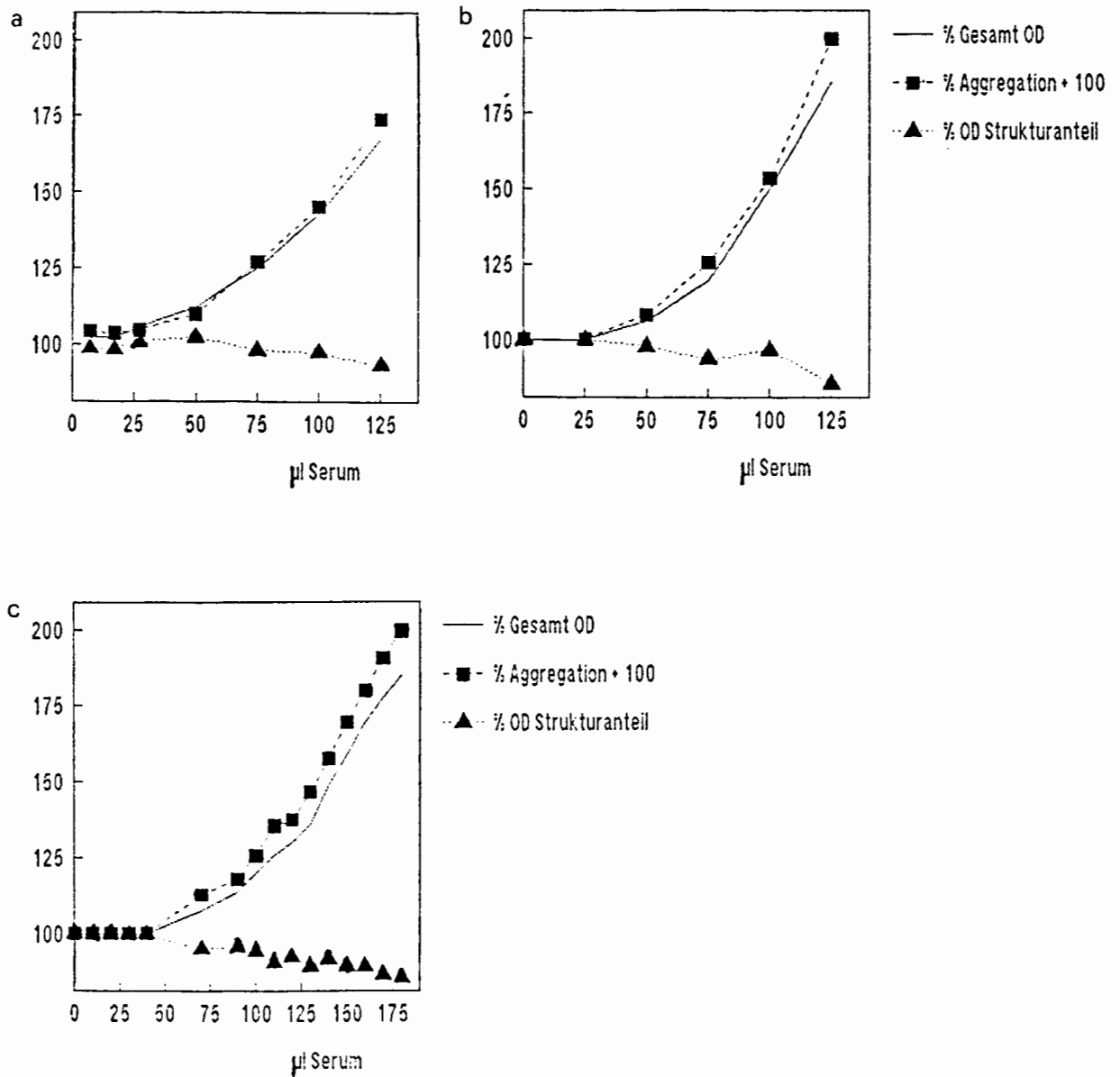


Abb.4.14 Änderung der  $OD_{260}$  bei Zugabe von Seren.

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: MEF<sub>1</sub>-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 MEF<sub>1</sub> (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).

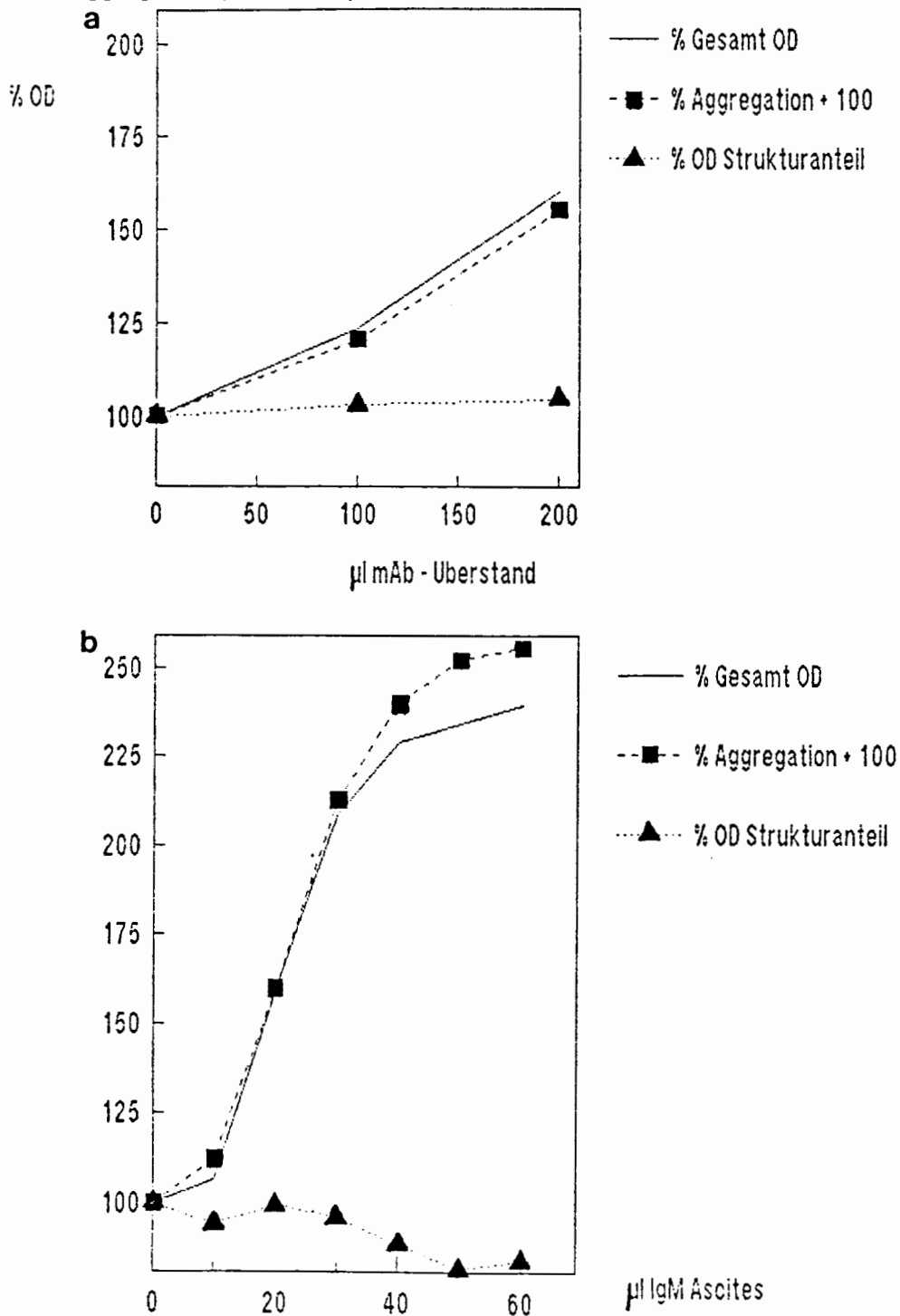


Abb.4.15 Änderung der OD<sub>260</sub> bei Zugabe von IgM.

a: MEF<sub>1</sub>-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)

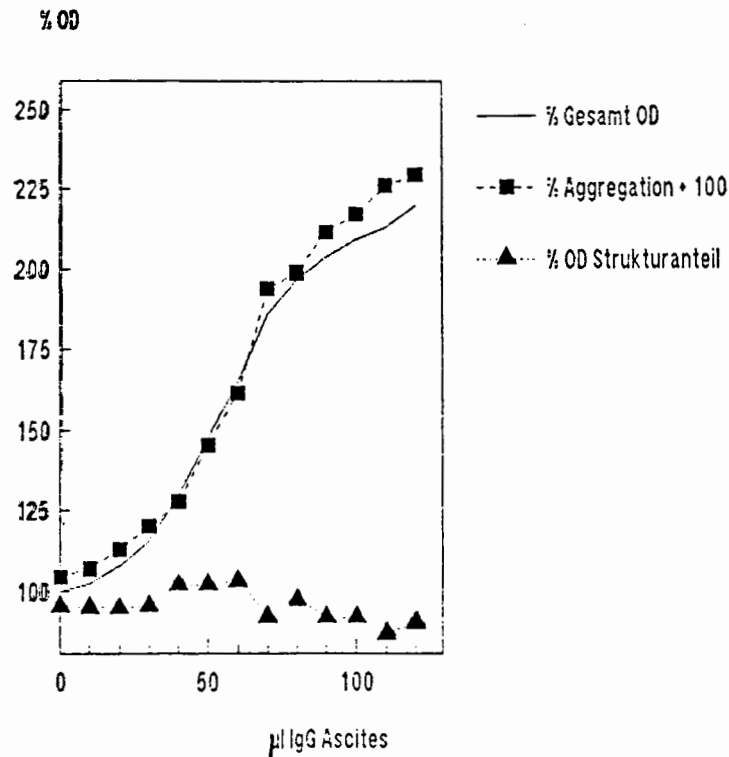


Abb.4.16 Änderung der  $OD_{260}$  nach Zugabe von homologem IgG.

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)

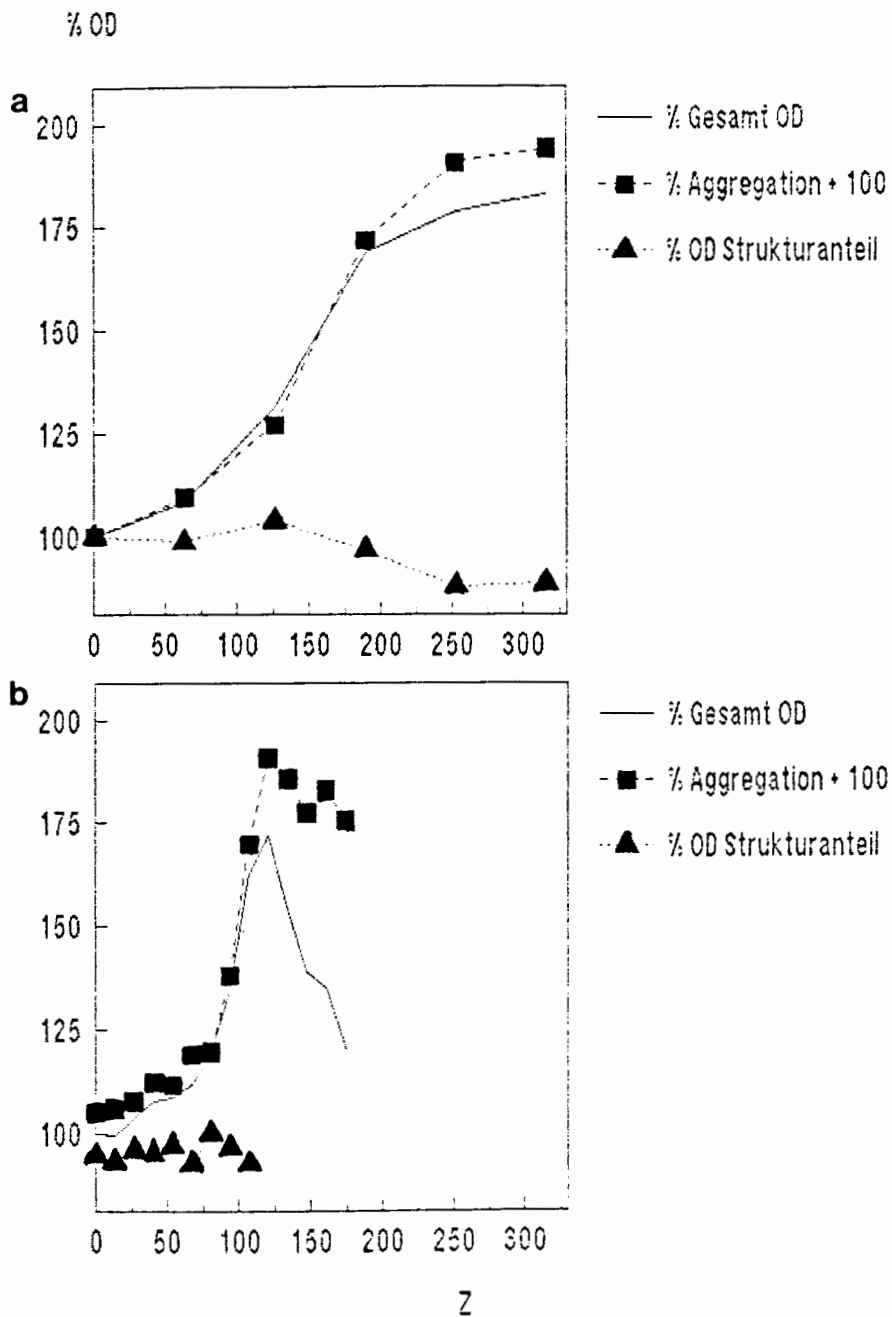


Abb.4.17 Vergleich einer heterologen und einer homologen Reaktion des IgG mAb 7J6 (gegen Typ 2) aus Maushybridomaüberstand.

a: heterolog, Zugabe zu Mahoneyviren, b: homolog, zu MEF<sub>1</sub>Viren. 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 Neutralisationstitern

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 Neutralisationstitern entsprechen. (Tab. 4.1)

Tab. 4.1: Vergleich von Nt-Titern 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  $\mu\text{l}$ , 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 Verdünnung 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  $\beta$ -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.

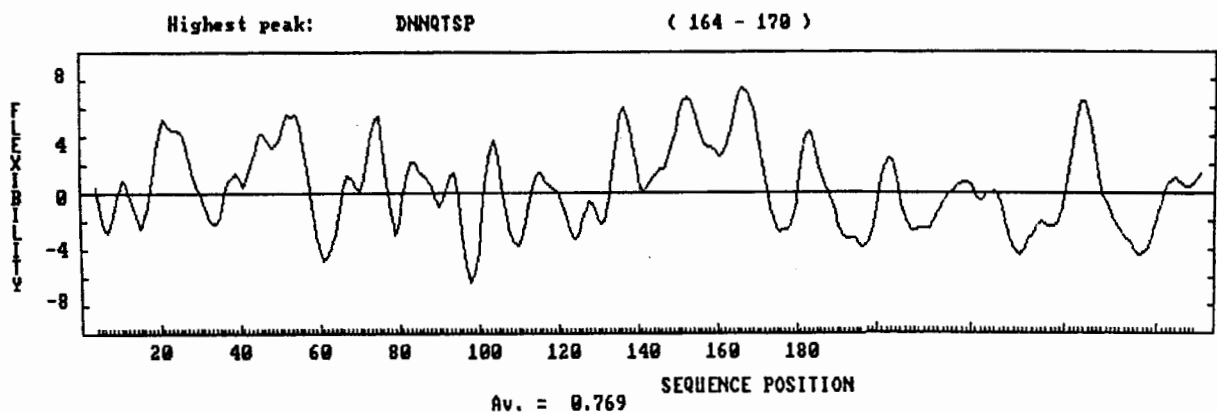
#### 4.2.1.4. Sequenzanalysen durch Computerprogramme

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 auf einmal 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	VQHRSR	SESSIES	FFARGAC	VTIMVDNP	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	VQHRSR	SESSIES	FFARGAC	VAIITVD	NSASTKN						
	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	GLGDIEGVV	EGVTRNAL	PLTPANNLP	DTQSSGPAH	SKETPALT	AVETGATN	NPLVPSD	VQTRHV	IQKTR	SESTVES	FFARGAC	VAIIEVD	NDAPTKR					
	c c	cCc c	cc ccc	CCCCCCCC	cccCCc	cCCc	cCCCCc		cCCCCCC		cCCCCCC		E EEE EE					
			b bB	bBbB	bb bb b		bB		bBb Bb		bBb Bb		bBb Bb					
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff		ffffffffff					
-----																		
3LVP1	GIEDLISEVA	QGAL - -	TL	SLPKQD	SLPDTKASG	PAH	SK	VEPALT	AVETGATN	NPLAPSD	VQTRHV	VQRRSR	SESTIES	FFARGAC	VAIIEVD	NEQPTTR		
	c Cc		ccCCc	CCc	CCCCc	cccCCc	cccCCc	ccCCCCc		ccCCCCc		ccCCCCc		ccCCCCc		E E E EEE		
			b BBB	bBbB	bb bb b	bb bb b	bb	bb		bb		bb		bb		bb		
	fffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff	ffffffffff		ffffffffff		
			4444	4444		4444								55555				
			xxxxxxxxx						xxxxxxxxxxx					xxxxxxxxxxx				
-----																		
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200								
1MVP1	KDKLFAVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSRFDM	ELT FVV	TANFTET	NNGHAL	NQVYQIM	YVPPGAP	VP	PEKWD	DDYTQ	TSSNPS	IF	TYGTAP	ARISVP	PVYG	
	AA AA	AAA A	AA		AAAA			AA	AAAAAAA									
			I I I I	II III I				I I II	I I								III	
	SSSS	HHHHH..	TTSSSS	SSSSSSSS	SSSSSS	SSSSSS	TTTT	TTTTTT	SSSSSS	SSSS								
	W				W													
	C	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	cc Ccc	cc cCCc	cccc								
	Ff			fffff	fffff	fffff	fffff	f fffff	fffff									
		4444	4444		4444					55555								
			xxxxxxxxx						xxxxxxxxxxx									
-----																		
1SVP1	KDKLFTVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSRFDM	EFT FVV	TANFTET	NNGHAL	NQVYQIM	YVPPGAP	VP	PEKWD	DDYTQ	TSSNPS	IF	TYGTAP	ARISVP	PVYG	
	C	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	cc Ccc	cc cCCc	cccc								
	Ff			fffff	fffff	fffff	fffff	f fffff	fffff									
2LVP1	ASKLFSVWK	IYKDTVQL	RRKLEFF	TYSRFDM	EFT FVV	TNSYD	DANNGHAL	NQVYQIM	YIPGAP	IP	PKW	NDYTQ	TSSNPS	VF	TYGAPP	ARISVP	PVYG	
	E E																	
	c	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccc cc	ccCCc	ccc								
	ff			fffff	fffff	fffff	fffff	ff fffff	fffff									
3LVP1	AQKLFAM	MRITYK	DVQLRRK	LEFFTY	SRFDM	EFT FVV	TANFTN	ANNGHAL	NQVYQIM	YIPGAP	TPK	SWDDYT	Q	TSSNPS	IF	TYGA	PARISVP	PVYG
	EE																	
	c	cccccc	c c	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	ccccCCCC	Cccc cCcc	cc CCc	ccc								
	ff			fffff	fffff	fffff	fffff	ffffffffff	fffff									
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190								

	210	220	230	240	250	260	270
1MVP1	ISNAYSHFYDGF	SKVPLK-DQSAALGDS	LYGAASLND	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-DQSAALGDS	LYGAASLND	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		ccCCCccC	c	cc
	b	bB bBb	bbb		BBB		BBb
		ffffffFf			ffffffFf		ff
3LVP1	LANAYSHFYDGF	AKVPLKTDANDQIG	DSLYSAMTVDD	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= $\alpha$ -Helix, S= $\beta$ -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		$\beta$ -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		$\beta$ -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
		ffff		$\beta$ -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		$\beta$ -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 IIIIIIIIIIII 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	SPNIEACGYSDRVMQLTLGNSTITTQEAANSVVAYGRWPEYIKDSEANPVDQPTPEPDVAACRFYTLDTVTRKESRGWWW							
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 KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFKHGALGVFAVPEMCLAGDSNTTMMHTSYQANANPGEKGGTFTGT
          A      A      A                      A                      AAA  A  A  AA  AAAAAAAAAA
          II I
          SSSSSSSSSSS TT..SSSSSSSSS                      HHHHHH TTTTSSS
          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      444444
          xxxxxx
          -----
1SVP2 KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFKHGALGVFAVPEMCLAGDSNTTMMHTSYQANANPGEKGGTFTGT
          cc      Ccc  ccCcccc  c      cCCCCCCCCcCCcCCCCCCCCc  c
          ff      b  b      bbB  b      bBBBB  b  bBBBBBBb  b
          fFFFf  fFFFFFFFffff
          -----
2LVP2 KLPDALKDMGLFGQNMFYHYLGRAGYTVHVQCNAKFKHGALGVFAVPEMCLAGDS-TTHMFTKYENANPGEKGGFKGS
          E
          8nd  9-      10-      11-      12-?
          cc      c      ccCcccc  c      ccCC C      cCCCCCCCCc
          ff      b      b      b      b  bb      bBBBBBBb  bb
          4444  4444      4444  4444      fF f      fFFFFFFFffff
          5      55555      4444      55555
          -----
3LVP2 KLPDALRDMGLFGQNMYYHYLGRSGYTVHVQCNAKFKHGALGVFAIPEYCLAGDS-DKQRYTSYANANPGERGGKFYSQ
          8nd  9-      10-      11-      12-
          cc      Ccc  ccCcccc  c      cCCC CCCccccccCCCCCc  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	FTPDDNQTS PARRFC PVDYLLGNGTLLGNFVFPHQIINLR TNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPLNFA							
	AAAAAAAAAAAA A I I I A AA							
	EWWWEE TTTT HHHHHHHHSSSSS..TT SSSSSS HHH..S SSSSSS S S..							
	W W							
	X13(+)		14+		15+			
	cccCCCCC			ccCCc	cc	ccc c		c
	bbBBBBBb	bbbbbbb		bbbb	bb	Bbb		
	fffffffffff	fffff		ff				
	44							
		55555 55555			xxxxxx		xxxxxx	
						---		
1SVP2	FTPDDNQTS PARRFC PVDYLLGNGTLLGNFVFPHQIINLR TNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPLNFA							
	ccCCCCCcc ccCCc cc ccc c c							
	bbBBBBBb bbbbbbb bbbb bb Bbb							
	fffffffffff fffff ff							
2LVP2	FTLDTNATNPARNFC PVDYLLGSGVLGNFVFPHQIINLR TNNCATLVLPYVNSLSIDSMVKHNNWGIAILPLAPL DFA							
	E E E							
	X13-		14-		15-			
	ccCCcCc			ccCCc	cc ccCccc			c
	bbb bb b bb			bbbb	bb bBbb			
	ffffff	f		ff	ffff			
		55555 55555			xxxxxx		xxxxxx	x
						-----		
3LVP2	FNKDNAVTSPKREFCPVDYLLGCGVLLGNFVFPHQIINLR TNNSATIVLPYVNALAIDSMVKHNNWGIAILPLSPL DFA							
	E EE E							
	X13-		14-		15-			
	CCcCCcCccCccc			ccCCc	ccc c			C
	bbbb			bbbb	Bbb	b		
	fffff			fff				
		55555 55555			xxxxxx		xxxxxx	
	-	-	-	-	-	-	-	-
	160	170	180	190	200	210	220	230

```

                250      260      270
                -        -        -
1MVP2  SESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITLPRLQ
        AAAA A                A A AAA
                II
        TT  SSSSSSSSSS  SSS
        W  W                                W
                16(+) 17

        cCCcc                c
        bb b                b  b
        fFFFFf

```

```

                xxxxxx                xxxxxx
                -----

```

```

1SVP2  SESSPEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITLPRLQ
        cCCcc                c
        bb b                b  b
        fFFFFf

```

```

2LVP2  TESSTEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITVPRQ
        W  E
                16+  17

        cCCcC                c                c
                b  b
        fFFFFf                f
        4
        55
        xxxxx  xxxxxx                xxxxxx
                -----

```

```

3LVP2  QDSSVEIPITVTIAPMCSEFNGLRNVTAPKFQ
                16-  17

        cCCc                c  c                cc
                b  b
        fff                f
        4

        xxxxxxxxxxxx                xxxxxx
                -----
        -          -          -          -
        240      250      260      270

```

## Mahoney VP2

äußere Oberfläche: A= außen

innere Oberfläche: I= innen

H=  $\alpha$ -Helix, S=  $\beta$ -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&gt;4, c&gt;2

 $\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F&gt;4, f&gt;2

T-Zell-Motiv aus 4 AS

T-Zell-Motiv aus 5 AS

Sette-Matrix

mögliche Bildung amphipatischer Helices

## Sabin 1 VP2

Hydrophilie: C&gt;4, c&gt;2

 $\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F&gt;4, f&gt;2

## Lansing VP2

E= antigene AS aus Literatur

Kreuzreaktion der Typ 1 Peptide mit Typ 2

Serum 54

Hydrophilie: C&gt;4, c&gt;2

 $\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F&gt;4, f&gt;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&gt;4, c&gt;2

 $\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2

Beweglichkeitsvorhersage: F&gt;4, f&gt;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	MEMYRVRLSDKPH	TDDPILCLSLSPASDP	PRLSHTML	
	III I I IIII I IIIII			I III IIIII III I		A AAAAA A A A AAAAAAAA		A AA A A		
	SSSSS.TTTTT TTTT			SSSS..HH...T SSS		HHHH TTTT SSSS		SSSSSSHHHHHHH..T.HH		
	ccCCcCcc cc cccc	cc	cc	c Cc	c	ccCCCCc	cccCCCCC	ccCCccc		
	BBBBb Bb b			bb b			bbbbbbBb	b bbBB bb		
	fFFFFf fff		ff fffff			fFFFF	ffffff	fffff		
				4444			4444			5555
								xxxxxxx xxxxxx		
1SVP3	GLPVMNTPGSNQYLTA	DNFQSPCALPEFDVTP	PPIDIPGEVKNMELAE	IDTMI	PFDSL	SAKKNTMEMYRVRLSDKPH	TDDPILCLSLSPASDP	PRLSHTML		
	ccCCcCcc cc cccc	cc	cc	c Cc	c	ccCCCCc	cccCCCCC	ccCCccc		
	BBBBb Bb b			bb b			bbbbbbBb	b bbBB bb		
	fFFFFf fff		ff fffff			fFFFF	ffffff	fffff		
2LVP3	GLPVLNTPGSNQYLTA	DNYQSPCAIPEFDVTP	PPIDIPGEVRNMMELAE	IDTMI	PLNLTNRKNTMDMYR	VELNDAAHSDTPILCLSLSPASDP	PRLAHTML			
	cCCcCcc cccCCCCc	cc	c cc	c	E E E	ccCCcCc c	cccCCCCC	ccCCcc		
	BBBBb bbBBb b		bb b		b bb	b	bb	b bbBB		
	fFFFFf ffff		ff fffff		fFFFFF		f	ffff		
3LVP3	GLPVLNTPGSNQYLTS	DNHQSPCAIPEFDVTP	PPIDIPGEVKNMELAE	IDTMI	PLNLESTKRNTMDMYR	VTLSDSADLSQPILCLSLSPASDP	PRLSHTML			
	cCCcCcccccCCCCc	cc	c Cc	c	EE E E	ccCCcCc	cccCCCCc	ccCCccc		
	BBBBb bbBBB b		bb b		b bb	b	bbb	b bbBB bb		
	fFFFFf fffffff		ff fffff		fFFFFf		ff	fffff		
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1MVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGFMATGKLLVSY	APPAGDPPKPKRKEAML	GTHVIWDIGLQSSCTM	VVPWISNTTYRQTIDDS	FTEGGYISVFYQTRIVV				
	II I I I I IIIII			A AA AA A		III I I II II		II		
	HHHHHHSSSS SSSSSSSSS TTT.SSSSSSSSS			HHHH..TTSSSSSSS		SSSSSSS		SSS HHHHH SSSSSSSSSSS		
				ccCCCCCCCCc		ccc	cCCc cCCcCccccc			
				bBbbBBBbBb		b	b b b bb b			
			ff	fffffff		ff	ffffffFffffff			
	4444 4444							4444		
	5		55555		55555 55555					
			xxxxxx			xxxxxx		xxxxxx		xxx
1SVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGSMATGKLLVSY	APPAGAEAPKSRKEAML	GTHVIWDIGLQSSCTM	VVPWISNTTYRQTINDS	FTEGGYISMFYQTRVVV				
				ccCCCCCCCCc		ccc	cCCc cCCcCccccc			
			ff	bBbbBBBbBb		b	b b b bb b			
			ff	fffffff		ff	ffffffFffffff			
2LVP3	GEILNYYTHWAGSLKFT	FLFCGSMATGKLLVSY	APPAGAEAPKSRKEAML	GTHVIWDIGLQSSCTM	VVPWISNTTYRQTINDS	FTEGGYISMFYQTRVVV				
				ccccCCCCCcc		ccc	cCCc cCC Cccccc			
			ff	bBb		b	b b b bb bb			
			ff	fffffff		ff	ffffffFffff			
3LVP3	GEVLNYYTHWAGSLKFT	FLFCGSMATGKILVAY	APPAQPTSRKEAML	GTHVIWDLGLQSSCTM	VVPWISNVTYRQTQDS	FTEGGYISMFYQTRIVV				
				ccccCCCCCcc		ccc	ccccCCCCcCccccc			
			f	bBbBbbbbb		b	b bb bb			
				fffffff		ff	ffffffFffffff			
	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 I I I I I I I I I I I I I I		I I	innere Oberfläche: I= innen
	SSSSSSSSSSS.TTTSSS			H= $\alpha$ -Helix, S= $\beta$ -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		$\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff		f fff	Beweglichkeitsvorhersage: F>4, f>2
	44444444	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		$\beta$ -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		$\beta$ -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	$\beta$ -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	IIIIIII I	IIIIIII I	innere Oberfläche
	SSSSSS	SSS	SSSS	TTTT	SSSS	HHHHH	TTTT	$\alpha$ -Helix, $\beta$ -Strang, Turn
	ccCcCccccC	CCCCcccccccc	c	ccCCCCCCCC	CcCCCCCcccc	cc		Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		BbbBb	b b	bBBBbb		$\beta$ -Turn-Vorhersage: B>4, b>2
	fff	ffff	ffff	ff	ffffffffff	ffff		Beweglichkeitsvorhersage
		4444			4444		55555	T-Zell-Motiv aus 4 AS
				xxxxxx				T-Zell-Motiv aus 5 AS
	-----	-----	-----	-----	-----	-----		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		$\beta$ -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	CcCccCcccc	cc	c c	Hydrophilie: C>4, c>2
	b	bbbbbbBbbbBb		BbbBb	b	bbb		$\beta$ -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	$\beta$ -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  $-36^\circ$  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

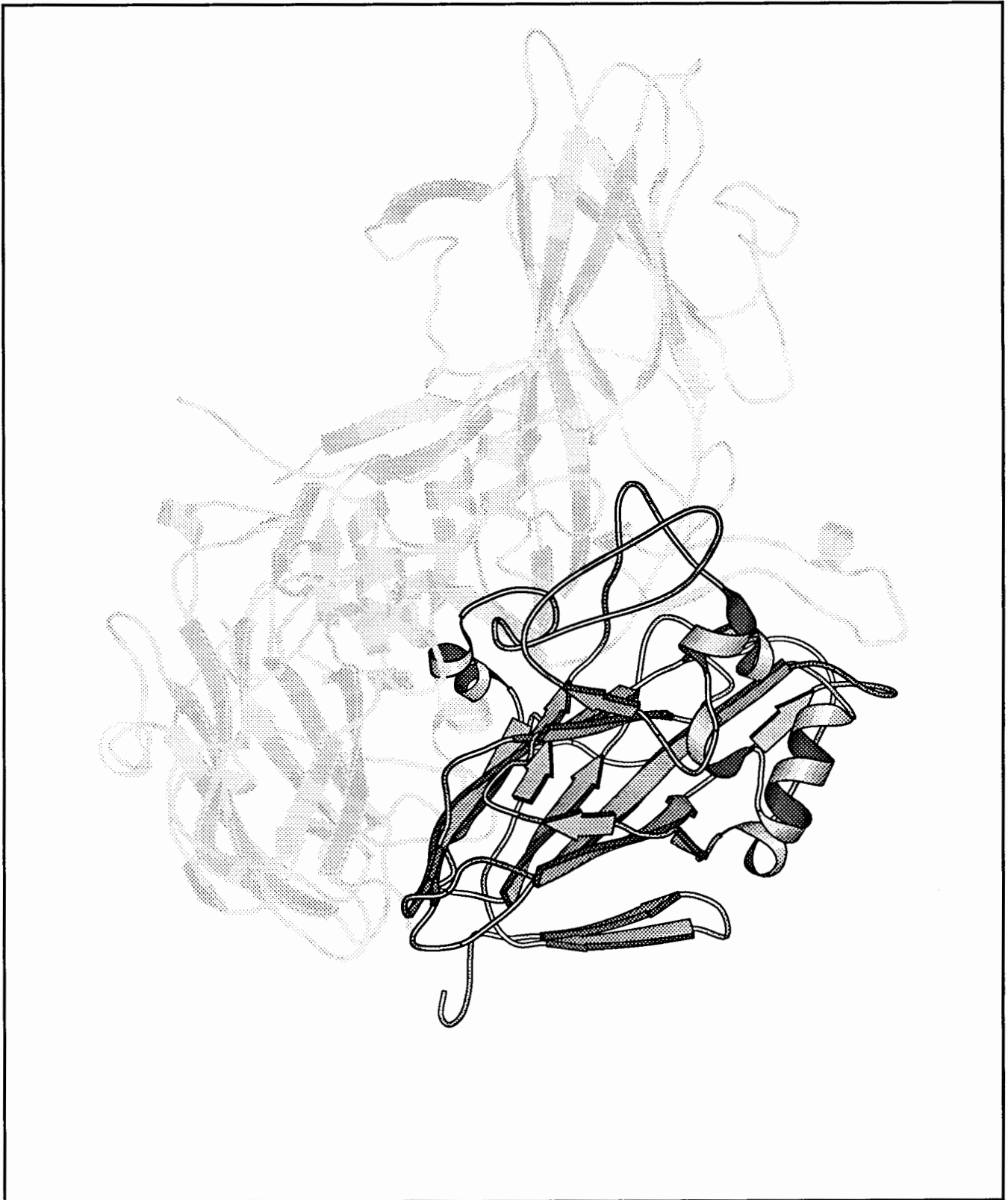


Abb.4.20B Die Lage von VP2 im Protomer

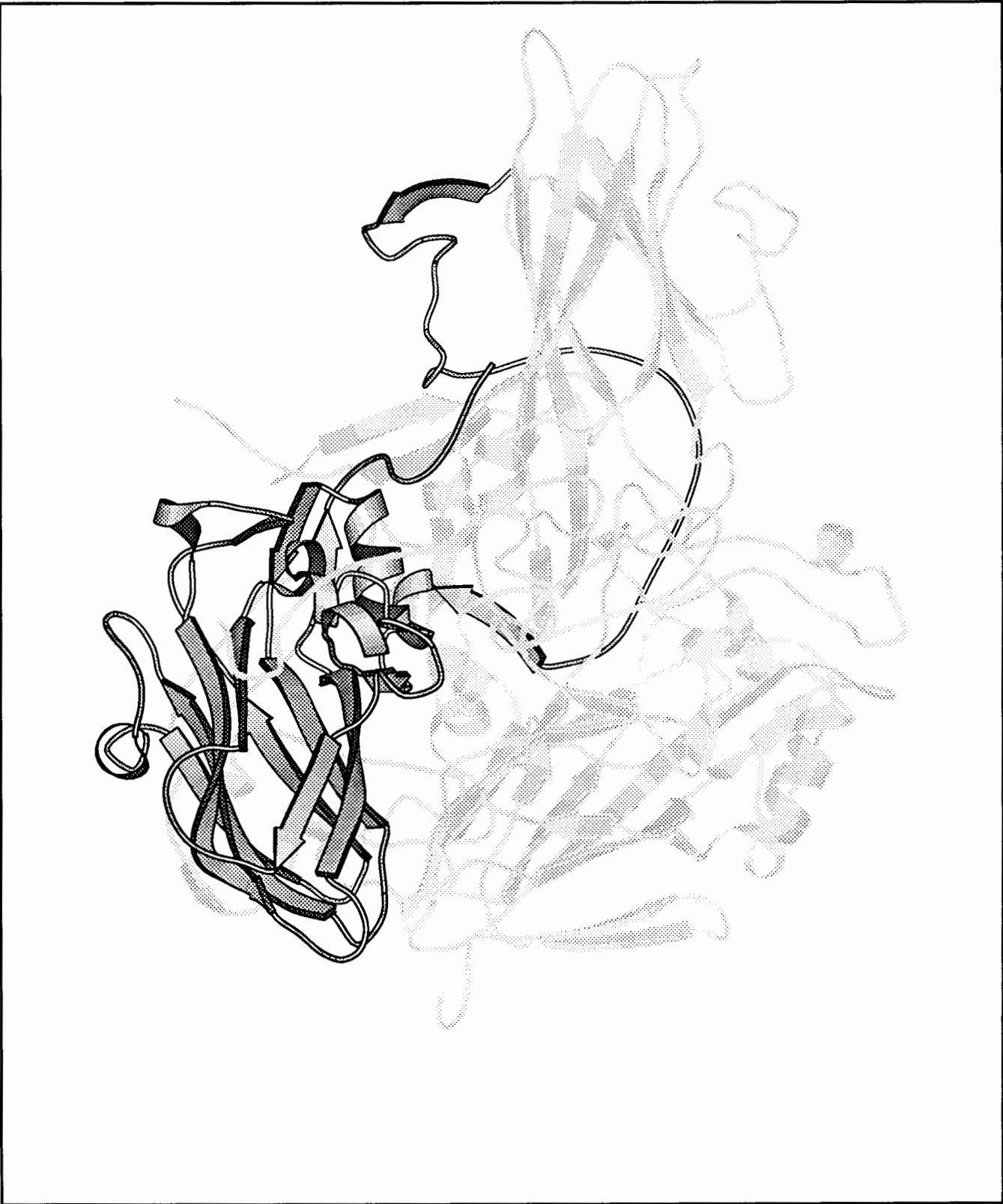
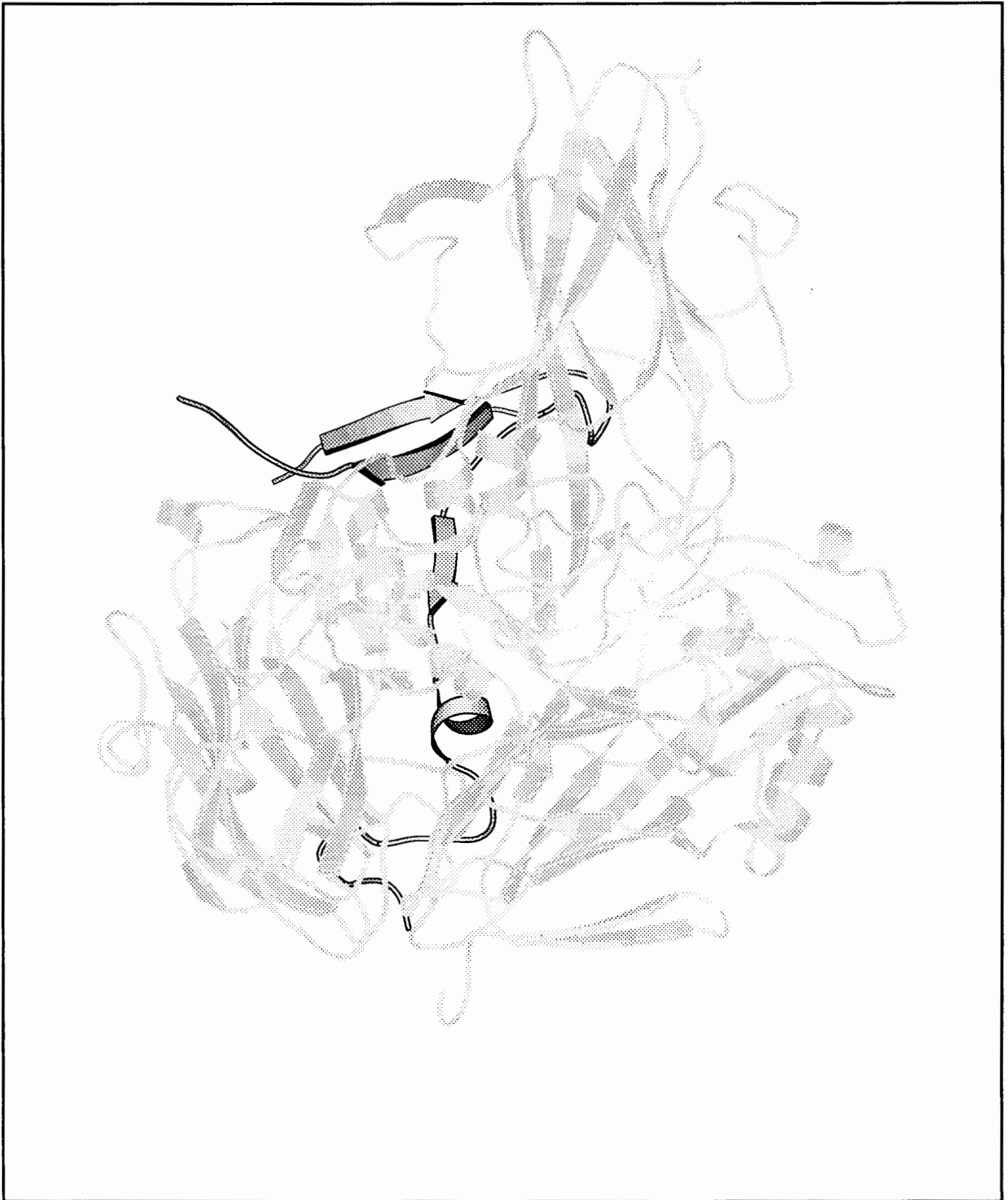


Abb.4.20C Die Lage von VP3 im Protomer



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.

