

## 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 Poliostämmen. 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, Kopfschmerz 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 "Dreitagefieber" durch Cardioviren (Rueckert 1976) und die Neugeborenensepsis 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 Formalininaktivierung 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 verseucht 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  $5-10 \times 10^6$  Diarrhoetote. 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 siebzehn 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 Sabin Stamm. 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 pro Woche 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 eIPV 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 unemerkt. 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<sup>+</sup>-Ionen, 900 Na<sup>+</sup>-Ionen, 110 Mg<sup>++</sup>-Ionen und ungefähr 50 Polyamine (kein Ca<sup>++</sup>). 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  GLGQMLESMIDNTVRETVGAATSRDALPNTTEASGPTHSEKIPALTAIVETGATNPLVPSDTVQTRHVQHRSESSIESFFARGACVTIMTVDNPASTTN
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**L-SLPKQQ-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
      .      .      .      .      .      .      .      .      .      .
ISNAYSHFYDGFQSKVPLK*DQSAALGDSLGAASLNDFFGILAVRVVNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPRAVAYYGPGVDYKDGTLTLPSTKDLTTY
-----*-----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  SPNIEACGYSRDLVQLTLGNSTITTEAANSVVAYGRWPEYLRDSEANPVDQPTPEPVAACRFYTLDTVSWTKESRGWVWKLDPALRDMGLFGQNMYYHY
1SVP2  -----

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

      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-----

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

```

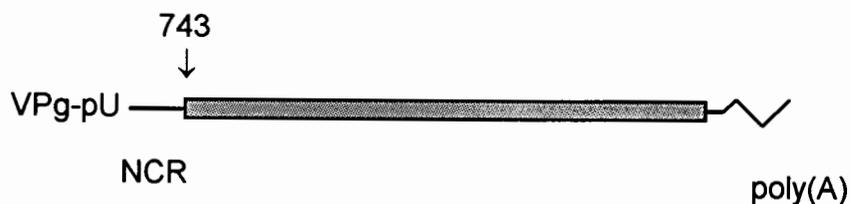
### Aminosäuresequenzen des VP3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1MVP3	GLPVMNTPGSNQYL	TADNFQSPCALPE	FDVTPPIDIPGEV	KNMMELAEIDTM	IPFDLSATKKNT	MEMYRVRLSDK	PHTDDPILCLSL	SPASDPRLSHT	ML	
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	STINYTTINYYR	SASNAASKQDF	SQDPSKFTEP	IKDVLIKTAPMLN
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 Säugierzellen 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-Schleufe vom VP2 des PV2 (Lansing) in die EF-Schleufe vom VP2 des PV1 (Mahoney) führte zur Neutralisation des chimären PV1 mit PV2-spezifischen Seren, Einbau derselben Sequenz in die BC-Schleufe 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-Schleufe 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-Schleufe 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-Schleufe ist die Hauptneutralisationsdomäne, PND, von HIV-1 (gp120 von gp160), einer disulfidgebundenen Schleufe 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

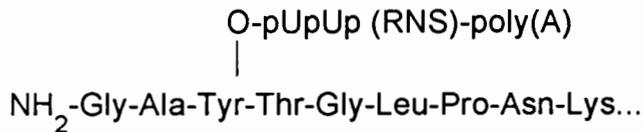
des VP2 bis AS157 des VP1 von PV1 und Einbau von HIV-1 Proteinen in diesem Bereich kam es zur Expression von Fusionsproteinen in HeLa- Zellen (Choi et al. 1991). - Der Einbau von 18AS des gp41 von HIV-1 statt der AS1091-1102 in Sab1 führte in Kaninchen zu Antiseren, die eine große Menge von amerikanischen 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

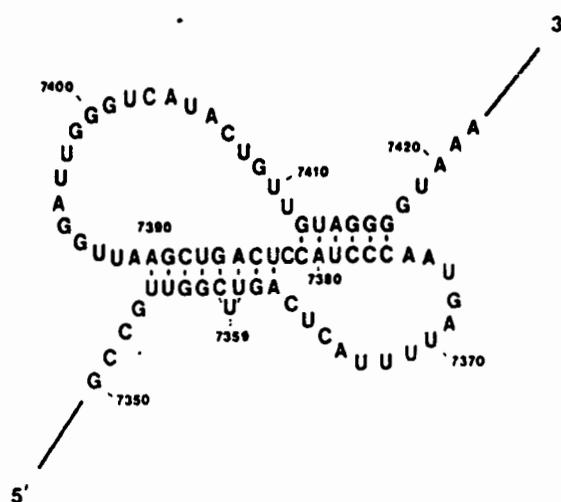
Die RNS des Poliovirus (PV) ist länger als die durchschnittliche Zell-RNS (Sonenberg & Meerovitch 1990). Die einsträngige RNS hat +-Strangcharakter; sie ist gleichzeitig Boten-RNS. Nach der Eigen-Shuster-Hypothese gehört +-RNS zu den Verwandten der ersten selbst replizierenden Moleküle (Gorbalenya et 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).

