

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.

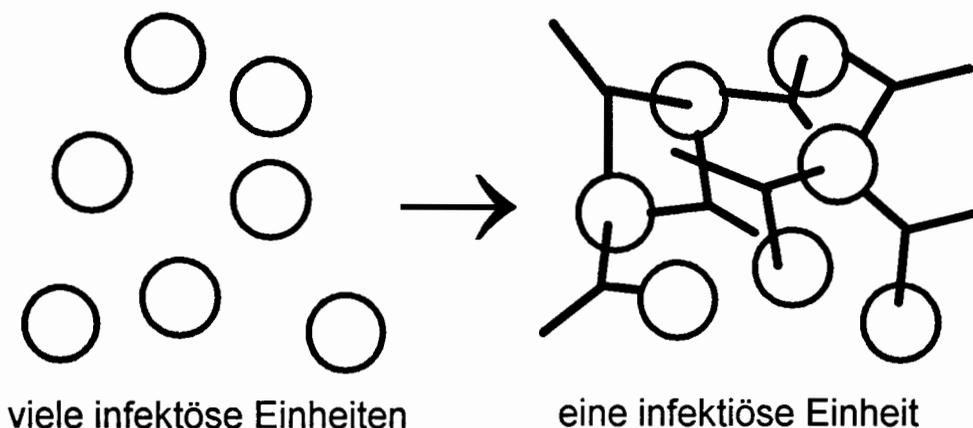
Neutralisation muß irgendetwas mit Antikörperbindung zu tun haben. Vier Möglichkeiten einer PV-Neutralisation werden diskutiert:

1) Zerstörung der Virionen durch Antikörper.

Fab-Arme können in einem Abstand von 5-18nm Antigen binden. Der Abstand der PV-Epitope über die Zweiersymmetriachse 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.

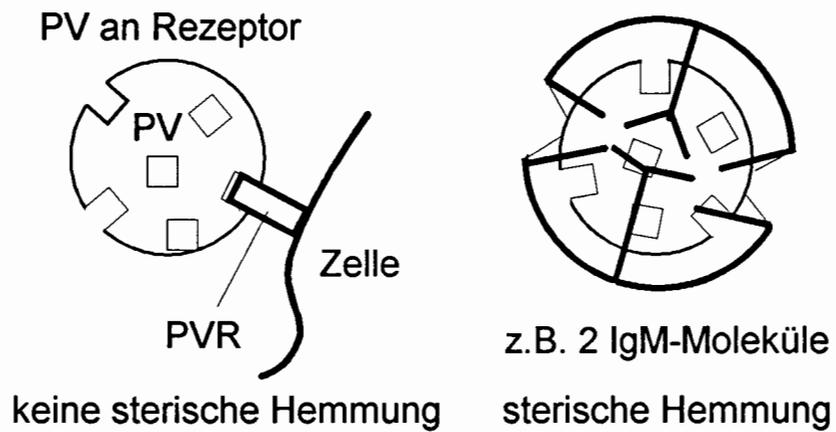
Nach Vrijsen et al. (1993) können Ak Viren nur bei niedriger Ionenstärke aufbrechen.

2) Aggregation.



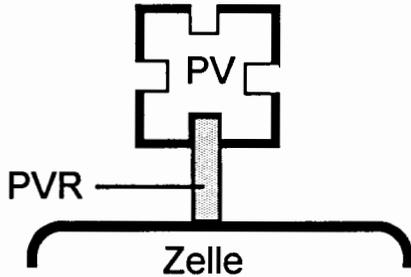
3) Sterische Hinderung der Infektion durch Antikörper. (z.B. 2 IgM)

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

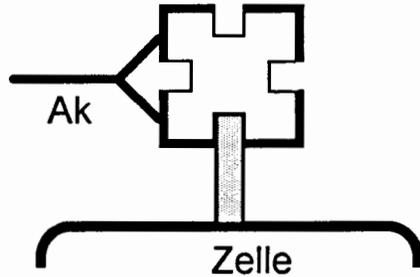


4) Ein unbekannter Mechanismus. (z.B. Eine andere Aufnahme des Virus mit Antikörper)

