



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Fach Mikrobiologie

**Struktur- und Funktionsanalyse
von Pertussis Toxin unter Einsatz
C-terminal an Cellulose
fixierter Peptide**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Lars Peter Hans von Olleschik-Elbheim
aus Glendale, Arizona
-1998 -

....nichts ist unbedeutend, nur weil es klein ist.

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt oder die Zeit während der Promotionsvorbereitung begleitet haben:

bei Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt für seine Betreuung und die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, insbesondere auch für den freundschaftlichen Umgang im Arbeitskreis und die Gewährung von Freiräumen für meine persönliche und berufliche Weiterentwicklung,

bei Herrn Prof. Dr. Paul Tudzynski für die Unterstützung beim Wechsel zum ZMBE und die Übernahme des Koreferates,

bei allen Kollegen im Arbeitskreis des Instituts für Infektiologie: Christina, Inga, Kerstin, Christoph, Clemens, Rita, Dörthe, Gisela, Andreas, Julia, Barbara, Lilo, Marc, Barbara, Andreas, Sven, Ulla, Martin, Waltraud (auch den oder die, die ich hier vergessen habe) und ganz besonders bei Ali, mit dem zusammen ich die ersten Stühle ins Institut getragen habe und der mir bei Problemen stets als interessierter Gesprächspartner zur Verfügung stand,

bei meinen Eltern, die mich nach Kräften unterstützt und entlastet haben,

bei meinen Freunden und Freundinnen, die Zeit für mich hatten - wenn ich Zeit hatte - und die in den letzten Jahren viel zu meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen haben,

bei Gebhard, Lisa und Josephine für ihr Verständnis und die Unterstützung.

1	Einleitung	1
1.1	Der Organismus <i>Bordetella pertussis</i>	4
1.2	Krankheitsverlauf bei Keuchhusten	4
1.3	Diagnose	6
1.4	Immunologische Reaktion gegen Pertussis nach natürlichem Kontakt und Immunisierung	7
1.5	Virulenzfaktoren von <i>Bordetella pertussis</i>	8
1.6	Pertussis Toxin	9
1.6.1	Aufbau von Pertussis Toxin	9
1.6.2	Funktionen des B-Oligomers von Pertussis Toxin	10
1.6.3	ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch das A-Protomer (S1 Untereinheit) von Pertussis Toxin	11
1.7	Impfstoffe gegen Pertussis	14
1.8	Die Spotsynthese von Peptiden als Hilfsmittel für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen	17
1.9	Ziele dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Seren	19
2.1.2.1	Gewinnung von Seren aus Blutproben	19
2.1.2.2	Humanseren nicht geimpfter Kinder	20
2.1.2.3	Humanseren aus einer italienischen Impfstudie	20
2.1.2.4	Humanseren aus einer deutschen Impfstudie mit APV 50	20
2.1.2.5	Kaninchenseren	20
2.1.3	Peptide	21
2.1.4	Proteine, Enzyme und Antikörper	21
2.1.5	Chemikalien	22
2.1.6	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Peptidsynthesen auf Cellulosefiltern	25
2.2.1.1	Derivatisierung von Cellulosefiltern mit funktionellen NH ₂ -Gruppen	26
2.2.1.2	Spotsynthese	29
2.2.1.3	Entschützen der Seitenketten	30
2.2.1.4	Bindung und Nachweis der Bindung von Human- und Kaninchenseren an Pepscans von Pertussis Toxin	31

2.2.1.5	Bindung und Nachweis der Bindung von humanem Transferrin an Pepsans von Transferrin bindendem Protein	32
2.2.1.6	Quantifizierung von Farbreaktionen auf Membranen	32
2.2.1.7	Antikörperstripping von Pepsans	32
2.2.2	ELISA-Methoden	33
2.2.2.1	Kovalente Fixierung von Peptiden an ELISA-Platten	33
2.2.2.2	Detektion von Pertussis Toxin Peptiden und Holotoxin durch Kaninchen- und Humansen im ELISA	34
2.2.2.3	Bestimmung von IgG-, IgM- und IgA-Titern mit dem Testkit der Firma Viramed	34
2.2.3	Arbeiten mit Pertussis Toxin	35
2.2.3.1	Aktivierung von Pertussis Toxin	35
2.2.3.2	Modifikation von Transducin durch Pertussis Toxin mit ³² P markiertem NAD	35
2.2.3.3	Modifikation C-terminal fixierter Peptide durch Pertussis Toxin mit ³² P markiertem NAD	36
2.2.3.4	Bindung von Pertussis Toxin an C-terminal fixierte Peptide	37
2.2.4	Quantifizierung serieller Verdünnungen von ³² P- und Proteinkonzentrationen auf Western Blots	37
2.2.5	Datenbankrecherchen	38
2.2.6	Raum-Struktur-Berechnungen und dreidimensionale Darstellung	39
2.2.6.1	Dreidimensionale Visualisierung von Epitopen auf der Raumstruktur von Pertussis-Toxin	39
2.2.6.2	Modellrechnungen zur Strukturbestimmung und Energieminimierung von Peptiden	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Optimierung der Peptidsynthese mit dem Robotersystem	41
3.2	Etablierung eines Verfahrens zur Auswertung von Farbreaktionen auf Peptidspot-Filtern	46
3.2.1	Einsatzmöglichkeiten von Flachbettscannern in Kombination mit Graphikbearbeitungssoftware zur Quantifizierung von Farbreaktionen auf Membranen	47
3.2.2	Linearitätsbereiche und Anwendungsspektrum der scanner-gestützten Quantifizierung im Vergleich mit alternativen Quantifizierungsmethoden	49
3.3.	Antigene Epitope in den Pertussis Toxin Untereinheiten	52
3.3.1	Nachweis von anti-Pertussis-Toxin-Antikörpern in den eingesetzten Humansen in ELISA-Tests mit Holotoxin und immobilisierten Peptiden	52
3.3.1.1	Reaktionen gegen Pertussis Toxin	53
3.3.1.2	Reaktionen der Kaninchen- und Humansen im Viramed Testsystem	54
3.3.1.3	Reaktionen gegen immobilisierte Peptide von Pertussis Toxin	55
3.3.2	Der Einsatz von Pepsans zur Identifizierung linearer, humaner Epitope des Pertussis Toxin	59