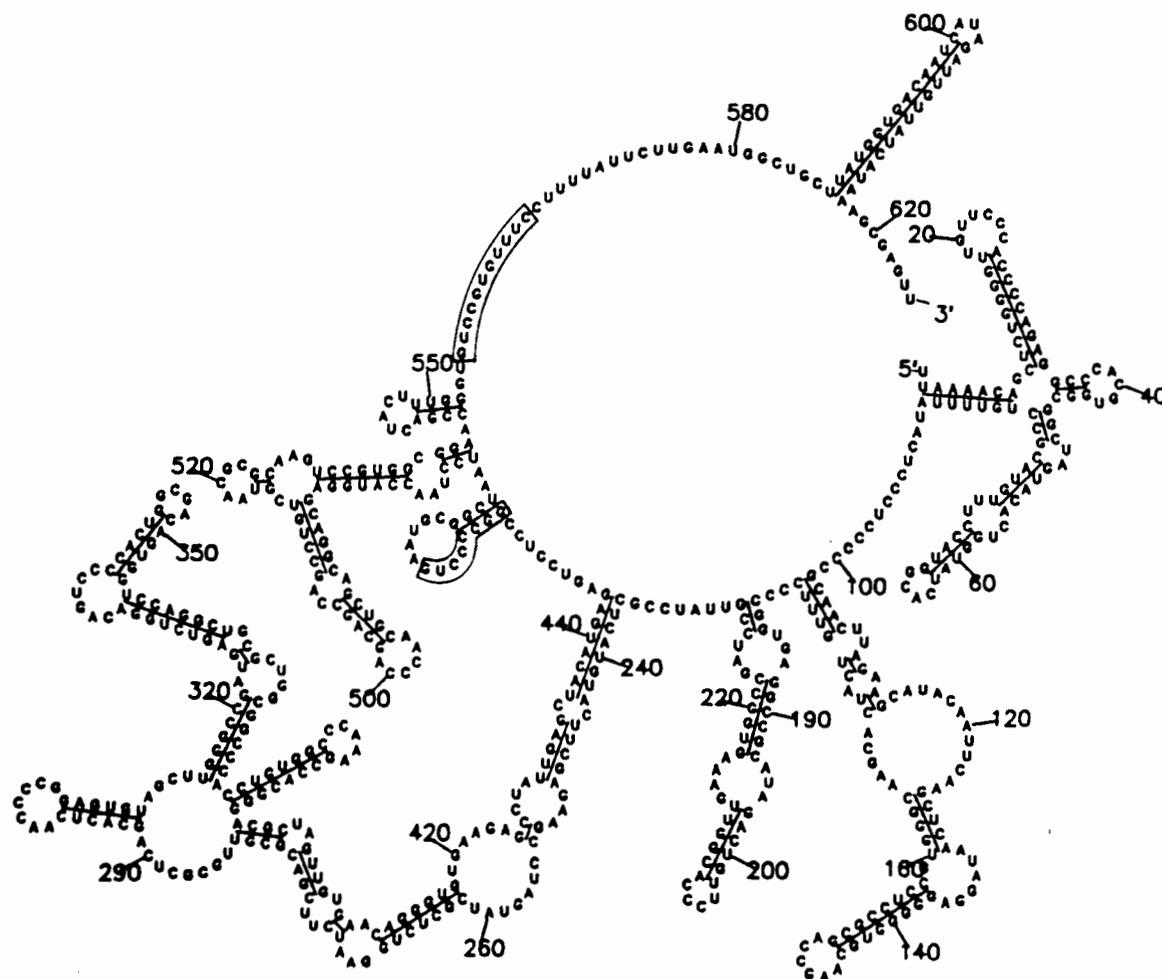


Die 5'NCR ist eine sehr kompliziert gebaute Struktur, die der Regulation der viralen Funktionen dient. Sie besitzt 742 (PV1) bis 747 Nukleotide, im Gegensatz zur NCR von Wirbeltier-RNS, die nur 20-100 Nukleotide hat. Die Anzahl der AUG-Kodons schwankt zwischen fünf und 15 (Pöyry et al. 1992, Sonenberg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

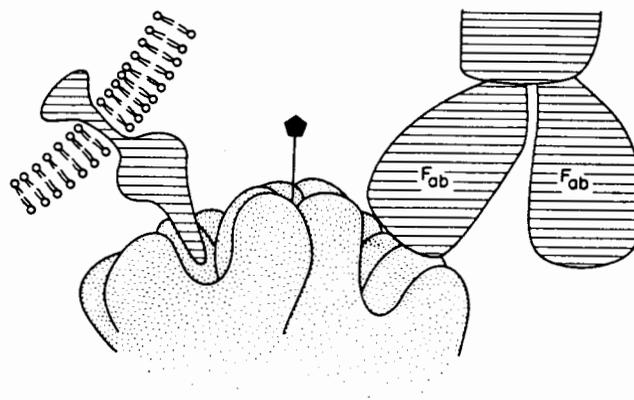
Polioviren können humane Darmzellen (Cacozyellen) und Affennierenzellen (Verozellen) sowohl über die apikale als auch über die basale Plasmamembran infizieren. (Tucker et al. 1993)

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)

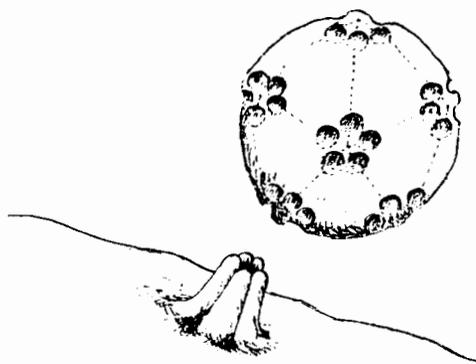
#### **a) Der humane Rezeptor:**

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 (Wieggers 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)

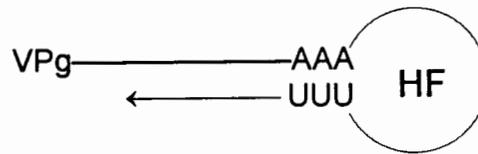
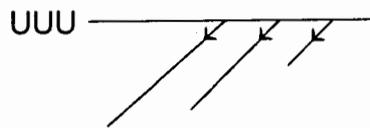