Abb4.21 Lage der Oberflächen-AS im Protomer

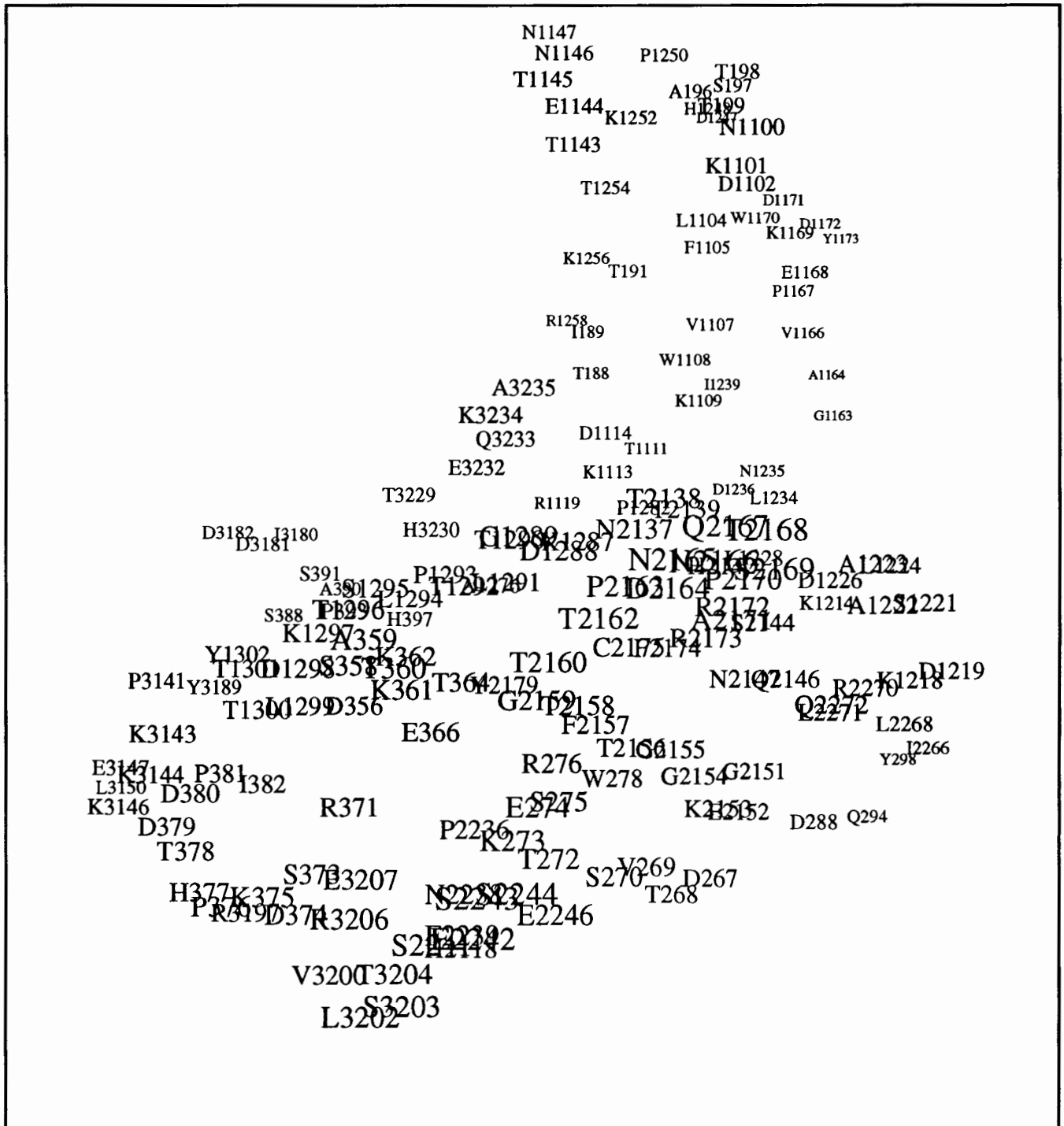
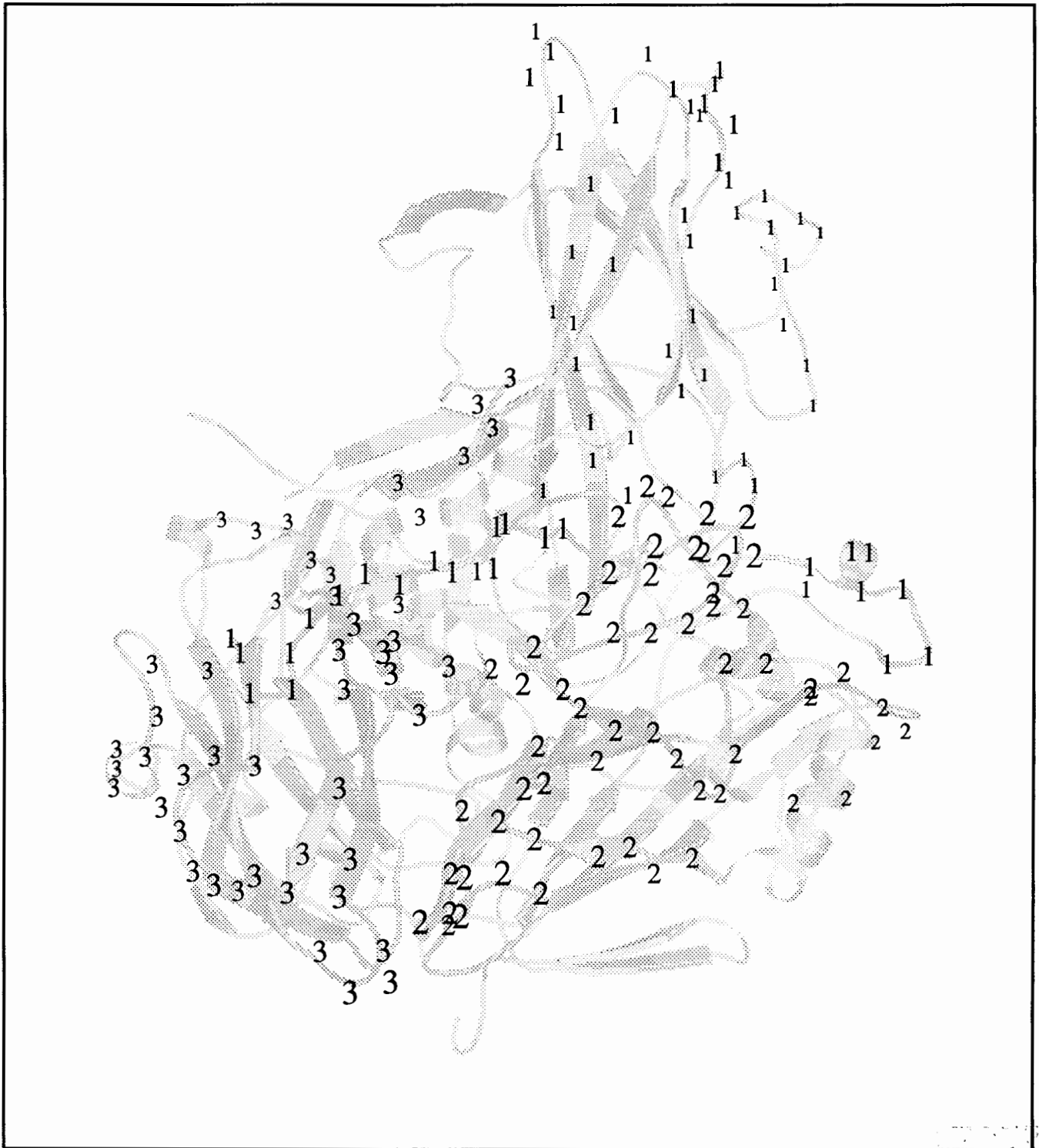


Abb.4.21 zeigt alle an der Oberfläche liegenden AS. Die AS sind mit ihrer AS-Art (im "one letter code") und mit ihrer AS-Nummer angegeben. Die erste Ziffer der Zahl bedeutet die Nummer des Virusproteins, dahinter steht direkt die Nummer der AS im VP. Die Mitte der Beschriftung gibt immer die Lage des C<sub>α</sub>-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.



Klick für  
Farbbild

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



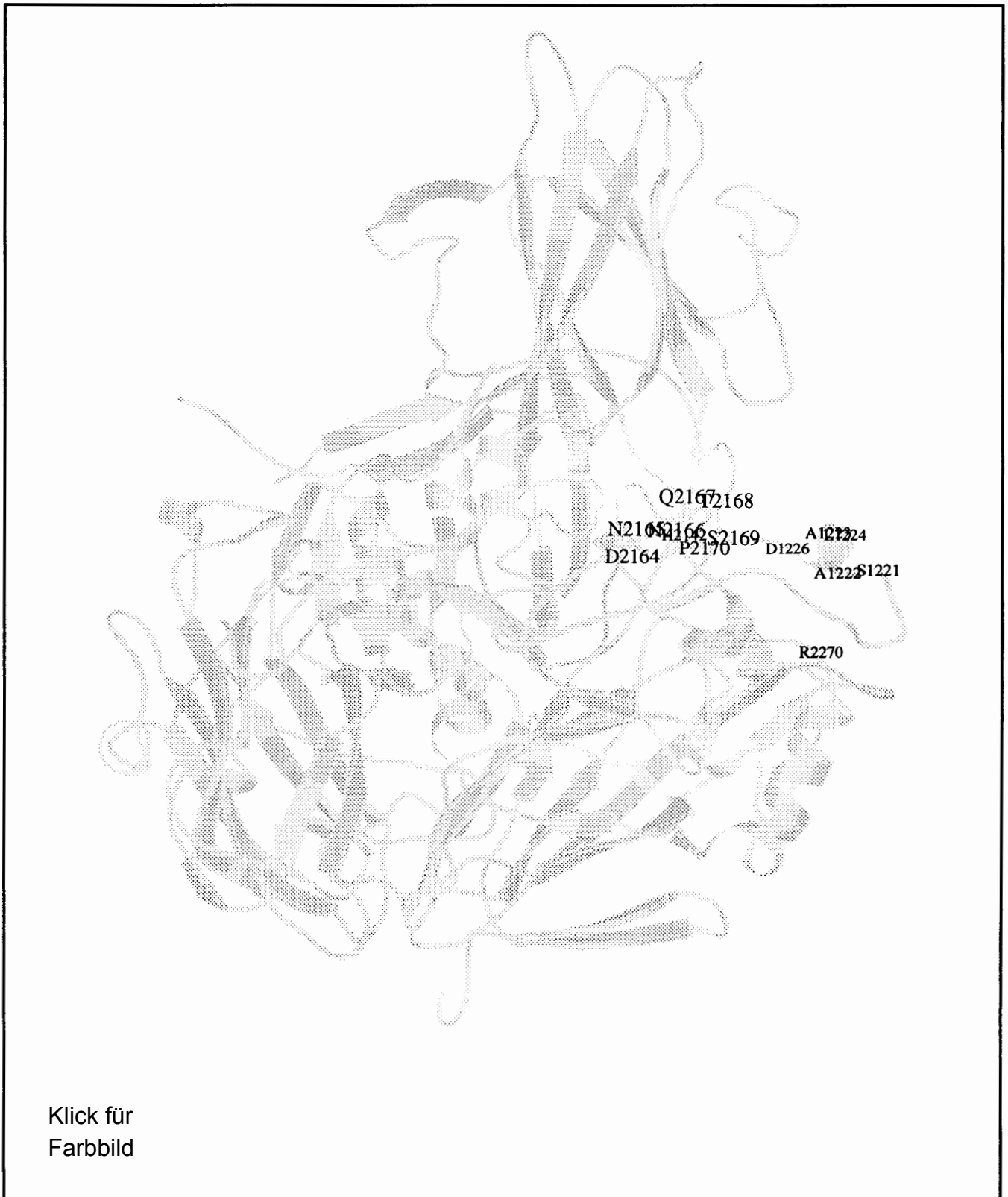


Abb.4.23B Die Oberflächen-AS der antigenen Region 2

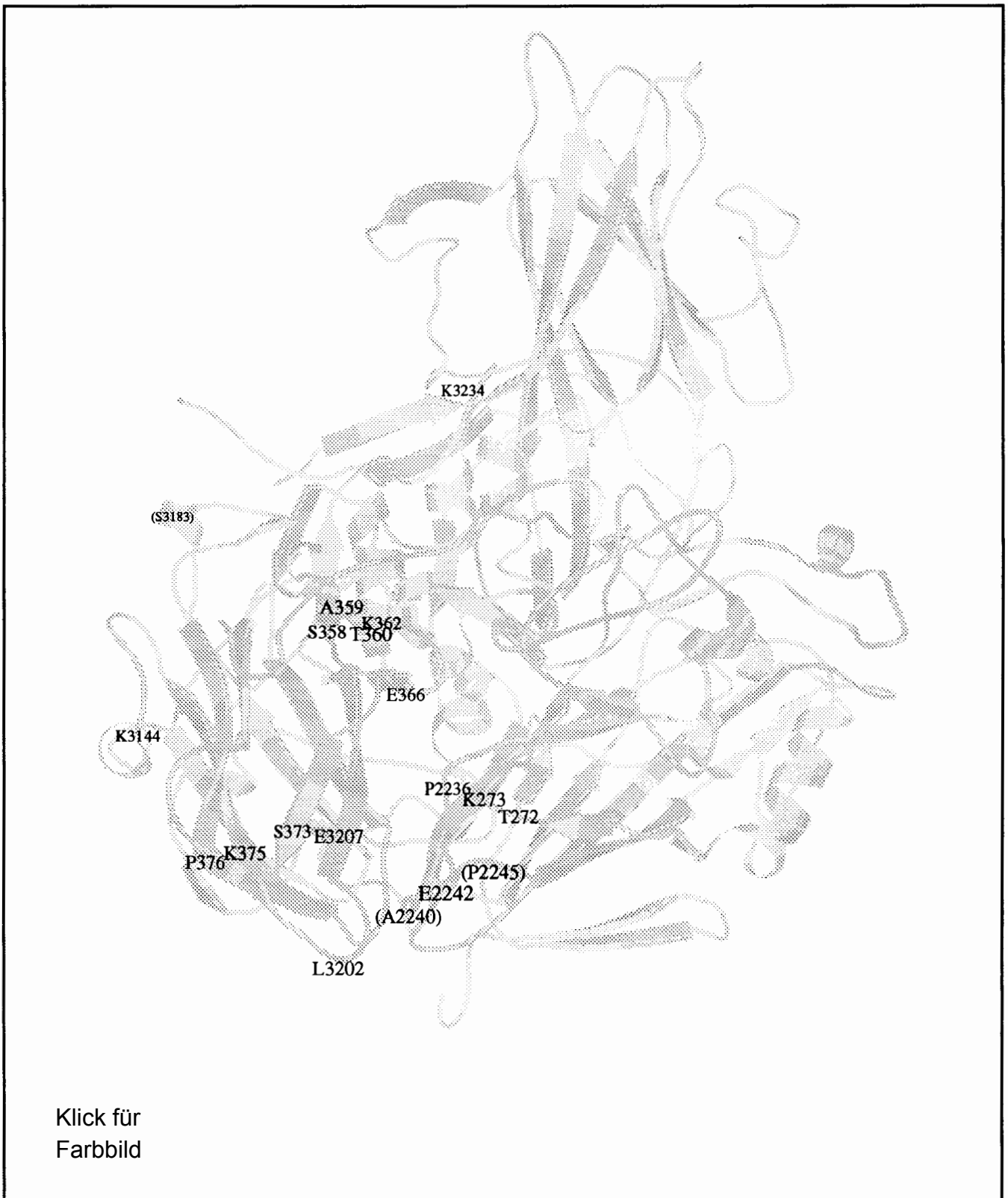


Abb.4.23C Die Oberflächen-AS der übrigen antigenen Regionen

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  $72^\circ$  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.

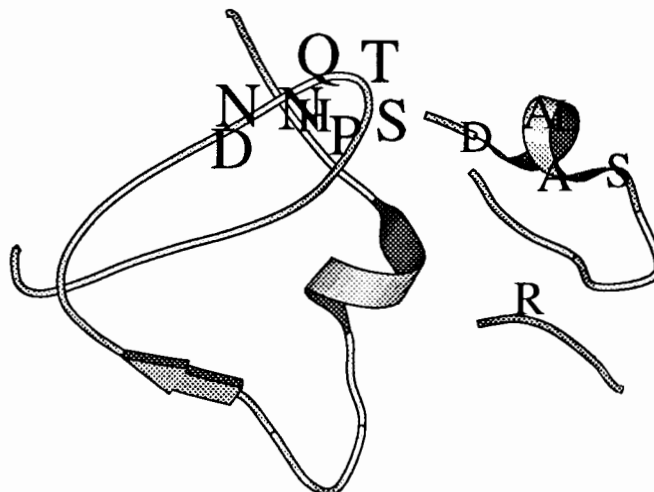
Abb.4.23A II Die Struktur der antigenen Region 1

Klick für  
Stereoansicht



Abb.4.23B II Die Struktur der antigenen Region 2

Klick für  
Stereoansicht



### 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -Puffer bei 25°C in 130 min eluiert. Ein Teilstreich entspricht dabei 10% Acetonitril.

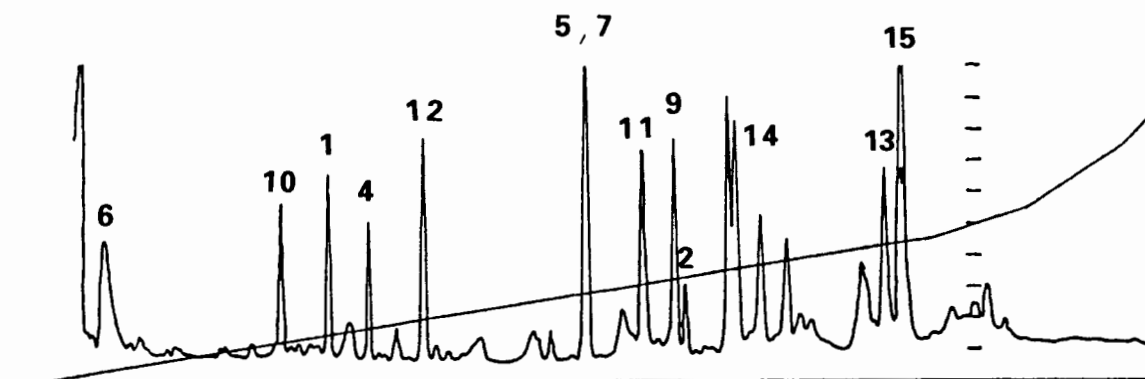


Abb. 4.24 Gradient zur Isolierung der VP2-Peptide

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  $\mu\text{l}$  aufgetragen, bei Peptid 1, 2 und 3a meist 2  $\mu\text{l}$ . 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 ?

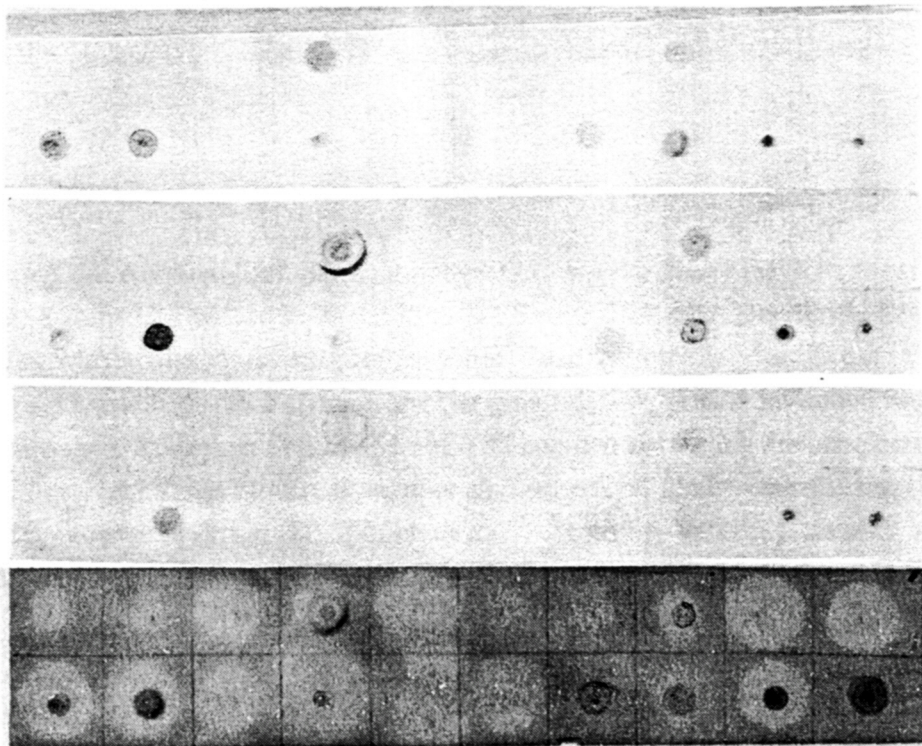
Bei allen hier abgebildeten Versuchen mit Seren wurden die Peptide auf Streifen von 2 cm x 10 cm aufgetropft. Für je ein Peptid war die Mitte eines  $\text{cm}^2$  bestimmt.

T1	PBS SDS	T3	T4	T5	-K	-K	T8	T9	T10
T11	T12	T13	T14	T15 <sup>N</sup> <sub>C</sub>	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

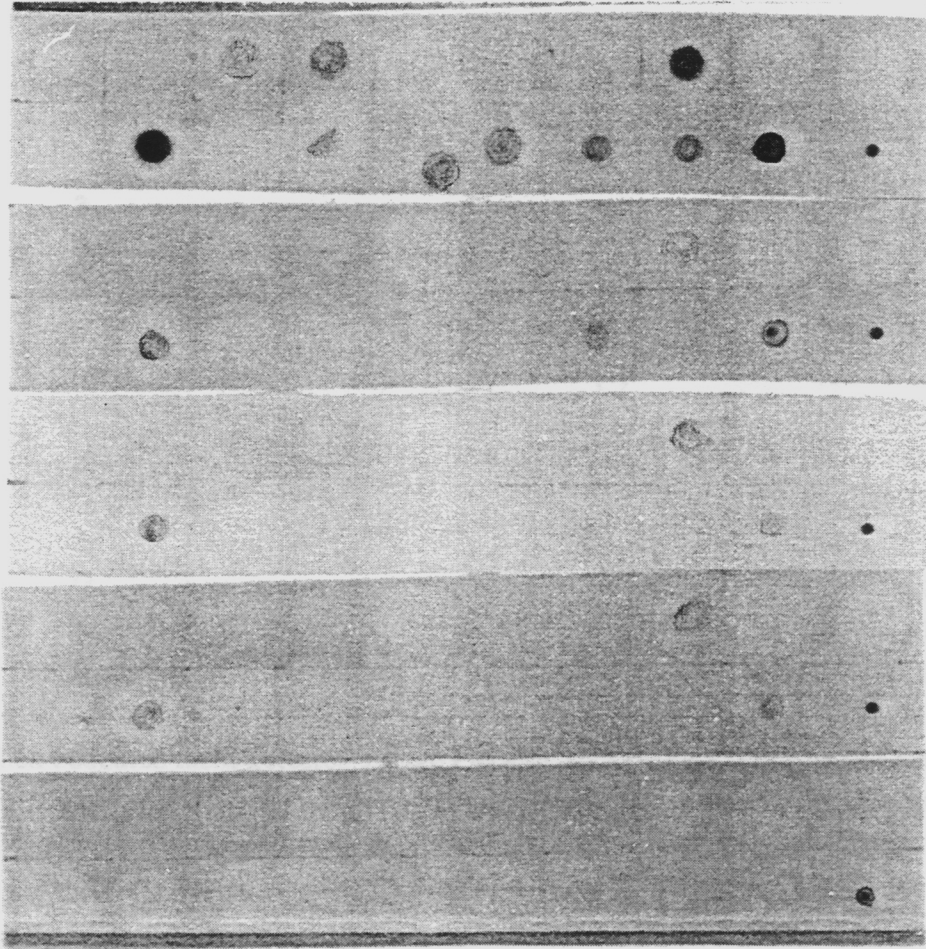


Abb. 4.26 zeigt die Abhängigkeit der Immunreaktion von der Höhe der Virusdosis bei der Immunisierung. Serum 154 wurde 1:10 verdünnt zu Serum 155 usw. Der fünfte Streifen ist eine Präserumnegativkontrolle, hier reagiert nur die Positivkontrolle des direkt aufgetragenen Primärserums. Deutlich ist die Verringerung 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

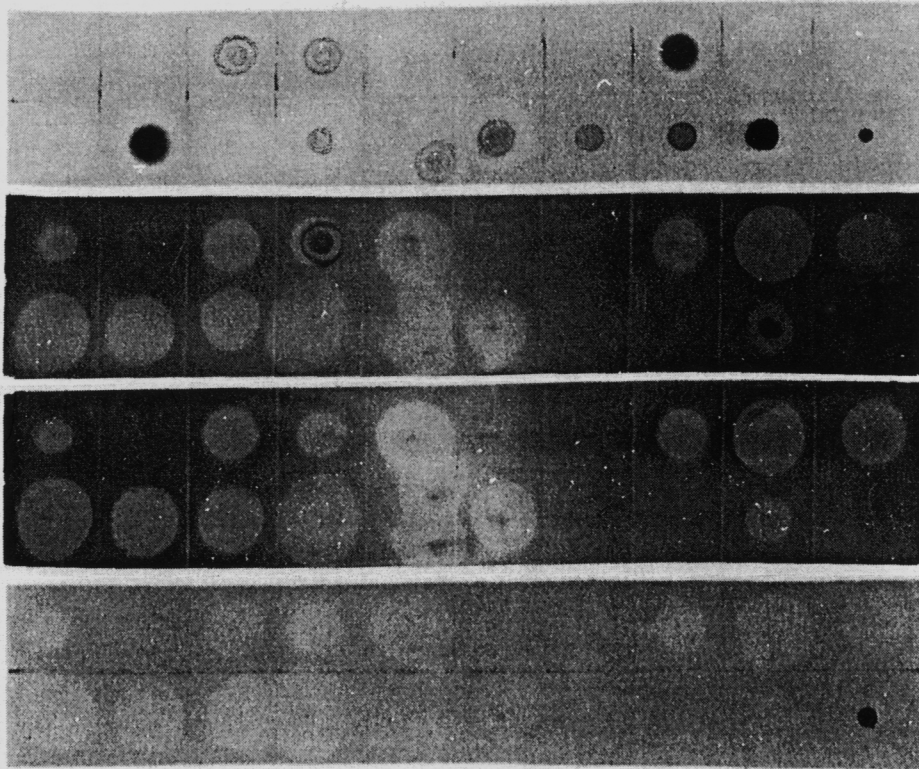
Freie Stellen bedeuten nicht getestet. Einige Flecken, so z.B. Peptid 9, sind auf den Fotos nicht mehr zu erkennen, weil die Farbreaktion nicht bei allen Peptiden stabil war. Die Liste der Reaktionen wurde gleich nach Beendigung der Färbung aufgezeichnet. **Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß polyklonale 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).

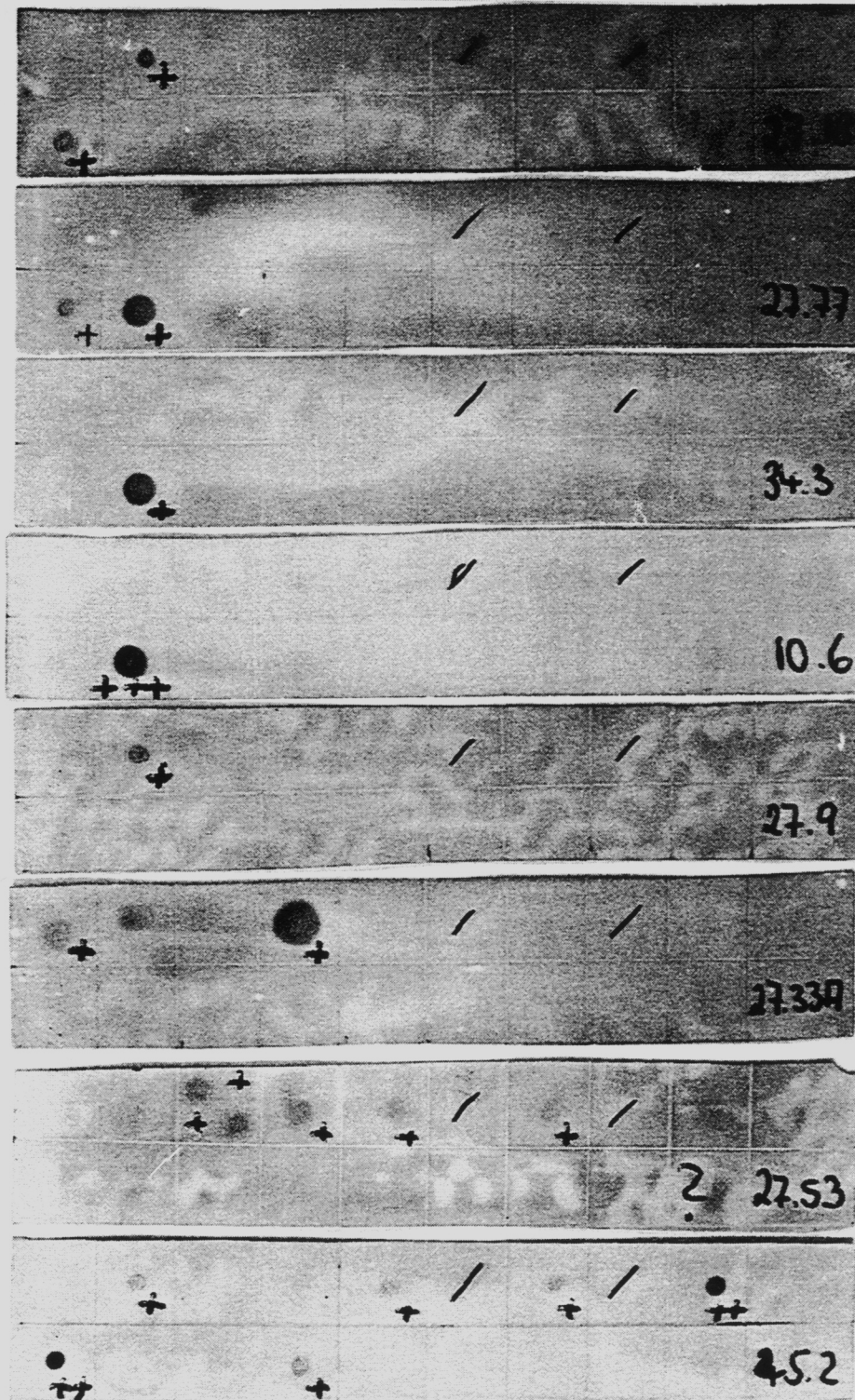


Abb.4.28 Immunreaktion monoklonaler Antikörper mit VP2-Peptiden

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 <b>SEAN</b> <u>P</u> vdQp <b>T</b> ePdVAaCr
Peptid 15	<b>SESS</b> <u>P</u> ei <u>P</u> i <b>T</b> 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

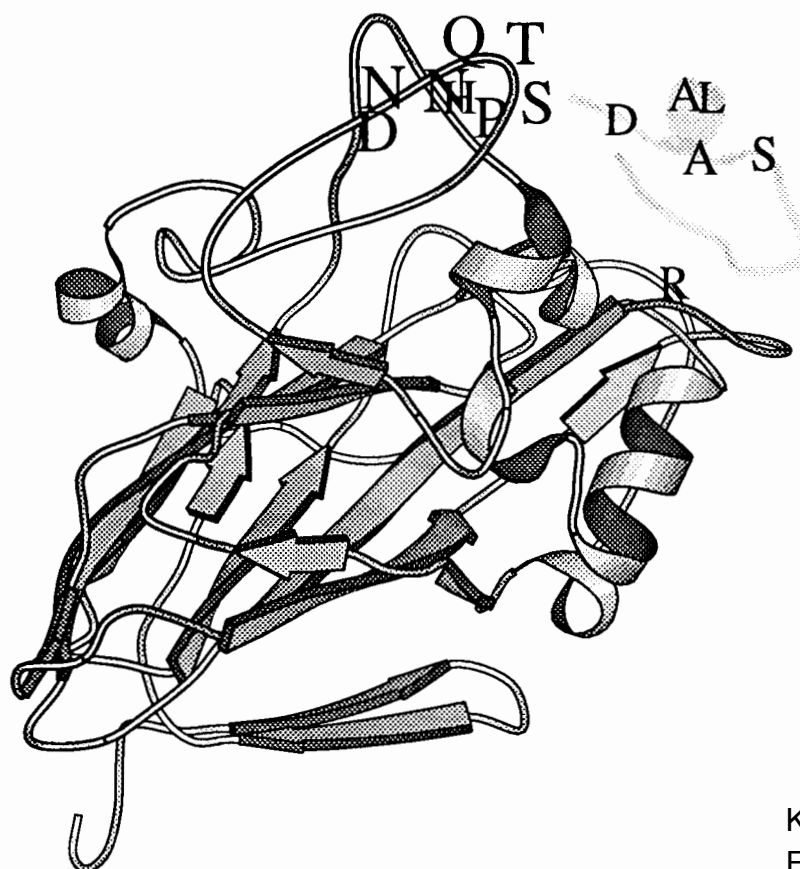
Bei den Peptiden 1, 2, 11, 13 und 15 muß also darauf geachtet werden, daß ihre immunologi-



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.



Klick für  
Farbbild

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

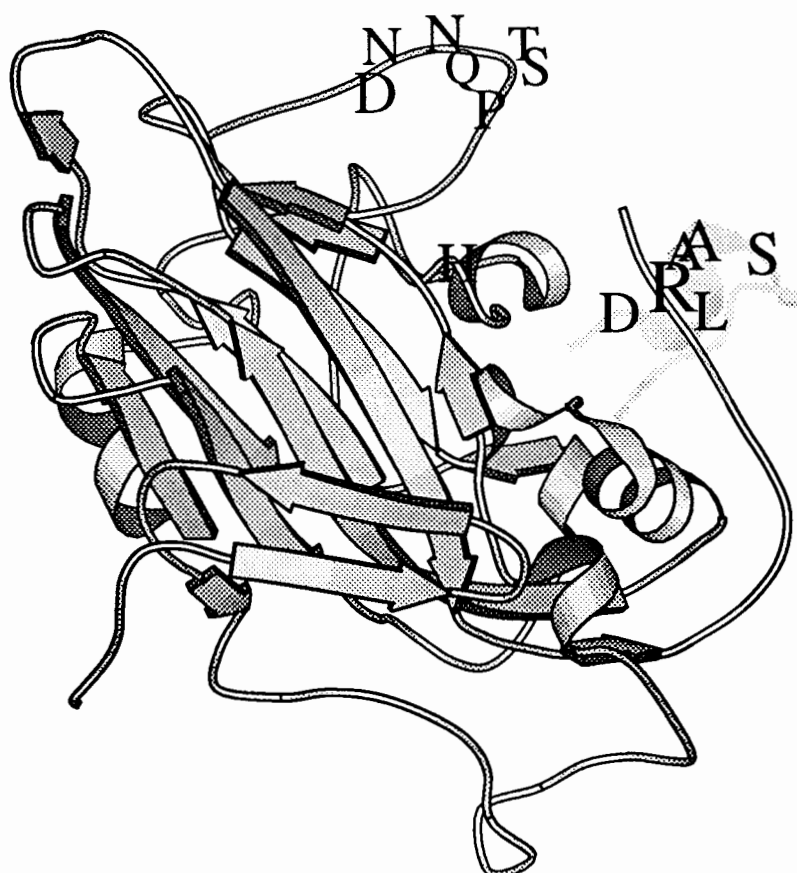
In der nächsten Darstellung, Abb.4.31, ist VP2 um  $-90^\circ$  um die X-Achse gedreht. Das bewirkt,

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

Klick für  
Farbbild

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

Klick für  
Farbbild

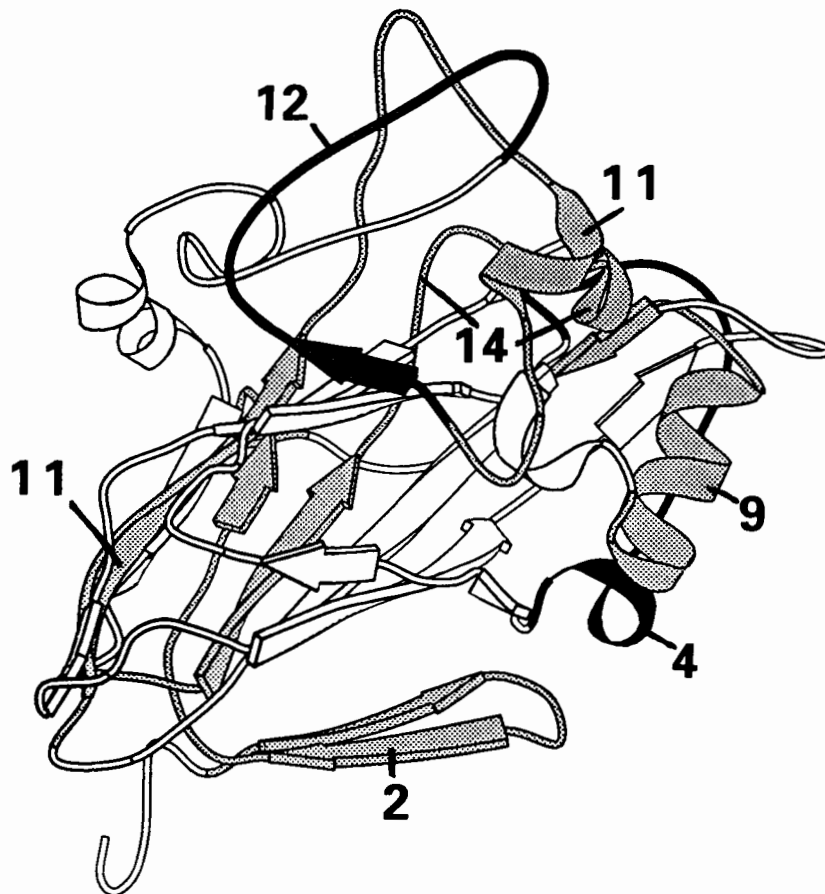
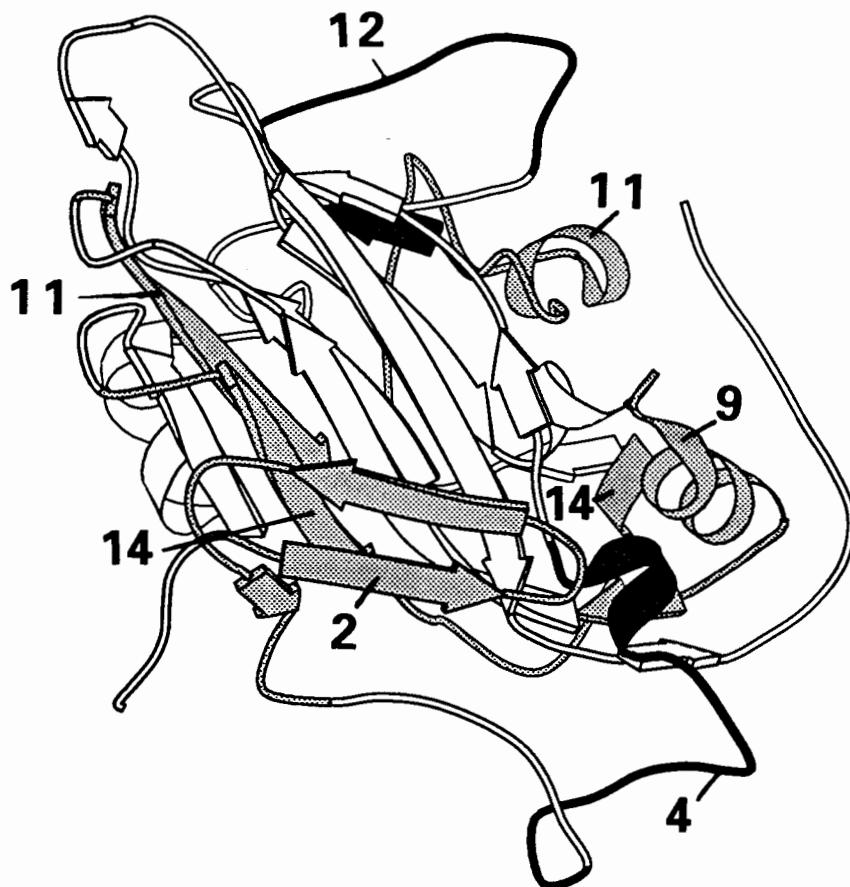


Abb.4.33 Seitenansicht von VP2 mit Immunreaktion der tryptischen Peptide

außen

[Klick für  
Farbbild](#)

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -Strang E und etwa der Hälfte der großen EF-Oberflächenschleife. Auch die helikale Struktur der EF-Schleife 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-Schleife. 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  $\beta$ -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

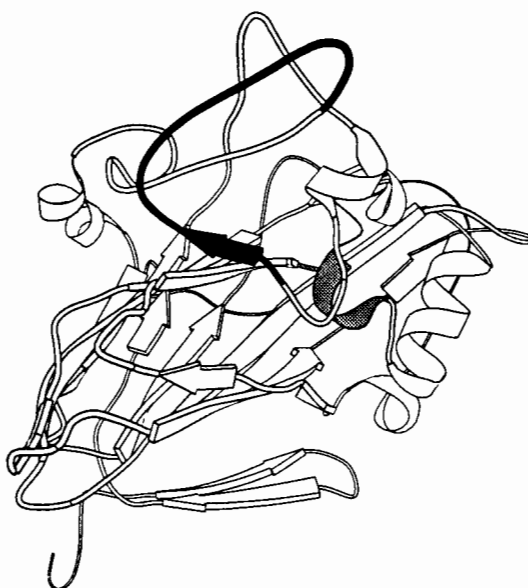
**27.77:** Die Region **2164-2170** war als Bindungsregion dieses Antikörpers angegeben. Die Sequenz liegt auf Peptid 12. Gleichzeitig reagierte der mAk auch noch mit **Peptid 11**. Da beide Peptide zusammen die große EF-Schleufe auf der Oberfläche bilden, und H2142 auf Peptid 11 auch als antigen bekannt 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 <b>TTQ</b>	AS 2013-2026
Peptid 11	VpEMcLAGDSn <b>TTT</b>	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**.

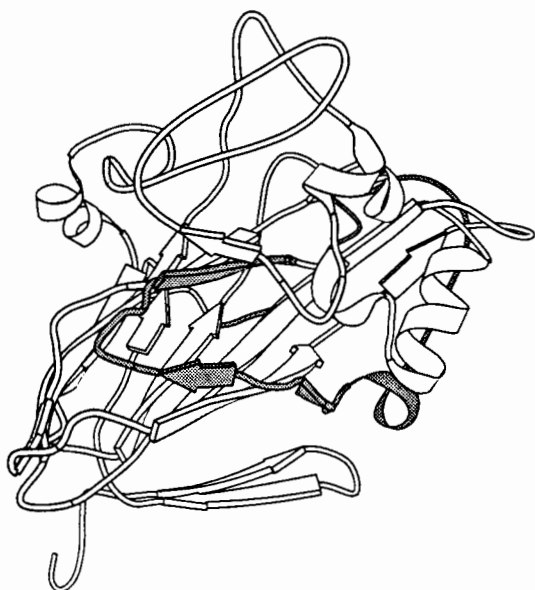
Peptid 1	<u>PNIEAC</u>	AS 2002-2007
Peptid 4	<u>PDVAAC</u>	AS 2056-2061

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

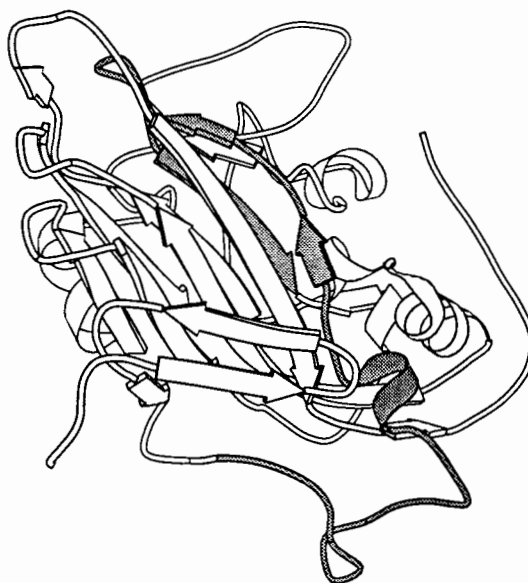
**27.53:** Das Epitop wurde neu bestimmt. Es enthält Peptid 3, 4, 5 und 7. **Peptid 3** besteht nur aus 6 AS; diese liegen alle innen, trotzdem reagiert das Peptid schwach mit 27.53. Bemerkenswert ist, daß die kurze Sequenz ein vollständiges 4AS-T-Zell-Epitop enthält. **Peptid 4** ist aus den Versuchen 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

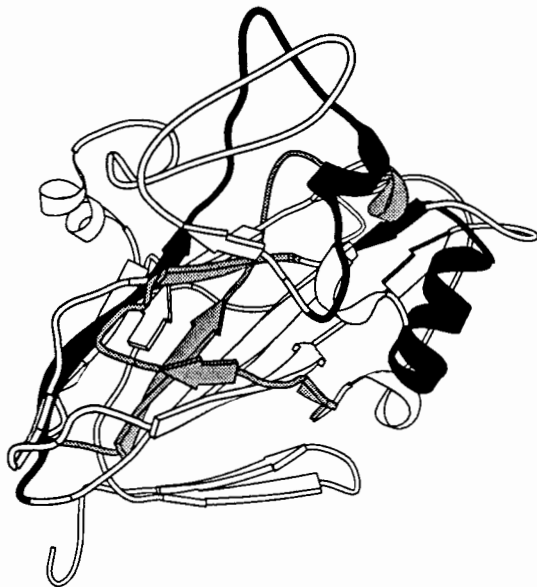
(Um die Struktur nicht zu unterbrechen, wurden die drei AS von Peptid 6 und AS 2082 mit markiert.)



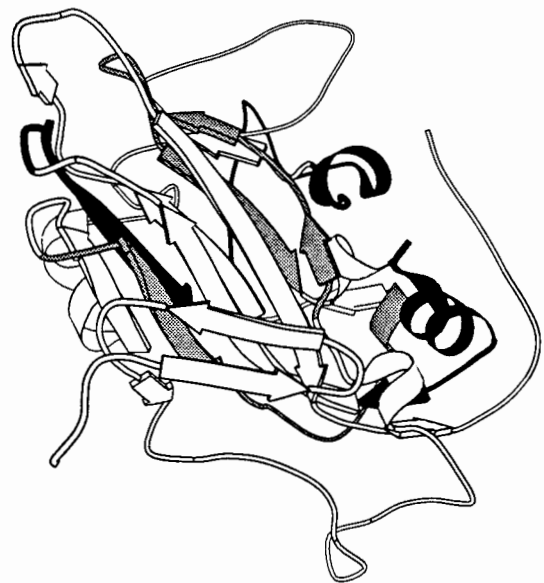
**45.2:** Das Epitop wurde neu bestimmt. Es ist sehr komplex. Der Ak reagiert mit Peptid 2, 5, 7, 9, 11 und 14. Die Reaktionen mit Peptid 9 und 11 sind deutlich stärker. Die Reaktion mit dem innen liegenden Peptid 2 läßt sich als Kreuzreaktion zu Peptid 11 erklären (siehe Ak 27.18). Die **Peptide 5 und 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)

a



b außen



innen

#### 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.**

## 5. Diskussion

Polioviren gehören zu den best untersuchten Viren überhaupt. Deshalb sind sie zur Untersuchung so komplizierter Mechanismen wie Antigenität, Antikörperbindung und Neutralisation besonders geeignet. Man kann auf vorhandene Informationen aus Sequenz, Röntgenstruktur und Mutationen antigener Regionen zurückgreifen. Durch Röntgenstruktur wird zwar die Ak-Antigen-Kontaktfläche genau bestimmt, die Wichtigkeit der einzelnen AS, die kritisch für die Bindung sind, bleibt jedoch unbewertet (Getzoff et al. 1991).