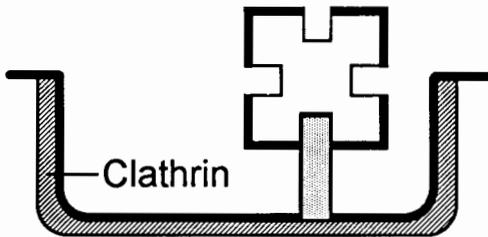
PV-Adsorption



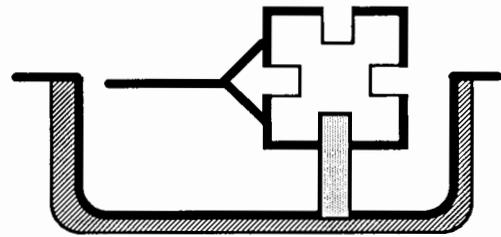
PV-Ak-Adsorption



PV-Penetration

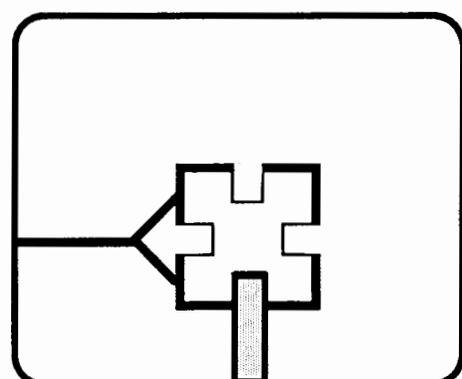
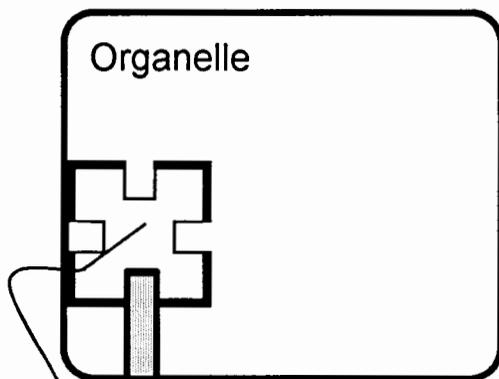


PV-Ak-Penetration



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 Vrijnsen 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.** 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.

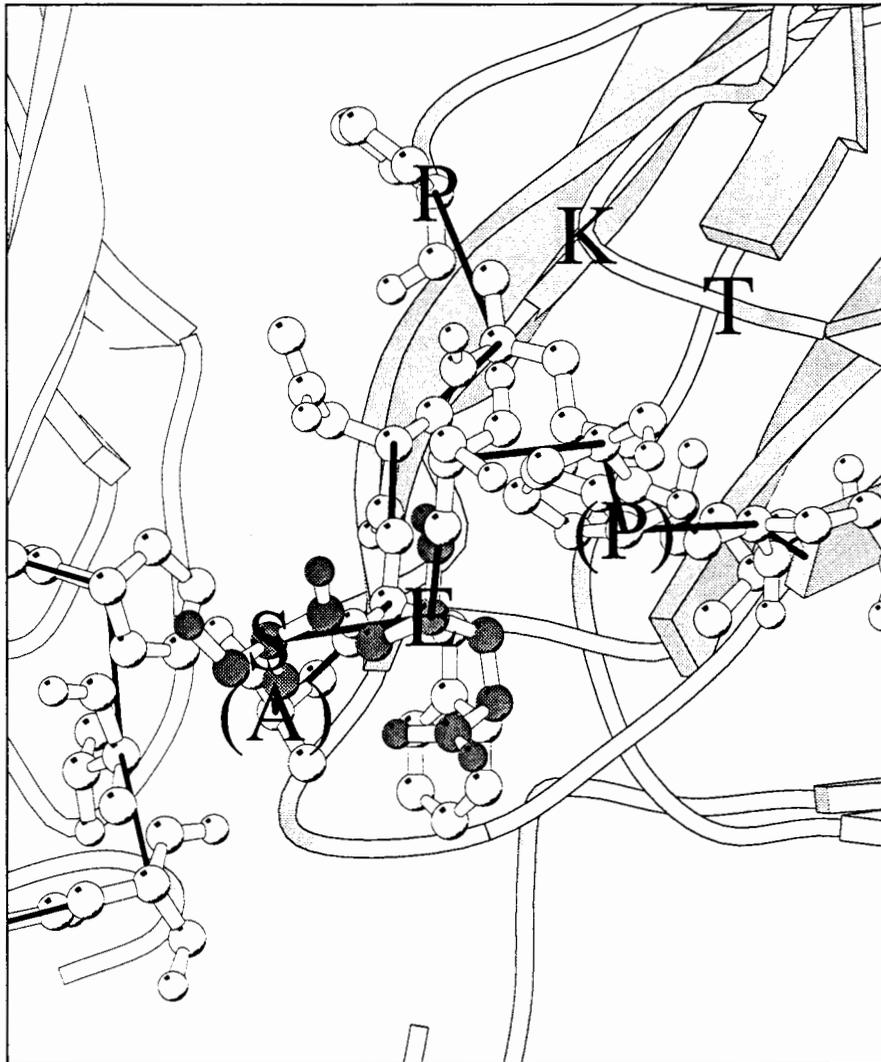
Abb.5.2 zeigt einen Teil des möglichen Epitopes von 7J6. Sehr hoch auf der Oberfläche liegt E2242, das als antigen bekannt ist. PV1-Mutanten, in denen E2242 zu D verändert ist, können von 7J6 nicht mehr neutralisiert werden; das gleiche gilt für die entsprechende AS E2241 von Typ 2.

