

## Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABKÜRZUNGEN	III
<b>1. LITERATURÜBERBLICK</b>	<b>1</b>
1.0. Neue Viruserkrankungen	1
1.1. <b>Poliovirus</b>	<b>1</b>
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>	<b>50</b>
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>	<b>64</b>
1.4. <b>Die Antigenität der Polioviren</b>	<b>68</b>

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 Ca <sup>2+</sup>	101
4.1.1.5.	Hemmung der pH-Aggregation durch Mg <sup>2+</sup>	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