### 5.1. Der Mechanismus der Neutralisation

Multivalente Antigen-Antikörperreaktionen können Aggregate bilden und stimulieren Lymphozyten. Das können Haptene nicht. (Bhimarao et al. 1989) Zur Untersuchung des Phänomens Antigenität ist man deshalb auch auf größere Moleküle angewiesen. Die Aggregation von Lysozym durch einen mAk ist auf Dimere beschränkt. Die Arbeit mit kleinen Viren aus gleichen Untereinheiten bietet für die Erklärung der Aggregation die besten Voraussetzungen.

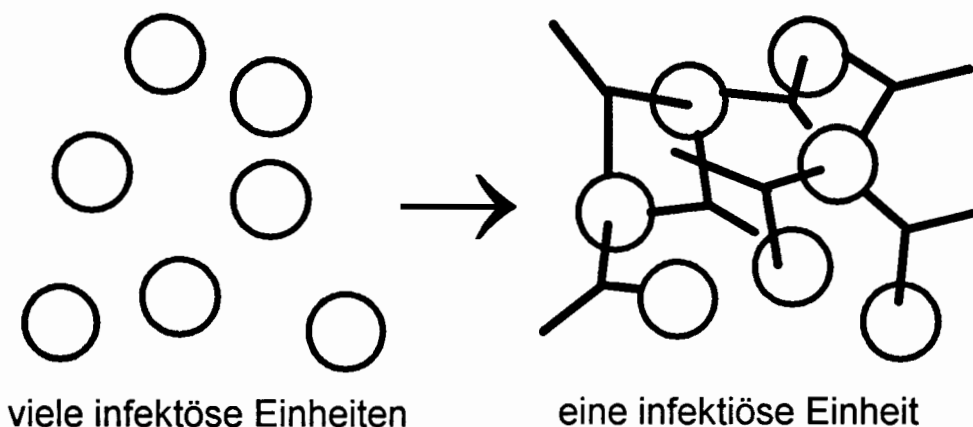
Neutralisation muß irgendetwas mit Antikörperbindung zu tun haben. Vier Möglichkeiten einer PV-Neutralisation werden diskutiert:

#### 1) Zerstörung der Virionen durch Antikörper.

Fab-Arme können in einem Abstand von 5-18nm Antigen binden. Der Abstand der PV-Epitope über die Zweierymmetriachse beträgt 12nm für Region 1, 5nm für Region 2 und 18nm für Region 3. "Die entstehende Verdrillung und Spannung der Fab-Arme bei der Antikörperbindung könnte Änderungen der Konformation des Viruspartikels bewirken, die ausreichend sind, um mit den normalen Prozessen der Infektion nicht vereinbar zu sein." (Rossmann & Rueckert 1987) Wären solche Änderungen so groß, daß die Hülle geöffnet wird, sollte sich dies an einer Änderung der Absorption von Virussuspensionen messen lassen.

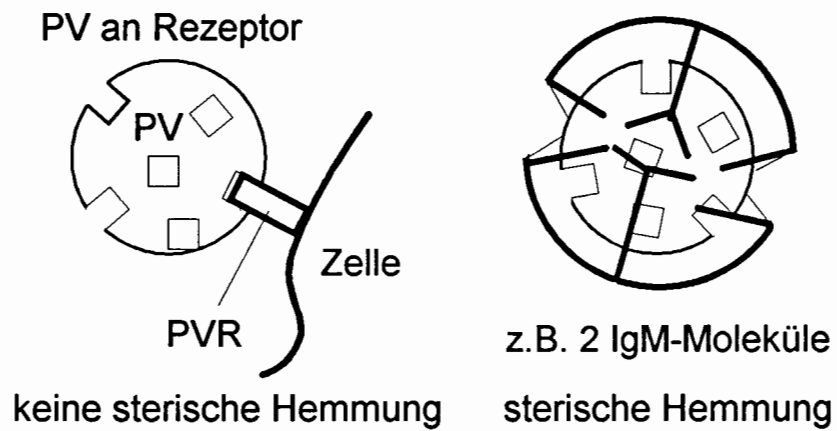
Nach Vrijsen et al. (1993) können Ak Viren nur bei niedriger Ionenstärke aufbrechen.

#### 2) Aggregation.



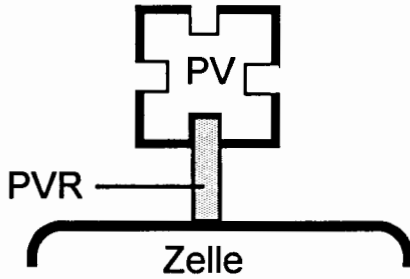
### 3) Sterische Hinderung der Infektion durch Antikörper. (z.B. 2 IgM)

Sterische Hinderungen der Infektiosität treten nur bei großem Ak-Überschuß auf (Vrijnsen et al. 1993)

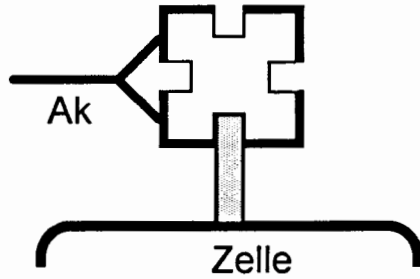


4) Ein unbekannter Mechanismus. (z.B. Eine andere Aufnahme des Virus mit Antikörper)

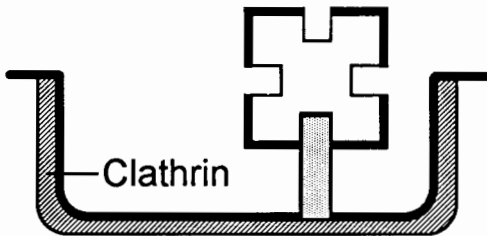
PV-Adsorption



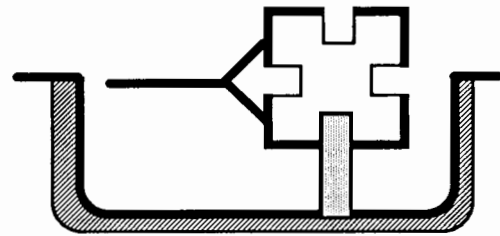
PV-Ak-Adsorption



PV-Penetration

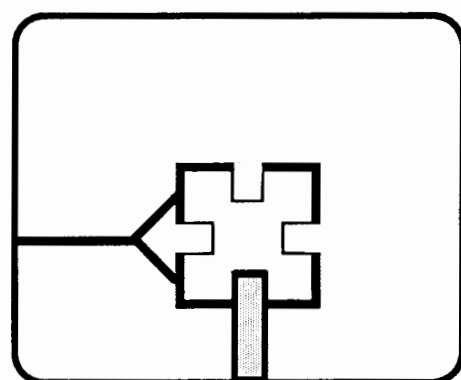
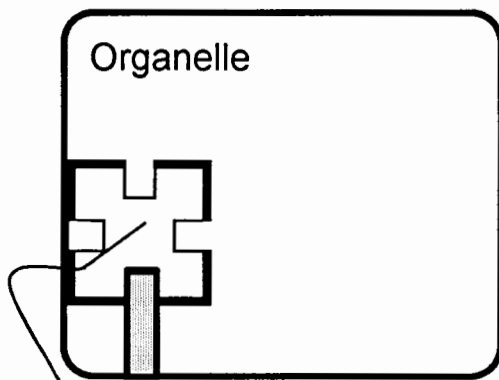


PV-Ak-Penetration



Aufnahme der PV mit und ohne Ak in zelluläre Vesikel

Aufnahme in Zellkompartiment (z.B. Lysosom, Endosom)



Zytoplasma  
RNS entweicht bei Kontakt zur Membran

kein Kontakt durch Ak

Infektion

RNS-Abbau

## 5.2. Untersuchungen der Aggregation und Virusstrukturänderung

Es war bekannt, daß pH-Wertänderungen in die Struktur von Polioviren eingreifen. Um zu klären, ob solche Veränderungen auch bei Zugabe von Antikörpern stattfinden, wurden sowohl Säure- und Basezugabe, als auch Seren- und Antikörperzugabe untersucht.

Durch ein neu erstelltes Programm (Bergmann & Bergmann 1988) gelang es, bei Messung der optischen Dichte der Virussuspensionen, die Absorption der Viren selbst von der Streuung der Virusaggregate zu trennen. (Englander & Epstein, 1957)

### 5.2.1. Wirkungen pH-Titration

Während die Spektren der optischen Dichte für alle drei Typen noch sehr ähnlich aussehen, macht die Auftrennung deutliche Unterschiede klar. Alle drei Virustypen zeigen **Aggregation** und **stärkere Knäuelung der RNS bei Säurezugabe**. Am stärksten ist der Effekt bei PV1. Bei pH4,5 treten bei Typ 1 und 2 sprunghaft Aggregation und Strukturänderungen auf. Eine neue stabile Form wird bei pH3 erreicht und bis pH2 erhalten. pH2 zerstört Polioviren (pH>9 auch). Die Aggregate sind abzentrifugierbar. Bei pH3 erfolgt vollständige Sedimentation. Die Infektiosität geht in die Aggregate über.

Eine unterschiedliche Reaktion der Virustypen auf äußere Bedingungen ist auch aus der Dissoziation bekannt. Typ 3 dissoziiert sehr langsam bei 25°C in 9M Harnstoff, Typ 2 dissoziiert schneller als Typ 1 Mahoney (Drzeniek et al. 1979-1980). Meine Messungen der optischen Dichte stehen im Einklang mit denen aus Fluoreszenzuntersuchungen (Koch & Koch 1985), die auch zeigen, daß sich die Struktur der PV-Partikel beim Wechsel von pH7 auf pH4,5 verändert. Die von Mandel 1962 gefundene verschiedene Empfindlichkeit der Virustypen gegenüber pH-Werten in SDS wird in meinen Titrationskurven auch ohne SDS wiedergefunden.

Polioviren werden durch  $Mg^{2+}$ -Ionen gegenüber Säure stabiler. Zugabe von  $Mg^{2+}$  zu Ribosomen bewirkt Abgabe von  $H^+$ .  $Mg^{2+}$  scheint ionische Brücken zwischen den RNS-Ketten der Untereinheiten herzustellen. (Kliber et al. 1976) Dieser Effekt könnte auch die höhere Stabilität von PV-Partikeln in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen erklären. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Ionen die Virushülle durchdringen können. Sowohl  $Ca^{2+}$  als auch  $Mg^{2+}$  heben die Aggregation nicht auf, wie Floyd und Sharp fanden (1978), sondern zögern sie über Stunden hinaus. 1% SDS verhindert pH-Aggregation.

15% Saccharose stabilisieren Typ 3 Leon auch ohne  $MgCl_2$  (Srivastava 1989). Dies stimmt mit meinen Ergebnissen überein. 30% Saccharose verzögern die Aggregation, und die RNS-Konformationsänderungen wurden fast vollständig verhindert.

Die optische Dichte (OD) bei 260 nm gibt Auskunft darüber, wie dicht die Basen der Nucleinsäure gepackt sind (base-stacking; Wilson 1988) (die Absorption des Proteins ist demgegenüber vernachlässigbar klein). Dichte Packung bewirkt niedrige OD, gelockerte Struktur hohe OD. Im Virion wird ein Teil der RNS-Struktur durch das Protein bestimmt. Die Zugabe von Substanzen, die das Virion dissoziieren oder destabilisieren, führt zunächst zu einer Abnahme der OD, weil die Interaktion zwischen Protein und RNS gestört wird. Nach Willingmann et al. (persönliche Mitteilung und Poster Berlin 1988) schwillt die Proteinhülle von Polioviren nach Eintritt in die Zelle an. Durch das Anschwellen der Proteinkugel verliert die RNS den Kontakt zum Protein. Die RNS kann sich darauf in eine Form stärkster Knäuelung zusammenziehen. Dieser Vorgang scheint dem bei Zugabe von Säure ähnlich zu sein, wie die OD-Untersuchungen

vermuten lassen. Wird freie RNS z.B. erhitzt, so tritt ein starker hyperchromer Effekt ein, weil durch die Entfaltung mehr Licht absorbiert wird.

Abb.5.1 Poliovirus-RNS verläßt die Virushülle



Bei Rücktitration der Poliovirus suspensionen auf neutrale pH-Werte lösen sich die Aggregate auf, und die Absorption nimmt Ausgangswerte an. Die Infektiosität kehrt mit der Auflösung der Aggregate zurück. Schon 1962 beschrieben Galasso und Sharp, daß die Infektiosität von Virus suspensionen sinkt bei steigender Aggregation; die benutzten Vacciniaviren bleiben aber individuelle, infektiöse Viren. Dies ist nach meinen Untersuchungen auch bei PV der Fall. Bleibt die RNS im Virion, so kann ihre Struktur bei Wiedereinstellung für die Viren neutraler Bedingungen vollständig zurückgewonnen werden. Hierfür scheint jedoch der Zusammenhalt der Hülle Voraussetzung zu sein. Wird die Hülle z.B. bei  $\text{pH} < 2$  zerstört, so kommt es nicht zur Wiederherstellung der Struktur der viralen RNS. Mandel (1971) nahm an, daß durch Hitze, neutralisierende Antikörper oder hohe UV-Dosen Polioviren, normalerweise in "A-Form", irreversibel in eine "B-Form" überführt würden. Die beiden Formen sollten verschiedene isoelektrische Punkte haben, die A-Form  $\text{pH} 7$ , die B-Form  $\text{pH} 4,2$ . Zwischen den Werten sollten keine Übergangsformen sein. Wie meine pH-Titrationen zeigen, gibt es tatsächlich einen ziemlich abrupten Übergang in der PV-Struktur bei  $\text{pH} 4,5$ . Die Veränderungen sind bei Rücktitration jedoch vollständig **reversibel**. Auch die Infektiosität wird zurückgewonnen.

Hochgereinigte Viren fokussieren nach Untersuchungen in unserem Labor immer bei  $\text{pH} 7$ , was der A-Form von Mandel (1971) entspricht. Aber auch bei  $\text{pH} 4,5$  findet man Viren, die in den Aggregaten unverändert sind und bei Neuauftrag wieder als A-Form fokussieren. (Tessmer & Dernick 1987) Dies entspricht der vollständigen Reversibilität der optischen Dichte bei Säure-Base-Titration in meinen Versuchen. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die IEF-Versuche von Vrijzen et al. (1983). Eine stabile B-Form scheint es somit nicht zu geben.

### 5.2.2. Wirkung der Serumtitration

Die Serumzugabe zu Poliovirus suspensionen führte allein zur Zunahme der Streuung, also der **Aggregation** der Viren. **Eine Strukturänderung, die stark genug wäre, die RNS zu berühren, trat nicht ein.**  $\text{Ca}^{++}$  stört die Aggregation durch Seren nicht.

Antikörper sollen nach Mandel (1976) Polioviren gegen ein Enthüllen stabilisieren. D.h. letztlich, daß die RNS in Virionen mit Antikörpern sogar geschützter sein müßte. Das scheint in der Zelle aber nicht der Fall zu sein, weil die Anwesenheit von Antikörpern zum Abbau der Infektiosität führt. Allerdings zeigen meine Versuche, daß die Struktur der Viren durch Seren nicht verändert wird, zumindest nicht in so gravierender Art und Weise wie durch sauren pH-Wert. Mandel erkannte, daß kein irreversibler Abbau der Polioviren durch Aggregation selbst stattfindet, weil sich infektiöses Virus aus Banden der "B-Form" isolieren ließ. Dies entspricht

der Auflösung der Aggregate nach Rücktitration in meinen Experimenten. Auch aus Virusaggregaten mit Antikörpern können wieder infektiöse Polioviren isoliert werden. Die Bindung eines Antikörpers allein macht keine Neutralisation aus. Dazu sind andere Schritte nötig. (Mandel 1976) Deshalb scheidet Aggregation als Endstufe der Neutralisation aus (Mechanismus 2, 5.1.).

HRV ist PV sehr eng verwandt. Ein HRV-Fab-Komplex ist untersucht worden. Der verwendete Ak bindet HRV bivalent, damit gehört er zu einer besonderen Untergruppe von Antikörpern, die nicht aggregieren. (Smith et al. 1993) Diese Eigenart wird dadurch ermöglicht, daß zwei Epitope auf dem Virus räumlich gleichzeitig vom Ak zu erreichen sind. Meine Versuche zeigen jedoch eindeutig, daß ein großer Teil der Ak aggregiert, also nicht bivalent auf einem Viruspartikel bindet. Bivalent bindende Ak müssen einen so kleinen Anteil der Ak in Seren darstellen, daß sie in den Serumversuchen nicht auffallen. Die Anlagerung einzelner Ak an einzelne Viren kann auch nur in der Änderung der Streuung sichtbar sein, die unter den größer werdenden Aggregaten verschwindet. Weiter ist bekannt, daß auch Virusaggregate und Viren mit Antikörpern in Zellen aufgenommen werden. Damit entfällt auch die sterische Hemmung als Endpunkt der Neutralisation (3).

Auch Ak, die die Fähigkeit haben, Polioviren zu zerstören, können nicht in großer oder wirksamer Menge in Seren vorhanden sein, weil das an einer Änderung der Absorption sichtbar wäre; (1) entfällt. D.h., der eigentliche Mechanismus der Neutralisation ist unbekannt. Ak sind eine Art "Zulieferer". Bekannt ist, daß es Ak mit unterschiedlichen Funktionen gibt, einige neutralisieren Virus, andere binden nur Virionen oder Teilpartikel.

Es ist bekannt, daß bei gleichen Ak- und Antigenkonzentrationen in verschiedenen immunologischen Tests unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden (Pettit et al. 1987). In diesem Sinne ist die -wenn auch grobe- Übereinstimmung zwischen der Serumkonzentration, die zur Neutralisation benutzt wird, und der zum Auslösen der Aggregation in Lösung zu verstehen. Vergleicht man die Werte aus Mikroneutralisationstests oder Neutralisationstests mit denen der optischen Streuung nach Serumzugabe, so wird deutlich, daß die Werte proportional sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch Seren nicht die Struktur der RNS geändert wird, also die innere Form und große Teile der Kapsidhülle auf jeden Fall erhalten bleiben, wenn Ak binden.

### 5.2.3. Wirkungen monoklonaler Antikörper

Wie aus der Untersuchung von Seren erwartet, reagieren die meisten mAk, indem sie PV ausschließlich **aggregieren**, IgM 7J3, IgM 19.9 und IgG 19.2. Die Verschiedenheit der Reaktion unterschiedlicher, monoklonaler Antikörper besteht darin, daß in die optische Dichte Unterschiede in Form und Größe der Aggregate mit eingehen; diese sind mit Sicherheit nach mAk verschieden.

Der mAk IgG 7J6 war als **Ausnahme** bekannt (Uhlig et al. 1990), weil er Typ 2, gegen den er hergestellt wurde, wesentlich besser neutralisiert als Typ 1, den er kreuzneutralisiert. Wie die Titrationen zeigen, verhält sich 7J6 gegenüber Typ 1 so wie alle anderen Ak, er aggregiert PV1. Pipettiert man jedoch 7J6 zu Suspensionen des homologen Types 2, so läuft ab einer kritischen Konzentration eine völlig andere Reaktion ab, die jede Messung unmöglich macht. Die optische Dichte fällt schlagartig stark ab, und auf dem Küvettenboden entsteht ein Niederschlag. Ungewöhnlich starke Aggregation müßte die optische Dichte zunächst stark ansteigen lassen;



das ist nicht der Fall. Der Effekt erinnert eher an das Zerfallen der Viren bei sehr sauren pH-Werten; nur daß in diesem Fall die Ak mitgerissen werden müßten.

Anfängliche Versuche, die unterschiedliche Reaktion des 7J6 über Homologien der erkannten Sequenz von P2236 bis P2245 mit vorhandenen Homologien in VP1 und VP3 zu erklären, schlugen fehl, weil die betreffenden Sequenzen in VP1 und 3 ganz andere Strukturen zeigten.

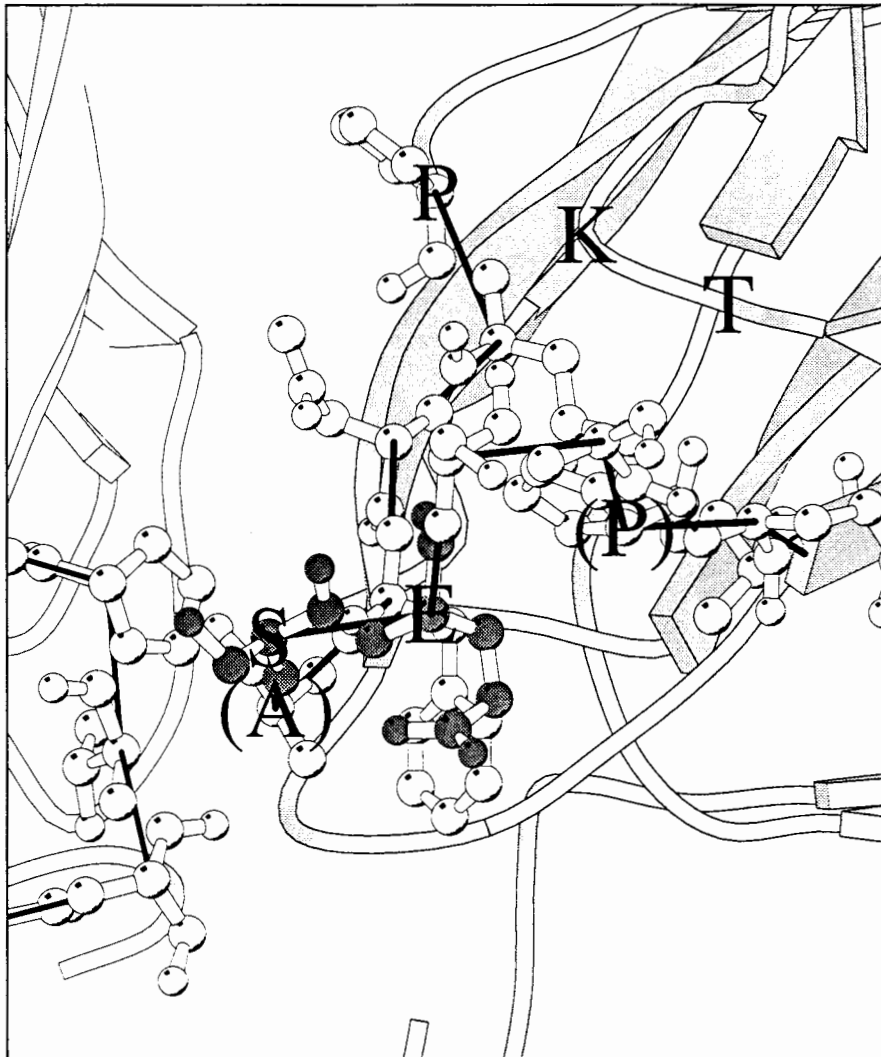
Abb.5.2 zeigt einen Teil des möglichen Epitopes von 7J6. Sehr hoch auf der Oberfläche liegt E2242, das als antigen bekannt ist. PV1-Mutanten, in denen E2242 zu D verändert ist, können von 7J6 nicht mehr neutralisiert werden; das gleiche gilt für die entsprechende AS E2241 von Typ 2.

E2242 und S2241 sind mit dunkleren Kugeln (balls and sticks) eingezeichnet. Die hellen Kugeln sind Moleküle der HI-Schleife von VP2, von rechts kommend, und Moleküle der HI-Schleife vom VP3 desselben Protomers, von links kommend. Zeichnet man die Moleküle der DE-Schleife von VP2 mit ein, so ist der Raum an der Spitze von VP2 ausgefüllt. Neben dem F2239 liegt dann ein zweiter Phenylring. Beide Ringsysteme könnten durch ein D statt E2242 behindert werden, was die Struktur beeinträchtigen würde. Aber auch die Ladungsänderung allein dürfte 7J6 beeinflussen.

S2241 entspricht T2240 von Typ 2. Die AS liegt an einer kritischen Stelle für die Stabilität des Virus, zwischen VP2 und 3. Eine **zusätzliche Methylgruppe** hat eventuell die Wirkung, das Virus in Anwesenheit von Antikörpern an der dreizähligen Achse zu destabilisieren, was ein Zerfallen von Typ 2 erklären würde. Eventuell sind **auch noch andere AS** an diesem Unterschied zwischen Typ 1 und 2 beteiligt. Die besondere Neutralisationsstärke des Antikörpers gegenüber seinem homologen Virus bestände somit in seiner Fähigkeit, Typ 2 zu destabilisieren.

Der mAk 7J6 reagiert nicht mit 14S-Partikeln von PV1. Er scheint nur ganze Virionen zu erkennen. (Schnittger 1990) Wahrscheinlich überschreitet der Fußabdruck des Antikörpers die Protomer- und Pentamergrenzen, was seine Empfindlichkeit für Strukturänderungen noch unterstreicht.

Abb.5.2 Die Lage von S2241 und E2242 in Typ 1



### 5.3. Computervorhersagen

Computerprogramme zur Suche von Homologien unterscheiden sich erheblich in dem, was sie suchen. Deshalb muß das Programm auf das Problem abgestimmt sein. (Day & McMorris 1992) So wurde z.B. für das grobe Alignment der PV-Sequenzen ein anderes Programm benutzt als für die Suche nach unspezifischen Kreuzreaktionen.

Nach den Versuchen von Scott & Smith (1990) mit riesigen Mengen verschiedener Peptide aus Phagen ist es möglich, daß Antikörper auch Peptide mit nicht homologen AS erkennen. Solche lassen sich durch Suchprogramme also nicht ausschließen. Offensichtlich ist zur Bindung in der Kreuzreaktion vor allem die Einhaltung einer bestimmten äußeren Struktur notwendig, dabei kann die Zahl der gleichen AS sehr gering sein (Sibbald & White 1987).

Da einzelne Programme zur Antigenitätssuche immer zu Fehlern führen, kommt es bei Benutzung nur eines Programmes leicht zu Überinterpretationen. Um dies zu vermeiden, sollten verschiedene Programme nebeneinander ausgeführt werden. (Schulz 1988) Von den 14 B-Zell-Programmen, die mir z.B. zur Verfügung standen, sind in dieser Arbeit nur drei aufgezeichnet.

### 5.3.1. B-Zell-Vorhersagen

Im Durchschnitt aller bekannten Proteine sind 50% aller AS in Turns und Schlaufen, 50% in regelmäßigen Strukturen (25% Helices, 25% Faltblatt). In Helices und Faltblättern wird wenig Antigenität gefunden, außer an den Enden dieser Strukturen. Programme wie die von Chou & Fasman (1978) sagen die Struktur von Proteinen zu 55-70% richtig vorher. Aber auch durch die Strukturdaten der Brookhaven-Datenbank lassen sich die AS oft nicht eindeutig zuordnen, weil die natürliche Struktur zahlreiche Zwischenformen zuläßt. Meist sind dann mehrere Eigenschaften angegeben. Nur die Programme von Karplus & Schulz (Beweglichkeit) (1985) und Parker et al. (Hydrophilie der betreffenden AS in Einheitspeptid, HPLC, mit Einbau anderer Programme) (1985) geben statistisch bessere Vorhersagen zur Antigenität als die übrigen. (Pellequeur et al. 1991, van Regenmortel 1990). Meine eigenen Beobachtungen wurden durch die Pellequers und van Regenmortels bestätigt. Trägt man Beweglichkeit, inverse Packungsdichte, Zugänglichkeit und weniger wichtig Oberflächenlage auf, so entsteht ein Maß für immunologische Reaktivität. Die zur Zeit vorhandenen Vorhersagen der Antigenität aus Daten der Primär- und Sekundärstruktur sind aber noch nicht 100%ig zuverlässig. (Getzoff et al. 1991)

Mit Computerdaten berechnete Veränderungen oder Nichtveränderungen der Struktur beim konservativen Austausch von AS lassen sich in der Immunreaktion im Experiment wiederfinden (Feller & Collett 1992).

Obwohl die Anzahl der Röntgenstrukturdaten zur Zeit stark zunehmen, bleibt diese Methode sehr aufwendig, so wird es auf lange Sicht nicht möglich sein, große Mengen an Antigen-Antikörperkomplexen zu untersuchen. Es ist daher wichtig, durch andere Methoden der Lage und Struktur von Epitopen näher zu kommen. Computeruntersuchungen bieten einen größeren, vorläufigen Überblick. Zusammenfassung siehe Abb.4.19.

Wie Tabelle 4.7 zeigt, sind die drei **am stärksten immunologisch reagierenden Peptide**, 4, 11 und 12, auch die mit der größten **Hydrophilie (C)**, **Knickwahrscheinlichkeit (B)** und **Flexibilität (F)**. Knickwahrscheinlichkeit alleine (Peptid 1, 10 oder 15) oder Flexibilität allein (Peptid 2) reichen nicht aus, dem Peptid starke Immunogenität zu verleihen.

### 5.3.2. T-Zell-Vorhersage

Schon vor 30 Jahren gelang es Anderer (1963) Ak gegen Peptide des Hüllproteins von TMV herzustellen. Peptide haben einige Vorteile gegenüber infektiösen Keimen. Sie können definiert hergestellt werden und sind sehr haltbar; ihre Massenproduktion ist nicht aufwendig; nach ihrer Herstellung sind keine weiteren Aufarbeitungsschritte nötig. Für die Herstellung von geeigneten Peptiden ist jedoch detailliertes Wissen darüber notwendig, was die Peptide zu immunogenen Peptiden macht. Peptide allein sind wenig immunogen. An Trägerproteine gebundene Peptide, dimere oder polymere Peptide sind erfolgreicher. Heute wird zunehmend die Nachbarschaft von T-Zellepitopen für essentiell gehalten. (Brown 1992)

Nachdem für kleinere Moleküle wie 2.4-Dinitrophenol die Wichtigkeit eines T-Zell-Epitopes in der Nähe ( $<90\text{\AA}$ ) zum Erreichen von Immunogenität gezeigt worden ist, konnte nun auch für den N-Terminus von VP1 von Sab1 ein solcher Zusammenhang gezeigt werden (Lewis & Feng 1992). Für die Untersuchungen wurden die Peptide AS70-80 oder AS70-83 benutzt. Diese Sequenz weist nur mit einem Computerprogramm eine amphipatische Helix am Ende der Sequenz auf. Dicht dahinter  $>AS80$  wären nach meinen Untersuchungen mehr T-Zell-Epitope zu erwarten, was eventuell zu stärkeren Reaktionen geführt hätte. In Mäusen und Menschen sind beide

Peptide immunogen. Die Stelle liegt beim intakten Virus innen, wird aber bei der Infektion nach außen gestülpt.

Aus Mäusen sind polioviruspezifische Lymphozyten (CD4-positive T-Helferzellen) isoliert worden, die gegen PV1 oder VP1 oder synthetische Peptide von VP1 aus PV1 gerichtet sind. Die Epitope unterscheiden sich von den B-Zell-Epitopen, den Antikörperbindungsepitopen. Bei der Maus zeigte sich, daß die T-Zell-Epitope vorwiegend in VP1 (nicht VP2 oder VP3) liegen. - Laut Vorhersage sind jedoch in allen VPs T-Zell-Epitope vorhanden. Nicht jede Art und nicht jedes Individuum reagiert jedoch auf jedes T-Zell-Epitop. - Besonders stark induzierten AS 1007-1024, AS 1100-1109 und AS 1202-1241 die T-Zell-Proliferation, allerdings nicht in allen Mäusen und nicht so stark wie ganzer PV1, Mahoney. Während das kurze Stück AS 1100-1109 Proliferation auslöste, zeigte AS 1091-1109 keine Reaktion, was die Wichtigkeit der Struktur betont. Es fällt auf, daß die T-Helfer-Epitope in VP1 mit den neutralisierenden Epitopen zusammen fallen; B- und T-Epitope liegen physikalisch nah zusammen. Es wird vermutet, daß effektive Antikörperbildung abhängig ist von der Nähe der B- und T-Zell-Determinanten auf einem Antigenfragment. (Kutubuddin et al. 1992a) Obwohl eine ganze Reihe von Sequenzen der großen VPs T-Zellmotive enthält, reagieren nur die wenigen neben B-Zell-Epitopen. In dem verwendeten Mausstamm reagierte VP2 nicht, trotz einer Erkennungssequenz neben der Region 2164-2172. (Kutubuddin et al. 1992b)

Die ersten 190 AS von VP2 enthalten auffallend viele 4- und 5-AS-T-Zell-Motive. Dies mag bewirken, daß auch schwächer B-zell-immunogen wirkende Peptide Antikörper hervorrufen. Peptid 4 besitzt selbst kein T-Zell-Motiv, aber ein 4-AS-Motiv liegt nah genug, die B-Zell-Antwort zu stimulieren. Peptid 9 und 11 besitzen beide selbst ein 4-AS-Motiv und je ein 5-AS-Motiv liegt in der Nähe. Peptid 12 besitzt von beiden Motiven eines in der Sequenz selbst. Es wäre günstig zu überprüfen, ob die Peptide 9, 11 und 12 für sich allein immunogen sind.

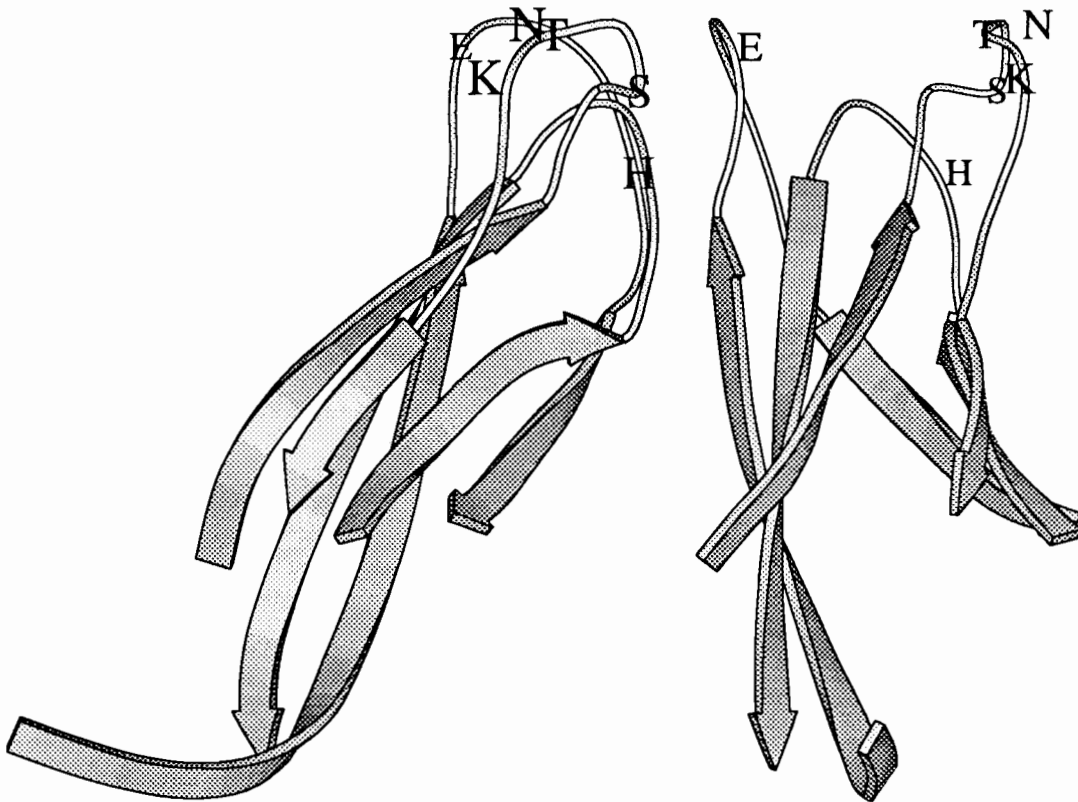
Untersuchungen der T-Zell-Antwort nach Polioimpfungen zeigten eine verstärkte Immunreaktion auch gegen Tetanustoxin und Reovirus. Deshalb stellt sich die Frage, ob durch Impfungen mit Viren eventuell auch Autoimmunreaktionen hervorgerufen werden können. (Hafler et al. 1987)

## **5.4. Die Lage der antigenen Aminosäuren auf dem Virion**

### **5.4.1. Die antigene Region 1**

Auf den Strukturabbildungen, die antigenen AS zeigen, ist auch der "Canyon" gut zu erkennen (Abb.4.21 und 4.22). Er trennt die antigenen Region 1 von den übrigen. Diese Region besteht aus den drei Schlaufen von VP1, die das Plateau an der fünfzähligen Achse erreichen. Vier der antigenen AS liegen in der BC-Schleife, E1144 in der DE-Schleife. Diese 5 AS liegen erhaben an der Oberfläche. Etwas tiefer in der HI-Schleife dazwischen liegt H1248, das die Struktur der BC-Schleife beeinflussen könnte, aber auch für Ak zugänglich sein müßte. E1144 liegt in der Aufsicht auf die fünfzählige Achse (Abb.4.23A II) so, daß die AS von zwei BC-Schleifen gleich weit entfernt ist. Die Seitenansicht auf die antigenen Region 1 zeigt jedoch, daß E1144 wahrscheinlich zur Region des jeweils linken Nachbarpentamers gehört. Abb. 5.3 zeigt die VP1-Spitzen von Pentamer 1 und 5. (Im Anhang 2 Abb.A2 ist die Region in stereo zu sehen.)

Abb.5.3 Seitenansicht der antigenen Region 1



Die "antigene" AS F1142 (Murdin & Wimmer 1989) ist nicht eingezeichnet; sie liegt nicht an der Oberfläche (vergl. Abb.4.23AII).

Es ist noch mit einer Ausweitung der antigenen Region 1 auf die AS A1096, T1098, D1102 und AS T1143, T1145, N1146, N1147 und AS P1250, K1252, T1254 und eventuell auch weiter innen liegender AS zu rechnen. (Abb.4.21)

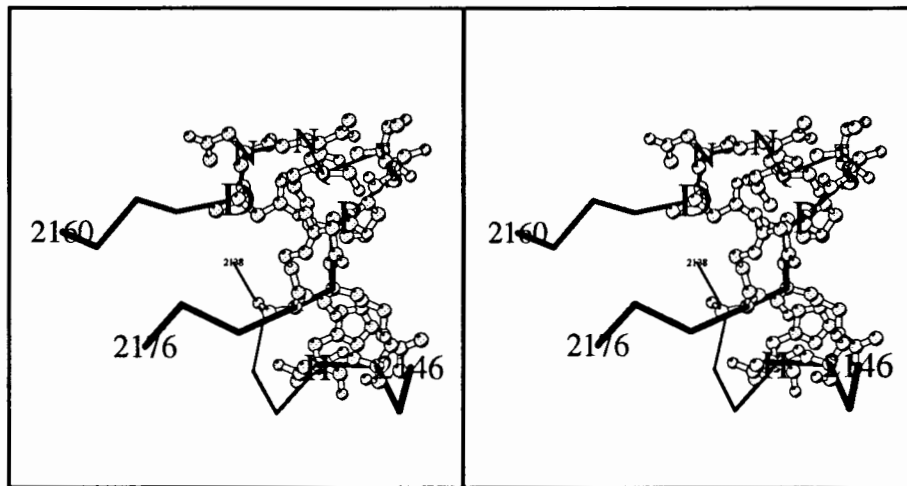
Verschiedene Enteroviren zeigen immunologische Kreuzreaktionen vor allem unter defekten, erhitzten oder aufgebrochenen Virionen. Die Kreuzreaktion ist besonders stark beim N-Terminus von VP1. Gegen diese Region können auch neutralisierende Antikörper gebildet werden. (Cello et al.1993) Der N-Terminus von VP1 liegt zwar beim intakten Viruspartikel innen, wird aber bei der Infektion nach außen gestülpt.

#### 5.4.2. Die antigenen Region 2

Schon die Lage der Region 2 im Protomer (Abb.4.23B) zeigt, daß die Beschriftung der AS H2142 klein unter der anderer AS verschwindet. Im Ausschnitt (Abb.4.23B II) liegt H2142 genau unter der großen Schlaufe der EF-Schlaufe. Um die Lage der AS zu klären, wurde deshalb ein Stereobild angefertigt (Abb.5.4). Es zeigt deutlich, wie nah H2142 den AS der großen

Oberflächenschleufe ist. Mutationen in dieser AS verändern die Struktur des tiefer liegenden Teils der EF-Schleufe und behindern dadurch die Struktur der Oberflächenschleufe. Dieser Effekt dürfte größer sein als ein eventueller Kontaktverlust des Antikörpers zum tief unter der Oberfläche liegenden H2142.

Abb.5.4 Die Lage von H2142 in der antigenen Region 2



Es ist noch mit einer Ausdehnung der Antigenen Region 2 auf die AS K1214, K1218, D1219 und 1228 von VP1 zu rechnen. Der VP1-N-Terminus könnte die Region in Richtung VP3 erweitern, K1287 bis P1293, auch Y2179. Von VP2 könnten noch N2137-T2139, S2144, Q2146, N2147 und T2162, P2163, Q2172-C2175 sowie L2268, L2271 und Q2272 Region 2 vergrößern. (Abb.4.21)

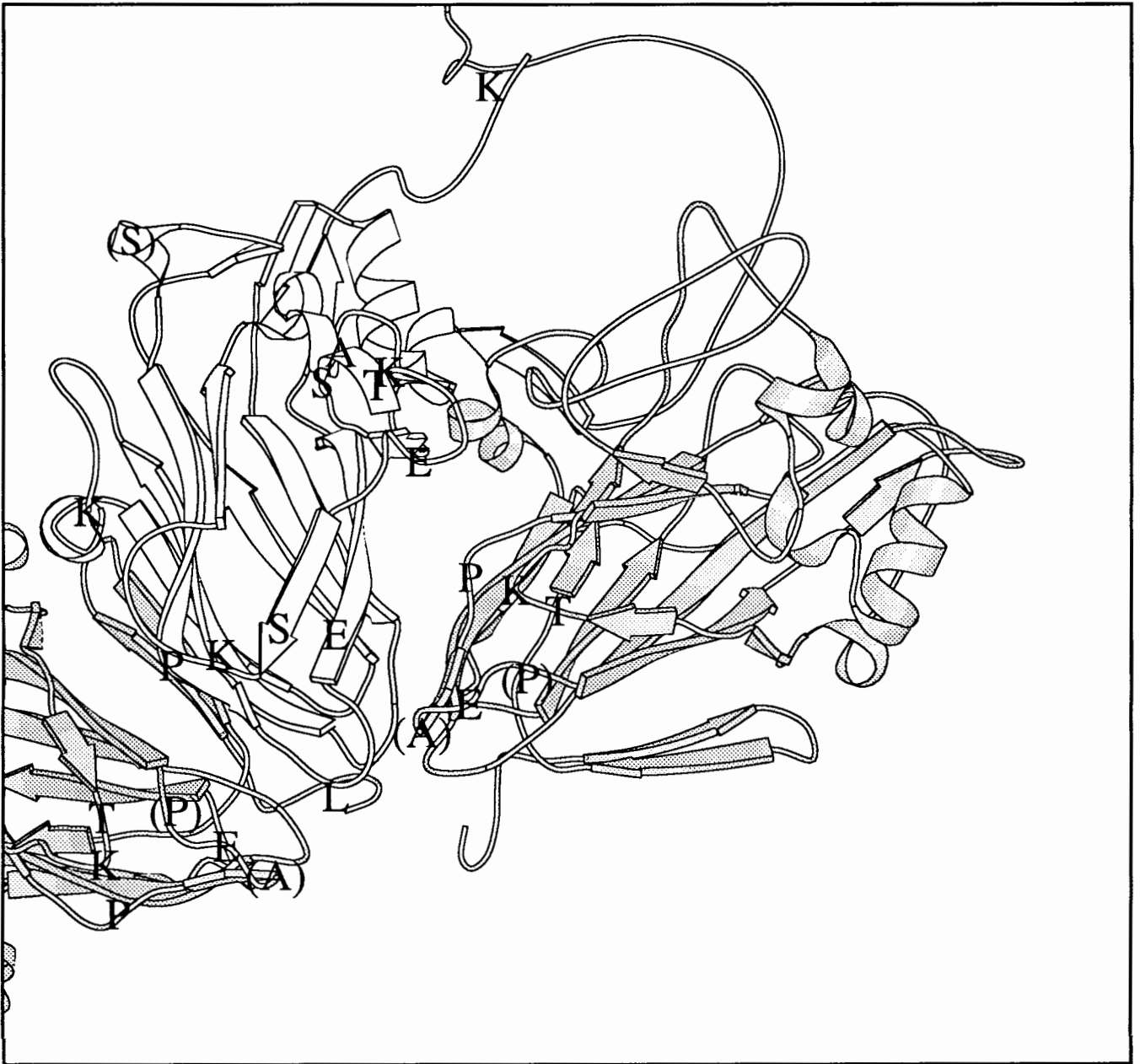
### 5.4.3. Die antigene Region 3

Die antigene Region 3 liegt um die dreizählige Achse verstreut. Die Zuordnung zu Unterregionen erscheint sehr willkürlich. Der Kern von "3a" enthält die dicht nebeneinander in einer gedrehten Oberflächenschleufe von VP3 liegenden AS S3058, A3059, T3060, K3062 und E3066. Vergleiche Abb.4.23C und Abb.5.5 (im Anhang 2 als Stereobild Abb.A4). S3073 und P2236, die weiter entfernt liegen, sollen aber auch noch dazugehören.