### 1.1.14.2. Transkription, Translation und Proteinspaltung

Die Initiationsfaktoren (eIF-4E und eIF-4F) helfen die gefaltete mRNA 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 mRNA 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 unbekannter 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 rauen 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 & Flanegan 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 & Flanegan 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-



#### 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 unbekannte 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).

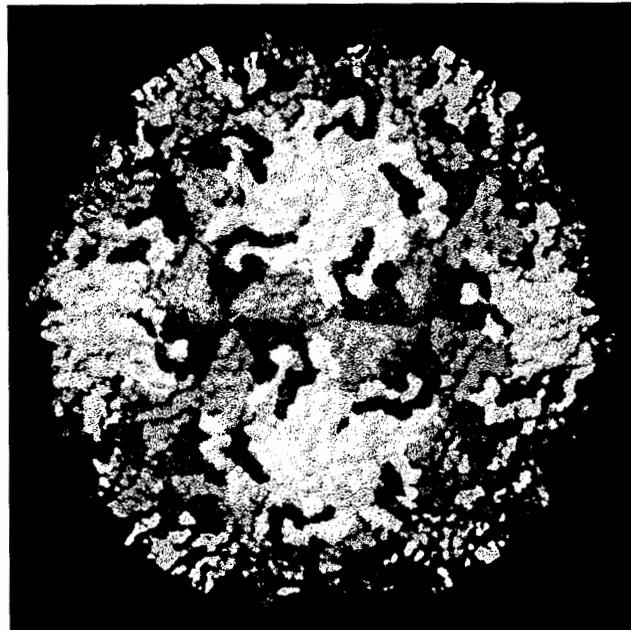
### 1.1.15. Die Proteinstruktur des Antigens Poliovirus

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)

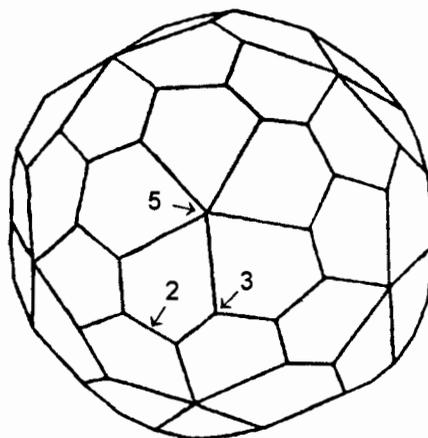
Kapsidstrukturen dieser Art haben sich aus einfachsten Vorstufen entwickelt unter Reduzierung auf das Wichtigste. Gleiche Proteine, auch wie Waben in einer Fläche angeordnet, stoßen an sechs Nachbarproteine und brauchen sechs verschiedene Bindungen, um eindeutig plaziert zu sein. Solche Anordnungen sind 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  $T=1, 3, 4, 7, \dots$  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  $T=3$ .