3.3.2.1	Kontrollen und nicht-reaktive Seren	60
3.3.2.2	Mit Hilfe des Pepscan von Pertussis Toxin identifizierte, lineare Epitope	64
3.3.2.3	Die Erkennung humaner B-Zellepitope in der dreidimensionalen Darstellung	71
3.3.2.4	Immunologische Bedeutung der von den Postimmunseren detektierten Epitope auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin	80
3.3.2.5	Veränderungen bei der Erkennung linearer Epitope von Pertussis Toxin im Verlauf der Immunisierung	82
3.3.2.6	Epitoperkennung durch Humansen, deren Immunreaktion gegen Pertussis Toxin in Folge einer natürlichen Infektion aufgebaut wurde	85
3.3.2.7	Kreuzreaktionen in der Erkennung gruppenspezifischer Peptide von Virulenzfaktoren	87
3.4	Untersuchungen zu Substratwechselwirkungen von Pertussis Toxin: ADP-Ribosylierung C-terminaler Peptide der α Untereinheiten von G-Proteinen durch Pertussis Toxin	89
3.4.1	Substrateigenschaften C-terminaler Sequenzen der α Untereinheiten von G-Proteinen	90
3.4.2	Einfluß von Sequenz, Aufbau und Länge des Abstandmoleküls (Spacers) und der Zielpeptidsequenz auf die ADP-Ribosylierungseffizienz	91
3.4.3	Identifizierung der C-terminalen Sequenz von α -G _h als effizientes Pertussis Toxin-Substrat	95
3.4.4	Auswahl einer „Muster“-Sequenz für weitere Untersuchungen	96
3.4.5	Effekte von Aminosäureaustauschen im α -G ₁₃ 16mer auf die Pertussis Toxin-Substrateigenschaften der Peptidsequenzen	96
3.4.6	Simulation der sterischen Effekte der Positionsaustausche im α -G ₁₃ 16mer in energieminierten, dreidimensionalen molekularen Modellen	99
3.5	Weitere Einsatzmöglichkeiten der Spotsynthese zur Klärung molekularer Ursachen bei infektiologischen Fragestellungen	105
3.5.1	Bindung von tierischem Transferrin an Pepscans von Transferrin-bindendem Protein TfbA aus <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	106
3.5.2	Bindung von humanem Transferrin an Pepscans von Transferrin-bindendem Protein TbpB aus den <i>Neisseria meningitidis</i> Stämmen M928 und B16B6	107
4	Diskussion	110
4.1	Spotsynthese von Peptiden mit dem Abimed System	110
4.2	Quantifizierung immunologischer Farbreaktionen mit Hilfe von Flachbettscannern	112
4.3	Präsentation fixierter Peptide für immunologische Tests zum Nachweis einer Pertussis Infektion	113
4.4	Pepscans von Pertussis Toxin als Hilfsmittel zur Identifizierung immunrelevanter linearer und konformeller Epitope in humanen Antiseren	115

4.4.1	Immunologische Bedeutung der durch Antiseren erkannten Epitope auf Pertussis Toxin	122
4.4.2	Beobachtungen zur Epitoperkennung an Impfseren	123
4.4.3	Epitoperkennung nach natürlicher Infektion	124
4.5	Untersuchungen zu Substratwechselwirkungen von Pertussis Toxin: ADP-Ribosylierung C-terminaler Peptide der α Untereinheiten von G-Proteinen durch Pertussis Toxin	125
4.5.1	Einsatz C-terminal fixierter Peptide als Substrate für die ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin	126
4.5.2	Effekte der Längenvariationen von Peptidsubstraten auf Erkennung und ADP-Ribosylierungseffizienz	127
4.5.3	Detektion von α -G _h als hocheffizientes Pertussis Toxin-Substrat	128
4.5.4	Effekte von Positionsaustauschen von Aminosäuren auf die ADP-Ribosylierungseffizienz	128
4.5.5	Berechnungen und Strukturvorhersagen zu den Effekten der Positionsmutationen	131
4.6	Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur und Funktion von Pertussis Toxin für weiterführende immunologische Arbeiten und praktische Perspektiven	133
4.7	Das Potential der Spotsynthesemethode als Verfahren bei der Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen	134
5	Anhang	137
5.1	Ergänzende Daten zu den innerhalb dieser Arbeit gesammelten und eingesetzten Humanseren	137
5.1.1	Humanseren von nicht gegen Pertussis geimpften Kindern	137
5.1.2	Humanseren aus einer italienischen Impfstudie mit rekombinantem Pertussis Toxin	139
5.1.3	Humanseren aus einer deutschen Impfstudie	140
5.1.4	Humanseren aus der Sammlung des Instituts für Infektiologie	141
5.2	Datenbanksequenzen	142
5.2.1	Sequenzen für die Pepscans von Pertussis Toxin	143
5.2.2	Sequenzen für die Pepscans von Transferrin-bindendem Protein	144
5.2.3	BLASTP-Suche nach Sequenzen mit Homologie zum C-terminalen α -G ₁₃ Peptid	145
5.3	BLASTP-Recherchen nach Sequenzhomologien zu den auf den Pertussis Toxin Untereinheiten S1 bis S5 gefundenen immunodominanten, linearen Epitopen	146
6	Zusammenfassung	156
7	Veröffentlichungen und wissenschaftliche Beiträge	158
7.1	Veröffentlichungen	158
7.2	Vorträge und Poster	158
8	Literaturverzeichnis	160