Zu "3b" werden T2072 und K2073 aus der BC-Schleufe von VP2 gezählt, sowie die nicht an der Oberfläche liegenden P2245 und A2240 der HI-Schleufe von VP2. Auch die in der BC-Schleufe von VP3 liegenden AS K3075 und P3076 sollen zu "3b" gehören. Alle diese AS könnten unter einem Ak-Fußabdruck liegen, Teile von "3a" und das ganze "3c" würden aber dann mit darunter liegen. Weit entfernt liegt das zu "3b" gezählte K3144, neben den Helices von Peptid 4 und Peptid 9 von VP2.

"3c" liegt an der dreizähligen Achse und besteht aus drei AS, E2242 der HI-Schleufe von VP2, L3202 der HI-Schleufe von VP3 und E3207 in  $\beta$ -Strang I.

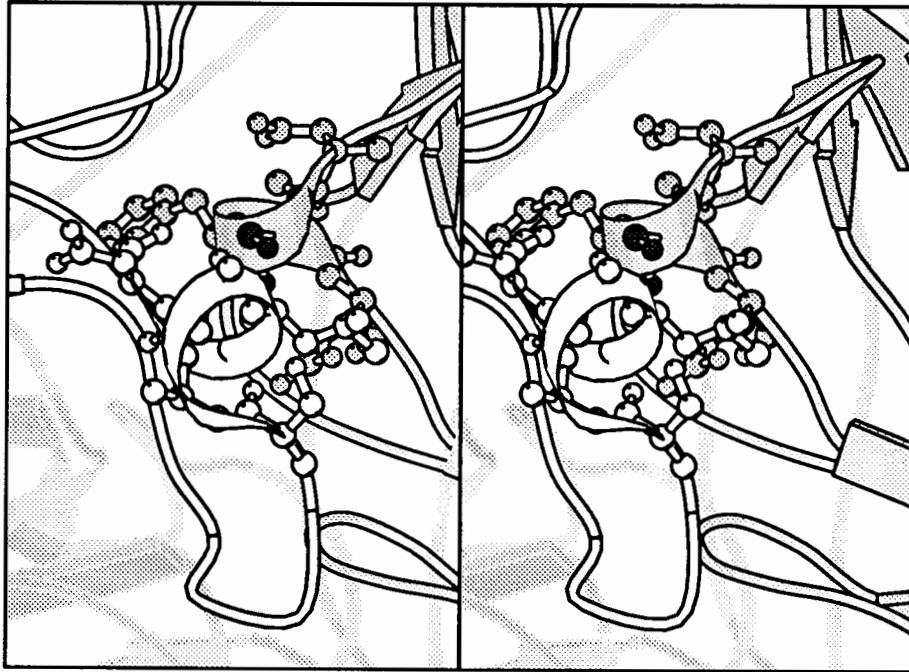
Abb.5.5 Die antigene Region "3"



Weit entfernt über dem "Canyon" liegt die AS3234. Sie könnte nur durch Verlagerung in die Nähe von Region "3" gebracht werden; der C-Terminus von VP3 ist aber mit Sicherheit auch sehr beweglich.

Auch AS S3183 (Page et al. 1988) soll noch zu Region "3" gehören. Laut Sgro (persönliche Mitteilung) liegt S3183 nicht an der Oberfläche. Wie Abb.5.6 zeigt, liegt S3183 in einem kurzen Stück Helix auf VP3. Diese Helix liegt unter einer ebenfalls kurzen Helix in der "MKS"-Schleife von VP1, die zur antigenen Region 2 gehört. Die nach vorne ins Bild ragende OH-Gruppe des S3183 ist offensichtlich doch der Oberfläche zugänglich und könnte ein Teil der antigenen Region 2 sein oder diese beeinflussen. Hiermit könnte die Region 2 die Protomergrenze überschreiten.

Abb.5.6 Lage der AS S3183



Auch die antigenen AS A2240 (Uhlig et al. 1990) und P2245 (Wiegers & Dernick 1992) sollen nicht an der Oberfläche liegen. Abb.5.7 (stereo im Anhang 2 Abb.A5) bestätigt, daß kein Teil der funktionellen Gruppe von P2245 die Oberfläche erreicht. Die Metylgruppe von A2240 liegt jedoch an der Oberfläche und könnte durch ihre Hydrophobie Einfluß auf die Antigenität der Region haben.



Abb.5.7 Lage der AS A2240 und P2245



Der N-Terminus von VP1 könnte ab AS K1287 bis zu seinem Ende die antigene Region 3 erweitern. Von VP2 könnten die AS D2067-S2070 und E2074-R2076 und W2078 und G2155-T2160 die Region in Richtung VP2 ergänzen, ebenso N2238, F2239, S2241, S2243, S2244 und E2246. Auch an der Oberfläche von VP3 liegen noch eine ganze Reihe AS, die noch nicht als antigen erkannt sind. In Region 3 scheint es keine starken Vertiefungen zu geben. (Abb.4.21)

Für Region 3 gibt es Ak, die ein aus verschiedenen 14S Partikeln zusammengesetztes Epitop der Region 3 am Virus erkennen und gleichzeitig mit reduziertem Titer an einzelne 14S binden (Wiegiers & Dernick 1992). Hier scheinen Ak schwach mit Teilen ihres gesamten Neotopes reagieren zu können, wie es von van Regenmortel (1990) vermutet wurde.

Auch bei Typ 2 D1093 und D1095 (La Monica et al. 1987a, b), A2239 (Uhlig 1991) und bei Typ 3 D1093 (Minor 1985) entsprechen die AS solchen AS vom Typ 1, die nicht außen liegen, oder die Region besitzt durch andere angrenzende AS eine ganz andere Struktur.

### 5.5. Die Immunreaktion von Peptiden

"Weil nicht alle Antigene wichtig für die Infektion sind, resultiert die Interaktion eines Antikörpers nicht unbedingt in der Neutralisation," schreibt Mandel 1979. Es war also damals schon bekannt, daß die Hauptaufgabe von Antikörpern nicht Neutralisation, sondern Antigenbindung ist. Aufgabe dieser Arbeit ist es, die AS-Sequenzen von Bindungsstellen zu untersuchen.

Hogle & Filman schreiben (1989): "Die antigenen Regionen von PV, identifiziert durch eine Sammlung von Resultaten von Antikörperkompetitionstests mit monoklonalen Antikörpern, sind klar konformationale. ... wenigstens im Fall von PV erkennen Antipeptid-Antikörper sequentielle zusammenhängende Stücke von größeren konformationalen Sites..."

Die Untersuchung der Bindung von Antikörpern an Peptide ist deshalb günstig, weil es Kreuzreaktionen der Ak gibt, die sowohl das ganze Epitop des Proteins als auch das Teilepitop des Peptids erkennen. So kann allmählich die Reaktion aller Einzelteile eines Epitops erschlossen werden. (van Regenmortel 1987)

Lineare Fragmente binden schlechter als das gesamte Epitop, einmal weil sie eben nur ein Teil des gesamten Epitops sind, aber auch weil sie eventuell nicht die richtige Konformation haben. (Pellequer et al. 1991)

Wie NMR-Untersuchungen zeigen, sind Peptide in Lösung frei beweglich. Durch Bindung an einen Antikörper bekommen sie eine fest gefaltete Struktur. (Cung et al. 1991)

"Versuche mit Peptiden dienen hauptsächlich der Suche nach sequenziellen Epitopen, weil mit ihnen die Struktur einer Helix z.B. nicht berücksichtigt wird. Hierfür wären Peptide nötig, die etwa aus jeder 3,6ten AS einer Sequenz bestehen." (Getzoff et al. 1991) Solche Strukturen herzustellen ist jedoch sehr schwierig, z.Z. noch unmöglich. Einige Peptide dürften jedoch in Lösung der nativen Struktur ähnliche Formen annehmen. Dies könnte für die Helices in Peptid 9 und 11 zutreffen, falls die Immunogenität dieser Peptide den bekannt antigenen Oberflächen-AS entspricht.

Es ist nicht verwunderlich, daß selbst Peptidkonzentrationen im pmol-Bereich noch zu Reaktionen führen, wenn man bedenkt, daß 1 pmol immer noch 600 Milliarden Moleküle enthält, deren immunologische Reaktion durch die chemische Anlagerung von Molekülen vervielfacht wird.

Eine einzelne Punktmutation in einem Peptid kann die Immunreaktion drastisch verändern (Cello et al. 1993)

Das am stärksten reagierende Peptid 12 ist Teil des Neotops, zu dem AS1221-1226 und AS2164-2170 gehören, einem Epitop der PV-Quartärstruktur. Viele Ak, die intakte Proteine erkennen, binden auch Peptide. So kann aus der Bindung an ein Peptid nicht auf die Existenz eines kontinuierlichen (linearen) Epitopes geschlossen werden. (van Regenmortel 1992) Dies zeigen besonders Ak 34.3 und 27.77, die nur eine lineare Sequenz in Peptid 12 binden sollten, in meinem Test aber zusätzlich Peptid 8 bzw. 11 banden.

Die Versuche dieser Arbeit mit tryptischen Peptiden von VP2 bestätigen die Ergebnisse mit synthetischen Peptiden von VP1 (Chow et al. 1985). Immunreaktionen verschiedenen Grades sind über das gesamte Protein verteilt. Auch innen liegende Peptide reagieren; ihre Reaktion wurde durch Ausschließen möglicher unspezifischer Kreuzreaktionen durch Computersuche nach Homologien abgesichert. Allerdings zeigen Untersuchungen der Struktur vieler Proteine, daß eine gleiche Sequenz von sechs oder sieben AS in anderer Umgebungssequenz eine völlig andere

dreidimensionale Struktur einnehmen kann. (Getzoff et al. 1991)

Von VP2 reagieren alle Peptide, die mehr als 6AS haben, mit Antiseren gegen ganze Viren.

Unspezifische Kreuzreaktionen zwischen Teilen des gleichen Proteins, des gleichen Virus, werden auch bei anderen Viren gefunden. Z.B. binden mAk gegen HIV-1 Protein p24 eine ganze Reihe von Proteinen aus HIV-1 (nicht aber aus Zellysat, HTLV-1 oder HIV-1) (Liang et al. 1990).

Nach Roivainen et al. (1991) binden humane Seren die Sab-3-Peptide 2049-2062, 2118-2131, 2193-2206 und 2217-2242. 2049-2062 entspricht einem N-terminal verkürzten Peptid 4 ab P2049, das der Anfang der antigenen Region sein könnte. 2118-2131 ist der Anfang von Peptid 11, außer der ersten AS; laut Computervorhersagen ist die Reaktion dieses Teiles von Peptid 11 eher unwahrscheinlich, trotz einer AS an der Oberfläche. 2193-2206 enthält die ersten AS des schwach reagierenden Peptid 14. 2217-2242 ist der Übergang zwischen den beiden schwach reagierenden Peptiden 14 und 15.

Baltimore schreibt 1985: "Es ist ein Rätsel, gestellt von Strukturdaten, warum Peptide, die innere Regionen des Virions bilden, neutralisierende Antikörper bilden können." Allein dies zeigt, daß wir den Mechanismus der Neutralisation noch nicht verstehen. Vielleicht gibt es "den" Mechanismus auch gar nicht, sondern es existieren eine ganze Menge von Möglichkeiten, auf verschiedenen Wegen Viren unschädlich zu machen. Hier sei nur an Ak erinnert, die gegen funktionelle Sequenzen gerichtet sind, wie z.B. die rezeptorbindende RGD- Sequenz von MKS.

## 5.6. Die Eigenschaften einer antigenen Region

Es wurde spekuliert, welche Veränderungen am Virus und am Antikörper bei der Bindung entstehen. Bislang wurden keine Verlagerungen (größer  $1,6\text{\AA}$ ) gefunden (Getzoff et al. 1991). Das bedeutet, daß sich keines der Proteine entfaltet. Ausnahmen könnten Ak wie 7J6 sein. Die Verdrehungen der Antikörpermoleküle sind keine konformationellen Änderungen, weil die bewegten Regionen Gelenke (Scharniere) sind, die das Ak-Molekül an sich immer besitzt, wie eine Tür, die ihre Form nicht verändert, indem man sie öffnet. Die offene und geschlossene Stellung gehören zu ihren flexiblen Möglichkeiten. Lange wurde angenommen, daß Viren durch Ak ihre Struktur ändern und deshalb abgebaut statt vermehrt werden. Es scheint aber auszureichen, sie durch Antikörper auf einem anderen Weg in die Zelle einzuschleusen.

Da die Struktur des Innenraumes der Antikörper, der Antigen bindet, hydrophobe AS enthält (Chothia et al. 1985), ist zu erwarten, daß auch auf der Seite des Antigens hydrophobe AS erkannt werden. Y scheint eine besondere Rolle zu spielen.

Konservative Austausche werden häufiger in antigenen Regionen gefunden, wahrscheinlich weil durch sie die Struktur weniger verändert wird.

Nur 50% der D-spezifischen mAk (gegen native Viren) neutralisieren PV, obwohl alle binden. (In dieser Arbeit wurden nur solche Ak verwendet, die auch denaturiertes Virus erkennen.) Im Gegensatz dazu sollten alle Ak neutralisieren, die D und C erkennen. Ak 34.3 entspricht diesem Bild, Ak 27.77 erkennt D und C, neutralisiert aber trotzdem nicht. C spezifische Ak neutralisieren nicht, was dem Verhalten von 27.18, 10.6, 27.9 und 27.33A entspricht. Sechs von 20 mAk gegen Typ 3 reagierten mit VP1 oder VP3 aus der SDS-Page. (Minor et al. 1982) Bei sehr niedrigen, nicht physiologischen Ionenstärken wurden Ak beobachtet, die native Viren in H-Antigene, EC (leere Kapside), verwandeln (Delaet et al. 1992). Ob es solche Bedingungen in

Schleimschichten oder in Zellkompartimenten gibt, ist allerdings fraglich.

Einige AS treten nicht mit dem Ak in Kontakt, beeinflussen aber trotzdem die Antigenität, z.B. P2245. Das bekannteste Beispiel stammt vom Maul-und-Klauen-Seuchevirus (MKS). Röntgenstrukturuntersuchungen am MKS zeigen, daß Mutationen weit entfernt von der Bindungsregion eines Antikörpers auf die Bindung einwirken können. Es wurden MKS-Mutanten isoliert, die neutralisationsresistent gegen Ak sind, die gegen die große GH-Schleife, die "MKS-Schleife", und den C-Terminus von VP1 gerichtet sind. Keine der Mutanten hatte eine Änderung in der Schleife selbst, sondern in der BC-Schleife von VP1. Trotz der AS-Substitution in der BC-Schleife zeigte diese keine Konformationsänderung in der Nachbarschaft. Die Mutationen bewirkten jedoch, daß die gesammte GC-Schleife umklappte, wobei das Epitop zerstört wurde.

### 5.6.1. Die Rolle des Prolins

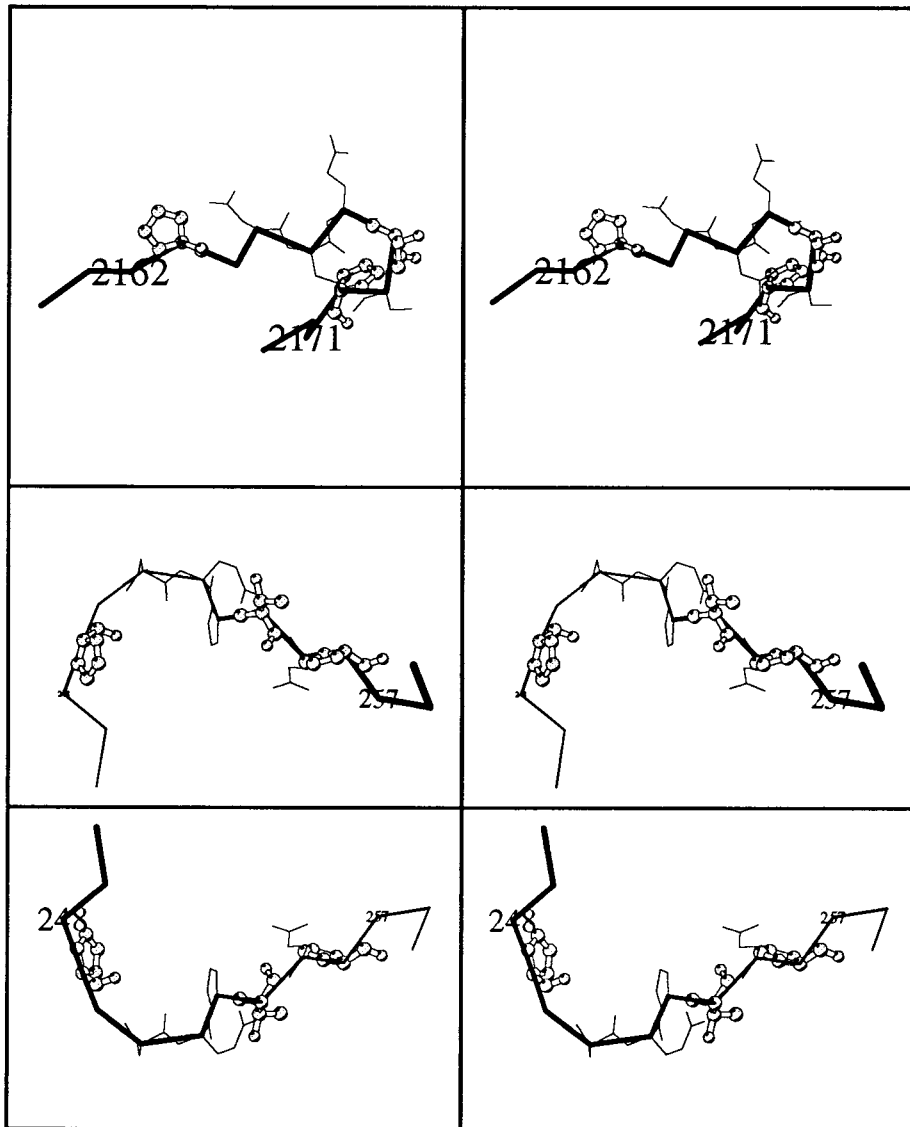
Proline hat einen besonderen Einfluß auf die Proteinstruktur (MacArthur et al. 1991). Proline zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Aminogruppe, die an der Peptidbindung beteiligt ist, in einem Fünfering liegt. Dadurch ist die Verbindung zwischen dem Stickstoffatom und dem C<sup>α</sup>-Atom des P steif. Proline brechen die Struktur von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen. In Knicken, auch echten "Turns", sind sie oft. Dort nehmen sie vorzugsweise die zweite, manchmal auch die dritte Position ein. (Chou & Fasman 1987) Die Knicke neben antigenen AS in PV enthalten keine Proline.

Bei Einbau von HAV-Sequenzen in die BC-Schleife von VP1 von Sab1 zeigte sich, daß unter den Chimären, die durch Ak neutralisiert wurden, zwei waren, die Proline an beiden Enden seitlich des Epitopes enthielten (Lemon et al. 1992)

Am DESY sind jetzt Röntgenstrukturdaten über einen monoklonalen Ak gegen ein Picornavirus erhalten worden. Der mAk 8F5 gegen HRV2 erkennt die EF-Schleife von VP2, eine Region, die Peptid 12 etwa entspricht. Die Hauptbindungs-AS (TRLNPD) enthalten auch ein P. Der Ellenbogenwinkel zwischen den konstanten und variablen Regionen beträgt  $127^{\circ}$ . (Tormo et al. 1992)

Beim Vergleich der beiden am besten immunreaktiven Peptide, 4 und 12, fiel auf, daß auch sie Proline enthalten (4.3.5.5.). Da die Peptide keine Kreuzreaktion zeigen, aber trotzdem eine Homologie besitzen, wurde zunächst angenommen, daß eventuell strukturelle Ähnlichkeiten bestehen könnten. Ein Vergleich der Struktur (Abb.5.8) zeigt aber, daß die Form der Schleifen unterschiedlich ist. Die obere Abb. zeigt den betroffenen Abschnitt aus Peptid 12 in Oberflächenaufsicht, die mittlere Peptid 4 in Aufsicht, die untere Peptid 4 aus Sicht der inneren Oberfläche.

Abb.5.8 Strukturvergleich der Peptide 4 und 12



Wie sich herausstellte, arbeitet die Arbeitsgruppe von Frau Prof.Dr.Finn (Pittsburgh) z.Z. an der Antigenität des Zelloberflächenproteins Mucin. Dieses Protein enthält bei verschiedenen Krebs-erkrankungen weniger Zucker und wird dadurch dem Immunsystem zugänglich. (Gendler et al. 1988) Die antigene Sequenz ähnelt der der antigenen Peptide 4 und 12. Sie enthält auch Proline, die antigene AS präsentieren.

Mucin	<b>PDTRPAP</b>
Peptid 4	PVDQ <b>PTEP</b>
Peptid 12	PDNN <b>QTSP</b>

Die als antigen bekannten AS sind fett gedruckt. Stimmt die These von Frau Finn, daß die 3AS zwischen den Prolinen, DTR, wegen der Proline besonders antigen sind, so müßte die Antigenität von Peptid 4 in den präsentierten AS VDQ liegen. Die Wahrscheinlichkeit einer geknickten Struktur ist im ganzen Peptid 12 groß (auch bei QT).

Offen ist jedoch, in welcher Form die AS dem Immunsystem dargeboten werden. Der direkte

Kontakt zum Ak muß es nicht sein, siehe Strukturvergleich. Es wird vermutet, daß Prolinproteasen eine Rolle in der Immunologie spielen. Sie spalten X-P (Yaron & Naider 1993).

Auf jeden Fall scheinen Proline wichtig zu sein. Abb.5.9 zeigt deshalb die Sequenzen der VPs mit fett und kursiv gedruckten Prolinen. Alle innen liegenden AS sind mit Kleinbuchstaben angegeben, alle außen liegenden mit Großbuchstaben. Die als antigen bekannten AS sind unterstrichen. AS, die in einem Knick liegen oder in einer Vorhersageregion mit großer Knickwahrscheinlichkeit sind auch fett gedruckt, sofern sie im Bereich antigener AS liegen.

Abb.5.9 Proline und Antigenität

```
glgqmlesmi dntvretvga atsrdalpnt easgpthske ipaltavetg
atnplvpsdt vqtrhvvqhr srsessiesf fargacvTIm TvdnpASTTN
KdKLFaVWki TyKDtvtqlRr klefftyrf dmeltfvvta nftTETNNgha
lnqvyqimyv ppGApVPEKW DDYtwqtssn psifytygta parisvppyvg
isnayshfyd gfsKvplKDq SAALgDsLyg aasLNDfgIl avrvvnDHnP
tKvTsKiRvy lkpkhirvwc prpprAvayy gPgvdyKDGT LTPLSTKDLT
TY
```

```
spnieacgys drvlqtlgn stittqeaan svvaygrwpe ylrdseanpv
dqptepdvaa crfytlDTVS wTKESRgWww klpdalrDmg lfgQnmyYhy
lgrsgyvhv qcnaskfHqg algvfavpem clagdsNTTt mHtSyQNanp
GEKGGTFTGT FTPDNNQTSP ARRFCpvdYl lngtllgna fvfphqiinl
rtncatlvl pynslsids mvkhnnwgia ilplaPLNFa SESSpEipit
ltiapmccf nglrnItLpR LQ
```

```
glpvmntpgs nqyltadnfq spcalpefdv tppidipgev knmmelaeid
tmipfDLSAT KKnTmEmyrv RlSDKPHTDD PIlclslSpA SdPrlsHtml
geilnyythw agslkftflf cgfmmatgkl lvsyppgad PpKKrKEamL
gthviwdigl qssctmvvpw isnttyrqtI DDSfteggYi svfyqtRivV
pLSTpREmdi lgfvsacndf svrllrdtH iEQKalaq
```

Gruppen von antigenen AS liegen in Regionen, die sowohl Knicke als auch Proline haben. In Peptid 4 wird beides gefunden. Der Knick RDSEA besteht aus fünf AS. Peptid 12 besitzt keinen Knick (turn) laut Röntgenstruktur, aber eine ausgesprochen hohe Knickwahrscheinlichkeit dem Vorhersageprogramm nach. Diese Region FTPDNNQT und eine weitere SDKPHTD sind deshalb mit fett gedruckt.

## 5.7. Ausblick auf die Poliovirusimpfung

Bei der Herstellung von IPV wird die Struktur beeinträchtigt. Ein großer Teil der neutralisierenden Antikörper in Seren bindet nur natives Virus. Durch die Veränderungen können dann vorwiegend nur noch die Antikörper binden, die D- und C-Antigen erkennen. Zusätzlich reagiert jeder Mensch verschieden auf ein Antigen, und von Charge zu Charge gibt es Unterschiede. So erscheint ein IPV-Antigen dem Immunsystem des Impflings sehr verschieden von Wildtypviren. (Ferguson et al. 1993) Die Gefahr, durch den Lebendimpfstoff Infektionen auszulösen, muß jedoch beseitigt werden.

In die antigenen Regionen 1 und 2 von PV1 wurden Antigene Epitope anderer Typen eingebaut (Murdin et al. 1992). Die neutralisierenden Antikörpertiter waren jedoch in den meisten Fällen sehr niedrig. Ist in einem Impfstoff ein Typ nur durch eine einzige antigenen Region vertreten, besteht die Gefahr, daß der Schutz durch eine einzige Mutation verlorenght. Dies wird dazu führen, daß auch in naher Zukunft noch keine Impfstoffe mit Sequenzen anderer Organismen in PV auf den Markt kommen (Marwick 1992).

Auch Antikörper gegen Nichtstruktuproteine schützen *in vivo*. Die Unfähigkeit, mit Peptiden Tiere zu immunisieren, könnte behoben werden, wenn das Peptid an das T-Zell-Epitop eines anderen Proteins gekoppelt würde (van Regenmortel 1990). Diese Beobachtung ist wichtig für die Entwicklung neuer Impfstoffe.

Bislang wurde angenommen, daß der Kontakt zwischen Antigen und Ak immer außerhalb der Zelle stattfindet. Antikörper können aber auch in Nervenzellen eindringen und die Zellen von Viren befreien. Das ist wichtig, weil die langlebigen Nervenzellen sich vor Zerstörung schützen, indem sie kein Antigen präsentieren. (Levine et al. 1991)

Die Frage, was Antigenität ist, bleibt noch offen. Die Röntgenstruktur gibt die Kontaktfläche an. Mutanten erklären Störungen, die den Kontakt unmöglich oder schwieriger machen. Hydrophilität, Flexibilität, Oberflächenlage, Ladung usw. geben Wahrscheinlichkeiten an, ob eine Region stark oder schwach immunogen reagiert. Dabei scheinen besondere Strukturen eine wichtige Rolle zu spielen. Die Existenz von Knicken und Kurven z.B. wird bei der Suche nach immunogenen Regionen deshalb besonders berücksichtigt. (Zegers et al. 1991)

- Aarnes, C. M., I. H. Madhus, J. C. Guillemot, K. Sandvig & S. Olsnes (1987) Formation and activity of covalent conjugates of poliovirus and ligands binding to cell surface structures - *Exp. Cell Res.* **170**, 483-490
- Abecassis, J., C. David-Eteve & A. Soun (1985) The separation of 24 OPA-AA of natural origin and quantitative analysis of tyrosine by means of HPLC - *J. Liq. Chromatogr.* **8**, 135-153
- Abola, E., F. C. Bernstein, S. H. Bryant, T. F. Koetzle & J. Weng (1987) Protein Data Bank - In: *Crystallographic databases - Information content, software systems, scientific applications*, Herausg. Allen, F. H., G. Bergerhoff & R. Sievers, Data Commission of the International Union of Crystallography Bonn/Cambridge/Chester, S. 107-132
- Abraham, R., T. Chonmaitree, J. McCombs, B. Prabhakar, P. T. Lo Verde & P. L. Ogra (1993) Rapid detection of poliovirus by reverse transcription and polymerase chain amplification: application for differentiation between poliovirus and nonpoliovirus enteroviruses - *J. Clin. Microbiol.* **31**, 395-399
- Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands & F. Brown (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9Å resolution - *Nature* **337**, 709-716
- Adam, M. A., N. Ramesh, A. D. Miller & W. R. A. Osborne (1991) Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus-5' nontranslated regions - *J. Virol.* **65**, 4985-4990
- Adenyi-Jones, S. C. A., H. Faden, M. B. Ferdon, M. S. Kwong & P. L. Ogra (1992) Systemic and local immune responses to enhanced-potency inactivated poliovirus vaccine in premature and term infants - *J. Pediat.* **120**, 686-689
- Agol, V. I. (1991) The 5'-untranslated region of picornaviral genomes - In: *Advances in Virus Research*, Vol 40, S. 103-180
- Agol, V. I., S. G. Drozdov, T. A. Ivannikova, M. A. Kolesnikova, M. B. Korolev & E. A. Tolskaya (1989) Restricted growth of attenuated poliovirus strains in cultured cells of a human neuroblastoma - *J. Virol.* **63**, 4034-4038
- Agterberg, M. & J. Tommassen (1991) Outer membrane protein PhoE as a carrier for the exposure of foreign antigenic determinants at the bacterial cell surface - *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **59**, 249-262
- Agut, H., K. M. Kean, O. Fichot, J. Morasco, J. B. Flanagan & M. Girard (1989) A point mutation in the poliovirus polymerase gene determines a complementable temperature-sensitive defect of RNA replication - *Virology* **168**, 302-311
- Aida, M. (1988) Ab initio molecular orbital study on the sequence-dependency of DNA conformation: an evaluation of intra- and inter-strand stacking interaction energy - *J. theor. Biol.* **130**, 327-335
- Aleksandrov, N. N. (1990) Global immunization for poliomyelitis reaches 67% level - *Bull. WHO* **68**, 115-116
- Almela, M. J., M. E. Gonzalez & L. Carrasco (1991) Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles - *J. Virol.* **65**, 2572-2577
- Almond, J. W. (1987) The attenuation of poliovirus neurovirulence - *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 153-180
- Almond, J. W., G. D. Westrop, D. M. A. Evans, G. Dunn, P. D. Minor, D. Magrath & G. C. Schild (1987b) Studies on the attenuation of the Sabin type 3 oral polio vaccine - *J. Virol. Meth.* **17**, 183-189
- Altmeyer, R., A. D. Murdin, J. J. Harber & E. Wimmer (1991) Construction and characterization of a poliovirus/rhinovirus antigenic hybrid - *Virology* **184**, 636-644
- Amit, A. G., R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips & R. J. Poljak (1985) Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 6Å resolution - *Nature* **313**, 156-158
- Amit, A. G., R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips & R. J. Poljak (1986) Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution - *Science* **233**, 747-753
- Anderer, F. A. (1963) Versuche zur Bestimmung der serologische terminanten Gruppen des Tabakmosaikvirus - *Z. Naturforsch.* **18B**, 1010-1014
- Andino, R., G. E. Rieckhof & D. Baltimore (1990a) A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA - *Cell* **63**, 369-380
- Andino, R., G. E. Rieckhof, D. Trono & D. Baltimore (1990b) Substitutions in the protease (3C<sup>pro</sup>) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region - *J. Virol.* **64**, 607-612
- Andrews, N. C. & D. Baltimore (1986a) Lack of evidence for VPg priming of poliovirus RNA synthesis in the host factor-dependent in vitro replicase reaction - *J. Virol.* **58**, 212-215
- Andrews, N. C. & D. Baltimore (1986b) Purification of a terminal uridylyltransferase that acts as host factor in the in vitro poliovirus replicase reaction - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 221-225
- Ansardi, D. C., D. C. Porter & C. D. Morrow (1991) Coinfection with recombinant vaccinia viruses expressing poliovirus-P1 and poliovirus-P3 proteins results in polyprotein processing and formation of empty capsid structures - *J. Virol.* **65**, 2088-2092
- Ansardi, D. C., D. C. Porter & C. D. Morrow (1992) Myristylation of poliovirus capsid precursor-P1 is required for assembly of subviral particles - *J. Virol.* **66**, 4556-4563
- Ansardi, D. C., D. C. Porter & C. D. Morrow (1993) Complementation of a poliovirus defective genome by a recombinant vaccinia virus which provides poliovirus P1 capsid precursor in trans - *J. Virol.* **67**, 3684-3690
- Argos, P. (1989) A possible homology between immunodeficiency virus p24 core protein and picornaviral VP2 coat protein: prediction of HIV p24 antigenic sites - *EMBO J.* **8**, 779-785
- Armon, C., J. R. Daube, A. J. Windebank & L. T. Kurland (1990) How frequently does classic amyotrophic lateral sclerosis develop in survivors of poliomyelitis? - *Neurology* **40**, 172-174
- Arnold, E., M. Luo, G. Vriend, M. G. Rossmann, A. C. Palmenberg, G. Parks, M. J. H. Nicklin & E. Wimmer (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 21-25
- Arnold, E. & M. G. Rossmann (1990) Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refi-



- ned at a resolution of 3.0 Å - *J. Mol. Biol.* **211**, 763-801
- Arnold, G. J. & A. Jung (1986) Photometrische Bestimmung von Nucleinsäuren im Mikromaßstab mit programmgesteuerter Streulicht-Korrektur - *Beckman Report*, 10-12
- Arya, S. C. (1988) Continuing global poliomyelitis morbidity and lacunae of trivalent poliovirus vaccines - *Vaccine* **6**, 213-214
- Arya, S. C. (1990) Non-immunological facets of poliovirus vaccines - *Vaccine* **8**, 179
- Auvinen, P. (1990) Common and specific sequences in picornaviruses - *Mol. Cell. Probes* **4**, 273-284
- Aycock, W. L. (1992) Tonsillectomy and poliomyelitis. 1. Epidemiologic considerations (Reprinted from *Medicine*, Vol 21, Pg 65-95, 1942) - *Medicine* **71**, 312-315
- Badger, J., S. Krishnaswamy, M. J. Kremer, M. A. Oliveira, M. G. Rossmann, B. A. Heinz, R. R. Rueckert, F. J. Dutko & M. A. McKinlay (1989) Three-dimensional structures of drug-resistant mutants of human rhinovirus 14 - *J. Mol. Biol.* **207**, 163-174
- Badger, J., I. Minor, M. J. Kremer, M. A. Oliveira, T. J. Smith, J. P. Griffith, D. M. A. Guerin, S. Krishnaswamy, M. Luo, M. G. Rossmann, M. A. McKinlay, G. D. Diana, F. J. Dutko, M. Fancher, R. R. Rueckert & B. A. Heinz (1988) Structural analysis of a series of antiviral agents complexed with human rhinovirus 14 - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3304-3308
- Balanant, J., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux & R. Crainic (1991) The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay - *Virology* **184**, 645-654
- Ball, J. B., P. R. Andrews, P. F. Alewood & R. A. Hughes (1990) A one-variable topographical descriptor for the beta-turns of peptides and proteins - *FEBS Lett.* **273**, 15-18
- Baltera, R. F. & D. R. Tershak (1989) Guanidine-resistant mutants of poliovirus have distinct mutations in peptide 2C - *J. Virol.* **63**, 4441-4444
- Baltimore, D. (1985) Picornaviruses are no longer black boxes - *Science* **229**, 1366-1367
- Barbi, M., M. Bardare, C. Luraschi, G. Zehender, M. C. Schoeller & G. Ferraris (1992) Antibody response to inactivated polio vaccine (E-IPV) in children born to HIV positive mothers - *Eur. J. Epidemiol.* **8**, 211-216
- Barnert, R. H., H. Zeichhardt & K. O. Habermehl (1991) A rapid and sensitive micro scale assay for quantitative detection of cell protective effects - Application for the isolation of a monoclonal antibody against HeLa cell proteins involved in poliovirus attachment - *J. Virol. Meth.* **35**, 1-14
- Barnert, R. H., H. Zeichhardt & K. O. Habermehl (1992) Identification of 50-kDa and 23-/25-kDa HeLa cell membrane glycoproteins involved in poliovirus infection - Occurrence of poliovirus specific binding sites on susceptible and nonsusceptible cells - *Virology* **186**, 533-542
- Barton, D. J. & J. B. Flanagan (1993) Coupled translation and replication of poliovirus RNA in vitro - Synthesis of functional 3D polymerase and infectious virus - *J. Virol.* **67**, 822-831
- Bass, D. M. & H. B. Greenberg (1992) Strategies for the identification of icosahedral virus receptors - *J. Clin. Invest.* **89**, 3-9
- Baum, E. Z., G. A. Beberntz, O. Palant, T. Mueller & S. J. Plotch (1991) Purification, properties, and mutagenesis of poliovirus 3C protease - *Virology* **185**, 140-150
- Bauw, G., J. V. Damme, M. Puype, J. Vandekerckhove, B. Gesser, G. P. Ratz, J. B. Lauridsen & J. E. Celis (1989) Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7701-7705
- Bazan, J. F. & R. J. Fletterick (1988) Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: Structural and functional implications - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7872-7876
- Beck, M. A., S. Tracy, B. A. Collier, N. M. Chapman, G. Hufnagel, J. E. Johnson & G. Lomonosoff (1992) Comoviruses and enteroviruses share a T-cell epitope - *Virology* **186**, 238-246
- Belloq, C., K. M. Kean, O. Fichot, M. Girard & H. Agut (1987) Multiple mutations involved in the phenotype of a temperature-sensitive small-plaque mutant of poliovirus - *Virology* **157**, 75-82
- Benson, J. R. & P. E. Hare (1975) o-Phthalaldehyde: Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 619-622
- Bergmann, C. & R. Bergmann (1988) SCATTER: a program to correct UV spectra recorded with an LKB Ultraspec interfaced to an Apple //e for light scattering by particles or aggregates - *Comput. Appl. Biosci.* **4**, 407
- Berkhout, B., B. F. Schmidt, A. van Strien, J. van Boom, J. van Westrenen & J. van Duin (1987) Lysis gene of MS2 is activated by translation termination at the overlapping coat gene - *J. Mol. Biol.* **195**, 517-524
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi & M. Tasumi (1977) The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures - *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542
- Bernstein, H. D. & D. Baltimore (1988) Poliovirus mutant that contains a cold-sensitive defect in viral RNA synthesis - *J. Virol.* **62**, 2922
- Bernstein, H. D., P. Sarnow & D. Baltimore (1986) Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone - *J. Virol.* **60**, 1040-1049
- Bhimarao, C. & R. R. Joshi (1989) On antigen antibody binding distribution - *J. Theor. Biol.* **141**, 285-302
- Bienkowska-Szewczyk, K. & E. Ehrenfeld (1988) An internal 5'-noncoding region required for translation of poliovirus RNA in vitro - *J. Virol.* **62**, 3068-3072
- Bienz, K., D. Egger & L. Pasamontes (1987) Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography - *Virology* **160**, 220-226
- Bienz, K., D. Egger, T. Pfister & M. Troxler (1992) Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex - *J. Virol.* **66**, 2740-2747
- Bienz, K., D. Egger, M. Troxler & L. Pasamontes (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region - *J. Virol.* **64**, 1156-1163

- Birk, T. J. (1993) Poliomyelitis and the post-polio syndrome - Exercise capacities and adaptation - Current research, future directions, and widespread applicability - *Medicine and Science in Sports and Exercise* **25**, 466-472
- Black, T. L., G. N. Barber & M. G. Katze (1993) Degradation of the interferon-induced 68,000-Mr protein kinase by poliovirus requires RNA - *J. Virol.* **67**, 791-800
- Blair, W. S., S.-S. Hwang, M. F. Ypma-Wong & B. L. Semler (1990) A mutant poliovirus containing a novel proteolytic cleavage site in VP3 is altered in viral maturation - *J. Virol.* **64**, 1784-1793
- Blair, W. S., X. Y. Li & B. L. Semler (1993) A cellular cofactor facilitates efficient 3CD cleavage of the poliovirus P1 precursor - *J. Virol.* **67**, 2336-2343
- Blondel, B., R. Crainic, O. Fichot, G. Dufraisse, A. Candrea, D. Diamond, M. Girard & F. Hraud (1986) Mutations conferring resistance to neutralization with monoclonal antibodies in type 1 poliovirus can be located outside or inside the antibody-binding site - *J. Virol.* **57**, 81-90
- Blondel, B., R. Crainic, F. Horodniceanu & F. Jacob (1982) Le polypeptide structural VP1 du poliovirus type 1 induit des anticorps neutralisants. - *C. R. Acad. Sc. Paris* **294**, 91-94
- Boeyé, A. & B. Rombaut (1992) The proteins of poliovirus - In: *Progress in medical virology*, Vol 39, S. 139-166
- Bonneau, A.-M. & N. Sonnenberg (1987) Proteolysis of the p220 component of the cap-binding protein complex is not sufficient for complete inhibition of host cell protein synthesis after poliovirus infection - *J. Virol.* **61**, 986-991
- Borg, K., J. Borg, G. K. Dhoot, L. Edström, L. Grimby & L.-E. Thornell (1989) Motoneuron firing and isomyosin type of muscle fibres in prior polio - *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **52**, 1141-1148
- Borzakian, S., T. Couderc, Y. Barbier, G. Attal, I. Pelletier & F. Colberegarpin (1992) Persistent poliovirus infection - Establishment and maintenance involve distinct mechanisms - *Virology* **186**, 398-408
- Borzakian, S., I. Pelletier, V. Calvez & F. Colbere-Garapin (1993) Precise missense and silent point mutations are fixed in the genomes of poliovirus mutants from persistently infected cells - *J. Virol.* **67**, 2914-2917
- Böthig, B., L. Danes & S. Dittmann (1990) Immunogenicity of oral poliomyelitis vaccine (OPV) against variants of wild poliovirus type-3 - *Bull. WHO* **68**, 597-600
- Boublik, M. & R. Drzeniek (1977) Structural subunits of poliovirus particles by electron microscopy - *J. Gen. Virol.* **37**, 127-134
- Boublik, M. & R. Drzeniek (1976) Demonstration of a core in poliovirus particles by electron microscopy - *J. Gen. Virol.* **31**, 447-449
- Brack, A. & L. E. Orgel (1975) Beta structures of alternating polypeptides and their possible prebiotic significance - *Nature* **256**, 383-387
- Brandriss, M. W., J. J. Schlesinger, E. E. Walsh & M. Briselli (1986) Lethal 17D Yellow Fever encephalitis in mice. I. Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D Yellow Fever and Dengue 2 viruses - *J. Gen. Virol.* **67**, 229-234
- Bräutigam, S., E. Snezhkov & D. H. L. Bishop (1993) Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3 and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein - *Virology* **192**, 512-524
- Brioen, P., D. Dekegel & A. Boeyé (1983) Neutralization of poliovirus by antibody-mediated polymerization - *Virology* **127**, 463-468
- Brioen, P., B. Rombaut & A. Boeyé (1985) Hit-and-run neutralization of poliovirus - *J. Gen. Virol.* **66**, 2495-2499
- Brioen, P., R. J. Sijens, R. Vrijzen, B. Rombaut, A. A. M. Thomas, A. Jackers & A. Boeyé (1982) Hybridoma antibodies to poliovirus N and H antigen - *Arch. Virol.* **74**, 325-330
- Brioen, P., A. A. M. Thomas & A. Boeyé (1987) Lack of quantitative correlation between the neutralization of poliovirus and the antibody-mediated pI shift of the virions - *J. Gen. Virol.* **66**, 609-613
- Broekhuijsen, M. P., T. Blom, M. Kottenhagen, P. H. Pouwels, R. H. Melen, S. J. Barteling & B. E. Enger-Valk (1986a) Synthesis of fusion proteins containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus - *Vaccine* **4**, 119-124
- Broekhuijsen, M. P., T. Blom, J. van Rijn, P. H. Pouwels, E. A. Klasen, M. J. Fasbender & B. E. Enger-Valk (1986b) Synthesis of fusion proteins with multiple copies of an antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus - *Gene* **49**, 189-197
- Brown, F. (1992) Some unanswered questions about vaccination - *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 475-478
- Budowsky, E. I. (1991) Problems and prospects for preparation of killed antiviral vaccines - In: *Advances in Virus Research*, Vol 39, S. 255-290
- Burke, K. L., J. W. Almond & D. J. Evans (1991) Antigen chimeras of poliovirus - *Prog. Med. Virol.* **38**, 56-68
- Burke, K. L., G. Dunn, M. Ferguson, P. D. Minor & J. W. Almond (1988) Antigen chimeras of poliovirus as potential new vaccines - *Nature* **332**, 81-82
- Burke, K. L., D. J. Evans, O. Jenkins, J. Meredith, E. D. A. D'Souza & J. W. Almond (1989) A cassette vector for the construction of antigen chimeras of poliovirus - *J. Gen. Virol.* **70**, 2475-2479
- Burns, C. C., M. A. Lawson, B. L. Semler & E. Ehrenfeld (1989) Effects of mutations in poliovirus 3D<sup>pol</sup> on RNA polymerase activity and on polyprotein cleavage - *J. Virol.* **63**, 4866-4874
- Burns, C. C., O. C. Richards & E. Ehrenfeld (1992) Temperature-sensitive polioviruses containing mutations in RNA polymerase - *Virology* **189**, 568-582
- Burton, D. R. (1990) The conformation of antibodies - In: *Fc receptors and the action of antibodies*, Herausg. American Society of Microbiology Washington D.C., S. 31-54
- Cammack, N., A. Philipps, G. Dunn, V. Patel & P. D. Minor (1988) Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccinees - *Virology* **167**, 507-514
- Cantero-Aguilar, L., A. Sanchez-Trujillo & C. Fernandez-Tomas (1987) Poliovirion-derived capsid proteins in subviral ribonucleoprotein complexes - *Virology* **156**, 259-267
- Caspar, D. L. D. & A. Klug (1962) Physical principles in the construction of regular viruses - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 1-24