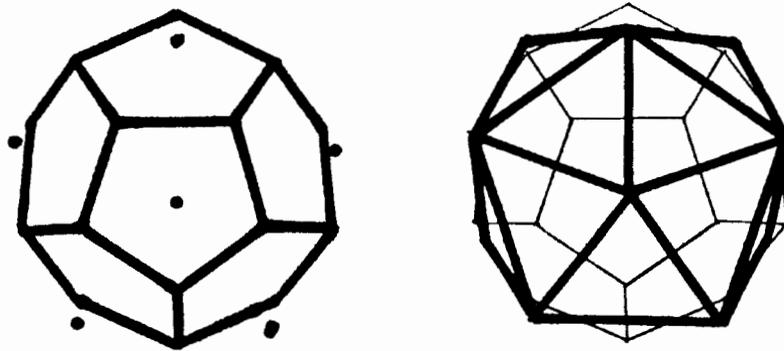
Diese symmetrischen Strukturen sind typisch für viele kleine Viren wie Picornaviren und die Struktur der innersten Kernhüllen von umhüllten Viren. Auch die Sequenzen sehr verschiedener Viren weisen Homologien auf, z.B. p24 von SIV mit VP2 von MKS (Argos 1989). p24 von HIV hat eine ähnliche Struktur wie 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.



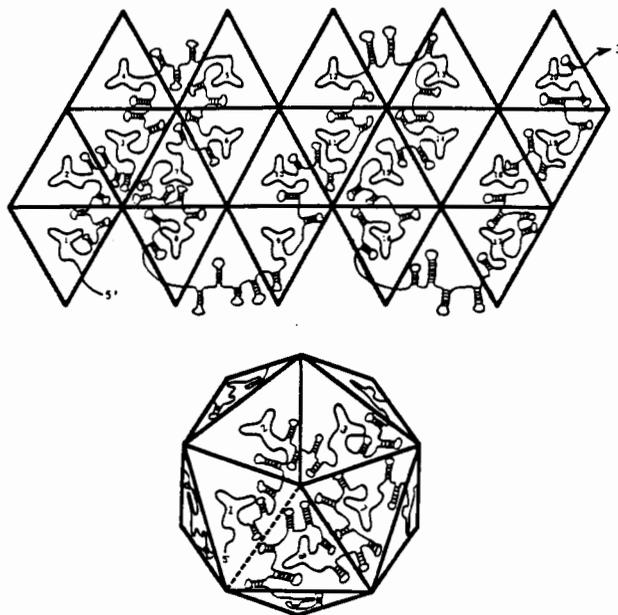
Die Abbildung nach Hogle et al (1985) zeigt VP1 in weiß, VP2 in grau und VP3 in schwarz. Schon in dieser Darstellung sind deutlich die Symmetrien der Viruspartikel zu erkennen.



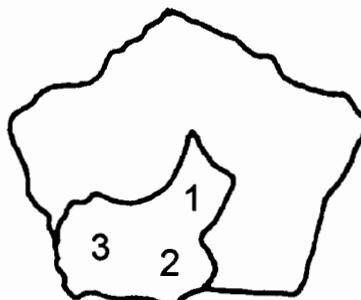
Fünf PV-Protomere sind um die fünfzählige Achse zu einem Fünfeck angeordnet, dessen Mitte stark erhaben ist und dadurch die Spitze eines Ikosaeders darstellt. Wie die folgende Abbildung zeigt, sind Polioviren eher pentagonale Dodekaeder als Ikosaeder. Beide Polyeder besitzen jedoch dieselben Symmetrien.



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.