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absorbiert
Acm-	Acetamidomethyl-
ACT	Adenylatcyclasetoxin
ADP	Adenosin-diphosphat
AGG	Agglutinogen
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APV	Azelluläre Pertussis Vakzine
AS	Aminosäure(n)
BCIP	Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz
BLAST	Basic Local Alignment Tool
Boc-	t-Buthoxycarbonyl-
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bTf	bovines Transferrin
C-terminal	carboxyterminal
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBS	Citrate Buffered Saline
CHO	Chinesische Hamster Ovar-Zellen
cpm	counts per minute (Signale pro Minute)
d.b.	das bedeutet
d.h.	das heißt
DICD	Diisopropylcarbodiimid
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNT	Dermonekrotisches Toxin
DTaP	Diphtherie-Tetanus-azelluläre-Pertussis-Vakzine
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ES	Erstserum
FHA	Filamentöses Hämagglutinin
Fim	Fimbrien

Fmoc-	Fluorenylmethylcarbonyl-
FT	Fußnote
g	Gramm
GAM	Goat-anti-mouse
GAR	Goat-anti-rabbit
GbF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung
ges.	gesamt
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HLT	Hitze-labiles Toxin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hrsg.	Herausgeber
HSP	High-scoring Segment Pair
hTf	humanes Transferrin
HUSAR	Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources
ICMPT	Intracerebral mouse protection test
IFA	Immunofluoreszenz-Antikörper
IFI	Institut für Infektiologie
Ig	Immunglobulin(e)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
It	italienisch
kD	Kilodalton
l	Liter
lin.	linear
log	logarithmisch
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
M	Molar
m-	milli-
m.	männlich
m. E.	mit Einschränkungen
max.	maximal
Melm	1-Methylimidazol
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MSP	Maximum-scoring Segment Pair

MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Thiazolblau-Tetrazoliumbromid)
N-terminal	aminoterminal
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NAD	Nikotinsäureamidadenindinucleotid
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
NCA	N-Carboxyanhydrid
NHS	N-Hydroxysuccimid
n. erf.	nicht erfaßt
NIH	National Institute of Health
NMP	1-Methyl-2-Pyrrolidon
Nr.	Nummer
o. a.	oben angeführt(en)
OD	Optische Dichte
Odhbt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazinester
org.	organisch(e)
PAM	Pair alignment matrix
PBS	Phosphate buffered saline
pdb-	Protein-Datenbank-
pers. Mittlg.	persönliche Mitteilung
Pfp-	Pentafluorphenyl-
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
PT	Pertussis Toxin
pTf	porcines Transferrin
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
s.c.	subcutan
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
sp.	Species
SQ	Sequenz (Sequence)
Tab.	Tabelle
Tbp	Transferrin bindendes Protein
TBS	Tris buffered saline
tBu-	tertiär-Butyl-

TCT	Tracheales Zytotoxin
term.	terminal
Tf	Transferrin
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
Triton X-100	(TX 100) Alkylphenylpolyethylenglykol
Trt-	Trityl-
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w.	weiblich
wcDTP	Whole cell (Ganzzell)-Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Vakzine
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZMBE	Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung
ZS	Zweitserum
°C	Grad Celsius
'	Minute(n)
''	Sekunde(n)

1 Einleitung

Der als typische Kinderkrankheit bekannte Keuchhusten, hervorgerufen durch den Erreger *Bordetella pertussis*, zählt zu den zehn am häufigsten mit Todesfolge endenden Infektionserkrankungen. Ebenso gehört er mit 40 Millionen auftretenden Infektionen im Jahr 1996 weltweit in die Gruppe der zehn am häufigsten beobachteten Infektionserkrankungen (WHO 1996). Mehr als 80% der bekannt werdenden klinischen Fälle betreffen Kinder im Alter von unter 10 Jahren. Lebensbedrohlich sind die im Rahmen des Krankheitsverlaufs auftretenden Komplikationen mit Schädigungen der respiratorischen Organe oder des zentralen Nervensystems insbesondere für Kleinkinder im Alter von unter einem halben Jahr (Howson *et al.* 1991). Im Jahr 1997 starben mehr als 400.000 Patienten an den Folgen einer Pertussis Infektion (vgl. Abb 1.1).