- Castrillo, J. L. & L. Carrasco (1987) Adenovirus late protein synthesis is resistant to the inhibition of translation induced by poliovirus - *J. Biol. Chem.* **262**, 7328-7334
- Castrillo, J. L., A. Urzainqui & L. Carrasco (1988) The P2 and P3 regions of the poliovirus genome are preferentially translated at alkaline pH in infected HeLa cells - *J. Gen. Virol.* **69**, 583-590
- Cello, J., A. Samuelson, P. Stålhandske, B. Svennerholm, S. Jeansson & M. Forsgren (1993) Identification of group-common linear epitopes in structural and nonstructural proteins of enteroviruses by using synthetic peptides - *J. Clin. Microbiol.* **31**, 911-916
- Chanh, T. C., G. R. Dreesman, P. Kanda, G. P. Linette, J. T. Sparrow, D. D. Ho & R. C. Kennedy (1986) Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides - *EMBO J.* **5**, 3065-3071
- Chapman, M. S., I. Minor, M. G. Rossmann, G. D. Diana & K. Andries (1991) Human rhinovirus-14 complexed with antiviral compound R-61837 - *J. Mol. Biol.* **217**, 455-463
- Charbit, A., J. C. Boulain, A. Ryter & M. Hofnung (1986) Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface - *EMBO J.* **5**, 3029-3037
- Charbit, A., J. Ronco, V. Michel, C. Werts & M. Hofnung (1991) Permissive sites and topology of an outer membrane protein with a reporter epitope - *J. Bacteriol.* **173**, 262-275
- Charbit, A., S. Van der Werf, V. Mimic, J. C. Boulain, M. Girard & M. Hofnung (1988) Expression of a poliovirus neutralization epitope at the surface of recombinant bacteria: First immunization results - *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **139**, 45-58
- Charini, W. A., C. C. Burns, E. Ehrenfeld & B. L. Semler (1991) trans rescue of a mutant poliovirus RNA polymerase function - *J. Virol.* **65**, 2655-2665
- Chen, Z., C. Stauffacher, Y. Li, T. Schmidt, W. Bomu, G. Kamer, M. Shanks, G. Lomonosoff & J. E. Johnson (1989) Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution - *Science* **245**, 154-159
- Cho, M. W., O. C. Richards, T. M. Dmitrieva, V. Agol & E. Ehrenfeld (1993) RNA duplex unwinding activity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase 3Dpol - *J. Virol.* **67**, 3010-3018
- Choi, W. S., R. Palghosh & C. D. Morrow (1991) Expression of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) gag, pol, and env proteins from chimeric HIV-1-poliovirus minireplicons - *J. Virol.* **65**, 2875-2883
- Chothia, C. (1976) The nature of the accessible and buried surfaces in proteins - *J. Mol. Biol.* **105**, 1-14
- Chothia, C., J. Novotny, R. Bruccoleri & M. Karplus (1985) Domain association in immunoglobulin molecules - The packing of variable domains - *J. Mol. Biol.* **186**, 651-663
- Chou, P. Y. & G. D. Fasman (1978) Empirical predictions of protein conformation - *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 251-276
- Chow, M. & D. Baltimore (1982) Isolated poliovirus capsid protein VP1 induces a neutralizing response in rats - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7518-7521
- Chow, M., J. F. E. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands & F. Brown (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance - *Nature* **327**, 482-486
- Chow, M., R. Yabrov, J. Bittle, J. Hogle & D. Baltimore (1985) Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 910-914
- Christodoulou, C., F. Colbère-Garapin, A. Macadam, L. F. Taffs, S. Marsden, P. Minor & F. Horaud (1990) Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature - *J. Virol.* **64**, 4922-4929
- Christodoulou, C., I. Pelletier & F. Colbere-Garapin (1989) Genetic stability of poliovirus insertion mutants with a foreign oligopeptide on the capsid surface - *Res. Virol.* **140**, 501-509
- Chumakov, K. M., L. P. Norwood, M. L. Parker, E. M. Dragunsky, Y. X. Ran & I. S. Levenbook (1992) RNA sequence variants in live poliovirus vaccine and their relation to neurovirulence - *J. Virol.* **66**, 966-970
- Chumakov, K. M., L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson & I. S. Levenbook (1991) Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 199-203
- Clark, M. E., T. Hämmerle, E. Wimmer & A. Dasgupta (1991) Poliovirus proteinase-3C converts an active form of transcription factor-IIIc to an inactive form - A mechanism for inhibition of host cell polymerase-III transcription by poliovirus - *EMBO J.* **10**, 2941-2947
- Clark, M. E., P. M. Lieberman, A. J. Berk & A. Dasgupta (1993) Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro - *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1232-1237
- Clarke, B. E., A. L. Brown, K. M. Currey, S. E. Newton, D. J. Rowlands & A. R. Carroll (1987) Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus - *Nucl. Acids Res.* **15**, 7067-7079
- Cockburn, W. C., B. Hobson, J. W. Lightbown, J. Lyng & D. Magrath (1992) The international contribution to the standardization of biological substances. 3. Biological standardization and the World-Health-Organization 1947-1990 - Specific activities and commentary - *Biologicals* **20**, 1-10
- Cohen, J. S. (1991) Antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents - *Antivir. Res.* **16**, 121-133
- Colbère-Garapin, F., S. Borzakian, V. Calvez & I. Pelletier (1992) Can poliovirus cause a persistent infection - *Bull. Inst. Pasteur* **90**, 143-163
- Colbère-Garapin, F., C. Christodoulou, R. Crainic, A.-C. Garapin & A. Candrea (1988) Addition of a foreign oligopeptide to the major capsid protein of poliovirus - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8668-8672
- Colbère-Garapin, F., C. Christodoulou, R. Crainic & I. Pelletier (1989) Persistent poliovirus infection of human neuroblastoma cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7590-7594
- Compton, S. R., B. Nelsen & K. Kirkegaard (1990) Temperature-sensitive poliovirus mutant fails to cleave VP0 and accumulates provirions - *J. Virol.* **64**, 4067-4075
- Condra, J. H., V. V. Sardana, J. E. Tomassini, A. J. Schla-bach, M.-E. Davies, D. W. Lineberger, D. J. Graham, L.

- Gotlib & R. J. Colonna (1990) Bacterial expression of antibody fragments that block human rhinovirus infection of cultured cells - *J. Biol. Chem.* **265**, 2292-2295
- Contag, C. H., J. T. Harty & P. G. W. Plagemann (1989) Dual virus etiology of age-dependent poliomyelitis of mice. A potential model for human motor neuron diseases - *Microb. Pathog.* **6**, 391-401
- Contreras, G. (1989) Effect of the administration of poliovirus vaccine on infantile diarrhoea mortality - *Vaccine* **7**, 211-212
- Contreras, G., K. Dimock, J. Furesz, C. Gardell, D. Hazlett, K. Karpinski, G. McCorkle & L. Wu (1992) Genetic characterization of Sabin type-1 and type-3 poliovaccine virus following serial passage in the human intestinal tract - *Biologicals* **20**, 15-26
- Cooper, J. D. H., G. Ogden, J. McIntosh & D. C. Turnell (1984) The stability of the o-phthalaldehyd/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique - *Anal. Biochem.* **142**, 98-102
- Cooper, P. D. (1962) Studies on the structure and function of the poliovirion: Effect of concentrated urea solutions - *Virology* **16**, 485-495
- Corrias, M. V., O. Flore, E. Broi, M. E. Marongiu, A. Pani, S. Torelli & P. la Colla (1987) Characterization and role in morphogenesis of a new subviral particle (55S) isolated from poliovirus-infected cells - *J. Virol.* **61**, 561-569
- Couderc, T., T. Barzu, F. Horaud & R. Crainic (1990) Poliovirus permissivity and specific receptor expression on human endothelial cells - *Virology* **174**, 95-102
- Couderc, T., C. Christodoulou, H. Kopecka, S. Marsden, L. F. Taffs, R. Crainic & F. Horaud (1989a) Molecular pathogenesis of neural lesions induced by poliovirus type 1 - *J. Gen. Virol.* **70**, 2907-2918
- Couderc, T., B. Guinguene, F. Horaud, A. Aubert-Combiescu & R. Crainic (1989b) Molecular pathogenesis of type 2 poliovirus in mice - *Eur. J. Epidemiol.* **5**, 270-274
- Couderc, T., A. Martin, C. Wychowski, M. Girard, F. Horaud & R. Crainic (1991) Analysis of neutralization-escape mutants selected from a mouse virulent type-1/type-2 chimeric poliovirus - Identification of a type-1 poliovirus with antigenic site-1 deleted - *J. Gen. Virol.* **72**, 973-977
- Crabbe, M. J. C., D. J. Evans & J. W. Almond (1990) Modeling of poliovirus - HIV-1 antigen chimaeras - *FEBS Lett.* **271**, 194-198
- Crainic, R. (1983) Natural variation of poliovirus neutralization epitopes - *Infect. Immunity* **41**, 1217
- Cross, A. B. (1989) The 1945 St Helena poliomyelitis epidemic after 40 years - *J. Roy. Soc. Med.* **82**, 339-342
- Crowell, R. L. (1987) Cellular receptors in virus infections - *ASM News* **53**, 422-425
- Cung, M. T., P. Demange, M. Marraud, V. Tsikaris, C. Sakkarellos, I. Papadoulis, A. Kokla & S. J. Tzartos (1991) Two-dimensional H-1-NMR study of antigen-antibody interactions - Binding of synthetic decapeptides to an anti-acetylcholine receptor monoclonal antibody - *Biopolymers* **31**, 769-776
- Currey, K. M., B. M. Peterlin & J. V. Maizel (1986) Secondary structure of poliovirus RNA: Correlation of computer-predicted with electron microscopically observed structure - *Virology* **148**, 33-46
- Cwirla, S. E., E. A. Peters, R. W. Barrett & W. J. Dower (1990) Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6378-6382
- Dalakas, M. & I. Illa (1991) Post-polio syndrome: Concepts in clinical diagnosis, pathogenesis, and etiology - In: *Advances in Neurology*, Vol. 56: Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases, Herausg. Rowland, L. P., Raven Press, S. 495-511
- Damerval, C., M. le Guilloux, J. Blaisonneau & D. de Vienne (1987) A simplification of Heukeshoven and Dermick's silver staining of protein - *Electrophoresis* **8**, 158-159
- Dansch, G. & J. O. R. Nørgaard (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue - *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 1394-1398
- Das, S. & A. Dasgupta (1993) Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3C<sub>pro</sub>-catalyzed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP - *J. Virol.* **67**, 3326-3331
- da Silva, E. E., M. A. Pallansch, B. P. Holloway, M. J. C. Oliveira, H. G. Schatzmayr & O. M. Kew (1991) Oligonucleotide probes for the specific detection of the wild poliovirus type-1 and type-3 endemic to Brazil - *Intervirology* **32**, 149-159
- Davies, D. R., E. A. Padlan & S. Sheriff (1990) Antibody-antigen complexes - *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439-473
- Davies, D. R., S. Sheriff & E. A. Padlan (1988) Antibody-antigen complexes - *J. Biol. Chem.* **263**, 10541-10544
- Day, W. H. E. & F. R. McMorris (1992) Critical comparison of consensus methods for molecular sequences - *Nucl. Acids Res.* **20**, 1093-1099
- Dean, E., J. Ross, J. D. Road, L. Courtenay & K. J. Madill (1991) Pulmonary function in individuals with a history of poliomyelitis - *Chest* **100**, 118-123
- de Clercq, E. (1990) Selective virus inhibitors - *Microbiology - Engl. Tr.* **13**, 165-178
- Dedieu, J. F., J. Ronco, S. van der Werf, J. M. Hogle, Y. Henin & M. Girard (1992) Poliovirus chimeras expressing sequences from the principal neutralization domain of human immunodeficiency virus type-1 - *J. Virol.* **66**, 3161-3167
- Delaet, I., R. Vrijssen & A. Boeyé (1992) Antigenic-N to antigenic-H conversion of poliovirus by a monoclonal antibody at low ionic strength - *Virology* **188**, 93-101
- Delarue, M. & D. Moras (1989) RNA structure - In: *Nucleic acids and molecular biology* **3**, Herausg. Eckstein, F. & D. M. J. Lilley, Springer Berlin Heidelberg, S. 182-196
- de la Torre, J. C., C. Giachetti, B. L. Semler & J. J. Holland (1992) High frequency of single-base transitions and extreme frequency of precise multiple-base reversion mutations in poliovirus - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2531-2535
- de la Torre, J., E. Wimmer & J. J. Holland (1990) Very high frequency of reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus - *J. Virol.* **64**, 664-671
- Delpeyroux, F., E. van Wezel, B. Blondel & R. Crainic (1990) Structural factors modulate the activity of antigen-

- nic poliovirus sequences expressed on hybrid hepatitis-B surface antigen particles - *J. Virol.* **64**, 6090-6100
- Deres, K., H. Schild, K.-H. Wiesmüller, G. Jung & H.-G. Rammensee (1989) In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine - *Nature* **342**, 561-564
- Dernick, R. (1981) Antigenic structure of poliovirus - International Symposium on Reassessment of Inactivated Poliomyelitis Vaccine, Bilthoven 1980, *Develop. Biol. Standard* **47**, 319-333
- Dernick, R. (1989a) Bestimmung von Nukleinsäuresequenzen - In: *Virologische Arbeitsmethoden, Band III Biochemische und biophysikalische Methoden*, Herausg. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Mayr-Bibrack & G. Wittmann, Gustav Fischer Stuttgart, New York, S. 123-163
- Dernick, R. (1989b) Isolierung und Nachweis infektiöser viraler RNS - In: *Virologische Arbeitsmethoden, Band III Biochemische und biophysikalische Methoden*, Herausg. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Mayr-Bibrack & G. Wittmann, Gustav Fischer Stuttgart, New York, S. 169-176
- Dernick, R. & J. Heukeshoven (1986) Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) - In: "Electrophorese Forum '86", Herausg. Radola, B. J., Technische Universität München, S. 107-122
- Dernick, R. & J. Heukeshoven (1989) Proteine und Peptide - In: *Virologische Arbeitsmethoden, Band III Biochemische und biophysikalische Methoden*, Herausg. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Mayr-Bibrack & G. Wittmann, Gustav Fischer Stuttgart, New York, S. 188-347
- Dernick, R., J. Heukeshoven & M. Hilbrig (1983) Induction of neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides - *Virology* **130**, 243-246
- Dernick, R., J. Heukeshoven, U. Kuck & K. J. Wiegiers (1987) Die Verwendung von Antikörpern zum spezifischen Nachweis von Proteinen und Peptiden durch SDS-PAGE - In: *Electrophorese Forum '87*, Herausg. Radola, B. J., Technische Universität München, S.
- Dernick, R., U. Kuck & K.-J. Wiegiers (1989) Electrophoretic peptide mapping as key step for the characterization of proteins - In: *Electrophoresis Forum '89, Proceedings of the International Meeting on Electrophoresis*, Herausg. Radola, B. J., Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie, Technische Universität München Freising-Weihenstephan, S. 217-228
- Dernick, R. & H.-J. Rziha (1989) Nukleinsäuren - In: *Virologische Arbeitsmethoden, Band III Biochemische und biophysikalische Methoden*, Herausg. Mayr, A., P. A. Bachmann, B. Mayr-Bibrack & G. Wittmann, Gustav Fischer Stuttgart, New York, S. 17-163
- Deshpande, J. M. & K. H.- Dave (1991) Intratypic characterization of poliovirus type-1 isolates - *Indian J. Med. Res.* **A 93**, 202-207
- Deshpande, J. M. & K. H.- Dave (1992) Antibody response of children immunized with poliovaccines - An evaluation using 2 strains of poliovirus type-1 - *Indian J. Med. Res.* **A 95**, 216-220
- Devanathan, S., T. A. Dahl, W. R. Midden & D. C. Neckers (1990) Readily available fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies can be easily converted into targeted phototoxic agents for antibacterial, antiviral, and anticancer therapy. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2980-2984
- Dewalt, P. G., W. S. Blair & B. L. Semler (1990) A genetic locus in mutant poliovirus genomes involved in overproduction of RNA polymerase and 3C proteinase - *Virology* **174**, 504-514
- Dewalt, P. G. & B. L. Semler (1987) Site-directed mutagenesis of proteinase 3C results in a poliovirus deficient in synthesis of viral RNA polymerase - *J. Virol.* **61**, 2162-2170
- Diamond, D. C., B. A. Jameson, J. Bonin, M. Kohara, S. Abe, H. Itoh, T. Komatsu, M. Arita, S. Kuge, A. Nomoto, A. D. M. E. Osterhaus, R. Crainic & E. Wimmer (1985) Antigenic variation and resistance to neutralization in poliovirus type 1 - *Science* **229**, 1090-1093
- Dildine, S. L. & B. L. Semler (1989) The deletion of 41 proximal nucleotides reverts a poliovirus mutant containing a temperature-sensitive lesion in the 5' noncoding region of genomic RNA - *J. Virol.* **63**, 847-862
- Dildine, S. L. & B. L. Semler (1992) Conservation of RNA-protein interactions among picornaviruses - *J. Virol.* **66**, 4364-4376
- Dildine, S. L., K. R. Stark, A. A. Haller & B. L. Semler (1991) Poliovirus translation initiation - Differential effects of directed and selected mutations in the 5' noncoding region of viral RNAs - *Virology* **182**, 742-752
- DiMarchi, R., G. Brooke, C. Gale, C. Cracknell, T. Doel & N. Mowat (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide - *Science* **232**, 639
- Dimmock, N. J. (1987) Multiple mechanisms of neutralization of animal viruses - *Trends Biochem. Sci.* **12**, 70-75
- Doerr, H. W. & G. Maass (1991) Polio vaccinations - *Deut. Med. Wochenschr.* **116**, 875
- Dolmage, T. E., M. A. Avendano & R. S. Goldstein (1992) Respiratory function during wakefulness and sleep among survivors of respiratory and nonrespiratory poliomyelitis - *Eur. Resp. J.* **5**, 864-870
- Dorval, B., M. Chow & A. M. Klibanov (1990) Lysine and other diamines dramatically stabilize poliovirus against thermoinactivation - *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 1051-1054
- Dorval, B. L., M. Chow & A. M. Klibanov (1989) Stabilization of poliovirus against heat inactivation - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 1177-1183
- Doty, P. & R. F. Steiner (1950) Light scattering and spectrophotometry of colloidal solutions - *J. Chem. Phys.* **18**, 1211-1220
- Drescher-Lincoln, O., J. R. Putnak & B. A. Phillips (1983) Use of temperature-sensitive mutants to study the morphogenesis of poliovirus - *Virology* **126**, 301-316
- Drzeniek, R. (1975) Dissociation and reassociation of poliovirus - I. Effect of urea on the virion - *Z. Naturforsch.* **30c**, 523-531
- Drzeniek, R. & P. Bilello (1972) Dissociation and reassociation of infectious poliovirus particles - *Nature New Biol.* **240**, 118-122
- Drzeniek, R. & P. Bilello (1974) Absence of glycoproteins in poliovirus particles. - *J. Gen. Virol.* **25**, 125-132
- Drzeniek, R., C. Reichel, K. J. Wiegiers, A. Hamann & M. Hilbrig (1980) Isoelectric focusing and two-dimensional



- electrophoresis of viral proteins and virus-infected cells - In: *Electrophoresis* 79, Advanced methods, biochemical and clinical applications, Herausg. Radola, B. J., Walter de Gruyter Berlin, S. 475-489
- Dubs, M. C., D. Altschuh & M. H. V. van Regenmortel (1992) Mapping of viral epitopes with conformationally specific monoclonal antibodies using biosensor technology - *J. Chromatogr.* 597, 391-396
- Eagles, J. M. (1992) Are polioviruses a cause of schizophrenia - *Br. J. Psychiatry* 160, 598-600
- Emini, E. A., B. A. Jameson, A. J. Lewis, G. R. Larsen & E. Wimmer (1982) Poliovirus neutralization epitopes: Analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies - *J. Virol.* 43, 997-1005
- Emini, E. A., B. A. Jameson & E. Wimmer (1983a) Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides - *Nature* 304, 699-703
- Emini, E. A., B. A. Jameson & E. Wimmer (1984a) Identification of multiple neutralization antigenic sites on poliovirus type 1 and the priming of the immune response with synthetic peptides - In: *Modern approaches to vaccines*, Herausg. Channock, R. M. & R. A. Lerner, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y., S. 65-76
- Emini, E. A., B. A. Jameson & E. Wimmer (1984b) Identification of a new neutralizing antigenic site on poliovirus coat protein VP2 - *J. Virol.* 52, 719-721
- Emini, E. A., S.-Y. Kao, A. J. Lewis, R. Crainic & E. Wimmer (1983b) Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies - *J. Virol.* 46, 466-474
- Emini, E. A., P. Ostapchuk & E. Wimmer (1983c) Bivalent attachment of antibody onto poliovirus leads to conformational alteration and neutralization - *J. Virol.* 48, 547-550
- Englander, S. W. & H. T. Epstein (1957) Optical methods for measuring nucleoprotein and nucleic acid concentrations - *Arch. Biochem. Biophys.* 68, 144-149
- Equestre, M., D. Genovese, F. Cavaliere, L. Fiore, R. Santoro & R. P. Bercoff (1991) Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2 - *J. Virol.* 65, 2707-2710
- Erickson, K. L. (1986) Dietary fat modulation of immune response - *Int. J. Immunopharmacol.* 8, 529-543
- Etchison, D. & J. R. Etchison (1987) Monoclonal antibody-aided characterization of cellular p220 in uninfected and poliovirus-infected HeLa cells: Subcellular distribution and identification of conformers - *J. Virol.* 61, 2702-2710
- Evans, D. J., J. McKeating, J. M. Meredith, K. L. Burke, K. Katrak, A. John, M. Ferguson, P. D. Minor, R. A. Weiss & J. W. Almond (1989) An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies - *Nature* 339, 385-388
- Evans, D. M. A., P. D. Minor, G. S. Schild & J. W. Almond (1983) Critical role of an eight-amino acid sequence of VP1 in neutralization of poliovirus type 3 - *Nature* 304, 459-462
- Everaert, L., R. Vrijnsen & A. Boeyé (1989) Eclipse products of poliovirus after cold-synchronized infection of HeLa cells - *Virology* 171, 76-82
- Faden, H., J. F. Modlin, M. L. Thoms, A. M. McBean, M. B. Ferdon & P. L. Ogra (1990) Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in childhood - Systemic and local immune responses - *J. Infect. Dis.* 162, 1291-1297
- Feinstein, A., N. Richardson & M. J. Taussig (1986) Immunoglobulin flexibility in complement activation - *Immunol. Today* 7, 169-174
- Feller, D. C. & M. S. Collett (1992) Dipeptide backbone conformation and antibody recognition of a viral octapeptide epitope - *Biopolymers* 32, 1407-1415
- Ferguson, M., D. M. A. Evans, D. I. Magrath, P. D. Minor, J. W. Almond & G. C. Schild (1985) Induction by synthetic peptides of broadly reactive, type-specific neutralizing antibody to poliovirus type 3 - *Virology* 143, 505-515
- Ferguson, M. & P. D. Minor (1990) Differences in conformation of type 3 poliovirus antigenic sites on non-infectious empty particles and infectious virus - *J. Gen. Virol.* 71, 1271-1274
- Ferguson, M., D. J. Wood & P. D. Minor (1993) Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines - *J. Gen. Virol.* 74, 685-690
- Filman, D. J., R. Syed, M. Chow, A. J. Macadam, P. D. Minor & J. M. Hogle (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus - *EMBO J.* 8, 1567-1579
- Floyd, R. & D. G. Sharp (1978a) Viral aggregation: Effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH - *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1084-1094
- Floyd, R. & D. G. Sharp (1978b) Viral aggregation: Quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus - *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1079-1083
- Foriers, A., B. Rombaut & A. Boeyé (1990) Use of high-performance size-exclusion chromatography for the separation of poliovirus and subviral particles - *J. Chromatogr.* 498, 105-111
- Freier, S. M., R. Kierzek, J. A. Jaeger, N. Sugimoto, M. H. Caruthers, T. Neilson & D. H. Turner (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9373-9377
- Freistadt, M., G. Kaplan & V. R. Racaniello (1990) Heterogeneous expression of poliovirus receptor - Related proteins in human cells and tissues - *Mol. Cell. Biol.* 10, 5700-5706
- Freistadt, M. S. & V. R. Racaniello (1991) Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus - *J. Virol.* 65, 3873-3876
- Fricks, C. E. & J. M. Hogle (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: Externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding - *J. Virol.* 64, 1934-1945
- Frisby, D. P., R. I. Cotter & B. M. Richards (1977) Structural studies of encephalomyocarditis virus RNA both in situ and in free solution - *J. Gen. Virol.* 37, 311-322
- Froehlich, P. (1989) Understanding the sensitivity specification for a fluorescence spectrophotometer - *Internat. Lab.* , 42-45
- Galasso, G. J. & D. G. Sharp (1962) Virus particle aggregation and the plaque-forming unit - *J. Immunol.* 88, 339-347

- Gallyas, F., T. Gorcs & I. Merenthaler (1982) High grade intensification of the end-product of diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry - *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 183-185
- Gallyas, F. & I. Merenthaler (1988) Copper-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation strikingly improves silver intensification of the nickel-diaminobenzidine (Ni-DAB) end-product of the peroxidase reaction - *J. Histochem. Cytochem.* **36**, 807-810
- Gendler, S., J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard & J. Burchell (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats - *J. Biol. Chem.* **263**, 12820-12823
- Getzoff, E. D., H. M. Geysen, S. J. Rodda, H. Alexander, J. A. Tainer & R. A. Lerner (1987) Mechanisms of antibody binding to a protein - *Science* **235**, 1191-1196
- Getzoff, E. D., J. A. Tainer, R. A. Lerner & H. M. Geysen (1988) The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens - *Adv. Immunol.* **43**, 1-99
- Geysen, H. M., S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick & P. G. Schoofs (1987) Strategies for epitope analysis using peptide synthesis - *J. Immunol. Method.* **102**, 259-274
- Geysen, H. M., R. H. Meloen & S. J. Barteling (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3998-4002
- Giachetti, C., S. S. Hwang & B. L. Semler (1992) cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication - *J. Virol.* **66**, 6045-6057
- Giachetti, C. & B. L. Semler (1991) Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis - *J. Virol.* **65**, 2647-2654
- Giammanco, G., V. de Grandi, L. Lupo, A. Mistretta, S. Pignato, D. Teuween, H. Bogaerts & F. E. Andre (1988) Interference of oral poliovirus vaccine on RIT 4237 oral rotavirus vaccine - *Eur. J. Epidemiol.* **4**, 121-123
- Gilligan, C. A. & A. Li Wan Po (1991) Oral vaccines: Design and delivery - *Int. J. Pharm.* **75**, 1-24
- Giranda, V. L., B. A. Heinz, M. A. Oliveira, I. Minor, K. H. Kim, P. R. Kolatkar, M. G. Rossmann & R. R. Rueckert (1992) Acid-induced structural changes in human rhinovirus-14 - Possible role in uncoating - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10213-10217
- Godel, H., T. Graser, P. Földi, P. Pfaender & P. Fürst (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography - *J. Chromatogr.* **297**, 49-61
- Goldbach, R. & J. Wellink (1988) Evolution of plus-strand RNA viruses - *Intervirology* **29**, 260-267
- Goldstein, J. L., R. G. W. Anderson & M. S. Brown (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis - *Nature* **279**, 679-685
- Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter & T. N. Conolly (1966) Hydrogen ion buffers for biological research - *Biochemistry* **5**, 467-476
- Gooding, L. R. (1992) Virus proteins that counteract host immune defenses - *Cell* **71**, 5-7
- Gorbalenya, A. E., V. M. Blinov & A. P. Donchenko (1986) Poliovirus-encoded proteinase 3C: A possible evolutionary link between cellular serine and cysteine proteinase families - *FEBS Lett.* **194**, 253-257
- Gorbalenya, A. E., A. P. Donchenko, V. M. Blinov & E. V. Koonin (1989) Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases - A distinct protein superfamily with a common structural fold - *FEBS Lett.* **243**, 103-114
- Gorbalenya, A. E. & E. V. Koonin (1989) Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern - *Nucl. Acids Res.* **17**, 8413-8440
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin & Y. I. Wolf (1990) A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses - *FEBS Lett.* **262**, 145-148
- Gotoh, O. (1990) Optimal sequence alignment allowing for long gaps - *Bull. Math. Biol.* **52**, 359-373
- Gould, E. A., A. Buckley, A. D. T. Barrett & N. Cammack (1986) Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural Yellow Fever virus proteins confer immunity in mice - *J. Gen. Virol.* **67**, 591-595
- Grady, L. J. & W. Kinch (1985) Two monoclonal antibodies against La Crosse virus show host-dependent neutralizing activity - *J. Gen. Virol.* **66**, 2773-2776
- Graham, S., E. C. Y. Wang, O. Jenkins & L. K. Borysiewicz (1993) Analysis of the human T-cell response to picornaviruses - Identification of T-cell epitopes close to B-cell epitopes in poliovirus - *J. Virol.* **67**, 1627-1637
- Green, M. S., R. Handsher, D. Cohen, J. L. Melnick, R. Slepson, E. Mendelsohn & Y. L. Danon (1993) Age differences in immunity against wild and vaccine strains of poliovirus prior to the 1988 outbreak in Israel and response to booster immunization - *Vaccine* **11**, 75-81
- Green, N. M. (1969) Electron microscopy of the immunoglobulins - *Adv. Immunol.* **11**, 1-30
- Groebe, D. R. & O. C. Uhlenbeck (1988) Characterization of RNA hairpin loop stability - *Nucl. Acids Res.* **16**, 11725-11735
- Gromeier, M. & K. Wetz (1990) Kinetics of poliovirus uncoating in HeLa cells in a nonacidic environment - *J. Virol.* **64**, 3590-3597
- Guinea, R. & L. Carrasco (1991) Effects of fatty acids on lipid synthesis and viral RNA replication in poliovirus-infected cells - *Virology* **185**, 473-476
- Guinea, R., A. Lopez-Rivas & L. Carrasco (1989) Modification of phospholipase C and phospholipase A2 activities during poliovirus infection - *J. Biol. Chem.* **264**, 21923-21927
- Hacker, G. W., L. Grmelius, G. Danscher, G. Bernatzky, W. Muss, H. Adam & J. Thurner (1988) Silver acetate autoradiography: An alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues - *J. Histo-technol.* **11**, 213-221 + Anhang
- Hafler, D. A., D. A. Fox, D. Benjamin, M.-L. Blue & H. L. Weiner (1987) Secondary immune amplification following live poliovirus immunization in humans - *Clin. Immunol. Immunopathol.* **44**, 321-328
- Hagino-Yamagishi, K. & A. Nomoto (1989) In vitro construction of poliovirus defective interfering particles - *J. Virol.*

- 63, 5386-5392
- Hahn-Zoric, M., F. Fulconis, I. Minoli, G. Moro, B. Carlsson, M. Böttiger, N. Rähä & L. A. Hanson (1990) Antibody responses to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding - *Acta Paediatr. Scand.* **79**, 1137-1142
- Hajdu, J. & L. N. Johnson (1990) Progress with Laue diffraction studies on protein and virus crystals - *Biochemistry* **29**, 1669-1678
- Haller, A. A. & B. L. Semler (1992) Linker scanning mutagenesis of the internal ribosome entry site of poliovirus RNA - *J. Virol.* **66**, 5075-5086
- Halstead, S. B. (1988) "Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular biology." - *Science* **239**, 476
- Hamann, A. & R. Drzeniek (1978) Isoelectric focusing of viral polypeptides in urea - A methodological study on poliovirus - *J. Chromatogr.* **147**, 243-262
- Hamann, A., C. Reichel, K. J. Wieggers & R. Drzeniek (1978) Isoelectric points of polypeptides of standard poliovirus particles of different serological types and of empty capsids and dense particles of poliovirus type 1 - *J. Gen. Virol.* **38**, 567-570
- Hamann, A., K. J. Wieggers & R. Drzeniek (1977) Isoelectric focusing and 2D-analysis of poliovirus proteins - *Virology* **78**, 359-362
- Hambidge, S. J. & P. Sarnow (1992) Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide-2A - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10272-10276
- Hammarback, J. A. & R. B. Vallee (1990) Antibody exchange immunochemistry - *J. Biol. Chem.* **265**, 12763-12766
- Hämmerle, T., C. U. T. Hellen & E. Wimmer (1991) Site-directed mutagenesis of the putative catalytic triad of poliovirus 3C proteinase - *J. Biol. Chem.* **266**, 5412-5416
- Hancock, W. S., C. A. Bishop, R. L. Prestidge & M. T. W. Hearn (1978) The use of high pressure liquid chromatography (hplc) for peptide mapping of proteins - *Anal. Biochem.* **89**, 203-212
- Hara, M., M. Arita, Z. Yamazaki, A. Hagiwara & Y. Saito (1987) Antigenic and biochemical characterization of poliovirus type 1 isolates - *Microbiol. Immunol.* **31**, 327-336
- Harber, J. J., J. Bradley, C. W. Anderson & E. Wimmer (1991) Catalysis of poliovirus VP0 maturation cleavage is not mediated by serine-10 of VP2 - *J. Virol.* **65**, 326-334
- Harms, J. (1988) Versuche zur Bestimmung antigener Determinanten von Peptiden des Polioviruspartikels. Diplomarbeit Universität Hamburg, FB Biologie
- Harris, K. S., S. R. Reddigari, M. J. H. Nicklin, T. Hämmerle & E. Wimmer (1992) Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase - *J. Virol.* **66**, 7481-7489
- Hashida, S. & E. Ishikawa (1990) Detection of one milliatomole of ferritin by novel and ultrasensitive enzyme immunoassay - *J. Biochem.* **108**, 960-964
- Heinz, F. X. (1986) Epitope mapping of Flavivirus glycoproteins - *Adv. Virus Res.* **31**, 103-168
- Heinz, F. Z., C. Mandl, R. Berger, W. Tuma & C. Kunz (1984) Antibody-induced conformational changes result in enhanced avidity of antibodies to different antigenic sites on the tick-born encephalitis virus glycoprotein - *Virology* **133**, 25-34
- Heitmann, D. & J. M. Lopez-Pila (1993) Frequency and conditions of spontaneous plasmid transfer from *E. coli* to cultured mammalian cells - *Biosystems* **29**, 37-48
- Held, J. P., O. Diziën & C. Diard (1991) Late post-poliomyelitis syndrome - *Presse Medicale* **20**, 1305-1306
- Hellen, C. U. T., H.-G. Krüsslich & E. Wimmer (1989) Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses - *Biochemistry* **28**, 9881-9890
- Hellen, C. U. T., C. K. Lee & E. Wimmer (1992) Determinants of substrate recognition by poliovirus-2A proteinase - *J. Virol.* **66**, 3330-3338
- Hellen, C. U. T. & E. Wimmer (1992a) Maturation of poliovirus capsid proteins - *Virology* **187**, 391-397
- Hellen, C. U. T. & E. Wimmer (1992b) The role of proteolytic processing in the morphogenesis of virus particles - *Experientia* **48**, 201-215
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1981) Chemische Analyse und Struktur des Poliovirus. - I. Cystein/Cystin-Gehalt, vollständige Aminosäureanalyse und Hydrophobizität von Poliovirus und seinen natürlichen leeren Kapsiden. - *Z. Naturforsch.* **36c**, 164-172
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1982) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of virus proteins and other large hydrophobic proteins in formic acid containing solvents - *J. Chromatogr.* **252**, 241-254
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1983) Rapid analytical and preparative separation of structural polypeptides of poliovirus by reverse-phase high-performance liquid chromatography - *J. Virol. Meth.* **6**, 283-293
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1985) Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography - *J. Chromatogr.* **326**, 91-101
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1988) The use of a photodiode array detector for detection and characterization of RP-HPLC-separated tryptic peptides - 1.-3. Würzburger Chromatographie-Gespräche 1986-1988. Pharmacia
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1988) Trennung hydrophober Virusproteine - *Chromatographia* **25**, 230-236
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1989) Analytische und präparative Auftrennung von Peptidmischungen: Kriterien zur Auswahl des Trennsystems - 4. Würzburger Chromatographie-Gespräche 4.-6. September 1989. Pharmacia LKB GmbH Freiburg 1990, S. 100-111
- Hey, T. D., O. C. Richards & E. Ehrenfeld (1986) Synthesis of plus- and minus-strand RNA from poliovirus RNA template in vitro - *J. Virol.* **58**, 790-796
- Hey, T. D., O. C. Richards & E. Ehrenfeld (1987) Host factor-induced template modification during synthesis of poliovirus RNA in vitro - *J. Virol.* **61**, 802-811
- Hinman, A. R., W. H. Foege, C. A. de Quadros, P. A. Patriarca, W. A. Orenstein & E. W. Brink (1987) The case for global eradication of poliomyelitis - *Bull. WHO* **65**, 835-840
- Hoatlin, M. E., O. M. Kew & M. E. Renz (1987) Regions of poliovirus protein VP1 produced in *E. coli* induce neutralizing antibodies - *J. Virol.* **61**, 1442-1447



- Hobom, B. (1. 7. 1992) Eleganter Knockout für Gene - Frankfurter Allgemeine Zeitung
- Hogle, J. M. (1988) Antigenic hybrids of poliovirus - *Nature* **332**, 13-14
- Hogle, J. M., M. Chow & D. J. Filman (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution - *Science* **229**, 1358-1365
- Hogle, J. M., M. Chow & D. J. Filman (1986) The structure of poliovirus at 2.9Å resolution - Crystallographic methods and biological implications - In: *Crystallography in molecular biology*, Herausg. Moras, D., J. Drenth, B. Strandberg, D. Suck & K. Wilson, Plenum Publishing Corp. New York, S. 281
- Hogle, J. M., M. Chow & D. J. Filman (1987a) Feinbau des Poliovirus - *Spektrum der Wissenschaft*, 96-104
- Hogle, J. M., M. Chow & D. J. Filman (1987b) The structure of poliovirus - *Scient. Am.* **256**, 42-49
- Hogle, J. M. & D. J. Filman (1989) The antigenic structure of poliovirus - *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* **323**, 467-478
- Hogle, J. M., D. J. Filman, R. Syed, M. Chow & P. D. Minor (1989) Structural basis for serotypic differences and thermostability in poliovirus - In: *Molecular aspects of picornavirus infection and detection*, Herausg. Semler, B. L. & E. Ehrenfeld, American Society for Microbiology Washington, DC, S. 125
- Hogle, J. M., R. Syed, T. O. Yeates, D. Jacobson, T. Critchlow & D. J. Filman (1988) Structural determinants of serotype specificity and host range in poliovirus - In: *Concepts in viral pathogenesis /III*, Herausg. Notkins, A. L. & M. B. A. Oldstone, Springer New York, S.
- Holgate, C. S., P. Jackson, Cowen P N & Bird C C (1983) Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity - *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 938-944
- Holland, J. J., E. Domingo, J. C. de la Torre & D. A. Steinhauer (1990) Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis - *J. Virol.* **64**, 3960-3962
- Homsy, J., M. Meyer, M. Tateno, S. Clarkson & J. A. Levy (1989) The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells - *Science* **244**, 1357-1360
- Hoover-Litty, H. & J. M. Greve (1993) Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion - *J. Virol.* **67**, 390-397
- Hopkins, G. R. & R. L. Sinsheimer (1955) Visible and ultraviolet light scattering by tobacco mosaic virus nucleic acid - *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 476-484
- Hopp, T. P. & K. R. Woods (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3824-3828
- Hovi, T. (1986) Immunization against poliomyelitis: Still problems to solve in both developed and developing countries - *Ann. Clin. Res.* **18**, 119-120
- Hovi, T. (1989) The outbreak of poliomyelitis in Finland in 1984-1985: Significance of antigenic variation of type 3 polioviruses and site specificity of antibody responses in antipolio immunizations - *Adv. Virus Res.* **37**, 243-275
- Hovi, T. (1991) Remaining problems before eradication of poliomyelitis can be accomplished - *Prog. Med. Virol.* **38**, 69-95
- Hovi, T. & M. Roivainen (1989) Radiometric cytolysis inhibition assay, a new rapid test for neutralizing antibodies to intact and trypsin-cleaved poliovirus - *J. Clin. Microbiol.* **27**, 709-715
- Howard, R. S., C. M. Wiles & G. T. Spencer (1988) The late sequelae of poliomyelitis - *Quart. J. Med., New Ser.* **66**, 219-232
- Hsu, Y.-H. (1984) Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper - *Anal. Biochem.* **142**, 221-225
- Hughes, P. J., D. M. A. Evans, P. D. Minor, G. C. Schild, J. W. Almond & G. Stanway (1986) The nucleotide sequence of type 3 poliovirus isolated during a recent outbreak of poliomyelitis in Finland - *J. Gen. Virol.* **67**, 2093-2102
- Hyatt, A. D., D. A. McPhee & J. R. White (1988) Antibody competition studies with gold-labelling immunoelectron microscopy - *J. Virol. Meth.* **19**, 23-32
- Icenogle, J., H. Shiwen, G. Duke, S. Gilbert, R. Rueckert & J. Andereg (1983) Neutralization of poliovirus by a monoclonal antibody: Kinetics and stoichiometry - *Virology* **127**, 412-425
- Iizuka, N., M. Kohara, K. Hagino-Yamagishi, S. Abe, T. Komatsu, K. Tago, M. Arita & A. Nomoto (1989) Construction of less neurovirulent polioviruses by introducing deletions into the 5' noncoding sequence of the genome - *J. Virol.* **63**, 5354-5363
- Ishida, Y., T. Fujita & K. Asai (1981) New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography - *J. Chromatogr.* **204**, 143-148
- Ishihama, A. & K. Nagata (1988) Viral RNA polymerases - *CRC Crit. Rev. Biochem.* **23**, 27-76
- Itoh, H., N. Nimura, T. Kinoshita, N. Nagae & M. Nomura (1991) Fast protein separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography on octadecylsilyl-bonded nonporous silica gel - II. Improvement in recovery of hydrophobic proteins - *Anal. Biochem.* **199**, 7-10
- Jablonski, S. A., M. Luo & C. D. Morrow (1991) Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerase mutants with single amino acid changes in the conserved YGDD amino acid motif - *J. Virol.* **65**, 4565-4572
- Jackson, R. J., M. T. Howell & A. Kaminski (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation - *Trends Biochem. Sci.* **15**, 477-483
- Jacobson, S. J., D. A. M. Konings & P. Sarnow (1993) Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification - *J. Virol.* **67**, 2961-2971
- Jaeger, J. A., D. H. Turner & M. Zuker (1989) Improved predictions of secondary structures for RNA - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7706-7710
- Jamal, G. A. & R. G. Miller (1991) Neurophysiology of post-viral fatigue syndrome - *Br. Med. Bull.* **47**, 815-825
- Jang, S. K., T. V. Pestova, C. U. T. Hellen, G. W. Witherell & E. Wimmer (1990) Cap-independent translation of picornavirus RNAs - Structure and function of the internal ribosomal entry site - *Enzyme* **44**, 292-309
- Jarvis, T. C. & K. Kirkegaard (1992) Poliovirus RNA recom-