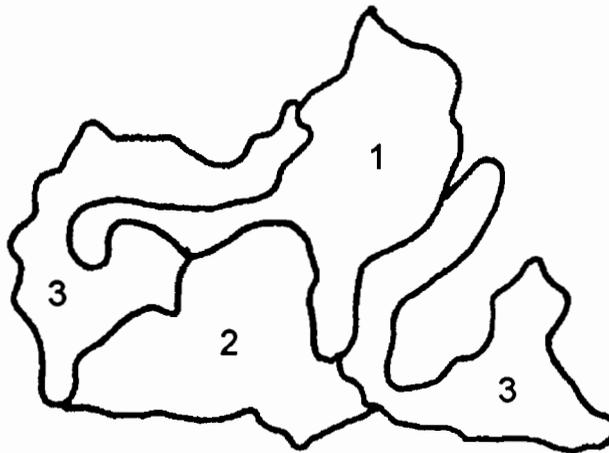


Durch Dissoziation zerfallen Polioviren in 14S-Partikel; diese entsprechen einer Fläche des Dodekaeders.

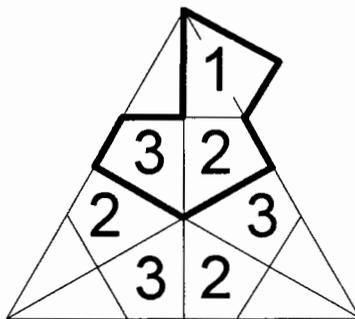


14S-Partikel sind fünfeckige Pentamere, die deshalb so heißen, weil sie aus fünf Untereinheiten, den Protomeren, zusammengesetzt sind. Pentamere (VP0+VP1+VP3)<sub>5</sub> können aus infizierten Zellen isoliert werden; ob freie Protomere vorkommen, ist noch umstritten (Boeyé & Rombaut 1992). Unter Bedingungen, die eventuell nicht denen in der intakten Zelle entsprechen, lagern sich auch in nanomolaren Konzentrationen 14S zu leeren Kapsiden zusammen (Boeyé & Rombaut 1992).

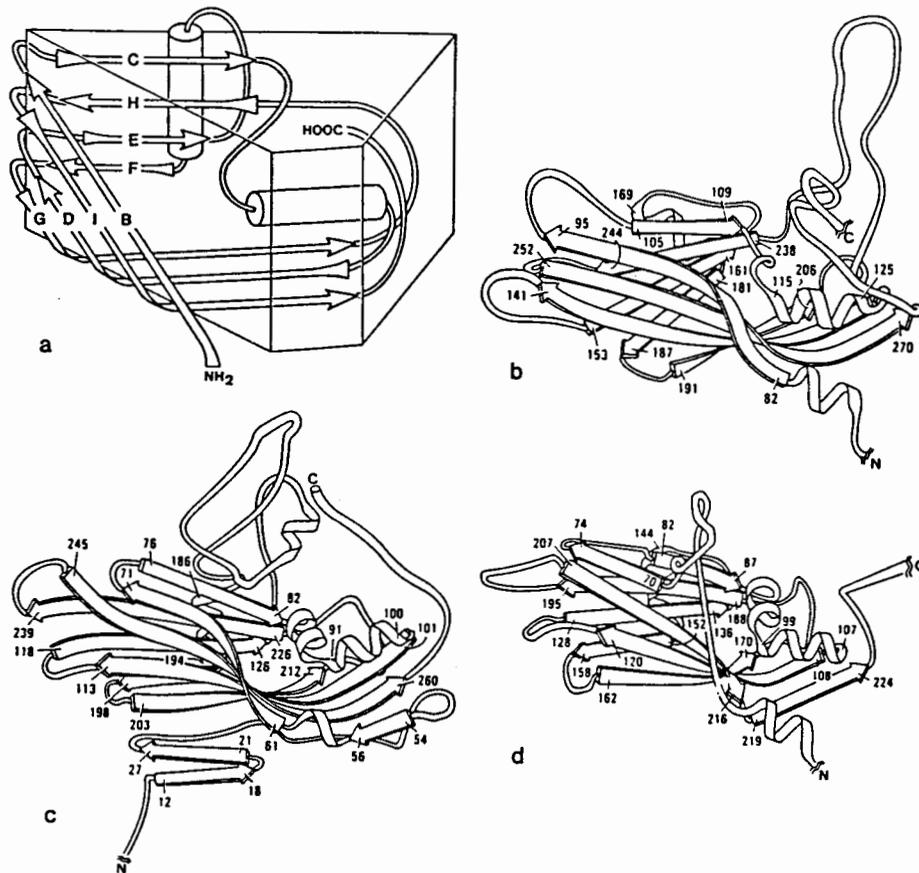
Die Abbildung zeigt ein Protomer mit einem zusätzlichen VP3 rechts. Unten links ist die Spitze zu erkennen an der je drei VP2 und VP3 zusammen die dreizählige Achse bilden. Die fünfzählige Achse ist der oberste Zipfel von VP1. Die zweizählige Achse liegt in dem geraden Stück von VP2. (An dieser Stelle 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.