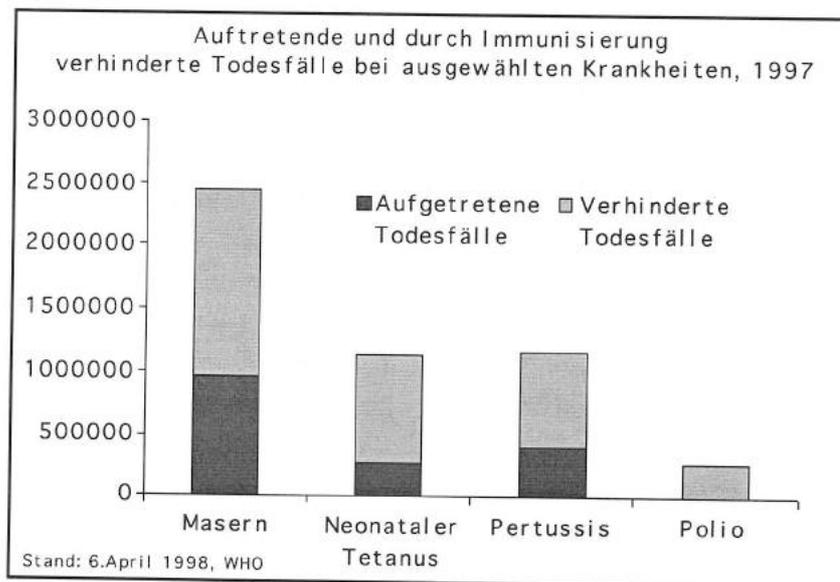


Abb. 1.1: Anzahl der weltweit beobachteten und der durch Immunisierung verhinderten Todesfälle nach einer Pertussis Infektion im Jahre 1997.

Grafik leicht verändert nach dem WHO-Bericht 1998 (Quelle: WHO, URL=<http://www.who.ch/gpv-surv/graphs.htm>).

Die Übertragung der Pertussis-Erreger erfolgt ausschließlich durch den Kontakt mit bereits infizierten Menschen. Insbesondere im Anfangsstadium oder bei erneuter Infektion eines Patienten mit dem Erreger ist der Krankheitsverlauf oft atypisch und wird dann nicht als Keuchhusten diagnostiziert. Aus diesem Grund ist die besonders gefährdete Gruppe von Kleinkindern nur schlecht von Überträgern fernzuhalten (Cherry 1989).

Da die im Rahmen einer Infektion oder der Immunisierung mit einem der bisher entwickelten Impfstoffe gegen *B. pertussis* erworbene Immunität offenbar keinen lebenslangen Schutz vor erneuter Infektion gewährleistet, existiert innerhalb der Bevölkerung ein permanentes Reservoir an Überträgern (Edwards *et al.* 1993). Mit den derzeit im Einsatz befindlichen Impfstoffen wird also nur ein zeitlich beschränkter Schutz aufgebaut, weshalb die Chancen einer weltweiten Ausrottung der Erreger gering sind.

In den letzten Jahren wurden neben der vorwiegend verwendeten Ganzzellvakzine (Griffiths 1988) eine Reihe neuer Impfstoffe gegen Keuchhusten entwickelt, erprobt und eingeführt. Dabei handelt es sich um azelluläre, möglichst Lipopolysaccharid-freie Vakzinen. Sie bestehen aus den immunologisch in besonderem Maße relevanten Komponenten des Erregers, im wesentlichen Pertussis Toxin (PT), Filamentöses Hämagglutinin (FHA), Pertactin und Fimbrien (Fim) in unterschiedlichen Zusammensetzungen. Das zur Impfung eingesetzte Pertussis Toxin ist in der Regel zuvor chemisch detoxifiziert. In den letzten Jahren wurde eine Vakzine entwickelt, in der ein durch Aminosäureaustausch gentechnisch detoxifiziertes Pertussis Toxin eingesetzt wird. Dadurch soll einerseits im Vergleich mit chemisch detoxifiziertem Pertussis Toxin eine verbesserte Protektivität der induzierten Immunantwort und weiterhin eine Verringerung der in Zusammenhang mit der chemischen Detoxifizierung induzierten Nebenwirkungen einer Vakzinierung erreicht werden. (Rappuoli *et al.* 1992, Wirsing von König und Finger 1995, Marsili *et al.* 1992).

Unabhängig von der hier angeführten Betrachtung der Impfstoffentwicklung gegen *B.pertussis* ist für neue Generationen von Impfstoffen allgemein zu fordern, daß sie eine deutlich verlängerte, protektive Immunität gegenüber Infektionen vermitteln. Dies kann gelingen, wenn die für die immunologische Protektivität relevanten Epitope dem Immunsystem in besonders geeigneter Weise präsentiert werden.

Perspektivisch wäre es wünschenswert, mit Hilfe von nur einer Immunisierung gleichzeitig eine protektive Immunität gegenüber mehreren Pathogenen aufzubauen und damit die Gesamtzahl erforderlicher Vakzinierungen zu minimieren.

Die Möglichkeit dazu ist im Prinzip bei genauer Kenntnis der immunologisch relevanten Epitope gegeben. Dabei sind mit „immunologisch relevant“ all jene Epitope gemeint, für die ein ausreichender Antikörpertiter im Wirt eine gegenüber dem Pathogen protektive Immunität vermittelt.

Diese Epitope könnten dann in neuen, auf gentechnischem Wege kostengünstig herzustellenden Kombinationsvakzinen optimal präsentiert und kombiniert werden.

Ebenso ist es sinnvoll, eine standardisierte, differentielle Schnell-Diagnostik zu entwickeln, die Frühphasen der Infektion und Grenzen zwischen bestehender protektiver und nichtprotektiver Immunität diagnostiziert, indem sie in der Lage ist, die Spezifität des Patientenserums gegenüber „kritischen“ Epitopen zu bestimmen.

Weiterhin sollte sie zwischen natürlich erworbener und durch Immunisierung hervorgerufener Immunität differenzieren können.

Für diese Ziele sind detaillierte Informationen über die vom humanen System auf den bakteriellen Hauptvirulenzfaktoren erkannten, antigenen Epitope erforderlich. In Verbindung mit Daten zur Protektivität einer Immunantwort gegen diese Epitope oder zu bestimmten Kombinationen ergeben sich Hinweise für die Entwicklung neuartiger Kombinationsvakzinen und serologischer Tests mit der geforderten diagnostischen Aussagefähigkeit.