- bination - Mechanistic studies in the absence of selection - *EMBO J.* **11**, 3135-3145
- Jenkins, O., J. Cason, K. L. Burke, D. Lunney, A. Gillen, D. Patel, D. J. McCance & J. W. Almond (1990) An antigen chimera of poliovirus induces antibodies against human papillomavirus type 16 - *J. Virol.* **64**, 1201-1206
- Jerne, N. K. (1985) Die generative Grammatik des Immunsystems (Nobel-Vortrag) - *Angew. Chem.* **97**, 813-818
- Jewell, J. E., L. A. Ball & R. Rueckert (1990) Limited expression of poliovirus by vaccinia virus recombinants due to inhibition of the vector by proteinase 2A - *J. Virol.* **64**, 1388-1393
- Joachims, M. & D. Etchison (1992) Poliovirus infection results in structural alteration of a microtubule-associated protein - *J. Virol.* **66**, 5797-5804
- Johnson, K. L. & P. Sarnow (1991) Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus - *J. Virol.* **65**, 4341-4349
- Jones, A. E., A. Johns, D. I. Magrath, M. Melville-Smith & F. Sheffield (1989) Durability of immunity to diphtheria, tetanus and poliomyelitis after a three dose immunization schedule completed in the first eight months of live - *Vaccine* **7**, 300-302
- Jones, B. N., S. Pääbo & S. Stein (1981) Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure - *J. Liq. Chromatogr.* **4**, 565-586
- Jones, R. F. (1991) Post polio syndrome - What can we do - *Med. J. Australia* **155**, 360-361
- Jore, J., B. de Geus, R. J. Jackson, P. H. Pouwels & B. E. Enger-Valk (1988) Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro - *J. Gen. Virol.* **69**, 1627-1636
- Jore, J. P. M., G. Veldhuisen, P. H. Pouwels, A. Boeyé, R. Vrijzen & B. Rombaut (1991) Formation of subviral particles by in vitro translation of subgenomic poliovirus RNAs - *J. Gen. Virol.* **72**, 2721-2726
- Jubelt, B. & H. Lipton (1987) Lansing poliovirus infection in mice: Antibody demonstrable by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation but not by neutralization - *J. Neuroimmunol.* **14**, 109-121
- Jubelt, B., S. L. Ropka, S. J. Goldfarb & J. L. Janavs (1989) Anti-thymocyte serum delays clearance of poliovirus from the mouse central nervous system - *J. Neuroimmunol.* **22**, 223-232
- Jubelt, B., S. L. Ropka, S. Goldfarb, C. Waltenbaugh & R. P. Oates (1991) Susceptibility and resistance to poliovirus-induced paralysis of inbred mouse strains - *J. Virol.* **65**, 1035-1040
- Kaplan, G. & V. R. Racaniello (1988) Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons - *J. Virol.* **62**, 1687-1689
- Kaplan, G., M. Freistadt & V. R. Racaniello (1990b) Neutralization of poliovirus by cell receptors expressed in insect cells - *J. Virol.* **64**, 4697-4702
- Kaplan, G., A. Levy & V. R. Racaniello (1989) Isolation and characterization of HeLa cell lines blocked at different steps in the poliovirus life cycle - *J. Virol.* **63**, 43-51
- Kaplan, G., D. Peters & V. R. Racaniello (1990a) Poliovirus mutants resistant to neutralization with soluble cell receptors - *Science* **250**, 1596-1599
- Kaplan, G. & V. R. Racaniello (1991) Down regulation of poliovirus receptor RNA in HeLa cells resistant to poliovirus infection - *J. Virol.* **65**, 1829-1835
- Karplus, P. A. & G. E. Schulz (1985) Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens - *Naturwissenschaften* **72**, 212-213
- Katrak, K., B. P. Mahon, P. D. Minor & K. H. G. Mills (1991) Cellular and humoral immune responses to poliovirus in mice - A role for helper T-cells in heterotypic immunity to poliovirus - *J. Gen. Virol.* **72**, 1093-1098
- Kawamura, N., M. Kohara, S. Abe, T. Komatsu, K. Tago, M. Arita & A. Nomoto (1989) Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype - *J. Virol.* **63**, 1302-1309
- Kay, J. & B. M. Dunn (1990) Viral proteinases: Weakness in strength - *Biochim. Biophys. Acta* **1048**, 1-18
- Kean, K. M., M. T. Howell, S. Grünert, M. Girard & R. J. Jackson (1993) Substitution mutations at the putative catalytic triad of the poliovirus 3C protease have differential effects on cleavage at different sites - *Virology* **194**, 360-364
- Kean, K. M., N. Teterina & M. Girard (1990) Cleavage specificity of the poliovirus 3C protease is not restricted to Gly at the 3C/3D junction - *J. Gen. Virol.* **71**, 2553-2563
- Kean, K. M., C. Wychowski, H. Kopecka & M. Girard (1986) Highly infectious plasmids carrying poliovirus cDNA are capable of replication in transfected simian cells - *J. Virol.* **59**, 490-493
- Kellenberger, E. (1990) Form determination of heads of bacteriophages - *Eur. J. Biochem.* **190**, 233-248
- Kerr, M. A. (1990) The structure and function of human IgA - *Biochem. J.* **271**, 285-296
- Ketterlinus, R., K. Wieggers & R. Dernick (1993) Revertants of poliovirus escape mutants - New insights into antigenic structures - *Virology* **192**, 525-533
- Kew, O. M. & B. K. Nottay (1984) Molecular epidemiology of polioviruses - *Rev. Infec. Dis.* **6**, S499-S504
- Kilian, M., J. Mestecky & M. W. Russell (1988) Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases - *Microbiol. Rev.* **52**, 296-303
- Kimura-Kuroda, J. & K. Yasui (1983) Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese Encephalitis virus, using monoclonal antibodies - *J. Virol.* **45**, 124-132
- Kinet, J.-P. (1989) Antibody-cell interactions: Fc receptors - *Cell* **57**, 351-354
- King, A. M. Q. (1988) Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: An analysis of 40 intertypic cross-over sequences - *Nucl. Acids Res.* **16**, 11705-11723
- Kinnunen, E., M. Färkkilä, T. Hovi, J. Juntunen & P. Weckström (1989) Incidence of Guillain-Barre syndrome during a nationwide oral poliovirus vaccine campaign - *Neurology* **39**, 1034-1036
- Kinnunen, L. & T. Hovi (1989) Partial RNA sequencing of eight supposed derivatives of type 3 poliovirus/USA/Saukett/50 reveals remarkable differences

- between three apparent substrains - *Virology* **170**, 316-320
- Kinnunen, L., A. Huovilainen, T. Pöyry & T. Hovi (1990) Rapid molecular evolution of wild type 3 poliovirus during infection in individual hosts - *J. Gen. Virol.* **71**, 317-324
- Kinnunen, L., T. Pöyry & T. Hovi (1991) Generation of virus genetic lineages during an outbreak of poliomyelitis - *J. Gen. Virol.* **72**, 2483-2489
- Kirkegaard, K. (1990) Mutations in VP1 of poliovirus specifically affect both encapsidation and release of viral RNA - *J. Virol.* **64**, 195-206
- Kirkegaard, K. & B. Nelsen (1990) Conditional poliovirus mutants made by random deletion mutagenesis of infectious cDNA - *J. Virol.* **64**, 185-194
- Kitamura, N., B. L. Semler, P. G. Rothberg, G. R. Larsen, C. J. Adler, A. J. Dorner, E. A. Emini, R. Hanecak, J. J. Lee, S. van der Werf, C. W. Anderson & E. Wimmer (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA - *Nature* **291**, 547-553
- Kitson, J. D. A., K. L. Burke, L. A. Pullen, G. J. Belsham & J. W. Almond (1991) Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs - *J. Virol.* **65**, 3068-3075
- Kliber, J. S., G. Hui Bon Hoa, P. Douzou, M. Graffe & M. Grunberg-Manago (1976) Implication of electrostatic potentials on ribosomal proteins - *Nucl. Acids Res.* **3**, 3423-3438
- Kobayashi, R. & Y. Tashima (1989) Visualization of antigen on nitrocellulose membrane by the oxidative coupling reaction of N,N'-dimethyl-p-phenyldiamine and 4-chloro-1-naphthol - *Anal. Biochem.* **183**, 9-12
- Kobayashi, T., A. Ametani, K. Yamauchi & S. Kaminogawa (1991) Differences in defining residues relevant to antibody binding by ELISA and proteolysis protection at the level of peptide antigenic determinants - *Biochim. Biophys. Acta* **1077**, 11-18
- Koch, A. L. (1984) Turbidity measurements in microbiology - *ASM News* **50**, 473-477
- Koch, F. & G. Koch (1985) *The molecular biology of poliovirus*. Springer-Verlag Wien New York
- Kohara, M., S. Abe, T. Komatsu, K. Tago, M. Arita & A. Nomoto (1988) A recombinant virus between the Sabin 1 and Sabin 3 vaccine strains of poliovirus as a possible candidate for a new type 3 poliovirus live vaccine strain - *J. Virol.* **62**, 2828-2835
- Kohara, M., S. Abe, S. Kuge, B. L. Semler, T. Komatsu, M. Arita, H. Itoh & A. Nomoto (1986) An infectious cDNA clone of the poliovirus Sabin strain could be used as a stable repository and inoculum for the oral polio live vaccine - *Virology* **151**, 21-30
- Köhler, G. (1986) Derivation and diversification of monoclonal antibodies - *Science* **233**, 1281-1286
- Koike, S., H. Horie, I. Ise, A. Okitsu, M. Yoshida, N. Iizuka, K. Takeuchi, T. Takegami & A. Nomoto (1990) The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms - *EMBO J.* **9**, 3217-3224
- Koike, S., I. Ise & A. Nomoto (1991a) Functional domains of the poliovirus receptor - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4104-4108
- Koike, S., I. Ise, Y. Sato, H. Yonekawa, O. Gotoh & A. Nomoto (1992) A 2nd gene for the African Green Monkey poliovirus receptor that has no putative N-glycosylation site in the functional N-terminal immunoglobulin-like domain - *J. Virol.* **66**, 7059-7066
- Koike, S., C. Taya, T. Kurata, S. Abe, I. Ise, H. Yonekawa & A. Nomoto (1991b) Transgenic mice susceptible to poliovirus - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 951-955
- Kolaskar, A. S. & P. C. Tongaonkar (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens - *FEBS Lett.* **276**, 172-174
- Komaroff, A. L. (1988) Chronic fatigue syndromes: Relationship to chronic viral infections - *J. Virol. Meth.* **21**, 3-10
- König, H. & B. Rosenwirth (1988) Purification and partial characterization of poliovirus protease 2A by means of a functional assay - *J. Virol.* **62**, 1243
- Koonin, E. V. & A. E. Gorbalenya (1992) An insect picornavirus may have genome organization similar to that of caliciviruses - *FEBS Lett.* **297**, 81-86
- Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase & S. Jonjic (1991) The role of CD4 and CD8 T-cells in viral infections - *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 471-475
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs - *Nucl. Acids Res.* **15**, 8125-8132
- Kozak, M. (1992) A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes - *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **27**, 385-402
- Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures - *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950
- Kräusslich, H.-G. & E. Wimmer (1988) Viral proteinases - *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701-754
- Kräusslich, H. G., M. J. H. Nicklin, H. Toyoda, D. Etchison & E. Wimmer (1987) Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220 - *J. Virol.* **61**, 2711-2718
- Krishnaswamy, S. & M. G. Rossmann (1990) Structural refinement and analysis of Mengo virus - *J. Mol. Biol.* **211**, 803-844
- Kronenberger, P., R. Vrijnsen, A. Geerts & A. Boeyé (1992) Internalization of intact poliovirus by HeLa cells as shown by subcellular fractionation in isoosmotic Nycodenz gradients - *J. Gen. Virol.* **73**, 597-605
- Kuge, S., N. Kawamura & A. Nomoto (1989a) Strong inclination toward transition mutation in nucleotide substitutions by poliovirus replicase - *J. Mol. Biol.* **207**, 175-182
- Kuge, S., N. Kawamura & A. Nomoto (1989b) Genetic variation occurring on the genome of an in vitro insertion mutant of poliovirus type 1 - *J. Virol.* **63**, 1069-1075
- Kuge, S. & A. Nomoto (1987) Construction of viable deletion and insertion mutants of the Sabin strain of type 1 poliovirus: Function of the 5' noncoding sequence in viral replication - *J. Virol.* **61**, 1478-1487
- Kuge, S., I. Saito & A. Nomoto (1986) Primary structure of poliovirus defective-interfering particle genomes and

- possible generation mechanisms of the particles - *J. Mol. Biol.* **192**, 473-487
- Kuhn, R. J., H. Tada, M. F. Ypma-Wong, J. J. Dunn, B. L. Semler & E. Wimmer (1988b) Construction of a "mutagenesis cartridge" for poliovirus genome-linked viral protein: Isolation and characterization of viable and nonviable mutants - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 519-523
- Kuhn, R. J., H. Tada, M. F. Ypma-Wong, B. L. Semler & E. Wimmer (1988a) Mutational analysis of the genome-linked protein VPg of poliovirus - *J. Virol.* **62**, 4207-4215
- Kutubuddin, M., J. Simons & M. Chow (1992a) Identification of T-helper epitopes in the VP1 capsid protein of poliovirus - *J. Virol.* **66**, 3042-3047
- Kutubuddin, M., J. Simons & M. Chow (1992b) Poliovirus-specific major histocompatibility complex class-I - Restricted cytolitic T-cell epitopes in mice localize to neutralizing antigenic regions - *J. Virol.* **66**, 5967-5974
- Kyle, W. S. (1992) Simian retroviruses, poliovaccine, and origin of AIDS - *Lancet* **339**, 600-601
- Lahrech, M. T. & P. Caudrelier (1990) Immunological response of Moroccan children and newborns to oral poliovirus vaccine prepared on Vero cells - *Vaccine* **8**, 306-307
- Lai, M. M. C. (1992) RNA recombination in animal and plant viruses - *Microbiol. Rev.* **56**, 61-79
- Lain, S., J. L. Riechmann & J. A. Garcia (1990) RNA helicase - A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus - *Nucl. Acids Res.* **18**, 7003-7006
- Lama, J. & L. Carrasco (1992a) Expression of poliovirus non-structural proteins in *E. coli* cells - Modification of membrane permeability induced by 2B and 3A - *J. Biol. Chem.* **267**, 15932-15937
- Lama, J. & L. Carrasco (1992b) Inducible expression of a toxic poliovirus membrane protein in *E. coli*: Comparative studies using different expression systems based on T7 promoters - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 972-981
- Lama, J., R. Guinea, F. Martinez-Abarca & L. Carrasco (1992) Cloning and inducible synthesis of poliovirus non-structural proteins - *Gene* **117**, 185-192
- La Monica, N., J. W. Almond & V. R. Racaniello (1987b) A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus for humans - *J. Virol.* **61**, 2917-2920
- La Monica, N., W. J. Kupsy & V. R. Racaniello (1987a) Reduced neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing antigenic variants selected with monoclonal antibodies - *Virology* **161**, 429-437
- La Monica, N., C. Meriam & V. R. Racaniello (1986) Mapping of sequences required for mouse neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing - *J. Virol.* **57**, 515-525
- Langford, M. P., R. Crainic, R. Vrijssen & E. Wimmer (1991) Antibodies may act synergistically or additively with interferon to inhibit poliovirus - *Microb. Pathog.* **10**, 419-427
- Larsen, G. R., B. L. Semler & E. Wimmer (1981) Stable hairpin structure within the 5'-terminal 85 nucleotides of poliovirus RNA - *J. Virol.* **37**, 328-335
- Laver, W. G., G. M. Air, R. G. Webster & S. J. Smithgill (1990) Epitopes on protein antigens - Misconceptions and realities - *Cell* **61**, 553-556
- Le, S. Y., J. H. Chen, N. Sonenberg & J. V. Maizel (1992) Conserved tertiary structure elements in the 5' untranslated region of human enteroviruses and rhinoviruses - *Virology* **191**, 858-866
- Le, S. Y. & M. Zuker (1990) Common structures of the 5' non-coding RNA in enteroviruses and rhinoviruses - Thermodynamical stability and statistical significance - *J. Mol. Biol.* **216**, 729-741
- Le, S. Y. & M. Zuker (1991) Predicting common foldings of homologous RNAs - *J. Biomol. Struct. Dyn.* **8**, 1027-1044
- Leclerc, C., E. Deriaud, V. Mimic & S. van der Werf (1991) Identification of a T-Cell epitope adjacent to neutralization antigenic site 1 of poliovirus type 1 - *J. Virol.* **65**, 711-718
- Leclerc, C., P. Martineau, S. van der Werf, E. Deriaud, P. Duplay & M. Hofnung (1990) Induction of virus-neutralizing antibodies by bacteria expressing the C3 poliovirus epitope in the periplasm - The route of immunization influences the isotypic distribution and the biologic activity of the antipoliovirus antibodies - *J. Immunol.* **144**, 3174-3182
- Lee, C.-K. & E. Wimmer (1988) Proteolytic processing of poliovirus polyprotein: Elimination of 2A pro-mediated, alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis - *Virology* **166**, 405-414
- Lee, T., M. Crowell, M. H. Shearer, G. M. Aron & J. D. Irvin (1990) Poliovirus-mediated entry of Pokeweed antiviral protein - *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2034-2037
- Lee, W. M., S. S. Monroe & R. R. Rueckert (1993) Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses - Activation of an infectiousome - *J. Virol.* **67**, 2110-2122
- Lee, Y. M. H. & M. Chow (1992) Myristate modification does not function as a membrane association signal during poliovirus capsid assembly - *Virology* **187**, 814-820
- Lemon, S. M., W. Barclay, M. Ferguson, P. Murphy, L. Jing, K. Burke, D. Wood, K. Katrak, D. Sangar, P. D. Minor & J. W. Almond (1992) Immunogenicity and antigenicity of chimeric picornaviruses which express hepatitis-A virus (HAV) peptide sequences - Evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV - *Virology* **188**, 285-295
- Lemon, S. M. & S. E. Robertson (1991) Global eradication of poliomyelitis - Recent progress, future prospects, and new research priorities - *Prog. Med. Virol.* **38**, 42-55
- Lenstra, J. A., J. G. Kusters & B. A. M. van der Zeijst (1990) Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products - *Arch. Virol.* **110**, 1-24
- Lesk, A. M. (1985) Protein structure and evolution: Similar amino acid sequences sometimes produce strikingly different three-dimensional structures - *BioEssays* **2**, 213-214
- Levine, B., J. M. Hardwick, B. D. Trapp, T. O. Crawford, R. C. Bollinger & D. E. Griffin (1991) Antibody-mediated clearance of Alphavirus infection from neurons - *Science* **254**, 856-860
- Lewis, G. K. & C.-P. Feng (1992) Intrinsic immunogenicity of an internal VP1 T-B epitope pair of type-1 poliovirus - *Mol. Immunol.* **29**, 1477-1485
- Li, J.-P. & D. Baltimore (1988) Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis - *J. Virol.* **62**, 4016-4021

- Li, T. S., Z. G. Chen, J. E. Johnson & G. J. Thomas (1992) Studies of virus structure by laser Raman spectroscopy. 35. Conformations, interactions, and thermostabilities of RNA and proteins in Bean Pod Mottle Virus - Investigation of solution and crystal structures by laser Raman spectroscopy - *Biochemistry* **31**, 6673-6682
- Liang, C.-M., S. Henry, S.-M. Liang & J. S. Epstein (1990) An anti-p24 monoclonal antibody shows cross-reactivity with multiple HIV-1 proteins - *J. Immunol. Method.* **132**, 57-62
- Liljas, L. (1986) The structure of spherical viruses - *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **48**, 1-36
- Liljas, L. (1991) Structure of spherical viruses - *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 273-280
- Lipskaya, G. Y., A. R. Muzychenko, O. K. Kutitova, S. V. Maslova, M. Equestre, S. G. Drozdov, R. P. Bercoff & V. I. Agol (1991) Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype-2 specificity from vaccine-associated polio cases - *J. Med. Virol.* **35**, 290-296
- Lloyd, R. E. & M. Bovee (1993) Persistent infection of human erythroblastoid cells by poliovirus - *Virology* **194**, 200-209
- Lloyd, R. E., H. G. Jense & E. Ehrenfeld (1987) Restriction of translation of capped mRNA in vitro as a model for poliovirus-induced inhibition of host cell protein synthesis: Relationship to p220 cleavage - *J. Virol.* **61**, 2480-2488
- Lopez-Guerrero, J. A., L. Carrasco, F. Martinez-Abarca, M. Fresno, M. A. Alonso, S. G. (1989) Restriction of poliovirus RNA translation in a human monocytic cell line - *Eur. J. Biochem.* **186**, 577-582
- Lopez-Guerrero, J. A., F. Martinez-Abarca, M. Fresno, L. Carrasco & M. A. Alonso (1991) Cell type determines the relative proportions of (-) and (+) strand RNA during poliovirus replication - *Virus Res.* **20**, 23-29
- Lopez-Rivas, A., J. L. Castrillo & L. Carrasco (1987) Cation content in poliovirus-infected HeLa cells - *J. Gen. Virol.* **68**, 335-342
- Lubinski, J. M., G. Kaplan, V. R. Racaniello & A. Dasgupta (1986) Mechanism of in vitro synthesis of covalently linked dimeric RNA molecules by the poliovirus replicase - *J. Virol.* **58**, 459-467
- Lubinski, J. M., L. J. Ransone & A. Dasgupta (1987) Primer-dependent synthesis of covalently linked dimeric RNA molecules by poliovirus replicase - *J. Virol.* **61**, 2997-3003
- Ludlow, J. W. & R. A. Consigli (1987) Localization of calcium on the polyomavirus VP1 capsid protein - *J. Virol.* **61**, 2934-2937
- Maass, G. & U. Quast (1987) Acute spinal paralysis after the administration of poliomyelitis vaccine in the Federal Republic of Germany (1963-1984) - *J. Biol. Standardiz.* **15**, 185-191
- Macadam, A. J., C. Arnold, J. Howlett, A. John, S. Marsden, F. Taffs, P. Reeve, N. Hamada, K. Wareham, J. Almond, N. Cammack & P. D. Minor (1989) Reversion of attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees - *Virology* **172**, 408-414
- Macadam, A. J., G. Ferguson, C. Arnold & P. D. Minor (1991a) An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of the poliovirus type-3 vaccine strain - *J. Virol.* **65**, 5225-5231
- Macadam, A. J., G. Ferguson, J. Burlison, D. Stone, R. Skuce, J. W. Almond & P. D. Minor (1992) Correlation of RNA secondary structure and attenuation of Sabin vaccine strains of poliovirus in tissue culture - *Virology* **189**, 415-422
- Macadam, A. J., S. R. Pollard, G. Ferguson, G. Dunn, R. Skuce, J. W. Almond & P. D. Minor (1991b) The 5' non-coding region of the type-2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity - *Virology* **181**, 451-458
- Macadam, A. J., S. R. Pollard, G. Ferguson, R. Skuce, D. Wood, J. W. Almond & P. D. Minor (1993) Genetic basis of attenuation of the Sabin type-2 vaccine strain of poliovirus in primates - *Virology* **192**, 18-26
- MacArthur, M. W. & J. M. Thornton (1991) Influence of proline residues on protein conformation - *J. Mol. Biol.* **218**, 397-412
- Magrath, D. I. (1991) Safety of vaccines produced in continuous cell lines - In: *International Symposium on Virological Aspects of the Safety of Biological Products*, 75, S. 17-20
- Magrath, D. I., D. M. A. Evans, M. Ferguson, G. C. Schild, P. D. Minor, F. Horaud, D. Crainic, M. Stenvik & T. Hovi (1986) Antigenic and molecular properties of type 3 poliovirus responsible for an outbreak of poliomyelitis in a vaccinated population - *J. Gen. Virol.* **67**, 899-905
- Mahon, B. P., K. Katrak & K. H. G. Mills (1992) Antigenic sequences of poliovirus recognized by T-cells - Serotype-specific epitopes on VP1 and VP3 and cross-reactive epitopes on VP4 defined by using CD4+ T-cell clones - *J. Virol.* **66**, 7012-7020
- Mandel, B. (1962) Early stages of virus-cell interaction as studied by using antibody - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**, 123-136
- Mandel, B. (1971) Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis - *Virology* **44**, 554-568
- Mandel, B. (1973) An analysis of the physical and chemical factors involved in the reactivation of neutralized poliovirus by the method of freezing and thawing - *Virology* **51**, 358-369
- Mandel, B. (1976) Neutralization of poliovirus: A hypothesis to explain the mechanism and the one-hit character of the neutralization reaction - *Virology* **69**, 500-510
- Mandel, B. (1979) Interaction of viruses with neutralizing antibodies - In: *Comprehensive virology*, Vol. 15 Virus-host interactions, Herausg. Fraenkel-Conrat, H. & R. R. Wagner, Plenum Press N.Y., London, S. 37-121
- Mannweiler, K., P. Nobis, H. Hohenberg & W. Bohn (1990) Immunoelectron microscopy on the topographical distribution of the poliovirus receptor - *J. Gen. Virol.* **71**, 2737-2740
- Marc, D., G. Drugeon, A.-L. Haenni, M. Girard & S. van der Werf (1989) Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence - *EMBO J.* **8**, 2661-2668
- Marc, D., M. Girard & S. van der Werf (1991) A Gly1 to Ala substitution in poliovirus capsid protein VP0 blocks its myristoylation and prevents viral assembly - *J. Gen. Virol.*



- 72, 1151-1157
- Marc, D., G. Masson, M. Girard & S. van der Werf (1990) Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0 prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles - *J. Virol.* **64**, 4099-4107
- Martin, A., D. Benichou, T. Couderc, J. M. Hogle, C. Wychowski, S. van der Werf & M. Girard (1991) Use of type-1/type-2 chimeric polioviruses to study determinants of poliovirus type-1 neurovirulence in a mouse model - *Virology* **180**, 648-658
- Martin, A., C. Wychowski, D. Benichou, R. Crainic & M. Girard (1988a) Construction of a chimaeric type 1/type 2 poliovirus by genetic recombination - *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* **139**, 79-88
- Martin, A., C. Wychowski, T. Couderc, R. Crainic, J. Hogle & M. Girard (1988b) Engineering a poliovirus type 2 antigenic site on a type 1 capsid results in a chimaeric virus which is neurovirulent for mice - *EMBO J.* **7**, 2839-2847
- Martineau, P., J. G. Guillet, C. Leclerc & M. Hofnung (1992) Expression of heterologous peptides at 2 permissive sites of the MalE protein - Antigenicity and immunogenicity of foreign B-cell and T-cell epitopes - *Gene* **113**, 35-46
- Martyn, C. N. (1990) Poliovirus and motor neuron disease - *J. Neurol.* **237**, 336-338
- Martyn, C. N., D. J. P. Barker & C. Osmond (1988) Motor neuron disease and past poliomyelitis in England and Wales - *Lancet* **I**, 1319-1322
- Marwick, C. (1992) Alter a virus molecularly for polio vaccine - *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **267**, 473
- Maselli, R. A., N. R. Cashman, R. L. Wollman, E. F. Salazar-grueso & R. Roos (1992) Neuromuscular transmission as a function of motor unit size in patients with prior poliomyelitis - *Muscle & Nerve* **15**, 648-655
- Mason, P. W., B. Baxt, F. Brown, J. Harber, A. Murdin & E. Wimmer (1993) Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally unsusceptible cells via the Fc receptor - *Virology* **192**, 568-577
- Mathisen, G. E. & A. D. Allen (1992) Inactivated polio vaccine hyperimmunization in adults with HIV disease: A placebo-controlled study - *AIDS* **6**, 737-738
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes - *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038
- Maynell, L. A., K. Kirkegaard & M. W. Klymkowsky (1992) Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin-A - *J. Virol.* **66**, 1985-1994
- McCammon, J. A. & M. Karplus (1983) The dynamic picture of protein structure - *Acc. Chem. Res.* **16**, 187-193
- McClure, M. A. & J. Perrault (1985) Poliovirus genome RNA hybridizes specifically to higher eukaryotic rRNAs - *Nucl. Acids Res.* **13**, 6797
- McCullough, K. C. (1986) Monoclonal antibodies: Implications for virology - *Arch. Virol.* **87**, 1-36
- McCullough, K. C., F. De Simone, E. Brocchi, L. Capucci, J. R. Crowther & U. Kihm (1992) Protective immune response against foot-and-mouth disease - *J. Virol.* **66**, 1835-1840
- McKinlay, M. A., D. C. Pevear & M. G. Rossmann (1992) Treatment of the picornavirus common cold by inhibitors of viral uncoating and attachment - *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 635-654
- McKusick, V. A. (1992) Classics in medicine - Three landmark articles about poliomyelitis - *Medicine* **71**, 303(-325)
- Meerovitch, K., R. Nicholson & N. Sonenberg (1991) In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements within the poliovirus type-2 5' untranslated region - *J. Virol.* **65**, 5895-5901
- Meerovitch, K., J. Pelletier & N. Sonenberg (1989) A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: Implications for internal translation initiation - *Genes & Development* **3**, 1026-1034
- Melchers, W., M. Devisser, P. Jongen, A. van Loon, R. Nibbeling, P. Oostvogel, D. Willemse & J. Galama (1992) The postpolio syndrome: No evidence for poliovirus persistence - *Ann. Neurol.* **32**, 728-732
- Melnick, J. L. (1988) Vaccination against poliomyelitis: Present possibilities and future prospects - *Am. J. Public Health* **78**, 304-305
- Melnick, J. L. (1991) Virus inactivation - Lessons from the past - In: *International Symposium on Virological Aspects of the Safety of Biological Products, London 1990, Develop. biol. Standard., Vol. 75, Karger Basel, S. 29-36*
- Mendelsohn, C., B. Johnson, K. A. Lionetti, P. Nobis, E. Wimmer & V. R. Racaniello (1986) Transformation of a human poliovirus receptor gene into mouse cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7845-7849
- Mendelsohn, C. L., E. Wimmer & V. R. Racaniello (1989) Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily - *Cell* **56**, 855-865
- Menéndez-Arias, L. & R. Rodriguez (1990) A BASIC microcomputer program for prediction of B and T cell epitopes in proteins - *Comput. Appl. Biosci.* **6**, 101-105
- Merril, C. R. & M. E. Pratt (1986) A silver stain for rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates - *Anal. Biochem.* **156**, 96-110
- Metzger, H. (1970) Structure and function of gamma M macroglobulins - *Adv. Immunol.* **12**, 57-108
- Milstein, C. (1986) From antibody structure to immunological diversification of immune response - *Science* **231**, 1261-1268
- Minor, P. (1990) Summary report of a meeting on the estimation of the potency of inactivated poliovaccine - *Institut-Pasteur, Paris 12-13 February 1990 - Biologicals* **18**, 243-244
- Minor, P. D. (1990) Antigenic structure of picornaviruses - In: *Current Topics in Microbiology and Immunology Vol. 161, Picornaviruses, Herausg. Racaniello, V. R., Springer Berlin, S. 121-150*
- Minor, P. D. (1992) The molecular biology of poliovaccines - *J. Gen. Virol.* **73**, 3065-3077
- Minor, P. D., D. M. A. Evans, M. Ferguson, G. C. Schild, G. Westrop & J. W. Almond (1985) Principal and subsidiary antigenic sites of VP1 involved in the neutralization of poliovirus type 3 - *J. Gen. Virol.* **65**, 1159-1165
- Minor, P. D. & G. Dunn (1988) The effect of sequences in

- the 5' non-coding region on the replication of poliovirus in the human gut - *J. Gen. Virol.* **69**, 1091-1096
- Minor, P. D., G. Dunn, D. M. A. Evans, D. I. Magrath, A. John, J. Howlett, A. Phillips, G. Westrop, K. Wareham, J. W. Almond & J. M. Hogle (1989) The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: Molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3 - *J. Gen. Virol.* **70**, 1117-1123
- Minor, P. D., M. Ferguson, D. M. A. Evans, J. W. Almond & J. P. Icenogle (1986a) Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3 - *J. Gen. Virol.* **67**, 1283-1291
- Minor, P. D., M. Ferguson, K. Katrak, D. Wood, A. John, J. Howlett, G. Dunn, K. Burke & J. W. Almond (1990) Antigenic structure of chimeras of type-1 and type-3 poliovirus involving antigenic site-1 - *J. Gen. Virol.* **71**, 2543-2551
- Minor, P. D., M. Ferguson, K. Katrak, D. Wood, A. John, J. Howlett, G. Dunn, K. Burke & J. W. Almond (1991) Antigenic structure of chimeras of type-1 and type-3 polioviruses involving antigenic site-2, site-3 and site-4 - *J. Gen. Virol.* **72**, 2475-2481
- Minor, P. D., M. Ferguson, A. Phillips, D. I. Magrath, A. Huovilainen & T. Hovi (1987) Conservation in vivo of protease cleavage sites in antigenic sites of poliovirus - *J. Gen. Virol.* **68**, 1857-1865
- Minor, P. D., A. John, M. Ferguson & J. P. Icenogle (1986b) Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by primary vaccinee - *J. Gen. Virol.* **67**, 693-706
- Minor, P. D., O. Kew & G. C. Schild (1982) Poliomyelitis - Epidemiology, molecular biology and immunology - *Nature* **299**, 109-110
- Minor, P. D., P. A. Pipkin, D. Hockley, G. C. Schild & J. W. Almond (1984) Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus - *Virus Res.* **1**, 203-212
- Minor, P. D., G. C. Schild, J. Bootman, D. M. A. Evans, M. Ferguson, P. Reeve, M. Spitz, G. Stanway, A. J. Cann, R. Hauptmann, L. D. Clarke, R. C. Mountford & J. W. Almond (1983) Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization - *Nature* **301**, 674-679
- Minor, P. D., G. C. Schild, A. J. Cann, G. Dunn, D. M. A. Evans, M. Ferguson, G. Stanway, G. Westrop & J. W. Almond (1986c) Studies on the molecular aspects of antigenic structure and virulence of poliovirus - *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* **137 E**, 107-125
- Miranda-Pfeilsticker, B., D. Figarella-Branger, J. F. Pellissier & G. Serratrice (1992) Post-poliomyelitis syndrome - 29 cases - Le syndrome post-poliomyelitique: 29 cas - *Rev. Neurol.* **148**, 355-361
- Mirzayan, C., R. Ingraham & E. Wimmer (1991) Specificity of the polioviral proteinase-3C towards genetically engineered cleavage sites in the viral capsid - *J. Gen. Virol.* **72**, 1159-1163
- Mirzayan, C. & E. Wimmer (1992) Genetic analysis of an NTP-binding motif in poliovirus polypeptide-2C - *Virology* **189**, 547-555
- Miyamura, K., T. Ogino, N. Takeda, E. Utagawa, Y. Ikeda, M. Tanimura, M. Hara & S. Yamazaki (1990) A comparative seroepidemiologic study of the neutralizing antibody against the virulent standard strains and the Sabin vaccine strains of poliovirus among healthy Japanese - *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **43**, 141-149
- Modlin, J. F., I. M. Onorato, A. M. McBean, P. Albrecht, M. L. Thoms, L. Nerhood & R. Bernier (1990) The humoral immune response to type 1 oral poliovirus vaccine in children previously immunized with enhanced potency inactivated poliovirus vaccine or live oral poliovirus vaccine - *Am. J. Dis. Child.* **144**, 480-484
- Moeremans, M., G. Daneels, A. Van Dijk, G. Langanger & J. De Mey (1984) Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining - *J. Immunol. Method.* **74**, 353-360
- Mohammad, K. & A. Esen (1989) A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and Western blots - *J. Immunol. Method.* **177**, 141-145
- Molla, A., A. V. Paul & E. Wimmer (1991) Cell-free, *de novo* synthesis of poliovirus - *Science* **254**, 1647-1651
- Morrison, E. G. & J. A. Embil (1987) Poliomyelitis in North America: The disease is not dead yet - *Canad. Med. Assn. J.* **137**, 1085-1087
- Morrow, C. D., B. Warren & M. R. Lentz (1987) Expression of enzymatically active poliovirus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli* - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6050-6054
- Morse, S. S. (1991) The origins of 'new' viral diseases - *Environ. Carcinog. Rev.* **9**, 207-228
- Moscufo, N. & M. Chow (1992) Myristate-protein interactions in poliovirus - Interactions of VP4 threonine-28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions - *J. Virol.* **66**, 6849-6857
- Moscufo, N., J. Simons & M. Chow (1991) Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly - *J. Virol.* **65**, 2372-2380
- Moss, E. G. & V. R. Racaniello (1991) Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid - *EMBO J.* **10**, 1067-1074
- Mosser, A. G. & R. R. Rueckert (1993) WIN 51711-dependent mutants of poliovirus type-3: Evidence that virions decay after release from cells unless drug is present - *J. Virol.* **67**, 1246-1254
- Mueller, W. F., R. Garofalo & P. L. Ogra (1990) Local immune response to viruses - II. The basis for serodiagnosis and vaccines - In: *Immunochemistry of Viruses*, Herausg. van Regenmortel, M. H. V. & A. R. Neurath, Elsevier, S. 53-74
- Murdin, A. D., A. Kameda, M. G. Murray & E. Wimmer (1991b) Phenotypic characterization of antigenic hybrids of poliovirus - *Microb. Pathog.* **10**, 39-45
- Murdin, A. D., H. H. Lu, M. G. Murray & E. Wimmer (1992) Poliovirus antigenic hybrids simultaneously expressing antigenic determinants from all 3 serotypes - *J. Gen. Virol.* **73**, 607-611
- Murdin, A. D., C. Mirzayan, A. Kameda & E. Wimmer (1991a) The effect of site and mode of expression of a heterologous antigenic determinant on the properties of poliovirus hybrids - *Microb. Pathog.* **10**, 27-37

- Murdin, A. D. & E. Wimmer (1989) Construction of a poliovirus type 1/type 2 antigenic hybrid by manipulation of neutralization antigenic site II - *J. Virol.* **63**, 5251-5257
- Müri, F. (1987) Trübungsmessung in Flüssigkeiten - *LABO*, 42-45
- Murray, M. G., R. J. Kuhn, M. Arita, N. Kawamura, A. Nomoto & E. Wimmer (1988) Poliovirus type 1/type 3 antigenic hybrid virus constructed in vitro elicits type 1 and type 3 neutralizing antibodies in rabbits and monkeys - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3203-3207
- Muzychenko, A. R., G. Y. Lipskaya, S. V. Maslova, Y. V. Svitkin, E. V. Pilipenko, B. K. Nottay, O. M. Kew & V. I. Agol (1991) Coupled mutations in the 5'-untranslated region of the Sabin poliovirus strains during in vivo passages - Structural and functional implications - *Virus Res.* **21**, 111-122
- Najita, L. & P. Sarnow (1990) Oxidation - reduction sensitive interaction of a cellular 50-kDa protein with an RNA hairpin in the 5'noncoding region of the poliovirus genome - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5846-5850
- Namba, K., R. Pattanayek & G. Stubbs (1989) Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus - Refined Structure of Intact Tobacco Mosaic Virus at 2.9 Å Resolution by X-ray Fiber Diffraction - *J. Mol. Biol.* **208**, 307-325
- Nathanson, N. & S. D. Horn (1992) Neurovirulence tests of type-3 oral poliovirus vaccine manufactured by Leder-Laboratories, 1964-1988 - *Vaccine* **10**, 469-474
- Neufeld, K. L., O. C. Richards & E. Ehrenfeld (1991) Expression and characterization of poliovirus proteins 3BVPg, 3Cpro, and 3Dpol in recombinant baculovirus-infected *Spodoptera-Frugiperda* cells - *Virus Res.* **19**, 173-188
- Nicholson, R., J. Pelletier, S. Y. Le & N. Sonenberg (1991) Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type-2 - In vivo translation studies - *J. Virol.* **65**, 5886-5894
- Nicklin, M. J. H., K. S. Harris, P. V. Pallai & E. Wimmer (1988) Poliovirus proteinase 3C: Large-scale expression, purification, and specific cleavage activity on natural and synthetic substrates in vitro - *J. Virol.* **62**, 4586-4593
- Nicklin, M. J. H., H. G. Kräusslich, G. Toyoda & J. J. Dunn (1987) Poliovirus polypeptide precursors: Expression in vitro and processing by exogenous 3C and 2A proteinases - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4002-4006
- Niman, H. L., R. A. Houghten, L. E. Walker, R. A. Reisfeld, I. A. Wilson, J. M. Hogle & R. A. Lerner (1990) Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4949-4953
- Ninomiya, Y., N. Shimma & H. Ishitsuka (1990) Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents, chalcone amides - *Antivir. Res.* **13**, 61-74
- Nishio, O., J. Sumi, K. Sake, Y. Ishihara, S. Isomura & S. Inouye (1990) Fecal IgA antibody responses after oral poliovirus vaccination in infants and elder children - *Microbiol. Immunol.* **34**, 683-689
- Nobis, P., R. Zibirre, G. Meyer, J. Kühne, G. Warnecke & G. Koch (1985) Production of a monoclonal antibody against an epitope on HeLa cells that is the functional poliovirus binding site - *J. Gen. Virol.* **66**, 2563-2569
- Nolan, O. & R. O'Kennedy (1990) Bifunctional antibodies: Concept, production and application - *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 1-11
- Nomoto, A. (1993) Recombinant polioviruses as candidates for oral live poliovaccines - *Microbiol. Immunol.* **37**, 169-174
- Nomoto, A., N. Iizuka, M. Kohara & M. Arita (1988) Strategy for construction of live picornavirus vaccines - *Vaccine* **6**, 134-137
- Nomoto, A., T. Omata, H. Toyoda, S. Kuge, H. Horie, Y. Kataoka, Y. Genba, Y. Nakano & N. Imura (1982) Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5793-5797
- Nomoto, A. & E. Wimmer (1987) Genetic studies of the antigenicity and the attenuation phenotype of poliovirus - In: *Molecular basis of virus disease*, Herausg. Russell, W. C. & J. W. Almond, Cambridge University Press, S. 107-134
- Novak, J. E. & K. Kirkegaard (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells - *J. Virol.* **65**, 3384-3387
- Novotny, J. (1991) Protein antigenicity: A thermodynamic approach - *Mol. Immunol.* **28**, 201-207
- Novotny, J. & K. Sharp (1992) Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes - *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58**, 203-224
- O'Callaghan, D., A. Charbit, P. Martineau, C. Leclerc, S. van der Werf, C. Nauciel & M. Hofnung (1990) Immunogenicity of foreign peptide epitopes expressed in bacterial envelope proteins - *Res. Microbiol.* **141**, 963-969
- O'Neill, R. & V. R. Racaniello (1989) Inhibition of translation in cells infected with a poliovirus 2Apro mutant correlates with phosphorylation of alpha subunit of eucaryotic initiation factor 2 - *J. Virol.* **63**, 5069-5075
- Oberste, M. S. & J. B. Flanagan (1988) Measurement of poliovirus RNA polymerase binding to poliovirion and non-viral RNAs using a filter-binding assay - *Nucl. Acids Res.* **16**, 10339-10352
- Ogra, P. L., H. S. Faden, R. Abraham, L. C. Duffy, M. Sun & P. D. Minor (1991) Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines - *J. Infect. Dis.* **164**, 191-194
- Oldstone, M. B. A. (1989) Viral persistence - *Cell* **56**, 517-520
- Ollier, P., J. Rocca-Serra, G. Somme, J. Theze & M. Fougereau (1985) The idiotypic network and the internal image: Possible regulation of a germline network by paucigene encoded Ab2 (anti-idiotypic) antibodies in the GAT system - *EMBO J.* **4**, 3681-3688
- Olson, N. H., P. R. Kolatkar, M. A. Oliveira, R. H. Cheng, J. M. Greve, A. McClelland, T. S. Baker & M. G. Rossmann (1993) Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*