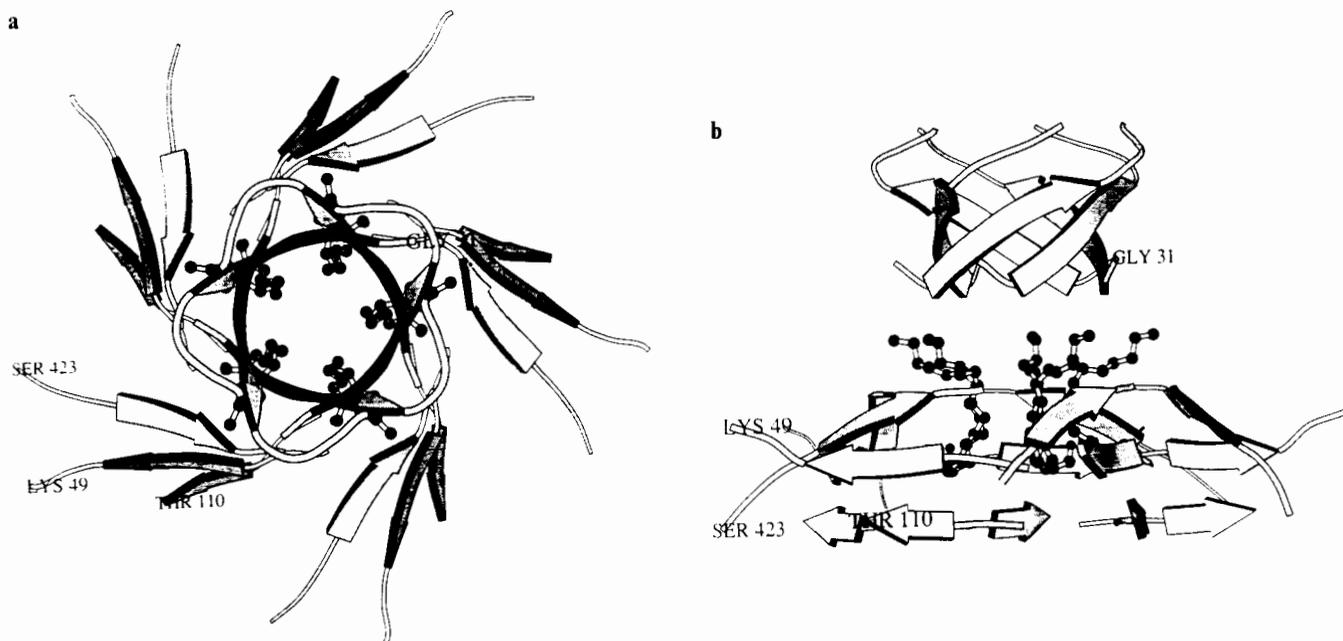
Alle drei großen VPs sind relativ hydrophob (Heukeshoven & Dernick 1982) und haben eine gemeinsame keilförmige Grundstruktur (a), die sie auch mit der anderer Viren teilen. Diese sog. Faßstruktur ist typisch für alle Strukturproteine aus ikosahedralen Viren; gemeinsam ist ihnen

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 erhabene 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).