Erste Ansätze für die Entwicklung derartiger Kombinationsvakzinen sind beispielsweise durch die Versuche von Boucher *et al.* (1993) oder Barbieri *et al.* (1992) gegeben. Sie konnten

jeweils am Beispiel einer Kombinationsvakzine, die gegen Pertussis Toxin und Tetanus Toxin gerichtet ist, demonstrieren, daß ein paralleler Aufbau von Antikörpern gegen immunologisch bedeutsame Epitope verschiedener Organismen mit Hilfe von Fusionsproteinen möglich ist.

Abgesehen von der Betrachtung der natürlichen oder durch Vakzinierung hervorgerufenen Antikörperreaktion gegen Pathogenitätsfaktoren vermittelt die genaue Betrachtung der für ein Pathogen kritischen Struktur-Funktionsbeziehungen Hinweise auf die für die Protektivität der Immunantwort potentiell bedeutsamen, immunogenen Epitope.

Die Induktion von Antikörpern ist unabhängig von der damit für den Organismus erzielten unmittelbaren Blockade oder Detoxifizierung der Pathogenitätsfaktoren, da das Immunsystem primär nur auf „Fremd“-Erkennung gerichtet ist.

Es ist denkbar, daß sich mit dem Wissen über Epitope von besonderer Bedeutung für die Wirts-Pathogen-Interaktion letztlich auch gezielte Immunität gegenüber hochprotektiven, jedoch in der Regel vom Immunsystem nicht oder nur schlecht erkannten Epitopen aufbauen läßt, wenn diese Epitope dem Immunsystem gezielt und optimal induzierend präsentiert werden. Gleichzeitig wird das Immunsystem „entlastet“ bzw. effizienter eingesetzt (Schmidt 1989, Plotkin 1993).

Ebenso bieten Erkenntnisse in diesem Bereich Ansatzpunkte für die Behandlung einer akuten Infektion, für die noch keine Immunantwort aufgebaut ist. Denkbar ist die Entwicklung molekularer Mimikri, die in die kritischen Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen Wirts- und Pathogenmolekülen eingreifen und sie hemmen oder blockieren. Ziel derartiger Entwicklungen wäre die Abschwächung des Einflusses des Pathogens auf seinen Wirt an genau charakterisierten Stellen des Infektionsverlaufs zum Einsatz für Forschungs- und Therapie Zwecke.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen und eingeführten Techniken zu diesen Fragestellungen sind in erster Linie auf Anwendungen im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen von Pertussis Toxin ausgerichtet. Gleichwohl werden weiterführende Möglichkeiten in der Anwendung aufgezeigt und das Potential der hier beschriebenen Methoden und Vorgehensweisen anhand einiger der bereits durchgeführten Kooperationsprojekte (Strutzberg *et al.* 1995, Renauld-Mongenien *et al.* 1997) demonstriert.

1.1 Der Organismus *Bordetella pertussis*

Der Erreger *B.pertussis* wurde im Jahre 1906 erstmals von Bordet und Gengou isoliert und identifiziert (Bordet und Gengou 1906). Bei diesem Bakterium handelt sich um ein 0,2 bis 1 µm langes gramnegatives Stäbchen, das der Gattung *Bordetella* zugeordnet wird.

Neben *B.pertussis* enthält die Gattung *Bordetella* nur wenige weitere Arten. Die drei bekanntesten sind *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis* und *B.avia*. *B.avia* befällt ausschließlich Vögel, vorwiegend Truthähne (Jackwood *et al.* 1995). *B.parapertussis* kann beim Menschen pertussiforme Krankheitsbilder hervorrufen. Eine Infektion mit *B.bronchiseptica* wird bei Menschen hingegen sehr selten beobachtet. Es befällt hauptsächlich Pferde, Schweine, Hunde, Meerschweinchen und Kaninchen (Goodnow 1980).

Das Pertussis Toxin-Operon ist in all diesen Arten zwar grundsätzlich vorhanden, wird aber nicht transkribiert. Es wird ausschließlich von *B.pertussis* innerhalb der Wirtsumgebung exprimiert.

Alleiniger Wirt von *B.pertussis* und ihr natürliches Reservoir ist der Mensch. Dies hat zur Folge, daß kein gutes Tiermodell für die Untersuchung der Pathogenese und Immunantwort existiert. Da Nagerschleimhäute jedoch von *B.pertussis* besiedelt werden können, wird behelfsmäßig die Maus in einem artifiziellen Testsystem, dem ICMPT (Intracerebral mouse protection test), für die vergleichende Analyse der Protektivität von Vakzinen herangezogen (Robinson und Funnell 1992). Daneben wird für bestimmte Fragestellungen zur Pertussis Toxin-Aktivität mit CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) gearbeitet, die nach einer Intoxifizierung mit Pertussis Toxin mikroskopisch zu beobachtende morphologische Veränderungen (sog. Cluster-Bildung) zeigen (Hewlett *et al.* 1983, Halperin *et al.* 1990).

1.2 Krankheitsverlauf bei Keuchhusten

Beim Keuchhusten, Pertussis, handelt es sich um eine durch Tröpfcheninfektion übertragene, akute Erkrankung der oberen Atemwege.