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.

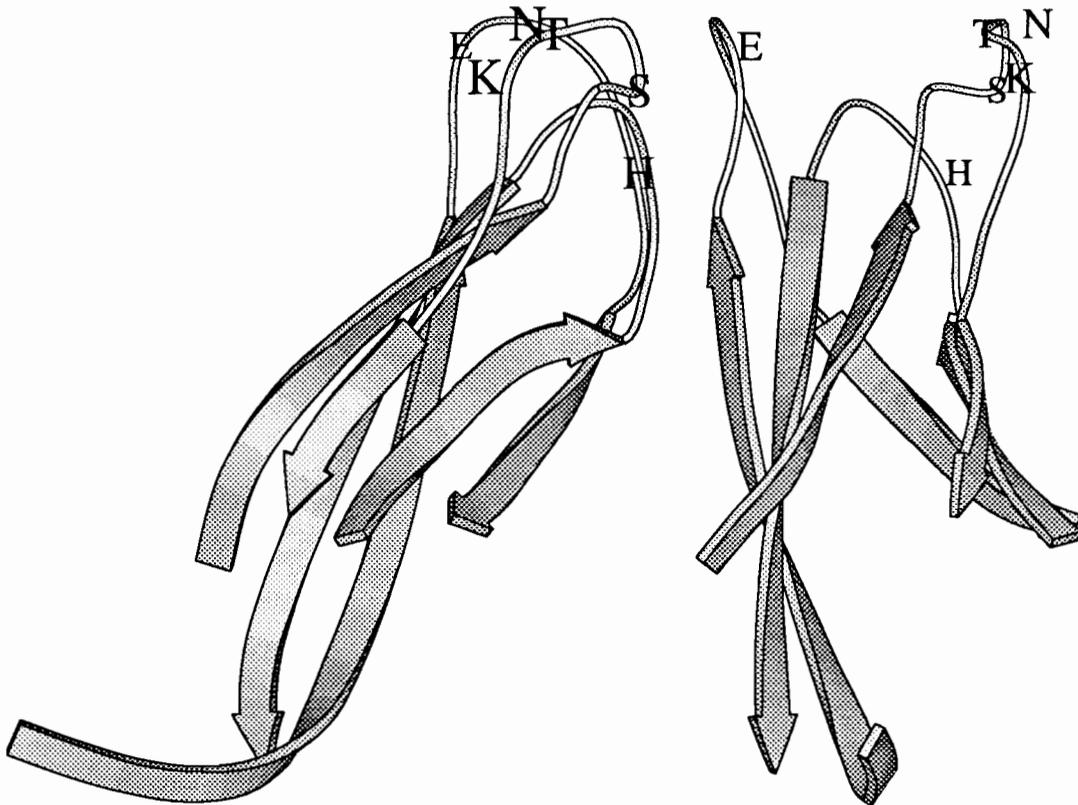
Untersuchungen der T-Zell-Antwort nach Polioimpfungen zeigten eine verstärkte Immunreaktion auch gegen Tetanustoxin und Reovirus. Deshalb stellt sich die Frage, ob durch Impfungen mit Viren eventuell auch Autoimmunreaktionen hervorgerufen werden können. (Hafler et al. 1987)