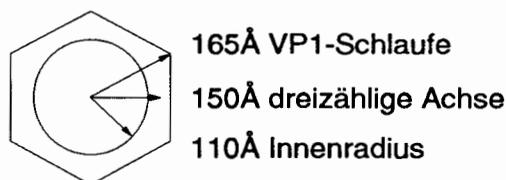
Vom N-Terminus des VP4 (bzw. P1 oder VP0) wird während der Translation die erste AS, das Methionin, abgespalten; danach wird durch Amidbindung eine Fettsäure (Myristinsäure,  $C_{14}$ ) (Myristin = Muskat) gebunden. Die Myristinsäure vermittelt zwischen den N-Termini von VP3 und VP4 und deckt die hydrophobe 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 Vrijnsen 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 (Wiegers & 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)

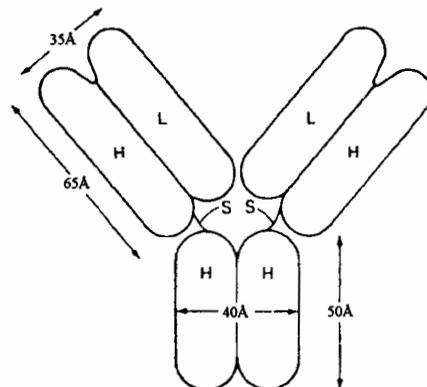
Neutralisation und passiver Schutz betreffen nicht notwendigerweise dieselben Epitope; Kreuzschutz wurde auch in Abwesenheit von kreuzneutralisierenden Ak gefunden. Nichtneutralisierende Ak können z.T. stärker binden als neutralisierende. Nichtneutralisierende Ak spielen nicht nur bei der Krankheit eine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

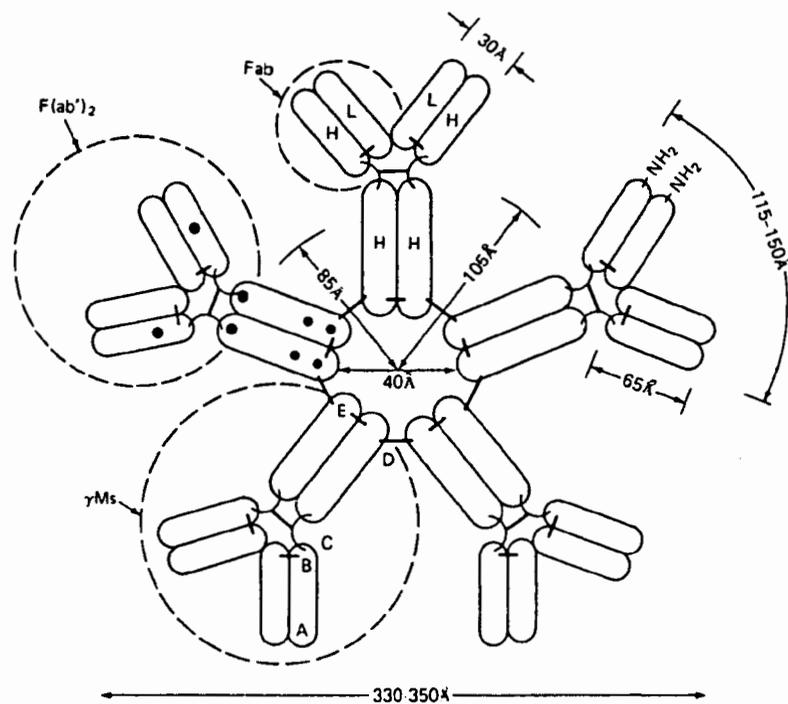
es "nichtfunktionale" Ak, die neutralisierende und schützende Ak an der Bindung hindern. Ebenso gibt es Ak, die mit anderen Haptinen reagieren, als dem, gegen das sie gemacht wurden. Einige mAk reagieren paradoxerweise nur mit heterologen Viren. Andere Ak erhöhen die Aufnahme von Viren in der Zielzelle. 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).

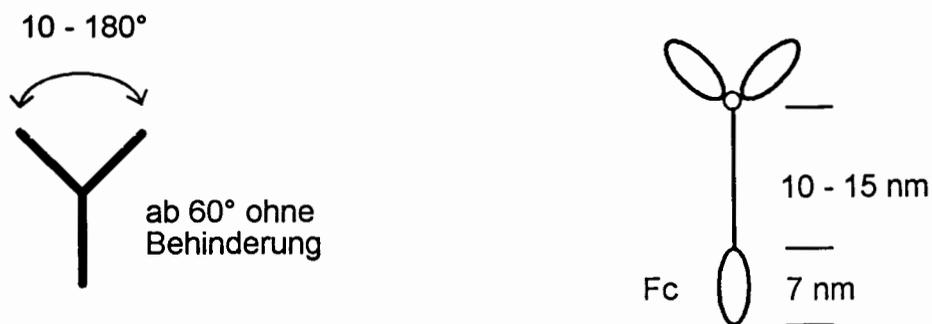
### 1.2.1. Die Struktur von Antikörpern

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





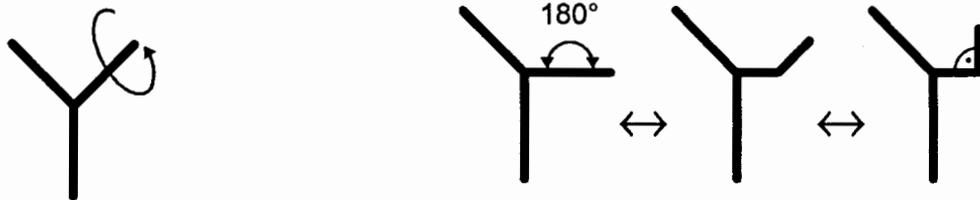
Durch bivalente kurze Haptene konnte im EM die Beweglichkeit von Antikörpern gezeigt werden. So bilden z.B. drei Ak mit drei Haptenen ein Dreieck mit Winkeln von  $60^\circ$ . Dimere (2 Ak + 2 Haptene) zeigten, daß die Kaninchen-IgG beweglich genug sind, daß beide Fab-Arme parallel ( $0^\circ$ ) gelegt 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*

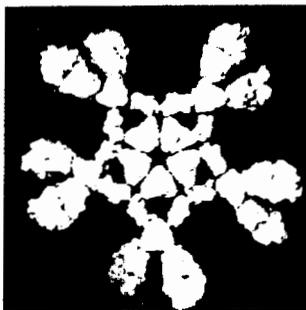
Die Gelenkregion zwischen Fab-Armen und Fc-Teil ist bei humanem IgG<sub>3</sub> 50 AS lang (Bild rechts), bei humanem IgD 60 AS, bei IgE und IgM sind extra Domänen eingefügt. Die Fab-Ar-

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.