Der Keuchhusten wurde 1578 erstmals beschrieben, nachdem es in Paris zu einer Epidemie gekommen war (Cone 1970). Die äußeren Symptome sind krampfartige, langanhaltende Hustenanfälle, die mit einem ziehenden Einatmungsgeräusch, dem sogenannten „Keuchen“, und Hervorwürgen von Schleim einhergehen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Flimmerepithel der oberen Atemwege weitgehend zerstört, so daß dem Körper keine andere Möglichkeit als das regelmäßige, intensive Abhusten bleibt, um die Schleimhäute zu reinigen. Der Erreger selbst ist zum Zeitpunkt des Auftretens der eigentlichen Keuchhustenphase in der Regel bereits nicht mehr nachzuweisen.

Die Krankheit betrifft primär Säuglinge und Kinder unterhalb von zwei Jahren. Da die natürlich erworbene Immunität gegenüber *B.pertussis* jedoch nur einige Jahre anhält (Edwards *et al.* 1993, Robertson *et al.* 1987) und die Durchimpfungsrate in einigen Ländern, wie in Abbildung 1.2 gezeigt, zudem unter 80% liegt, werden auch Jugendliche und Erwachsene regelmäßig reinfiziert. Bei diesen Patienten verläuft die Krankheit, oft ähnlich wie bei Kindern unter 6

Monaten asymptomatisch (Sotomayor *et al.* 1985). Sie tritt dann lediglich als langandauernde Erkältung mit oder ohne Husten in Erscheinung (Cherry *et al.* 1989), was die Diagnose und die Möglichkeiten zum vorsorglichen Schutz der gefährdeten Kleinkinder im Kontaktbereich erschwert.

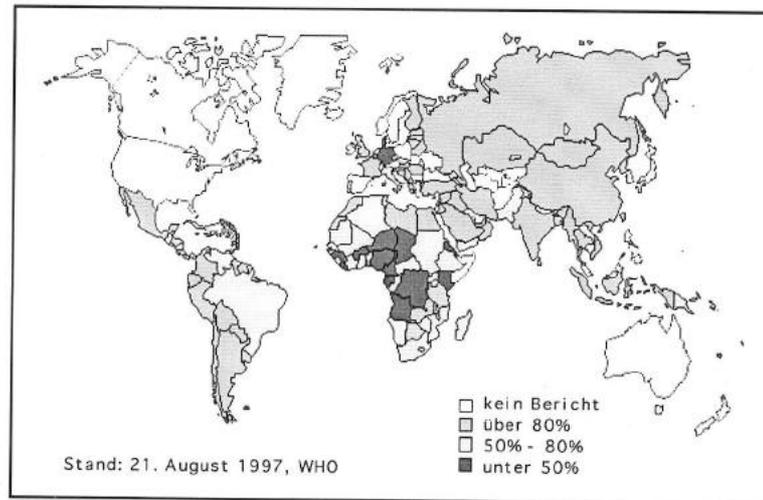


Abb. 1.2: Weltweite Durchimpfungsrate von Kindern mit drei Dosen einer Diphtherie-Pertussis-Tetanus Vakzine.

Grafik leicht verändert nach dem WHO-Bericht 1998 (Quelle: WHO, URL=<http://www.who.ch/gpv-surv/graphs.htm>).

Der typische Krankheitsverlauf des Keuchhustens wird in drei Stadien eingeteilt, das Stadium *catarrhale*, das Stadium *convulsivum* und das Stadium *decrementi*, und dauert im allgemeinen 6 bis 10 Wochen.

Die Inkubationsphase beträgt ein bis zwei Wochen. Innerhalb dieses Zeitraums breitet sich der Erreger auf den Schleimhäuten aus und besiedelt diese, ruft jedoch noch kein äußerlich erkennbares Krankheitsbild hervor.

In der Regel beginnt ab dem 10. Tag nach der Infektion das Stadium *catarrhale*, bei dem der Patient allgemeine Erkältungssymptome, wie tränende Augen, Schnupfen und uncharakteristischen, leichten und noch trockenen Husten ausbildet.

Nach weiteren zwei Wochen wechselt die Ausprägung des Hustens. Er tritt krampfartig und besonders gehäuft (stakkatoartig) während der Nacht auf. Damit ist die paroxysmale Phase (Stadium *convulsivum*) erreicht. Nach weiteren drei bis sechs Wochen vermindert sich die Schwere der Hustenanfälle (Olson 1975).

Als abschließendes Stadium *decrementi* wird die Phase bis zur vollständigen Genesung und Regeneration des respiratorischen Epithels bezeichnet. Es kann zwischen zwei Wochen und bis zu sechs Monaten beanspruchen.

Vor allem im Stadium *convulsivum*, aber auch später, können opportunistische Infektionen, Entelophatien und Pneumonien auftreten, die insbesondere für Kleinkinder unter einem Jahr lebensbedrohend sein können und die häufigste Todesursache darstellen (Durbin 1992).

Eine Behandlung der eigentlichen Pertussis Infektion ist nur in der ersten Phase möglich. Durch rechtzeitigen Einsatz des Antibiotikums Erythromycin über einen Zeitraum von zwei

Wochen werden die Keime auf den Schleimhäuten eliminiert. Die Behandlung des Patienten und sämtlicher gefährdeter Kontaktpersonen muß vor dem Eintritt in die paroxysmale Phase erfolgen. Später angesetzt, bleibt die Therapie wirkungslos, da die Erreger dann kaum noch nachweisbar sind oder in Makrophagen persistieren, wo sie vor der Antibiotikabehandlung geschützt sind (Bergquist *et al.* 1987).