5.4. Die Lage der antigenen Aminosäuren auf dem Virion

5.4.1. Die antigene Region 1

Auf den Strukturabbildungen, die antigene AS zeigen, ist auch der "Canyon" gut zu erkennen (Abb.4.21 und 4.22). Er trennt die antigene 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 antigene 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)

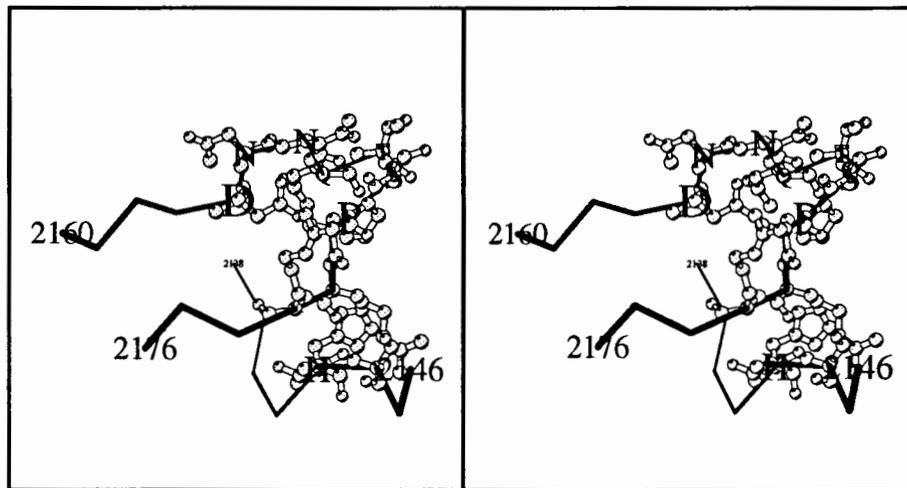
Verschiedene Enteroviren zeigen immunologische Kreuzreaktionen vor allem unter defekten, erhitzten oder aufgebrochenen Virionen. Die Kreuzreaktion ist besonders stark beim N-Terminus von VP1. Gegen diese Region können auch neutralisierende Antikörper gebildet werden. (Cello et al.1993) Der N-Terminus 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

Oberflächenschleife ist. Mutationen in dieser AS verändern die Struktur des tiefer liegenden Teils der EF-Schleife und behindern dadurch die Struktur der Oberflächenschleife. 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)