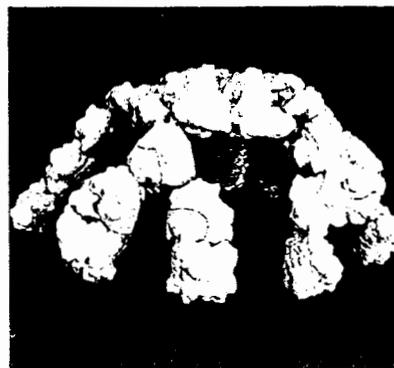


*Beweglichkeit des Ak-Ellenbogenwinkels*

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)



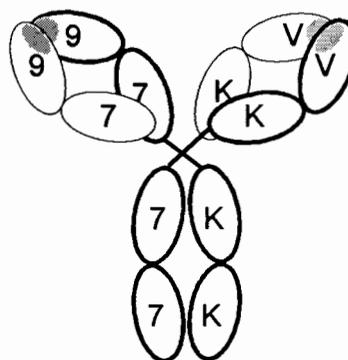
IgM ("staple")

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 Konkurrenz 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:

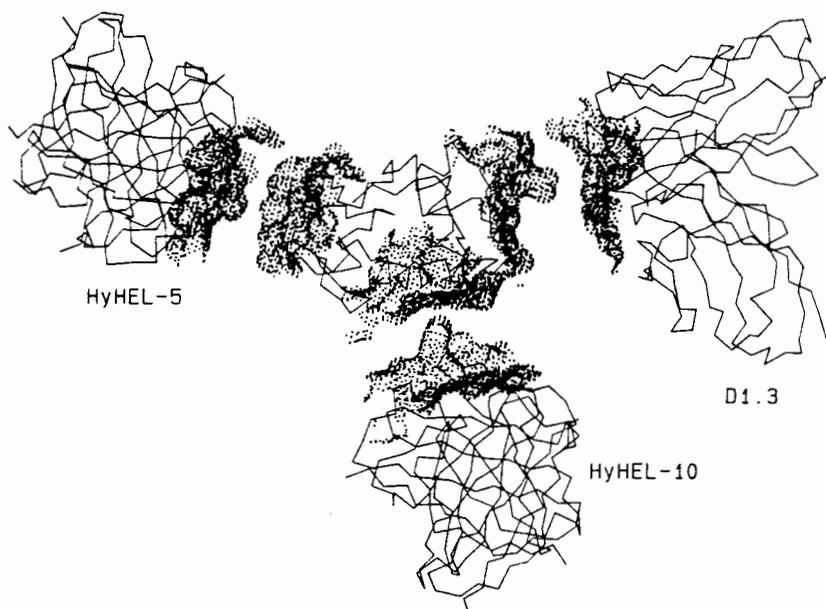
1. Ladungsneutralisation
2. van der Waals-Kontakte
3. Salzbrücken
4. Wasserstoffbrücken
5. hydrophobe Gruppen (besonders Tyrosin)

Die C<sub>α</sub>-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-Speicherring 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 dextranbeschichteten "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 Mückenzenellen; 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 Vrijnsen 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 <sup>125</sup>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 weitergeschoben 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 Kreureaktionen:

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. Anschließend 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.