Ein auffallendes Phänomen ist, daß das klinische Bild des Keuchhustens erst stark verzögert zum eigentlichen Wirtsbefall und dem Beginn der Infektion auftritt. Die Ursache dafür liegt in den vom Bakterium produzierten Exotoxinen, die nach der Sezernierung eine Reihe von Folgereaktionen hervorrufen, und der daraus abgeleiteten, verzögerten Ausprägung der auftretenden Krankheitssymptome. Diese sind dann auch unabhängig von der Gegenwart des Erregers vorhanden, insbesondere wenn sie, wie der eigentliche Husten, auf einer nachhaltigen Zerstörung des körpereigenen Flimmerepithels beruhen. Man bezeichnet Pertussis daher auch als toxinvermittelte Krankheit oder Toxikose (Finger und Wirsing von König 1986).

1.3 Diagnose

Die Diagnose von Pertussis anhand des klinischen Bildes gelingt am besten nach dem Eintritt in die paroxysmale Phase. In der Blutuntersuchung werden Leukocytenzahlen von 20.000 bis 30.000 Leukocyten/ml bestimmt und dabei vorwiegend kleine, reife Leukozyten beobachtet. Das keuchende Hustengeräusch und die stakkatoartigen Hustenanfälle während der Nacht sind eindeutige Hinweise für den behandelnden Arzt.

Vor dem Eintritt in diese Phase ist der Keuchhusten äußerlich und von den Symptomen her nicht von einfachen Erkältungskrankheiten zu unterscheiden (Bolag und Matter 1992).

Zu diesem Zeitpunkt ist die Krankheit jedoch schon soweit fortgeschritten, daß eine Antibiotikabehandlung in der Regel erfolglos bleibt.

Bei Verdacht auf Vorliegen einer frischen Infektion sind zur rechtzeitigen Diagnose und Therapie daher entweder die Erreger selbst zu isolieren und anzuzüchten, oder ihr Vorhandensein in geeigneter Form direkt nachzuweisen.

Die Isolation und Kultivierung gelingt am besten aus Nasopharyngialabstrichen. *B.pertussis* wächst allerdings nur sehr langsam und ist in Bezug auf die Kultivierungsbedingungen anspruchsvoll, so daß die Gewinnung klinischer Isolate oft mißlingt (Parker und Payne 1985). Bereits zwei Wochen nach der Infektion ist der Erreger auch ohne Antibiotikabehandlung kaum noch zu isolieren.

Als eine schneller zum Ergebnis führende Methode werden direkte Immunfluoreszenz-Antikörper (IFA) Markierungen zum Bordetellen-Nachweis eingesetzt. Diese sind jedoch in der Frühphase der Infektion oft falschnegativ, aufgrund zu geringer Keimzahl oder falschpositiv, da auch bereits abgetötete Erreger nachgewiesen werden. Die Auswertung ist also in hohem Maße von der Erfahrung des Mikroskopierenden abhängig (Durbin 1992).

Die Diagnose über IFA ist eine Hilfe bei der Entscheidung, ob mit einer antimikrobiellen Therapie begonnen werden sollte, sie stellt jedoch keine eindeutige Diagnose einer tatsächlich vorliegenden Infektion dar.

Es wurden verschiedene weitere Methoden zur Diagnose der Erreger entwickelt, die auf Agglutinationsreaktionen, ELISA-Nachweisen oder Immunoblotting-Techniken beruhen (Onorato und Wassilak 1987). Weiterhin wird eine bestehende *B.pertussis* Infektion mittlerweile routinemäßig durch spezifische Polymerase-Kettenreaktionen nachgewiesen (Lind-Brandenberg *et al.* 1998, Müller *et al.* 1997, McLafferty *et al.* 1986). Auch hier stellt sich jedoch das Problem der falschpositiven Diagnosen, beispielsweise durch Übersensitivität der PCR-Reaktion oder Replikation der DNA bereits abgetöteter Erreger.

Eine allgemein akzeptierte, sensitive Standardmethode (ein „Goldstandard“) oder breit eingeführte, kommerzielle Testsysteme fehlen bislang.

Abgesehen vom Nachweis der Erreger selbst ist für die differentielle Diagnose bei langandauerndem Husten die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter in den Immunglobulinklassen IgA, IgG und IgM gegen *B.pertussis* und ihre Verhältnisse zueinander ein wichtiges Hilfsmittel. Da die Induktion der Antikörperbildung versetzt zum Zeitpunkt der Erstinfektion erfolgt, ist sie für die Frühdiagnose ungeeignet.

Bei der Entscheidung, auch Kontaktpersonen mit unbekanntem Immunstatus gegenüber Pertussis in die antimikrobiellen Therapie mit Erythromycin miteinzubeziehen, ist die Bestimmung der spezifischen Antikörper-Titer hingegen sehr hilfreich. Das Kriterium für die Mitbehandlung einer Kontaktperson ist in diesem Fall das Fehlen eines protektiven Antikörpertiters.

Auch hier fehlen bislang allgemein verfügbare Standardseren mit protektivem und nichtprotektivem Immunstatus sowie allgemein zugängliche Seren aus verschiedenen Phasen des Infektionsverlaufs, die eine Eichung der Testverfahren ermöglichen könnten.

Kommerziell erhältlich ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit lediglich ein auf ELISA-Technik basierender Test, bei dem Antikörpertiter aller drei Immunglobulinklassen gegenüber fixierten Bordetellen-Präparationen bestimmt werden. Die Diagnose erfolgt durch direkten Vergleich der Proben mit negativen, schwach und stark positiven Kontrollseren des Herstellers (Viramed 1994).