- 90, 507-511
- Omata, T., M. Kohara, S. Kuge, T. Komatsu, S. Abe, B. L. Semler, A. Kameda, H. Itoh, M. Arita, E. Wimmer & A. Nomoto (1986) Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1 - *J. Virol.* **58**, 348-358
- Onodera, S., J. J. Cardamone & B. A. Phillips (1986) Biological activity and electron microscopy of poliovirus 14S particles obtained from alkali-dissociated procapsids - *J. Virol.* **58**, 610-618
- Onodera, S. & B. A. Phillips (1988) A novel method for obtaining poliovirus 14 S pentamers from procapsids and their self-assembly into virus-like shells - *Virology* **159**, 278-287
- Onorato, I. M., J. F. Modlin, A. M. Mcbean, M. L. Thoms, G. A. Losonsky & R. H. Bernier (1991) Mucosal immunity induced by enhanced-potency inactivated and oral polio vaccines - *J. Infect. Dis.* **163**, 1-6
- Ornoy, A., J. Arnon, M. Feingold & P. Ben Ishai (1990) Spontaneous abortions following oral poliovirus vaccination in first trimester - *Lancet* **I**, 800
- Ornoy, A. & P. Ben Ishai (1993) Congenital anomalies after oral poliovirus vaccination during pregnancy - *Lancet* **341**, 1162
- Outlaw, M. C. & N. J. Dimmock (1991) Insights into neutralization of animal viruses gained from study of influenza virus - *Epidemiol. Infect.* **106**, 205-220
- Page, G. S., A. G. Mosser, J. M. Hogle, D. J. Filman, R. R. Rueckert & M. Chow (1988) Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants - *J. Virol.* **2**, 1781-1794
- Pallai, P. V., F. Burkhardt, M. Skoog, K. Schreiner, P. Bax, K. A. Cohen, G. Hansen, D. E. H. Palladino, K. S. Harris, M. J. Nicklin & E. Wimmer (1989) Cleavage of synthetic peptides by purified poliovirus 3C proteinase - *J. Biol. Chem.* **264**, 9738-9741
- Palmenberg, A. (1987) A vaccine for the common cold ? - *Nature* **329**, 668-669
- Pangonis, W. J., W. Heller & A. Jacobson (1957) Tables of light scattering functions for spherical particles - Wayne State University Press, Detroit ,
- Parker, J. M. R., D. Guo & R. S. Hodges (1986) New hydrophobicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites - *Biochemistry* **25**, 5425-5432
- Parvin, J. D., A. Moscona, W. T. Pan, J. M. Leider & P. Palese (1986) Measurement of the mutation rates of animal viruses: Influenza A virus and poliovirus type 1 - *J. Virol.* **59**, 377-383
- Patel, V., M. Ferguson & P. D. Minor (1993) Antigenic sites on type 2 poliovirus - *Virology* **192**, 361-364
- Patriarca, P. A., F. Laender, G. Palmeira, M. J. Couto Oliveira, J. Lima Filho, M. C. de Souza Dantes, M. Tenorio Cordeiro, J. B. Risi & W. A. Orenstein (1988) Randomised trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil - *Lancet* **I**, 429-432
- Patriarca, P. A., P. F. Wright & T. J. John (1991) Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries - Review - *Rev. Infect. Dis.* **13**, 926-939
- Paul, A. V., A. Schultz, S. E. Pincus, S. Oroszlan & E. Wimmer (1987) Capsid protein VP4 of poliovirus is N-myristoylated - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7827-7831
- Payment, P., M. Trudel, L. Thibodeau & J. Lecomte (1989) Production and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against poliovirus type 1, 2, and 3 - *Can. J. Microbiol.* **35**, 550-553
- Pearson, W. & D. J. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448
- Pellequer, J. L., E. Westhof & M. H. V. van Regenmortel (1991) Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures - In: *Molecular design and modeling : Concepts and applications, Methods in Enzymology* **203**, S. 176-201
- Pelletier, I., T. Couderc, S. Borzakian, E. Wyckoff, R. Crainic, E. Ehrenfeld & F. Colbère-Garapin (1991) Characterization of persistent poliovirus mutants selected in human neuroblastoma cells - *Virology* **180**, 729-737
- Pelletier, J., M. E. Flynn, G. Kaplan, V. Racaniello & N. Sonenberg (1988a) Mutational analysis of upstream AUG codons of poliovirus RNA - *J. Virol.* **62**, 4486-4492
- Pelletier, J., G. Kaplan, V. R. Racaniello & N. Sonenberg (1988b) Translational efficiency of poliovirus mRNA: Mapping inhibitory cis-acting elements within the 5' non-coding region - *J. Virol.* **62**, 2219-2227
- Pelletier, J. & N. Sonenberg (1989) Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: Translation in HeLa cell extracts - *J. Virol.* **63**, 441-444
- Percy, N., W. S. Barclay, M. Sullivan & J. W. Almond (1992) A poliovirus replicon containing the chloramphenicol acetyltransferase gene can be used to study the replication and encapsidation of poliovirus RNA - *J. Virol.* **66**, 5040-5046
- Pérez, L. & L. Carrasco (1993) Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step - *J. Virol.* **67**, 4543-4548
- Pestova, T. V., C. U. T. Hellen & E. Wimmer (1991) Translation of poliovirus RNA - Role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5' nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein - *J. Virol.* **65**, 6194-6204
- Pestova, T. V., S. V. Maslova, V. K. Potapov & V. I. Agol (1989) Distinct modes of poliovirus polyprotein initiation in vitro - *Virus Res.* **14**, 107-118
- Petersen, N. O. (1986a) Scanning fluorescence correlation spectroscopy - 1. Theory and simulation of aggregation measurements *Biophys. J.* **49**, 809-815
- Petersen, N. O. (1986b) Scanning fluorescence correlation spectroscopy - 2. Application to virus glycoprotein aggregation *Biophys. J.* **49**, 817-820
- Pettit, C., L. L. Minnich, Z. S. Shehab & C. G. Ray (1987) Comparison between indirect immunofluorescence and microneutralization for detection of antibodies to polioviruses - *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1325-1326
- Pfister, T., L. Pasamontes, M. Troxler, D. Egger & K. Bienz (1992) Immunocytochemical localization of capsid-related particles in subcellular fractions of poliovirus-infected cells - *Virology* **188**, 676-684
- Phillips, B. A. & A. Emmert (1986) Modulation of the expression of poliovirus proteins in reticulocyte lysates - *Vi-*

- rology **148**, 255-267
- Pilipenko, E. V., V. M. Blinov & V. I. Agol (1990) Gross rearrangements within the 5'-untranslated region of the picornaviral genomes - *Nucl. Acids Res.* **18**, 3371-3375
- Pilipenko, E. V., V. M. Blinov, L. I. Romanova, A. N. Sinyakov, S. V. Maslova & V. I. Agol (1989) Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: An analysis of the segment controlling translation and neurovirulence - *Virology* **168**, 201-209
- Pilipenko, E. V., A. P. Gmyl, S. V. Maslova, Y. V. Svitkin, A. N. Sinyakov & V. I. Agol (1992a) Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA - *Cell* **68**, 119-131
- Pilipenko, E. V., S. V. Maslova, A. N. Sinyakov & V. I. Agol (1992b) Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs - A proposal for the existence of tert-RNA-like terminal structures - *Nucl. Acids Res.* **20**, 1739-1745
- Pincus, S. E., D. C. Diamond, E. A. Emini & E. Wimmer (1986) Guanidine-selected mutants of poliovirus: Mapping of point mutations to polypeptide 2C - *J. Virol.* **57**, 638-646
- Pincus, S. E., H. Rohl & E. Wimmer (1987) Guanidine-dependent mutants of poliovirus: Identification of three classes with different growth requirements - *Virology* **157**, 83-88
- Plotch, S. J., O. Palant & Y. Gluzman (1989) Purification and properties of poliovirus RNA polymerase expressed in *Escherichia coli* - *J. Virol.* **63**, 216-225
- Pohl, H. E. W., J. Hock & W. Müller-Esterl (1988) Plaque-lift testing of expression vector lambda<sub>gdgt11</sub> with gold-labeled immunoglobulins - *Anal. Biochem.* **175**, 414-421
- Poljak, R. J. (1991) Structure of antibodies and their complexes with antigens - *Mol. Immunol.* **28**, 1341-1345
- Pollard, S. R., G. Dunn, N. Cammack, P. D. Minor & J. W. Almond (1989) Nucleotide sequence of a neurovirulent variant of the type 2 oral poliovirus vaccine - *J. Virol.* **63**, 4949-4951
- Porath, J., T. Laas & J.-C. Janson (1975) Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes - Rigid agarose gels cross-linked with divinyl sulphone (DVS) - *J. Chromatogr.* **103**, 49-62
- Pöyry, T., L. Kinnunen, J. Kapsenberg, O. Kew & T. Hovi (1990) Type-3-poliovirus/Finland/1984 is genetically related to common mediterranean strains - *J. Gen. Virol.* **71**, 2535-2541
- Pöyry, T., L. Kinnunen & T. Hovi (1989) Restricted variability of a 17 nucleotide stretch within the 5'-noncoding region of poliovirus genome - *Epidemiol. Infect.* **103**, 671-683
- Pöyry, T., L. Kinnunen & T. Hovi (1992) Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5'noncoding region of poliovirus RNA - *J. Virol.* **66**, 5313-5319
- Puglisi, J. D., J. R. Wyatt & I. Tinoco (1991) RNA pseudoknots - *Acc. Chem. Res.* **24**, 152-158
- Putnak, J. R. & B. A. Phillips (1982) Poliovirus empty capsid morphogenesis: Evidence for conformational differences between self- and extract-assembled empty capsids - *J. Virol.* **41**, 792-800
- Querfurth, H. & P. Swanson (1990) Vaccine-associated paralytic poliomyelitis - *Arch. Neurol.* **47**, 541-544
- Qureshi, G. A., L. Fohlin & J. Bergström (1984) Application of high-performance liquid chromatography to the determination of free amino acids in physiological fluids - *J. Chromatogr.* **297**, 91-100
- Racaniello, V. R. (1986) Viral sequences required for neurovirulence of poliovirus - *BioEssays* **5**, 266-270
- Racaniello, V. R. & D. Baltimore (1981a) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4887-4891
- Racaniello, V. R. & D. Baltimore (1981b) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells - *Science* **214**, 916-919
- Ramlow, J., M. Alexander, R. La Porte, C. Kaufmann & L. Kuller (1992) Epidemiology of the post-polio syndrome - *Am. J. Epidemiol.* **136**, 769-786
- Ransone, L. J. & A. Dasgupta (1987) Activation of double-stranded RNA - Activated protein kinase in HeLa cells after poliovirus infection does not result in increased phosphorylation of eucaryotic initiation factor-2 - *J. Virol.* **61**, 1781-1787
- Ransone, L. J. & A. Dasgupta (1989) Multiple isoelectric forms of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase: Evidence for phosphorylation - *J. Virol.* **63**, 4563-4568
- Rao, A. (1991) Signaling mechanisms in T-cells - *Crit. Rev. Immunol.* **10**, 495-519
- Rapp, F. & J. M. Cory (1988) Mechanisms of persistence in human virus infections - *Microb. Pathog.* **4**, 85-92
- Rashin, A. A., M. Iofin & B. Honig (1986) Internal cavities and buried waters in globular proteins - *Biochemistry* **25**, 3619-3625
- Raymond, C. A. (1986) Decades after polio epidemics, survivors report new symptoms - *J. Amer. Med. Ass.* **255**,
- Reimann, B. Y., R. Zell & R. Kandolf (1991) Mapping of a neutralizing antigenic site of coxsackievirus-B4 by construction of an antigen chimera - *J. Virol.* **65**, 3475-3480
- Reincke, H. & K. R. Nelson (1990) Duchenne de Boulogne: Electrodiagnosis of poliomyelitis - *Muscle & Nerve* **13**, 56-62
- Ren, G., T. En-Hua, W. Hong, Y. Xiao-Feng, L. Ming-Ying, Q. Hong-Xing, L. Qi-Han, Z. Jun-Ying & L. Kai-Ming (1987) Preliminary studies on antigenic variation of poliovirus using neutralizing monoclonal antibodies - *J. Gen. Virol.* **68**, 989-994
- Ren, R., F. Costantini, E. J. Gorgacz, J. J. Lee & V. R. Racaniello (1990) Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: A new model for poliomyelitis - *Cell* **63**, 353-362
- Ren, R. & V. R. Racaniello (1992) Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice - *J. Virol.* **66**, 296-304
- Reuer, Q., R. J. Kuhn & E. Wimmer (1990) Characterization of poliovirus clones containing lethal and nonlethal mutations in the genome-linked protein VPg - *J. Virol.* **64**, 2967-2975
- Revsz, A., E. Neumann & A. Katchalsky (1973) Metastable secondary structures in ribosomal RNA - Molecular hysteresis in the acid-base titration of *Escherichia coli* riboso-

- mal RNA - *J. Mol. Biol.* **79**, 95-114
- Reynolds, C., D. Birnby & M. Chow (1992) Folding and processing of the capsid protein precursor P1 is kinetically retarded in neutralization site 3B mutants of poliovirus - *J. Virol.* **66**, 1641-1648
- Reynolds, C., G. Page, H. Zhou & M. Chow (1991) Identification of residues in VP2 that contribute to poliovirus neutralization antigenic site 3B - *Virology* **184**, 391-396
- Richards, O. C., L. A. Ivanoff, K. Bienkowska-Szewczyk, B. Butt, S. R. Petteway, M. A. Rothstein & E. Ehrenfeld (1987) Formation of poliovirus RNA polymerase 3D in *Escherichia coli* by cleavage of fusion proteins expressed from cloned viral cDNA - *Virology* **161**, 348-356
- Richards, O. C., P. Yu, K. L. Neufeld & E. Ehrenfeld (1992) Nucleotide binding by the poliovirus RNA polymerase - *J. Biol. Chem.* **267**, 17141-17146
- Richardson, J. S., E. D. Getzoff & D. C. Richardson (1978) The beta-bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2574-2578
- Rico-Hesse, R., M. A. Pallansch, B. K. Notay & O. M. Kew (1987) Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes - *Virology* **160**, 311-322
- Roberts, L. (1988) Change in polio strategy ? - *Science* **240**, 1145
- Rodriguez, P. L. & L. Carrasco (1992) Gliotoxin: Inhibitor of poliovirus RNA synthesis that blocks the viral RNA polymerase 3D<sup>pol</sup> - *J. Virol.* **66**, 1971-1976
- Rodriguez, P. L. & L. Carrasco (1993) Poliovirus protein-2C has ATPase and GTPase activities - *J. Biol. Chem.* **268**, 8105-8110
- Rodriquez, A. A. & J. C. Agre (1991) Correlation of motor units with strength and spectral characteristics in polio survivors and controls - *Muscle & Nerve* **14**, 429-434
- Roivainen, M. & T. Hovi (1987) Intestinal trypsin can significantly modify antigenic properties of poliovirus: Implications for use of inactivated poliovirus vaccine - *J. Virol.* **61**, 3749-3753
- Roivainen, M. & T. Hovi (1988) Cleavage of VP1 and modification of antigenic site 1 of type 2 polioviruses by intestinal trypsin - *J. Virol.* **62**, 3536-
- Roivainen, M., B. Montagnon, H. Chalumeau, M. Murray, E. Wimmer & T. Hovi (1990) Improved distribution of antigenic site specificity of poliovirus-neutralizing antibodies induced by a protease-cleaved immunogen in mice - *J. Virol.* **64**, 559-562
- Roivainen, M., A. Narvanen, M. Korkolainen, M. L. Huhtala & T. Hovi (1991) Antigenic regions of poliovirus type-3/Sabin capsid proteins recognized by human sera in the peptide scanning technique - *Virology* **180**, 99-107
- Rombaut, B., K. Andries & A. Boeyé (1991a) A comparison of WIN-51711 and R-78206 as stabilizers of poliovirus virions and procapsids - *J. Gen. Virol.* **72**, 2153-2157
- Rombaut, B. & A. Boeyé (1991) In vitro assembly of poliovirus-14-S subunits - Disoxaril stabilization as a model for the antigenicity conferring activity of infected cell extracts - *Virology* **180**, 788-792
- Rombaut, B., A. Boeyé, M. Ferguson, P. D. Minor, A. Mosser & R. Rueckert (1990) Creation of an antigenic site in poliovirus type 1 by assembly of 14 S subunits - *Virology* **174**, 305-307
- Rombaut, B., P. Brioen & A. Boeyé (1990a) Disoxaril stabilization and immunogenicity of poliovirus procapsids - *J. Gen. Virol.* **71**, 1081-1086
- Rombaut, B., A. Foriers & A. Boeyé (1990b) Purification of poliovirus 14-S subunits by sucrose gradient ultracentrifugation and high-performance size-exclusion chromatography - *J. Virol. Meth.* **29**, 303-312
- Rombaut, B., A. Foriers & A. Boeyé (1991b) In vitro assembly of poliovirus-14-S subunits - Identification of the assembly promoting activity of infected cell extracts - *Virology* **180**, 781-787
- Rombaut, B., R. Vrijssen & A. Boeyé (1984) In vitro assembly of poliovirus empty capsids: Antigenic consequences and immunological assay of the morphopoietic factor - *Virology* **135**, 546-550
- Rombaut, B., R. Vrijssen & A. Boeyé (1986) Assembly factors in poliovirus morphogenesis - *Virology* **153**, 137-144
- Rombaut, B., R. Vrijssen & A. Boeyé (1987) A pH-dependent dissociation of poliovirus procapsids - *Virology* **157**, 245-247
- Rombaut, B., R. Vrijssen & A. Boeyé (1989) Denaturation of poliovirus procapsids - *Arch. Virol.* **106**, 213-220
- Rombaut, B., R. Vrijssen, P. Brioen & A. Boeyé (1982b) A pH-dependent antigenic conversion of empty capsids of poliovirus studied with the aid of monoclonal antibodies to N and H antigen - *Virology* **122**, 215-218
- Rosenberg, L. T. & V. V. Hamparian (1992) Immune responses in the post-polio syndrome - Reply - *N. Engl. J. Med.* **326**, 640-641
- Rossmann, M. G. (1988) Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4625-4627
- Rossmann, M. G. (1989a) The structure of antiviral agents that inhibit uncoating when complexed with viral capsids - *Antivir. Res.* **11**, 3-14
- Rossmann, M. G. (1989b) The canyon hypothesis - *J. Biol. Chem.* **264**, 14587-14590
- Rossmann, M. G., E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankengerger, J. P. Griffith, H.-J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, B. Sherry & G. Vriend (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses - *Nature* **317**, 145-153
- Rossmann, M. G. & J. E. Johnson (1989) Icosahedral RNA virus structure - *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 533-573
- Rossmann, M. G. & M. A. McKinlay (1992) Application of crystallography to the design of antiviral agents - *Infectious Agents and Disease - Reviews Issues and Commentary* **1**, 3-10
- Rossmann, M. G. & A. C. Palmenberg (1988) Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses - *Virology* **164**, 373-382
- Rossmann, M. G. & R. R. Rueckert (1987) What does the molecular structure of viruses tell us about viral functions? - *Microbiol. Sci.* **4**, 206-214
- Rotbart, H. A. (1991) Nucleic acid detection systems for enteroviruses - *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 156-168

- Roth, M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids - *Anal. Chem.* **43**, 880-882
- Rothbard, J. B. & W. R. Taylor (1988) A sequence pattern common to T cell epitopes - *EMBO J.* **7**, 93-100
- Rothstein, M. A., O. C. Richards, C. Amin & E. Ehrenfeld (1988) Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerase synthesized in *Escherichia coli* from viral cDNA - *Virology* **164**, 301-308
- Rubinstein, S. J., T. Hämmerle, E. Wimmer & A. Dasgupta (1992) Infection of HeLa cells with poliovirus results in modification of a complex that binds to the rRNA promoter - *J. Virol.* **66**, 3062-3068
- Rueckert, R. R. (1976) On the structure and morphogenesis of picornaviruses - In: *Comprehensive Virology*, Vol. 6, Herausg. Frankel-Conrat, H., Wagner, R.R., Plenum Press New York, S. 131-213
- Rueckert, R. R. (1985) Picornaviruses and their replication - In: *Virology*, Herausg. Fields, B. N., Raven Press New York, S. 705-738
- Sabin, A. B. (1986) Strategy for rapid elimination and continuing control of poliomyelitis and other vaccine preventable diseases of children in developing countries - *Br. Med. J.* **292**, 531-533
- Sabin, A. B. (1991) Perspectives on rapid elimination and ultimate global eradication of paralytic poliomyelitis caused by polioviruses - *Eur. J. Epidemiol.* **7**, 95-120
- Salk, D. (1988) Polio immunization policy in the United States: A new challenge for a new generation - *Am. J. Public Health* **78**, 296-300
- Salk, J. (1990) Are booster doses of poliovirus vaccine necessary? - *Vaccine* **8**, 419-420
- Samuel, R., V. Balraj & T. J. John (1993) Persisting poliomyelitis after high coverage with oral poliovaccine - *Lancet* **341**, 903
- Sanekata, T., M. Arita, A. Kawamoto & A. F. Magnusen (1992) Reverse passive haemagglutination test for identification and serotyping of polioviruses - *Lancet* **340**, 1297-1298
- Saragovi, H. U., D. Fitzpatrick, A. Raktabutr, H. Nakanishi, M. Kahn & M. J. Greene (1991) Design and synthesis of a mimetic from an antibody complementarity-determining region - *Science* **253**, 792-795
- Sarnow, P. (1989) Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro - *J. Virol.* **63**, 467-470
- Sarnow, P., H. D. Bernstein & D. Baltimore (1986) A poliovirus temperature-sensitive RNA synthesis mutant located in a noncoding region of the genome - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 571-575
- Sarnow, P., S. J. Jackson & L. Najita (1990) Poliovirus genetics - *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **161**, 155-188
- Satterthwait, A. C., T. Arrhenius, R. A. Hagopian, F. Zavala, V. Nussenzweig & R. A. Lerner (1989) The conformational restriction of synthetic peptides, including a malaria peptide, for use as immunogens - *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* **323**, 565-572
- Savithri, H. S., S. Suryanarayana & M. R. N. Murthy (1989) Structure-function relationships of icosahedral plant viruses - *Arch. Virol.* **109**, 153-172
- Scheper, G. C., H. O. Voorma & A. A. M. Thomas (1992) Eukaryotic initiation factor-4E and factor-4F stimulate 5' cap-dependent as well as internal initiation of protein synthesis - *J. Biol. Chem.* **267**, 7269-7274
- Schimmel, P. (1989) RNA pseudoknots that interact with components of the translation apparatus - *Cell* **58**, 9-12
- Schmidt, B. F., B. Berkhout, G. P. Overbeek & A. van Strien van Duin, J. (1987) Determination of the RNA secondary structure that regulates lysis gene expression in Bacteriophage MS2 - *J. Mol. Biol.* **195**, 505-516
- Schneider, R. J. & T. Shenk (1987) Impact of virus infection on host cell protein synthesis - *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 317-332
- Schnittger, L. (1990) Untersuchungen über die Ausbildung antigenener Strukturen während der Poliovirus-Morphogenese. Diplomarbeit Universität Hamburg, FB Biologie
- Scholtssek, C. & E. Naylor (1988) Fish farming and influenza pandemics - *Nature* **331**, 215
- Schoub, B. D., S. Johnson, J. McAnerney, L. Gilbertson, K. I. M. Klaassen & S. G. Reinach (1988) Monovalent neonatal polio immunization - A strategy for the developing world - *J. Infect. Dis.* **157**, 836-839
- Schuler, G. D., S. F. Altschul & D. J. Lipman (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis - *Protein-Struct. Funct. Genet.* **9**, 180-190
- Schulz, G. E. (1988) A critical evaluation of methods for prediction of protein secondary structures - *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 1-21
- Schulz, M., R. M. Zinkernagel & H. Hengartner (1991) Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T-cells - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 991-993
- Schumaker, V. N., D. C. Hanson, C. A. Smith, P. H. Poon & M. L. Phillips (1984) The role of segmental flexibility in the immune response - In: *Multidomain Proteins, Proceedings of the UNESCO Workshop on Structure and Function of Proteins*, Herausg. Patthy, L. & P. Friedrich Budapest, S. 133-155
- Schumaker, V. N., M. L. Phillips & D. C. Hanson (1991) Dynamic aspects of antibody structure - *Mol. Immunol.* **28**, 1347-1360
- Schwabe, C. & J. C. Catlin (1989) Removal of a fluoram-positive impurity from hydrochloric acid - *Anal. Biochem.* **61**, 302-304
- Scott, J. K. & G. P. Smith (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library - *Science* **249**, 386-390
- Selinka, H. C., A. Zibert & E. Wimmer (1991) Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule-1 pathway - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3598-3602
- Selinka, H. C., A. Zibert & E. Wimmer (1992) A chimeric poliovirus/CD4 receptor confers susceptibility to poliovirus on mouse cells - *J. Virol.* **66**, 2523-2526
- Selvakumar, R. & T. J. John (1989) Intestinal immunity to poliovirus develops only after repeated infections in monkeys - *J. Med. Virol.* **27**, 112-116
- Semler, B. L. & E. Ehrenfeld (1989) Molecular aspects of picornavirus infection and detection. American Society for Microbiology, Washington
- Semler, B. L., V. H. Johnson, P. G. Dewalt & M. F. Ypma-Wong (1987) Site-specific mutagenesis of cDNA clones

- expressing a poliovirus proteinase - *J. Cell. Biochem.* **33**, 39-51
- Sette, A., S. Buus, E. Appella, J. A. Smith, R. Chesnut, C. Miles, S. M. Colon & H. M. Grey (1989) Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3296-3300
- Sharief, M. K. (1992) Immune responses in the post-polio syndrome - Reply - *N. Engl. J. Med.* **326**, 642
- Sharief, M. K., M. Phil, R. Hentges & M. Ciardi (1991) Intrathecal immune response in patients with the post-polio syndrome - *N. Engl. J. Med.* **325**, 749-755
- Shepley, M. P., B. Sherry & H. L. Weiner (1988) Monoclonal antibody identification of a 100-kDa membrane protein in HeLa cells and human spinal cord involved in poliovirus attachment - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7743-7747
- Sheriff, S., E. W. Silverton, E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. J. Smith-Gill, B. C. Finzel & D. R. Davies (1987) Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8075-8079
- Sibbald, P. R. & M. J. White (1987) How probable are antibody cross - reactions ? - *J. theor. Biol.* **127**, 163-169
- Sicinski, P., J. Rowinski, J. B. Warchol, Z. Jarzabek, W. Gut, B. Szczygiel, K. Bielecki & G. Koch (1990) Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells - *Gastroenterology* **98**, 56-58
- Simoës, E. A. F. & T. J. John (1986) The antibody response of seronegative infants to inactivated poliovirus vaccine of enhanced potency - *J. Biol. Standardiz.* **14**, 127-131
- Simoës, E. A. F. & P. Sarnow (1991) An RNA hairpin at the extreme 5' end of the poliovirus RNA genome modulates viral translation in human cells - *J. Virol.* **65**, 913-921
- Simons, J., M. Kutubuddin & M. Chow (1993a) Characterization of poliovirus-specific T-lymphocytes in the peripheral blood of Sabin-vaccinated humans - *J. Virol.* **67**, 1262-1268
- Simons, J., A. Rogove, N. Moscufo, C. Reynolds & M. Chow (1993b) Efficient analysis of nonviable poliovirus capsid mutants - *J. Virol.* **67**, 1734-1738
- Singer, C., F. Knauer, G. Bushar, M. Klutch, R. Lundquist & G. V. Quinnan (1989) Quantitation of poliovirus antigens in inactivated viral vaccines by enzyme-linked immunosorbent assay using animal sera and monoclonal antibodies - *J. Biol. Standardiz.* **17**, 137-150
- Skern, T., H. Torgersen, H. Auer, E. Kuechler & D. Blaas (1991) Human rhinovirus mutants resistant to low pH - *Virology* **183**, 757-763
- Skinner, M. A., V. R. Racaniello, G. Dunn, J. Cooper, P. D. Minor & J. W. Almond (1989) New model for the secondary structure of the 5'non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence - *J. Mol. Biol.* **207**, 379-392
- Slater, P. E., W. A. Orenstein, A. Morag, A. Avni, R. Handscher, M. S. Green, C. Costin, A. Yarrow, S. Rishpon, O. Havkin, T. Ben-Zvi, O. M. Kew, M. Rey, I. Epstein, T. A. Swartz & J. L. Melnick (1990) Poliomyelitis outbreak in Israel in 1988: a report with two commentaries - *Lancet* **335**, 1192-1198
- Smith, C. E., P. R. Musich & D. A. Johnson (1989) Sodium dodecyl sulfate enhancement of quantitative immunoenzyme dot-blot assays on nitrocellulose - *Anal. Biochem.* **177**, 212-219
- Smith, D. B. & S. C. Inglis (1987) The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: An analytical review - *J. Gen. Virol.* **68**, 2729-2740
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson & D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid - *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- Smith, T. J. & E. S. Chase (1992) Purification and crystallization of intact human rhinovirus complexed with a neutralizing Fab - *Virology* **191**, 600-606
- Smith, T. J., N. H. Olson, R. H. Cheng, H. S. Liu, E. S. Chase, W. M. Lee, D. M. Leippe, A. G. Mosser, R. R. Rueckert & T. S. Baker (1993) Structure of human rhinovirus complexed with Fab fragments from a neutralizing antibody - *J. Virol.* **67**, 1148-1158
- Sokhey, J., C. K. Gupta, B. Sharma & H. Singh (1988) Stability of oral polio vaccine at different temperatures - *Vaccine* **6**, 12-13
- Somerville, L. L. & K. Wang (1981) The ultrasensitive silver "protein" stain also detects nanograms of nucleic acids - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 53-58
- Sonenberg, N. & K. Meerovitch (1990) Translation of poliovirus messenger RNA - *Enzyme* **44**, 278-291
- Sonenberg, N. & J. Pelletier (1989) Poliovirus translation: A paradigm for a novel initiation mechanism - *BioEssays* **11**, 128-132
- Sonies, B. C. & M. C. Dalakas (1991) Dysphagia in patients with the post-polio syndrome - *N. Engl. J. Med.* **324**, 1162-1167
- Springer, T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system - *Nature* **346**, 425-434
- Srivastava, A. K. (1989) Stabilization of the attenuated poliovirus type 3 vaccine strain by sucrose - *Acta Virol.* **33**, 188-190
- Stanway, G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses - *J. Gen. Virol.* **71**, 2483-2501
- Stanway, G., P. J. Hughes, R. C. Mountford, P. Reeve, P. D. Minor, G. C. Schild & J. W. Almond (1984) Comparison of the complete nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon 12a1b - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1539-1543
- Stegmann, T., F. P. Booy & J. Wilschut (1987) Effects of low pH on influenza virus - *J. Biol. Chem.* **262**, 17744-17749
- Steinhauer, D. A. & J. J. Holland (1987) Rapid evolution of RNA viruses - *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 409-433
- Steitz, T. A. (1990) Structural studies of protein - nucleic acid interaction: The sources of sequence - specific binding - *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 205-280
- Stille, C. J., L. J. Thomas, V. E. Reyes & R. E. Humphreys (1987) Hydrophobic strip-of-helix algorithm for selection of T cell-presented peptides - *Mol. Immunol.* **24**, 1021-1027
- Strauss, J. H. & E. G. Strauss (1988) Evolution of RNA viruses - *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 657-683



- Sun, X.-H. & D. Baltimore (1989) Human immunodeficiency virus tat-activated expression of poliovirus protein 2A inhibits mRNA translation - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2143-2146
- Sutherland, M. W. & J. H. Skerritt (1986) Alkali enhancement of protein staining on nitrocellulose - *Electrophoresis* **7**, 401-407
- Sutter, R. W., E. W. Brink, S. L. Cochi, O. M. Kew, W. A. Orenstein, R. J. Biellik & A. R. Hinman (1989) A new epidemiologic and laboratory classification system for paralytic poliomyelitis cases - *Am. J. Public Health* **79**, 495-498
- Sutter, R. W., P. A. Patriarca, S. Brogan, P. G. Malankar, M. A. Pallansch, O. M. Kew, A. G. Bass, S. L. Cochi, J. P. Alexander, D. B. Hall, A. J. M. Suleiman, A. A. K. Alghassany & M. S. Elbualy (1991) Outbreak of paralytic poliomyelitis in Oman - Evidence for widespread transmission among fully vaccinated children - *Lancet* **338**, 715-720
- Svitkin, Y., N. Cammack, P. D. Minor & J. W. Almond (1990) Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: Association with an attenuating mutation C<sub>472</sub> to U - *Virology* **175**, 103-109
- Svitkin, Y. V., S. V. Maslova & V. I. Agol (1985) The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro efficiencies - *Virology* **147**, 243-252
- Svitkin, Y. V., T. V. Pestova, S. V. Maslova & V. I. Agol (1988) Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: A comparison of neurovirulent and attenuated strains - *Virology* **166**, 394-404
- Swartz, T. A., R. Handsher, P. Stoeckel, J. Drucker, P. Caudrelier, A. L. van Wezel, H. Cohen, D. Salk & J. Salk (1989) Immunologic memory induced at birth by immunization with inactivated polio vaccine in a reduced schedule - *Eur. J. Epidemiol.* **5**, 143-145
- Takahara, Y., N. Ando, M. Kohara, K. Hagino-Yamagishi, A. Nomoto, H. Itoh, N. Numao & K. Kondo (1989) Purification of enzymatically active poliovirus proteinase 3C produced in *Escherichia coli* - *Gene* **79**, 249-258
- Takeda, N., R. J. Kuhn, C.-F. Yang, T. Takegami & E. Wimmer (1986) Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells - *J. Virol.* **60**, 43-53
- Takeda, N., C.-F. Yang, R. J. Kuhn & E. Wimmer (1987) Uridylation of the genome-linked protein of poliovirus in vitro is dependent upon an endogenous RNA template - *Virus Res.* **8**, 193-204
- Taniguchi, K. & S. Urasawa (1987) Different virus-precipitating activities of monoclonal antibodies that recognize distinct sites of poliovirus particles - *Arch. Virol.* **92**, 27-40
- Tardy-Panit, M., B. Blondel, A. Martin, F. Tekai, F. Horaud & F. Delpeyroux (1993) A mutation in the RNA polymerase of poliovirus type 1 contributes to attenuation in mice - *J. Virol.* **67**, 4630-4638
- Tartaglia, J. & E. Paoletti (1990) Live Recombinant Viral Vaccines - The basis for serodiagnosis and vaccines. - In: *Immunochimistry of viruses, II*, Herausg. van Regenmortel, M. H. V. & A. R. Neurath, Elsevier, S. 125-151
- Tatem, J. M., C. Weekslevy, A. Georgiu, S. J. Dimichele, E. J. Gorgacz, V. R. Racaniello, F. R. Cano & S. J. Mento (1992) A mutation present in the amino terminus of Sabin 3 poliovirus VP1 protein is attenuating - *J. Virol.* **66**, 3194-3197
- Tatem, J. M., C. Weekslevy, S. J. Mento, S. J. DiMichele, A. Georgiu, W. F. Waterfield, B. Sheip, C. Costalas, T. Davies, M. B. Ritchey & F. R. Cano (1991) Oral poliovirus vaccine in the United States - Molecular characterization of Sabin type 3 after replication in the gut of vaccinees - *J. Med. Virol.* **35**, 101-109
- Tershak, D. R. (1985) Effect of temperature on growth of guanidine-resistant mutants of poliovirus - *Can. J. Microbiol.* **31**, 1166-1168
- Tershak, D. R. & R. Makkar (1988) Attachment, uncoating and blockage of cell protein synthesis by Sabin derivatives of poliovirus in HeLa and Vero cells - *Intervirology* **29**, 292-300
- Tessmer, U. & R. Dernick (1987) Isoelektrische Focussierung von Poliovirus-Partikeln in Saccharose-Gradienten - In: *Electrophoresis-Forum 1987*, Herausg. Radola, B. J., Technische Universität München, S. 329-335
- Tessmer, U. & R. Dernick (1989) Preparative separation of poliovirus structural polypeptides by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, copper staining and electroelution, and induction of monospecific antisera - *Electrophoresis* **10**, 277-279
- Tessmer, U. & R. Dernick (1990) Poliovirus production in HeLa cells propagated by continuous flow culture in a cell fermentor - In: *Dechema Biotechnology Conferences, Vol.4, Part A*, Herausg. Behrens, D. & P. Krämer, Dechema Frankfurt/Main, S. 147-150
- Thean, E. T. & B. H. Toh (1989) Western immunoblotting: Temperature-dependent reduction in background staining - *Anal. Biochem.* **177**, 256-258
- Thomas, A. A. M., P. Brioen & A. Boeyé (1985) A monoclonal antibody that neutralizes poliovirus by cross-linking virions - *J. Virol.* **54**, 7-13
- Thomas, A. A. M., R. Vrijnsen & A. Boeyé (1986) Relationship between poliovirus neutralization and aggregation - *J. Virol.* **59**, 479-485
- Tinoco, I., P. W. Davis, C. C. Hardin, J. D. Puglisi, G. T. Walker & J. Wyatt (1987) RNA structure from A to Z - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **LII**, 135-146
- Tolskaya, E. A., T. A. Ivannikova, M. S. Kolesnikova, S. G. Drozdov & V. I. Agol (1992) Postinfection treatment with antiviral serum results in survival of neural cells productively infected with virulent poliovirus - *J. Virol.* **66**, 5152-5156
- Tormo, J., E. Stadler, T. Skern, H. Auer, O. Kanzler, C. Betzel, D. Blaas & I. Fita (1992) 3-Dimensional structure of the Fab fragment of a neutralizing antibody to human rhinovirus serotype-2 - *Protein Science* **1**, 1154-1161
- Tovey, E. R., S. A. Ford & B. A. Baldo (1982) Enhanced immunodetection of blotted house dust mite protein allergens on nitrocellulose following blocking with Tween 20 - *Electrophoresis* **10**, 243-249
- Toyoda, H., K. Michinori, Y. Kataoka, T. Suganama, T. Omata, N. Imura & A. Nomoto (1984) Complete nucleotide sequence of all three poliovirus serotype genomes: Implications for genetic relationship, gene function, and

- antigenic determinants. - *J. Mol. Biol.* **174**, 561-585
- Toyoda, H., M. J. H. Nicklin, M. G. Murray, C. W. Anderson, J. J. Dunn, F. W. Studier & E. Wimmer (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein - *Cell* **45**, 761-770
- Toyoda, H., C.-F. Yang, N. Takeda, A. Nomoto & E. Wimmer (1987) Analysis of RNA synthesis of type 1 poliovirus by using an in vitro molecular genetic approach - *J. Virol.* **61**, 2816-2822
- Tribbick, G., B. Triantafyllou, R. Lauricella, S. J. Rodda, T. J. Mason & H. M. Geysen (1991) Systematic fractionation of serum antibodies using multiple antigen homologous peptides as affinity ligands - *J. Immunol. Method.* **139**, 155-166
- Trono, D., P. Andino & D. Baltimore (1988a) An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis - *J. Virol.* **62**, 2291-2299
- Trono, D., J. Pelletier, N. Sonenberg & D. Baltimore (1988b) Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region - *Science* **241**, 445-448
- Troxler, M., D. Egger, T. Pfister & K. Bienz (1992) Intracellular localization of poliovirus RNA by in situ hybridization at the ultrastructural level using single-stranded riboprobes - *Virology* **191**, 687-697
- Tsilimigras, C. W. A., E. Rossouw & B. D. Schoub (1989) Outbreak of poliomyelitis in South Africa investigated by oligonucleotide mapping - *J. Med. Virol.* **28**, 52-56
- Tucker, S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer & R. W. Compans (1993) Bidirectional entry of poliovirus into polarized epithelial cells - *J. Virol.* **67**, 29-38
- Tulchinsky, T., Y. Abed, S. Shaheen, N. Toubassi, Y. Sever, M. Schoenbaum & R. Handsheer (1989) A ten-year experience in control of poliomyelitis through a combination of live and killed vaccines in two developing areas - *Am. J. Public Health* **79**, 1648-1652
- Turner, D. H. & N. Sugimoto (1988) RNA structure prediction - *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 167-192
- Turner, P. C., D. C. Young, J. B. Flanagan & R. W. Moyer (1989) Interference with vaccinia virus growth caused by insertion of the coding sequence for poliovirus protease 2A - *Virology* **173**, 509-521
- Uhlenbeck, O. C., H.-N. Wu & J. R. Sampson (1987) Recognition of RNA by protein - In: *Molecular biology of RNA: New perspectives*, Herausg. Inouye, M. & B. S. Dudock, Academic Press, Inc., S. 285-294
- Uhlig, H. (1986) Charakterisierung viraler Antigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper am Beispiel des Poliovirus. Dissertation Universität Hamburg
- Uhlig, H. & R.-Dernick (1988a) Intertypic cross-neutralization of polioviruses by human monoclonal antibodies - *Virology* **163**, 214-217
- Uhlig, H. & R.-Dernick (1988b) Different specificities of murin and human monoclonal antibodies against poliovirus type 1 - *Zbl. Bakt. Hyg. A* **268**, 130
- Uhlig, H., F. Haardt & R. Dernick (1985) Binding of neutralizing monoclonal antibodies to empty capsids of poliovirus can be blocked by monospecific antisera to structural polypeptides VP1 and VP2 - *Arch. Virol.* **83**, 295-303
- Uhlig, H., G. Rutter & R. Dernick (1983) Evidence for several unrelated neutralization epitopes of poliovirus type 1, strain Mahoney, provided by neutralization tests and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - *J. Gen. Virol.* **64**, 2809-2812
- Uhlig, J. (1991) Spezifität monoklonaler Antikörper gegen Poliovirus. Dissertation Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg
- Uhlig, J., K. Wieggers & R. Dernick (1990) A new antigenic site of poliovirus recognized by an intertypic cross-neutralizing monoclonal antibody - *Virology* **178**, 606-610
- Unanue, E. R. & J.-C. Cerottini (1989) Antigen presentation - *FASEB J.* **3**, 2496-2502
- Urakawa, T., M. Ferguson, P. D. Minor, J. Cooper, M. Sullivan, J. W. Almond & D. H. L. Bishop (1989) Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector - *J. Gen. Virol.* **70**, 1453-1463
- Urzainqui, A. & L. Carrasco (1989a) Degradation of cellular proteins during poliovirus infection: Studies by two-dimensional gel electrophoresis - *J. Virol.* **63**, 4729-4735
- Urzainqui, A. & L. Carrasco (1989b) Post-translational modifications of poliovirus proteins - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 263-271
- UytdeHaag, F. G. C. M., H. Bunschoten, K. Weijer & A. D. M. E. Osterhaus (1986) From Jenner to Jerne: Towards idiotype vaccines - *Immunol. Rev.* **90**, 93-113
- Vajda, S., R. Kataoka, C. DeLisi, H. Margalit, J. A. Berzofsky & J. L. Cornette (1990) Molecular structure and vaccine design - *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 69-82
- van Amerongen, H., R. van Grondelle & P. C. van der Vliet (1987) Interaction between adenovirus DNA-binding protein and single-stranded polynucleotides studied by circular dichroism and ultraviolet absorption - *Biochemistry* **26**, 4646-4652
- Vanden Berghe, D. & A. Bocyé (1973) Stepwise degradation of poliovirus and top component by concentrated urea - *Arch. ges. Virusforsch.* **41**, 216-228
- van der Marel, P., T. G. Hazendonk, M. A. C. Henneke & A. L. van Wezel (1983) Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides VP1, VP2 and VP3 - *Vaccine* **1**, 17-22
- van der Sluis, P. J., C. W. Pool & A. A. Sluiter (1987) Press-blotting on gelatin-coated nitrocellulose membranes - A method for sensitive quantitative immunodetection of peptides after gel isoelectric focusing - *J. Immunol. Method.* **104**, 65-71
- van der Sluis, P. J., C. W. Pool & A. A. Sluiter (1989) Immunochemical detection of peptides and proteins on press-blot after direct tissue gel isoelectric focusing - *Electrophoresis* **9**, 654-661
- van der Werf, S., J. Bradley, E. Wimmer, F. W. Studier & J. J. Dunn (1986) Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2330-2334
- van der Werf, S., A. Charbit, C. Leclerc, V. Mimic, J. Ronco, M. Girard & M. Hofnung (1990) Critical role of neighbouring sequences on the immunogenicity of the C3 poliovirus neutralization epitope expressed at the surface of recombinant bacteria - *Vaccine* **8**, 269-277