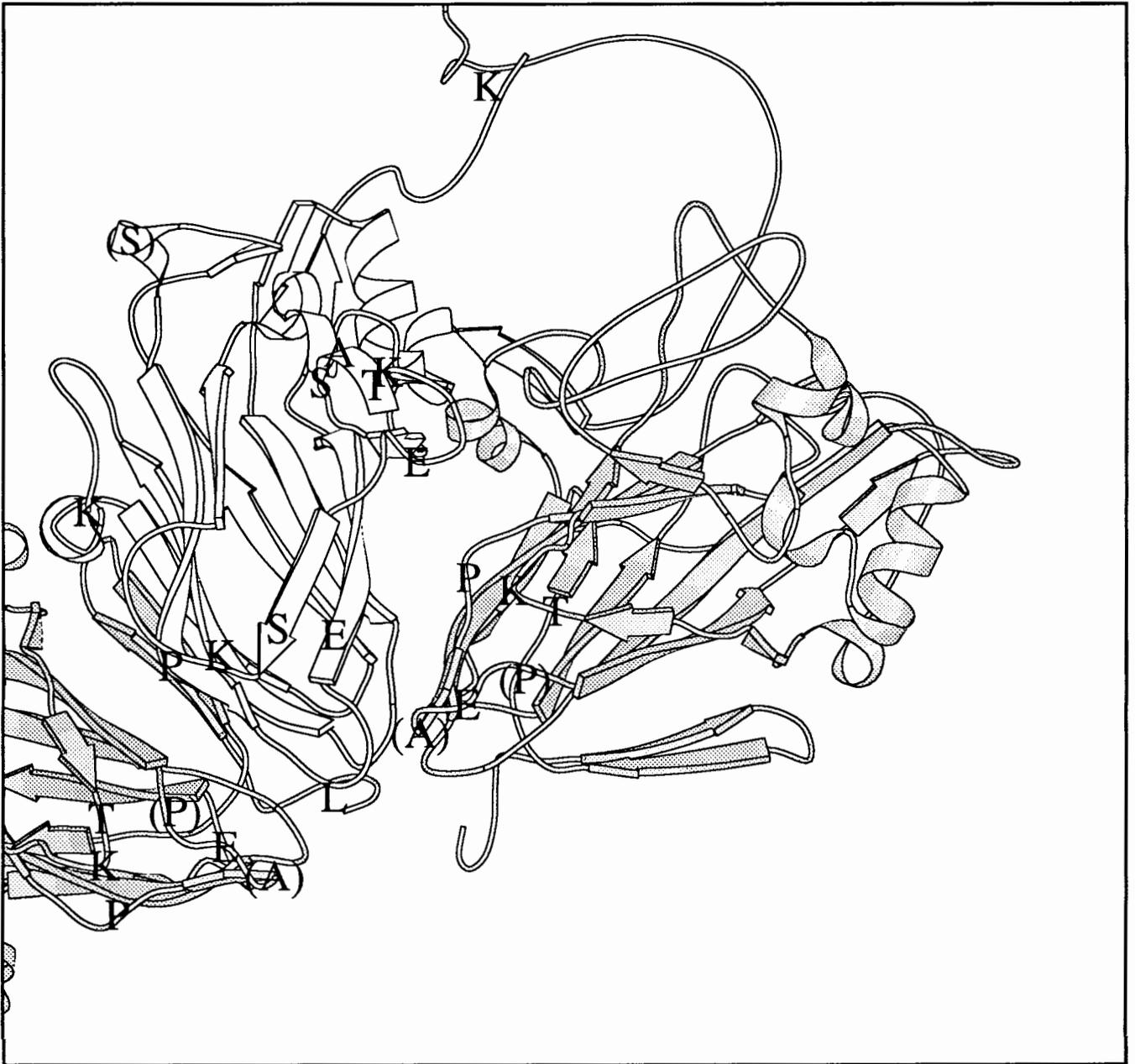
5.4.3. Die antigene Region 3

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 Oberflächenschleife 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-Schleife von VP2 gezählt, sowie die nicht an der Oberfläche liegenden P2245 und A2240 der HI-Schleife von VP2. Auch die in der BC-Schleife 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-Schleife von VP2, L3202 der HI-Schleife von VP3 und E3207 in β -Strang I.

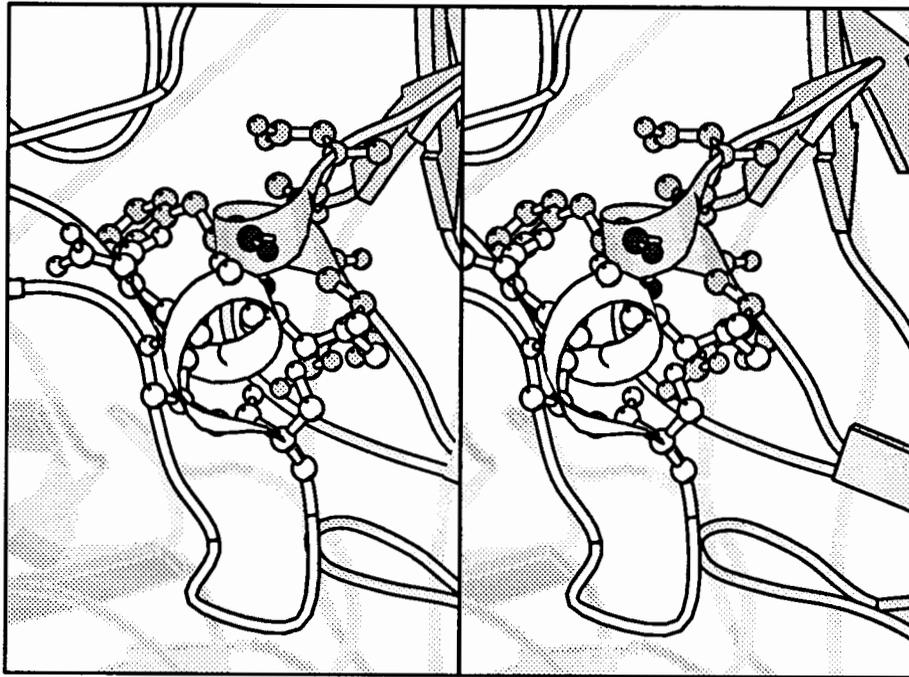
Abb.5.5 Die antigene Region "3"



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

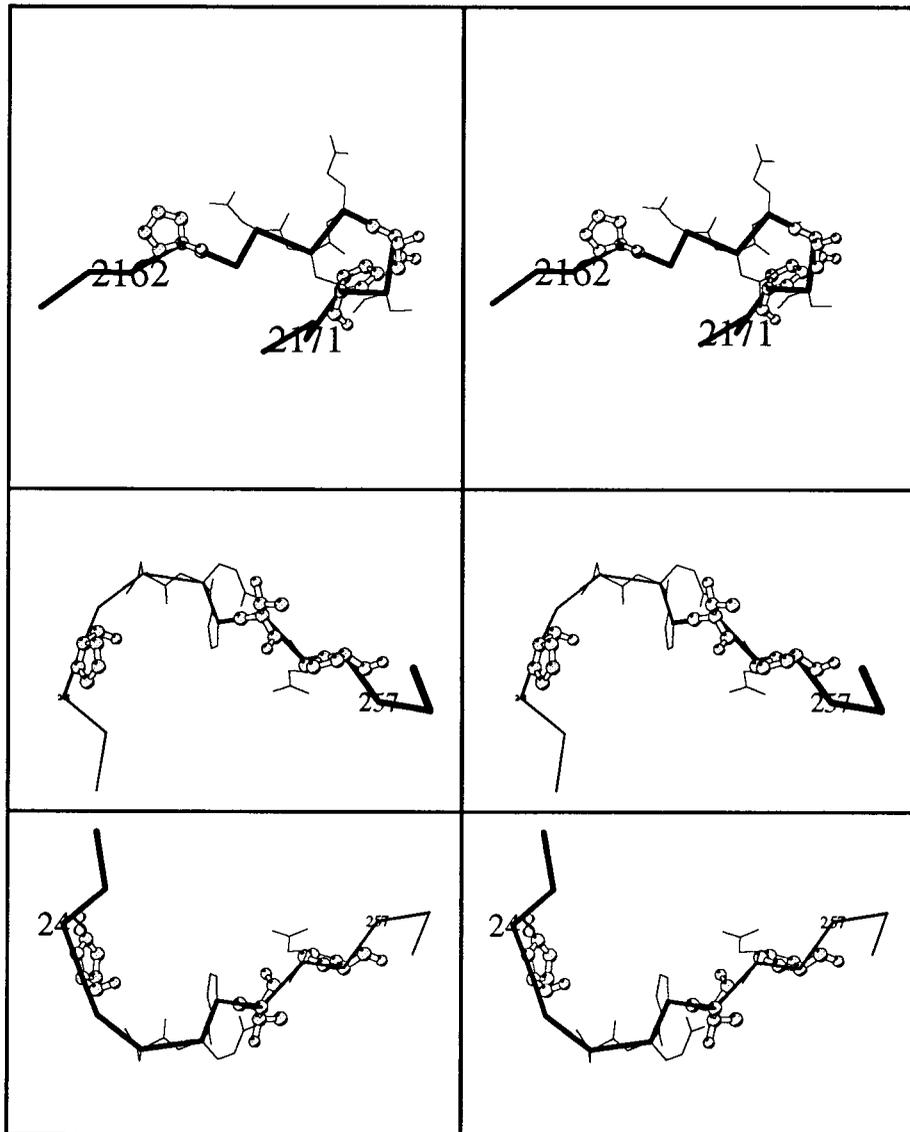
Proline hat einen besonderen Einfluß auf die Proteinstruktur (MacArthur et al. 1991). Proline zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Aminogruppe, die an der Peptidbindung beteiligt ist, in einem Fünfering liegt. Dadurch ist die Verbindung zwischen dem Stickstoffatom und dem C_α-Atom des P steif. Proline brechen die Struktur von α -Helices und β -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° . (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	PDTRPAP
Peptid 4	PVDQ PTEP
Peptid 12	PDNN QTSP

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 klefftyrfr 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 pyvnslsids mvkhnnwgia ilplaPLNFa SESSpEipit
ltiapmceef 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 verlorengelht. 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)