- van Regenmortel, M. H. V. (1987) Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: New insights and applications - *Trends Biochem. Sci.* **12**, 237-240
- van Regenmortel, M. H. V. (1989) The concept and operational definition of protein epitopes - *Phil. Trans. Roy. Soc. London B* **323**, 451-466
- van Regenmortel, M. H. V. (1990) The Structure of Viral Epitopes - In: *Immunochemistry of Viruses, II. The basis for serodiagnosis and vaccines*, Herausg. van Regenmortel, M. H. V. & A. R. Neurath, Elsevier, S. 1-24
- van Regenmortel, M. H. V. (1992) The conformational specificity of viral epitopes - *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 483-488
- Vardinon, N., R. Handsher, M. Burke, V. Zacut & I. Yust (1990) Poliovirus vaccination responses in HIV-infected patients: Correlation with T4 cell counts - *J. Infect. Dis.* **162**, 238-241
- Verlinde, J. D. & J. B. Wilterdink (1970) Neurovirulence of poliovirus isolated from sewage and stool of healthy children - *Arch. ges. Virusforsch.* **32**, 311-317
- Vertosick, F. T. & R. H. Kelly (1991) The immune system as a neural network: A multi-epitope approach - *J. Theor. Biol.* **150**, 225-237
- Vonsover, A., R. Handsher, M. Neuman, S. Guillot, J. Balanant, H. Rudich, E. Mendelson, T. Swartz & R. Crainic (1993) Molecular epidemiology of type 1 polioviruses isolated in Israel and defined by restriction fragment length polymorphism assay - *J. Infect. Dis.* **167**, 199-203
- Vrijisen, R., A. Mosser & A. Boeyé (1993) Postadsorption neutralization of poliovirus - *J. Virol.* **67**, 3126-3133
- Vrijisen, R., B. Rombaut & A. Boeyé (1983) pH-dependent aggregation and electrofocusing of poliovirus - *J. Gen. Virol.* **64**, 2339-2342
- Vrijisen, R., B. Rombaut & A. Boeyé (1984) Intertypic cross-reactions of nonneutralizing, monoclonal Poliovirus antibodies - *J. Virol.* **49**, 1002-1004
- Wada, A. & A. Suyama (1986) Local stability of DNA and RNA secondary structure and its relation to biological functions - *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **47**, 113-157
- Wade, R. C. & J. A. McCammon (1992) Binding of an antiviral agent to a sensitive and a resistant human rhinovirus - Computer simulation studies with sampling of amino acid side-chain conformations. 1. Mapping the rotamers of residue-188 of viral protein-1 - *J. Mol. Biol.* **225**, 679-696
- Wallis, C. & J. L. Melnick (1962) Cationic stabilization - A new property of enteroviruses - *Virology* **16**, 504-506
- Wallis, C. & J. L. Melnick (1971) Herpesvirus neutralization: The role of complement - *J. Immunol.* **107**, 1235-1242
- Wang, G. J., C. Porta, Z. G. Chen, T. S. Baker & J. E. Johnson (1992) Identification of a Fab interaction footprint site on an icosahedral virus by cryoelectron microscopy and X-ray crystallography - *Nature* **355**, 275-278
- Wang, K., L. Sun, B. Jubelt & C. Waltenbaugh (1989) Cell-mediated immune responses to poliovirus - I. Conditions for induction, characterization of effector cells, and cross-reactivity between serotypes for delayed hypersensitivity and T cell proliferative responses - *Cell. Immunol.* **119**, 252-262
- Ward, C. D. & J. B. Flanagan (1992) Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at 8 sites in the viral genome - *J. Virol.* **66**, 3784-3793
- Ward, R. L. & C. S. Ashley (1979) pH modification of the effects of detergents on the stability of enteric viruses - *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 314-322
- Warwicker, J. (1992) Model for the differential stabilities of rhinovirus and poliovirus to mild acidic pH, based on electrostatics calculations - *J. Mol. Biol.* **223**, 247-257
- Weckx, L. Y., B. J. Schmidt, A. A. Herrmann, C. H. Miyasaki & N. F. Novo (1992) Early immunization of neonates with trivalent oral poliovirus vaccine - *Bull. WHO* **70**, 85-91
- Weidner, J. R. & B. M. Dunn (1991) Development of synthetic peptide substrates for the poliovirus-3C proteinase - *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 402-408
- Weiss, R. (1988) Change the U.S. polio vaccine or leave it alone? - *ASM News* **54**, 560-562
- Welsh, R. M. (1986) Regulation of virus infections by natural killer cells - *Natur. Immun. Cell Growth Regul.* **5**, 169-199
- Westrop, G. D., K. A. Wareham, D. M. A. Evans, G. Dunn, P. D. Minor, D. I. Magrath, F. Taffs, S. Marsden, M. A. Skinner, G. C. Schild & J. W. Almond (1989) Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine - *J. Virol.* **63**, 1338-1344
- Wetz, K. (1993) Attachment of neutralizing antibodies stabilizes the capsid of poliovirus against uncoating - *Virology* **192**, 465-472
- Wetz, K. & K.-O. Habermehl (1982) Specific cross-linking of capsid proteins to virus RNA by ultraviolet irradiation of poliovirus - *J. Gen. Virol.* **59**, 397-401
- Wetz, K. & T. Kucinski (1991) Influence of different ionic and pH environments on structural alterations of poliovirus and their possible relation to virus uncoating - *J. Gen. Virol.* **72**, 2541-2544
- Wetz, K., P. Willingmann, H. Zeichhardt & K.-O. Habermehl (1986) Neutralization of poliovirus by polyclonal antibodies requires binding of a single IgG molecule per virion - *Arch. Virol.* **91**, 207-220
- WHO (1990) Potential use of new poliomyelitis vaccines: Memorandum from a WHO meeting - *Bull. WHO* **68**, 545-548
- WHO (Editorial) (1992) Poliovirus neutralizing antibody assays - *Bull. WHO* **70**, 669
- Wickens, M. P. & J. E. Dahlberg (1987) RNA-protein interactions - *Cell* **51**, 339-342
- Wieggers, K.-J. & R. Dernick (1983) Monospecific antisera against capsid polypeptides of poliovirus type 1 distinguish antigenic structures of poliovirus proteins - *J. Gen. Virol.* **64**, 777-785
- Wieggers, K.-J. & R. Dernick (1985) Evidence for conformational changes of poliovirus precursor particles during virus morphogenesis - *J. Gen. Virol.* **66**, 1037-1044
- Wieggers, K.-J. & R. Dernick (1987) Binding site of neutralizing monoclonal antibodies obtained after in vivo priming with purified VP1 of poliovirus type 1 is located between amino acid residues 93 and 104 of VP1 - *Virology* **157**, 248-251
- Wieggers, K.-J., H. Uhlig & R. Dernick (1986) In vitro stimu-



- lation of presensitized mouse spleen cells with poliovirus type 1, Mahoney, and enhancement of poliovirus-specific hybridomas - *J. Gen. Virol.* **67**, 2053-2057
- Wiegiers, K.-J., H. Uhlig & R. Dernick (1988a) Characterization of neutralization escape mutants selected by a monoclonal antibody against VP1 of poliovirus, type 1, Mahoney - *Zbl. Bakt. Hyg. A* **268**, 123
- Wiegiers, K.-J., H. Uhlig & R. Dernick (1989) N-AgIB of poliovirus, type 1: A discontinuous epitope formed by two loops of VP1 comprising residues 96-104 and 141-152 - *Virology* **170**, 583-586
- Wiegiers, K. & R. Dernick (1992) Molecular basis of antigenic structures of poliovirus - Implications for their evolution during morphogenesis - *J. Virol.* **66**, 4597-4600
- Wiegiers, K. J., K. Wetz & R. Dernick (1990) Molecular basis for linkage of a continuous and discontinuous neutralization epitope on the structural polypeptide VP2 of poliovirus type 1 - *J. Virol.* **64**, 1283-1289
- Wiegiers, K., H. Uhlig & R. Dernick (1988b) Evidence for a complex structure of neutralization antigenic site I of poliovirus type 1 Mahoney - *J. Virol.* **62**, 1845-1848
- Wiegiers, K., U. Yamaguchi-Koll & R. Drzeniek (1976) A complex between poliovirus RNA and the structural polypeptide VP1 - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1308-1312
- Williams, W. V., H. R. Guy, J. A. Cohen, D. B. Weiner & M. I. Greene (1990) Structure and regulation of internal image idiotypes - In: *Idiotypes in biology and medicine.*, Chem. Immunol. Vol. 48, Herausg. Carson, D. A., P. P. Chen & T. J. Kipps, Karger Basel, S. 185-208
- Willingmann, P., H. Barnert, H. Zeichhardt & K.-O. Habermehl (1989) Recovery of structurally intact and infectious poliovirus type 1 from HeLa cells during receptor-mediated endocytosis - *Virology* **168**, 417-420
- Wilson, C. C. (1988) Analysis of conformational parameters in nucleic acid fragments. III. Very short chain oligonucleotides. The effect of base stacking - *Nucl. Acids Res.* **16**, 4751-4759
- Windebank, A. J., W. J. Litchy, J. R. Daube, L. T. Kurland, M. B. Codd & R. Iverson (1991) Late effects of paralytic poliomyelitis in Olmsted county, Minnesota - *Neurology* **41**, 501-507
- Wittmann-Liebold, B. (1989) *Moderne chemische Strukturanalyse von Proteinen und Peptiden: Strategien, Methoden, Einsatzmöglichkeiten - Kontakte (Darmstadt)* **3**, 16-28
- Wolfenden, R., L. Andersson, P. M. Cullis & C. C. B. Southgate (1981) Affinities of amino acid side chains for solvent water - *Biochemistry* **20**, 849-855
- Wright, P. F., R. J. Kimfarley, C. A. Dequadros, S. E. Robertson, R. M. Scott, N. A. Ward & R. H. Henderson (1991) Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000 - *N. Engl. J. Med.* **325**, 1774-1779
- Wu, B., J. Mahony & M. Chernesky (1989) Comparison of three protein A-gold immune electron microscopy methods for detecting rotavirus - *J. Virol. Meth.* **25**, 109-118
- Wyatt, H. V. (1990) Incubation of poliomyelitis as calculated from the time of entry into the central nervous system via the peripheral nerve pathways - *Rev. Infec. Dis.* **12**, 547-556
- Wychowski, C., S. U. Emerson, J. Silver & S. M. Feinstone (1990) Construction of recombinant DNA molecules by the use of a single stranded DNA generated by the polymerase chain reaction: Its application to chimeric hepatitis A virus / poliovirus subgenomic cDNA - *Nucl. Acids Res.* **18**, 913-918
- Yang, C. F., L. De, B. P. Holloway, M. A. Pallansch & O. M. Kew (1991) Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction - *Virus Res.* **20**, 159-179
- Yang, C. F., L. N. De, S. J. Yang, J. R. Gomez, J. R. Cruz, B. P. Holloway, M. A. Pallansch & O. M. Kew (1992) Genotype-specific in vitro amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala - *Virus Res.* **24**, 277-296
- Yaron, A. & F. Naider (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins - *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **28**, 31-81
- Yeates, T. O., D. H. Jacobson, A. Martin, C. Wychowski, M. Girard, D. J. Filman & J. M. Hogle (1991) Three-dimensional structure of a mouse-adapted type-2/type-1 poliovirus chimera - *EMBO J.* **10**, 2331-2341
- Yohannan, M. D., S. Ramia & A. R. S. Alfrayh (1991) Acute paralytic poliomyelitis presenting as Guillain-Barre syndrome - *J. Infection* **22**, 129-133
- Young, D. C., B. M. Dunn, G. J. Tobin & J. B. Flanagan (1986) Anti-VPg antibody precipitation of product RNA synthesized in vitro by the poliovirus polymerase and host factor is mediated by VPg on poliovirion RNA template - *J. Virol.* **58**, 715-723
- Young, D. C., G. J. Tobin & J. B. Flanagan (1987) Characterization of product RNAs synthesized in vitro by poliovirus RNA polymerase purified by chromatography on hydroxylapatite or poly(U) sepharose - *J. Virol.* **61**, 611-614
- Young, P. R. (1989) Enhancement of immunoblot staining using a mixed chromogenic substrate - *J. Immunol. Method.* **121**, 295-296
- Ypma-Wong, M. F., P. G. Dewalt, V. H. Johnson, J. G. Lamb & B. L. Semler (1988b) Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor - *Virology* **166**, 265-270
- Ypma-Wong, M. F., D. J. Filman, J. M. Hogle & B. L. Semler (1988a) Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs - *J. Biol. Chem.* **263**, 17846-17856
- Ypma-Wong, M. F. & B. L. Semler (1987a) In vitro molecular genetics as a tool for determining the differential cleavage specificities of the poliovirus 3C proteinase - *Nucl. Acids Res.* **15**, 2069
- Ypma-Wong, M. F. & B. L. Semler (1987b) Processing determinants required for in vitro cleavage of the poliovirus P1 precursor to capsid proteins - *J. Virol.* **61**, 3181-3189
- Yu, S. F. & R. E. Lloyd (1991) Identification of essential amino acid residues in the functional activity of poliovirus 2A-protease - *Virology* **182**, 615-625
- Yu, S. Y. F. & R. E. Lloyd (1992) Characterization of the roles of conserved cysteine and histidine residues in poliovirus 2A-protease - *Virology* **186**, 725-735
- Yuan, J. & P. S. Low (1992) Epitope mapping by a method

- that requires no amino acid sequence information - *Anal. Biochem.* **205**, 179-182
- Zaman, S., B. Carlsson, A. Morikawa, S. Jeansson, I. Narayanan, K. Thiringer, F. Jalil & L. A. Hanson (1993) Poliovirus antibody titres, relative affinity, and neutralising capacity in maternal milk - *Arch. Dis. Child.* **68**, 198-201
- Zegers, N. D., E. Claassen, C. Neelen, E. Mulder, J. H. Vanlaar, M. M. Voorhorst, C. A. Berrevoets, A. O. Brinkmann, T. H. Vanderkwast, J. A. R. Dewinter, J. Trapman & W. J. A. Boersma (1991) Epitope prediction and confirmation for the human androgen receptor - Generation of monoclonal antibodies for multi-assay performance following the synthetic peptide strategy - *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 23-32
- Zeichhardt, H., M. J. Otto, M. A. McKinlay, P. Willingmann & K.-O. Habermehl (1987) Inhibition of poliovirus uncoating by disoxaril (WIN 51711) - *Virology* **160**, 281-285
- Zhaori, G., M. Sun & P. L. Ogra (1988) Characteristics of the immune response to poliovirus virion polypeptides after immunization with live or inactivated polio vaccines - *J. Infect. Dis.* **158**, 160-165
- Zhou, E.-M., G. R. Dreesman & R. C. Kennedy (1987) Antidiotypic antibodies: A new generation of vaccines against infectious agents - *Microbiol. Sci.* **4**, 36-40
- Zibert, A., H. C. Selinka, O. Elroystein, B. Moss & E. Wimmer (1991) Vaccinia virus-mediated expression and identification of the human poliovirus receptor - *Virology* **182**, 250-259
- Zibert, A., H. C. Selinka, O. Elroystein & E. Wimmer (1992) The soluble form of 2 N-terminal domains of the poliovirus receptor is sufficient for blocking viral infection - *Virus Res.* **25**, 51-61
- Zibert, A. & E. Wimmer (1992) N-glycosylation of the virus binding domain is not essential for function of the human poliovirus receptor - *J. Virol.* **66**, 7368-7373
- Zuker, M., J. A. Jaeger & D. H. Turner (1991) A comparison of optimal and suboptimal RNA secondary structures predicted by free energy minimization with structures determined by phylogenetic comparison - *Nucl. Acids Res.* **19**, 2707-2714

## SCATTER: a program to correct UV spectra recorded with an LKB Ultrospec interfaced to an Apple IIe for light scattering by particles or aggregates

Christiane Bergmann and Rolf Bergmann<sup>1</sup>

Conformational changes in nucleic acids can be estimated by measuring the peak absorbance in UV. When applying this method to intact viruses, we were confronted with the fact that our samples became turbid due to aggregation under the experimental conditions employed. However, a method already exists to measure the absorbance of the macromolecules in spite of light scattering (Englander and Epstein, 1957). The method is applicable to solutes which absorb UV but not visible light. Optical density (OD) by light scattering is a hyperbolic function of the wavelength. This function may be linearized by calculating the logarithms of both the OD and the wavelength. For wavelength values of visible light the OD is a result of scattering alone, and the resulting curve is a straight line. This line may be extrapolated to the UV part of the spectrum, giving the values for light scattering at these wavelengths. The difference between total OD and the value for scattering represents the intrinsic absorbance of the solute. This is illustrated in Figure 1. The spectra were recorded with an LKB Ultrospec photometer and the data stored on disk with an Apple IIe with the aid of software supplied by LKB.

The program SCATTER retrieves the data file chosen by the user and replots the spectrum with double logarithmic axes. The user is then asked to define the limits of the linear region of the plot, which is done by visual inspection on the screen. The program then calculates by least-squares fitting a straight line for the data points within the set limits. From the original OD data the wavelength of maximal OD is found, and for this wavelength the value of scattering is calculated and subtracted from the measured OD value. The user may choose whether to print the double logarithmic plot, the data for each wavelength or any combination of these. Graphic printing instructions are implemented for Grappler and Epson (APL) type interfaces. The program uses standard Applesoft instructions only and may easily be modified to include further calculations useful for a particular experimental set-up.

### Acknowledgement

We thank R.Dernick for introducing the problem to us.

<sup>1</sup>Heinrich Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, Martinistrasse 52, D 2000 Hamburg 20 and <sup>1</sup>Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Ohnhorststrasse 18, D 2000 Hamburg 52, FRG

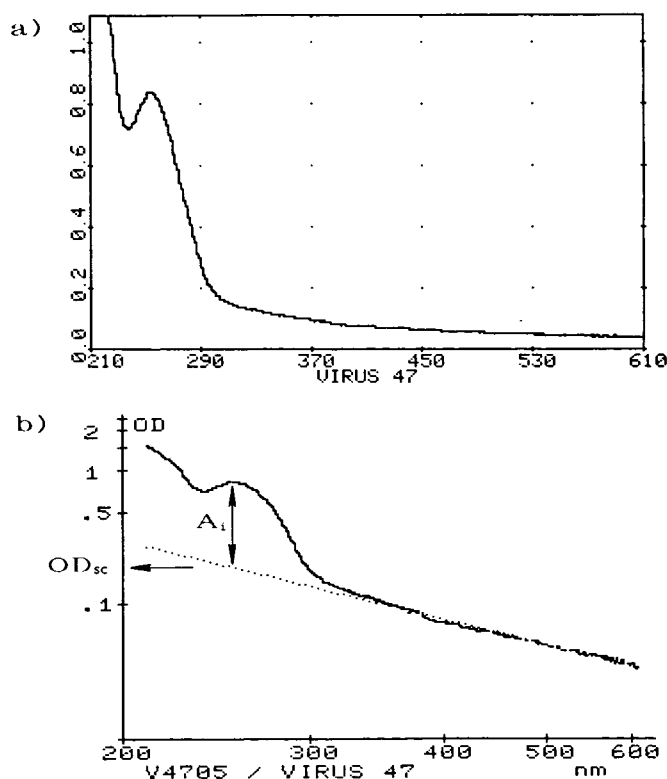


Fig. 1. (a) Sample spectrum as recorded by Ultrospec/Apple. (b) Double logarithmic replot by SCATTER. The measured OD is split into the part caused by light scattering ( $OD_{sc}$ ) and the intrinsic absorption of the solute ( $A_i$ ).

### Reference

- Englander, S.W. and Epstein, H.T. (1957) Optical methods for measuring nucleoprotein and nucleic acid concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 144–149.

Circle No. 12 on Reader Enquiry Card

```
100 REM *****
110 REM The program calculates scatter from the visible part of a spectrum
120 REM recorded with a LKB Ultrospec and stored on diskette. It finds the
130 REM maximal absorbance in the UV part of the spectrum and corrects the
140 REM peak value for scatter. The method of Englander & Epstein is used
150 REM (Arch.Biochem.Biophys. 68 (1957) 144-149).
160 REM *****
165 REM This version of scatter expects data format of ULTROSPEC I software
166 REM
170 REM Input all ASCII
180 FOR X = 768 TO 793: READ Y
190 POKE X,Y
200 NEXT X
210 DATA 32,6,227,32,190,222,32,227,223,32,108,221,133,133,132,134,32,44,
213,200,32,233,227,76,154,218
220 HIMEM: 28671: LOMEM: 24576
230 D$ = CHR$(4)
240 DIM L(701),W(10),H(10)
250 PRINT : PRINT D$;"BLOAD PLOTDATA,A3072,D1"
260 POKE 232,0: POKE 233,12
270 SCALE= 1: ROT= 0
280 HOME
290 VTAB 18: PRINT "(For CATALOG of D2 press <Return>)"
300 VTAB 10
310 PRINT "Filename of Ultrospec data file": PRINT : PRINT "(disk in drive 2)"
320 VTAB 12: HTAB 19: PRINT "? ";
330 CALL 768,A$
340 IF LEFT$(A$,1) = "" THEN GOTO 1840
350 POKE 43624,2: REM Now drive 2 for input
360 ONERR GOTO 280
370 PRINT : PRINT CHR$(4);"OPEN";A$
380 PRINT : PRINT CHR$(4);"READ";A$
390 INPUT T$
400 INPUT W1,W2,D
410 A = W2 - W1
420 RESTORE
430 FOR N = 1 TO A
440 INPUT L(N)
450 NEXT N
460 PRINT : PRINT CHR$(4);"CLOSE";A$
470 POKE 43624,1: REM back to drive 1
480 E = .4342945:NS = 0:ODA = 0
490 REM PLOT
500 HGR : GOSUB 1870
510 HCOLOR= 3
520 HPLOT 20,0 TO 20,170 TO 270,170
525 XM = 0
530 FOR I = W1 TO W2 - 3
540 S = I - W1 + 2
545 IF I > 620 THEN GOTO 630: REM limit screen output to 620nm
550 IF L(S) < = 10 OR L(S + 1) < = 10 OR L(S) > 2400 OR L(S + 1) > 2400 THEN
GOSUB 2230: GOTO 610: REM discard out of range values for screen output
560 X1 = LOG (I / 100) * E * 500 - 130
570 X2 = LOG ((I + 1) / 100) * E * 500 - 130
580 Y1 = 170 - LOG (L(S) / 10) * E * 70
590 Y2 = 170 - LOG (L(S + 1) / 10) * E * 70
600 HPLOT X1,Y1 TO X2,Y2
610 NEXT I
615 REM
620 REM Axes lettering
630 FOR M = 2 TO 6
640 DRAW 2 AT ( LOG (M) * E * 500 - 130),170
650 NEXT M
660 M = 1: GOSUB 830
670 FOR M = 5 TO 25 STEP 5
680 GOSUB 830
690 NEXT M
700 DRAW ASC ( LEFT$(A$,1)) AT 30,190
710 FOR S = 2 TO LEN (A$)
```

```
720 DRAW ASC ( MID$ (A$,S,1)): NEXT S
730 IF LEN (T$) < 2 THEN GOTO 780
740 DRAW 32: DRAW 47: DRAW 32
750 FOR S = 1 TO ( LEN (T$))
760 DRAW ASC ( MID$ (T$,S,1))
770 NEXT S
780 DRAW 50 AT 2,12: DRAW 49 AT 2,33: DRAW 46 AT 0,54: DRAW 53: DRAW 46 AT 0,102:
DRAW 49
790 DRAW 79 AT 25,8: DRAW 68
800 DRAW 50 AT 10,180: DRAW 48: DRAW 48: DRAW 51 AT 98,180: DRAW 48: DRAW 48: DRAW
52 AT 161,180: DRAW 48: DRAW 48: DRAW 53 AT 209,180: DRAW 48: DRAW 48: DRAW 54 AT
249,180: DRAW 48: DRAW 48
810 DRAW 110 AT 232,189: DRAW 109
820 GOTO 840
830 DRAW 2 AT 20, (170 - LOG (M * 10) * E * 70): RETURN
835 REM
840 REM FIND LAMBDA MAX
850 PN = 0
860 WP = 260:HP = L(260 - W1): REM if no peak found calculate for 260 nm
870 FOR I = 10 TO (A - 9)
880 IF L(I - 9) + 4 > L(I) THEN NEXT : GOSUB 930: GOTO 935
890 IF L(I + 9) + 4 > L(I) THEN NEXT : GOSUB 930: GOTO 935
900 IF L(I + 9) > L(I - 9) THEN NEXT : GOSUB 930: GOTO 935
910 WP = I + W1:HP = L(I): GOSUB 930
920 GOTO 935
930 PN = PN + 1:W(PN) = WP:H(PN) = HP / 1000: RETURN
935 IF XM > 0 THEN IF XM < 330 THEN GOTO 2500
940 REM
950 REM least squares fit
960 REM define linear part of curve
970 REM left border
980 POKE - 16301,0: REM mixed on
990 GOSUB 2360
1000 VTAB 21: PRINT "left border of linear part ": PRINT : PRINT " <- J K ->
/ ready: spacebar"
1010 XP = 125: REM 323 nm
1020 GOSUB 1110: GOSUB 1120
1030 LWL = INT (100 * (10 ^ ((XP + 130) / 500)))
1040 REM right border
1045 IF XM > 0 THEN GOTO 2260
1050 VTAB 21: PRINT "right border of linear part ": PRINT : PRINT " <- J K ->
/ ready : spacebar"
1060 XP = 245: REM 562 nm
1070 GOSUB 1110: GOSUB 1120
1080 RWL = INT (100 * (10 ^ ((XP + 130) / 500)))
1090 IF RWL > W2 THEN GOTO 2440
1100 GOTO 1170
1110 FOR YP = 30 TO 130 STEP 10: XDRAW 108 AT XP,YP: NEXT YP: RETURN
1120 GET B$:B = ASC (B$)
1130 IF B = 32 THEN GOSUB 1110: RETURN
1140 IF B = 74 OR B = 8 THEN GOSUB 1110:XP = XP - 4: GOSUB 1110: GOTO 1120
1150 IF B = 75 OR B = 21 THEN GOSUB 1110:XP = XP + 4: GOSUB 1110: GOTO 1120
1160 GOTO 1120
1170 IF LWL > RWL THEN GOTO 2410
1180 GOSUB 2360
1190 POKE - 16302,0: REM mixed off
1200 REM Least-squares fitting
1210 S1 = 0:S2 = 0:S3 = 0:S4 = 0:S5 = 0
1220 REM SUM X, X^2, Y, X*Y; X=lg WL, Y=lg OD
1230 FOR N = (LWL - W1) TO (RWL - W1)
1240 IF L(N) < 1 THEN L(N) = 1: GOTO 1300
1250 S1 = S1 + LOG ((N + W1) / 100) * E * 500 - 130
1260 S2 = S2 + ( LOG ((N + W1) / 100) * E * 500 - 130) ^ 2
1270 S3 = S3 + (170 - LOG (L(N) / 10) * E * 70)
1280 S5 = S5 + ( LOG ((N + W1) / 100) * E * 500 - 130) * (170 - LOG (L(N) / 10) * E
* 70)
1290 XDRAW 98 AT 200,20: XDRAW 117: XDRAW 115: XDRAW 121
1300 NEXT N
1310 REM equation formula Y=M*X+C
```

```

1320 N = RWL - LWL + 1
1330 M = (S5 - (S1 * S3 / N)) / (S2 - (S1 ^ 2 / N))
1340 C = (S3 - M * S1) / N
1350 DRAW 32 AT 200,20: DRAW 32: DRAW 32: DRAW 32
1360 GOSUB 1760: GOSUB 1870: GOSUB 1910: GOSUB 1910: GOSUB 1910
1370 REM aggregation OD at lambda max
1380 XMAX = LOG (W(1) / 100) * E * 500 - 130
1390 YAUSGL = M * XMAX + C
1400 ODA = (10 ^ ((170 - YAUSGL) / 70)) / 100
1410 ODA = (INT (ODA * 10000)) / 10000
1420 REM Print result
1430 GOSUB 1440: GOTO 1510
1440 TEXT : HOME
1450 PRINT " lambda max = ";W(1);" nm"
1460 PRINT " in spectrum ";A$
1470 PRINT : PRINT " OD in spectrum = ";H(1)
1480 PRINT : PRINT " OD by scatter = ";ODA
1490 PRINT : PRINT " corrected OD = ";H(1) - ODA
1500 RETURN
1505 REM
1510 REM PRINT
1520 VTAB 10: PRINT " _____"
1530 PRINT
1540 PRINT " print to paper:": PRINT
1550 PRINT " result <1>"
1560 PRINT " data <2>"
1570 PRINT " logarithmic plot <3>"
1580 PRINT " 1 + 2 <4>"
1590 PRINT " 1 + 3 <5>"
1600 PRINT " 2 + 3 <6>"
1610 PRINT " 1 + 2 + 3 <7>": PRINT
1620 PRINT " next spectrum <0>"
1630 PRINT " Exit <E>"
1640 GET PR$
1650 IF PR$ = CHR$ (69) OR PR$ = CHR$ (101) THEN HOME : END
1655 IF PR$ = CHR$ (13) AND XM > 0 THEN XP = LOG (XM / 100) * E * 500 - 130:
GOSUB 1870: GOTO 1080
1660 PR = VAL (PR$)
1670 IF PR = 0 THEN HOME : GOTO 300
1680 IF PR = 1 THEN GOSUB 2000: PRINT : PRINT : GOSUB 1450: PRINT : PRINT : GOSUB
2030: GOTO 1430
1690 IF PR = 2 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1920: GOSUB 2000: PRINT : PRINT : GOSUB
2070: PRINT : PRINT : GOSUB 2030: GOTO 1430
1700 IF PR = 3 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1950: GOSUB 2000: GOTO 1830
1710 IF PR = 4 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1920: GOSUB 2000: PRINT : PRINT : GOSUB
2070: PRINT : PRINT : GOSUB 1450: PRINT : PRINT : GOSUB 2030: GOTO 1430
1720 IF PR = 5 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1950: GOSUB 2000: GOSUB 1450: GOTO 1830
1730 IF PR = 6 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1920: VTAB 20: GOSUB 1960: GOSUB 2000: GOSUB
2070: GOTO 1830
1740 IF PR = 7 THEN GOSUB 1440: GOSUB 1920: VTAB 20: GOSUB 1960: GOSUB 2000: GOSUB
1450: PRINT : PRINT : GOSUB 2070: GOTO 1830
1750 GOTO 1640
1755 REM
1760 REM Plot calculated curve
1770 XL = INT ( LOG (W1 / 100) * E * 500 - 130)
1780 XR = INT ( LOG (W2 / 100) * E * 500 - 130)
1790 FOR I = XL TO XR STEP 3
1800 IF (M * I + C) < 0 OR (M * I + C) > 170 THEN GOTO 1820
1810 XDRAW 17 AT I,(M * I + C)
1820 NEXT I: RETURN
1830 ON PI GOSUB 2050,2060: GOSUB 2030: GOTO 1430
1840 HOME : PRINT : PRINT CHR$ (4);"CATALOG,D2"
1850 PRINT : PRINT " press <Return> to go on ": CALL 768,R$
1860 HOME : GOTO 300
1870 POKE - 16304,0: REM graphics screen on
1880 POKE - 16297,0
1890 POKE - 16302,0
1900 RETURN
1910 FOR I = 1 TO 1000: NEXT : RETURN

```

```

1920 VTAB 16
1930 PRINT A;" data points exist.          ": PRINT : PRINT "Enter step size for
printout : "
1940 INPUT DD: RETURN
1950 VTAB 16
1960 PRINT "   Enter type of printer interface :": PRINT
1970 PRINT "           Grappler   <1>"
1980 PRINT "           Epson (APL) <2>"
1990 GET PI: RETURN
2000 PRINT : PRINT D$;"PR#1"
2010 PRINT : PRINT CHR$ (9);"80N"
2020 RETURN
2030 PRINT : PRINT CHR$ (12): PRINT D$;"PR#0"
2040 RETURN
2050 PRINT : PRINT CHR$ (9);"GDR": RETURN
2060 PRINT : POKE 1273,65: PRINT CHR$ (17): RETURN
2070 REM   Data printout
2080 PRINT "           Data for spectrum ";A$
2090 PRINT : PRINT "           Wavel.(nm) OD          * Log(WL/100)   Log(OD*100)": PRINT
2100 FOR I = W1 TO W2 STEP DD
2110 S = I - W1 + 1
2120 IF L(S) < = 0 THEN GOTO 2210
2130 OD$ = STR$ (L(S))
2140 IF LEN (OD$) = 1 THEN OD$ = "0.00" + OD$
2150 IF LEN (OD$) = 2 THEN OD$ = "0.0" + OD$
2160 IF LEN (OD$) = 3 THEN OD$ = "0." + OD$
2170 IF LEN (OD$) = 4 THEN OD$ = LEFT$ (OD$,1) + "." + RIGHT$ (OD$,3)
2180 LGWL$ = LEFT$ ( STR$ ( LOG ( I / 100) * E),6)
2190 PRINT "           ";
2200 PRINT "           ";I;"           ";OD$;"           *           ";LGWL$;"           "; LOG ( ABS (L(S) / 10)) *
E
2210 NEXT I
2220 RETURN
2230 IF L(S) > 10 THEN RETURN
2240 NS = NS + 1: REM   count low OD values
2245 IF L(S) < 4 THEN XM = W1 + S: GOTO 630
2250 RETURN
2260 TEXT : HOME : VTAB 4
2270 PRINT "OD values above ";XM;" nm in this": PRINT "spectrum are too low to
calculate": PRINT "scatter. Now what:"
2280 PRINT
2290 PRINT "calculate anyway from left border"
2300 PRINT "up to ";XM;" nm          <Return>"
2310 PRINT
2330 PRINT "           next spectrum          <0>"
2340 PRINT "           Exit                      <E>"
2350 GOTO 1640
2360 FOR M = 3 TO 6
2370 XDRAW 2 AT ( LOG (M) * E * 500 - 130),15
2380 NEXT M
2390 XDRAW 51 AT 98,7: XDRAW 48: XDRAW 48: XDRAW 52 AT 161,7: XDRAW 48: XDRAW 48:
XDRAW 53 AT 209,7: XDRAW 48: XDRAW 48: XDRAW 54 AT 249,7: XDRAW 48: XDRAW 48
2400 RETURN
2410 PRINT : PRINT : VTAB 21: PRINT "The right border is to the left of": PRINT
"the left border - try again !"
2420 GOSUB 1910: GOSUB 1910: GOSUB 1910: PRINT : PRINT : GOTO 1000
2440 VTAB 24: PRINT "No data so far - move border to the left"
2450 PRINT CHR$ (7)
2460 GOSUB 1910: GOSUB 1910: GOSUB 1910
2470 PRINT : PRINT : PRINT : GOTO 1050
2500 REM   no scatter found
2510 TEXT : HOME : PRINT
2520 PRINT "No scatter found in spectrum"
2530 PRINT : PRINT A$
2535 PRINT : PRINT
2540 PRINT "lambda max = ";W(1);" nm"
2550 PRINT "           OD = ";H(1);
2560 GOTO 1520

```

Abb. A 1: VP2

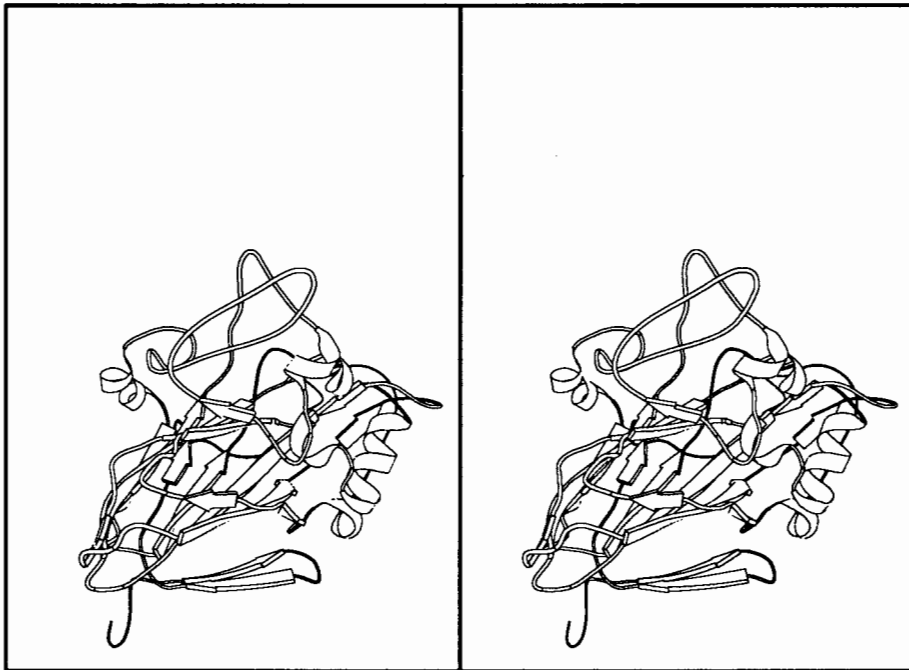
[Klick für Farbbild](#)

Abb. A 2: Seitenansicht der antigenen Region 1

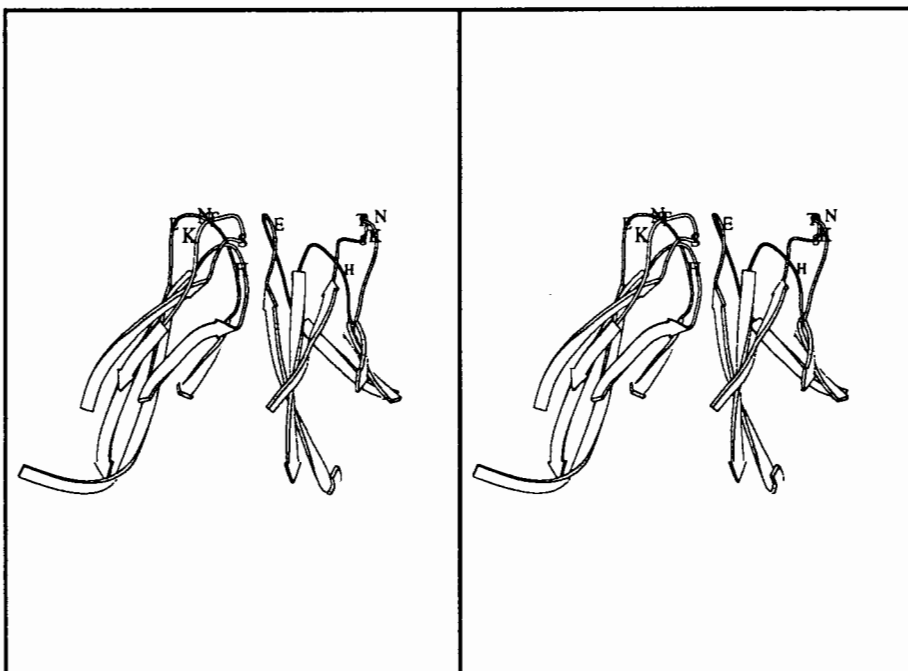
[Klick für Farbbild](#)



Abb. A 3: Aufsicht der antigenen Region 2

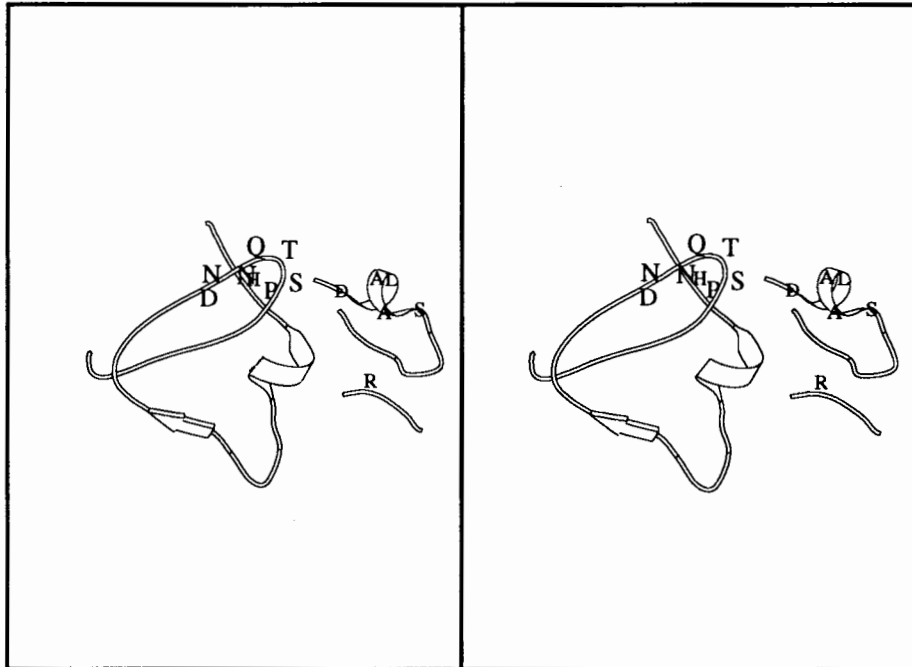


Abb. A 4: Ansicht der antigenen Region 3

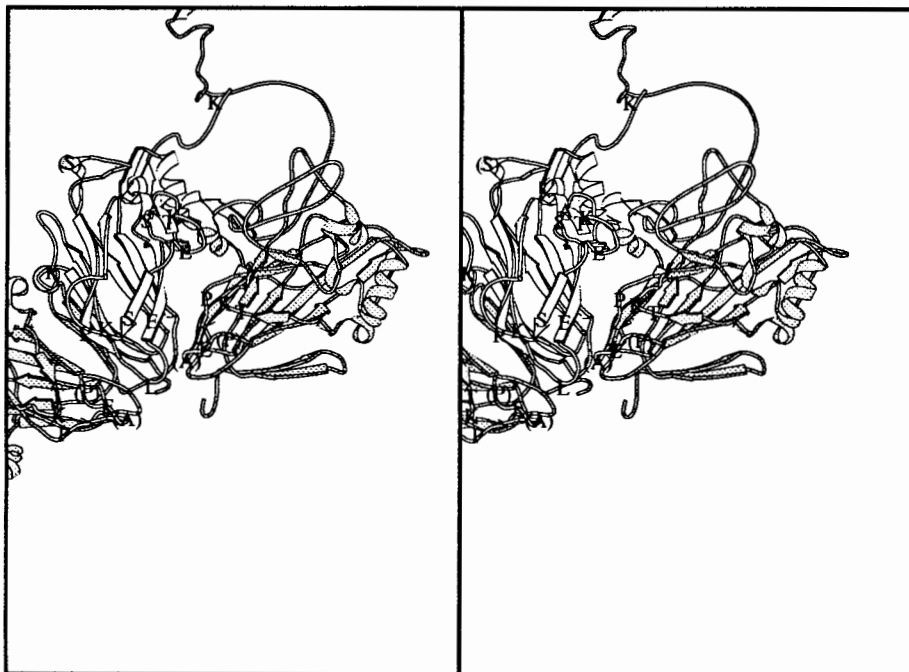
[Klick für Farbbild](#)

Abb. A 5: Die Lage der Aminosäuren A2240 und P2245



## **Danksagung**

Allen, die mir diese Arbeit möglich gemacht haben, sei herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. W. Abel danke ich dafür, daß ich mit seiner Hilfe ein Promotionsstudium in Hamburg beginnen durfte.

Besonders Herrn Prof. Dr. R. Dernick danke ich für die Vergabe des Themas meiner Arbeit, der Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material in der Abteilung "Biochemie der Viren" am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg.

Mein bester Dank gilt Herrn Heukeshoven für seine umfassende Hilfe bei der Aufarbeitung von Virusproteinen und Viruspeptiden, sowie seiner Ausdauer beim Ausfeilen von Methoden. Herrn Wiegers danke ich für das Überlassen von Mausaszites, Frau Hilbrig für das Heraussuchen von Virusproben und Seren, die dankenswertereweise von der Abteilung hergestellt waren, Frau Uhlig besonders für den Antikörper 7J6, Frau Heigl für das Abwiegen von DAB, Frau Gardemin für die Bestellung von Literatur.

Ein großer Dank gebührt der mikrobiologischen Abteilung des Botanischen Institutes in Hamburg für die Benutzung ihrer Computer; besonders meinem Mann, der mich in verschiedenste Programme einarbeitete, mir bei der Literaturverwaltung und bei der Erarbeitung eines eigenen Programms half. Dank sei auch dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg für die Benutzung der VAX.

Bester Dank gebührt L. Menedez-Arias und R. Rodriguez, sowie O. Gotoh und der Mikrobiologie, die mir ihre Programme kostenlos zur Verfügung stellten.

Meiner Tochter Julia danke ich für die Erlärung der Matrixrechnung, die zum Erstellen der Strukturbilder nötig war.

Ich danke Frau Kuck, Frau Hilbrig, Julia und Mario, die mich immer wieder aufgemuntert haben, und Tom, der mir immer wieder die Unwichtigkeit meiner Arbeit vor Augen führte.

## Lebenslauf

Christiane Bergmann geb. Lengelsen

Geburt: 17.12.49 in Altena/Westf.  
Vater: Friedrich Wilhelm Lengelsen (Geschäftsführer)  
Mutter: Rita Lengelsen geb. Beichel (Apothekerin)  
Geschwister: 2 jüngere Brüder

geheiratet: 1975 Dr. rer. nat. Rolf Bergmann (Chemiker, Mikrobiologe)  
Kinder: Julia Fee Bergmann geb. 1975  
Mario Lars Bergmann geb. 1979  
Tom Alexander Bergmann geb. 1982

1969: Abitur in Altena (neusprachliches Mädchengym.)  
ab 1969: Studium der Biologie in Bochum  
ab 1972: Betreuung verschiedener mikrobiologischer Praktika  
1974: Biologiediplom (Schwerpunkt: Mikrobiologie, Biochemie)  
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen von ribosomaler RNS während Wuchs und Sporulation von *Bacillus subtilis* (Spores VI)

1977: Umzug nach Hamburg  
ab 1977 ehrenamtliche Beratungen: Stillen, Ernährung, Umweltschutz  
Veröffentlichungen zu: Vitamin D, Schadstoffe in Muttermilch  
1977: FEBS Advanced Course No. 48 in Moskau und Pushchino  
1978: 12th FEBS Meeting Dresden  
ab 1985: Promotionsstudium an der Universität Hamburg

CA Berg

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß zur Durchführung und Abfassung der vorliegenden Dissertation keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Arbeit wurde an keiner anderen Universität eingereicht.

Hamburg, den 1. 4. 94

Q Berg —