1.4 Immunologische Reaktion gegen Pertussis nach natürlichem Kontakt und Immunisierung

Eine vollständige protektive Immunität gegenüber Pertussis besteht in der Kombination aus mukusaler IgA-Antwort auf den Schleimhäuten des respiratorischen Trakts (Granström *et al.* 1988), der humoralen IgG- und IgM-Antwort innerhalb des Serums (Thomas *et al.* 1989) und offenbar auch einer in ihrer Funktionalität noch nicht vollständig aufgeklärten zellulären Immunantwort durch spezielle Th1-Zellen (de Magistris *et al.* 1988).

Auf allen drei Ebenen wird diese Immunantwort nur bei Patienten beobachtet, die eine natürliche Keuchhusten-Infektion durchlebt haben. Mit den eingesetzten Impfstoffen wird vorwiegend eine IgG- und IgM-Antwort im Serum erzeugt. Die beobachtete Induktion protektiver IgA-Antikörper auf den Schleimhäuten ist nur gering (Shahin *et al.* 1990).

1.5 Virulenzfaktoren von *Bordetella pertussis*

B.pertussis ist innerhalb seiner Wirtsumgebung in der Lage, eine ganze Palette von Virulenzfaktoren zu exprimieren, deren Aufklärung und Charakterisierung in erster Linie durch Tn5-Insertionsmutagenese ermöglicht wurden (Weiss und Hewlett 1986). Diese Faktoren lassen sich in zwei funktional zu unterscheidende Gruppen einteilen:

Virulenzfaktoren in Wechselwirkung mit dem respiratorischen Epithel

Für die Einleitung der Pathogens ist im ersten Schritt die Anheftung und erfolgreiche Besiedelung des respiratorischen Epithels erforderlich. Dies wird von *B.pertussis* durch Wechselwirkung verschiedener Adhäsine mit dem Flimmerepithel des Wirts erreicht. Die wichtigsten Adhäsine sind:

- die fimbrillären, serospezifischen Agglutinogene (AGG), vor allem AGG2 und AGG3,
- das nicht fimbrilläre Agglutinogen Pertactin (P.69), ein äußeres Membranprotein und
- das filamentöse Hämagglutinin (FHA), ein hochmolekulares, stabförmiges Oberflächenprotein.

Virulenzfaktoren in Verbindung mit der systemischen Krankheit

Nach der Besiedelung wird die systemische Krankheit durch Sezernierung weiterer Virulenzfaktoren eingeleitet. Ihr Wirkspektrum ist vergleichsweise breit gefächert (Weiss und Hewlett 1986):

- Das Pertussis Toxin (PT) wirkt selbst auch als Adhäsion, ist jedoch vorwiegend ein in spezifische Zielzellen eindringendes Protein, das die Signaltransduktion der Zelle nachhaltig beeinflusst und wie das Adenylatzykloasetoxin den intrazellulären cAMP Spiegel erhöht.
- das Adenylatzykloasetoxin (ACT) besitzt sowohl Adenylatzyklase- als auch Hämolytische Aktivität. Es dringt in Säugerzellen ein und vergiftet diese durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels,
- das Hitze-labile Toxin (HLT), auch als Dermonekrotisches Toxin (DNT) bezeichnet, spielt eine Rolle bei der Zilienlähmung und Nekrose und schließlich
- das Tracheale Cytotoxin (TCT), welches ähnlich wirkt wie DNT und als Hauptfaktor für die Zerstörung des Flimmerepithels im respiratorischen Trakt des Wirtes und resultierenden charakteristischen Hustenreizes eingestuft wird.

Neben den hier aufgeführten Virulenzfaktoren produziert *B.pertussis* wie viele andere Pathogene auch Lipopolysaccharide (LPS), denen jedoch keine besondere Rolle für die Pathogenese zugeschrieben wird (Manclark und Cowell 1985).

1.6 Pertussis Toxin

Das Pertussis Toxin (PT) ist einer der Hauptvirulenzfaktoren von *B.pertussis*. Seine genetische Organisation wurde fast gleichzeitig und unabhängig voneinander von Loch und Keith (1986) sowie von Nicosia *et al.* (1986) aufgeklärt. Es wird in keiner der anderen Arten der Gattung *Bordetella* exprimiert und spielt in der Pathogenese des humanen Keuchhustens eine zentrale Rolle. Aus diesem Grund ist es für die Beschäftigung mit der natürlichen oder durch Vakzinierung spezifisch gegen *B.pertussis* hervorgerufenen Immunantwort von besonderer Bedeutung.

Pertussis Toxin wird vom Erreger in der geeigneten Wirtsumgebung als Exotoxin sezerniert und vermittelt nach Eindringen in die Zielzelle eine Reihe von Wirkungen auf den Zellstoffwechsel. Darüberhinaus sind Wirkungen des Toxins beschrieben, die allein durch Bindung an die Zielzellen induziert werden.

1.6.1 Aufbau von Pertussis Toxin

Der Aufbau von Pertussis Toxin entspricht dem für viele bakterielle Toxine charakteristischen A-B-Typ aus enzymatisch aktiver S1-Untereinheit (A-Protomer, 26,2 kDa) und dem die Bindung an die Zielzelle vermittelnden B-Oligomer. Das B-Oligomer besteht aus jeweils einer S2 (21,3 kDa), S3 (21,9 kDa), S5 (11,7 kDa) sowie zwei identischen S4 Untereinheiten (12,1 kDa).

Ähnliche A-B-Strukturen sind beispielsweise auch beim Diphtherie und Cholera Toxin verwirklicht (Krueger und Barbieri 1995). Bis zur Aufklärung der Kristallstruktur von Pertussis Toxin durch Stein *et al.* (1994) wurde das in Abb. 1.3 gezeigte Modell für das Holotoxin und die Interpretation sämtlicher experimenteller Befunde zugrunde gelegt.

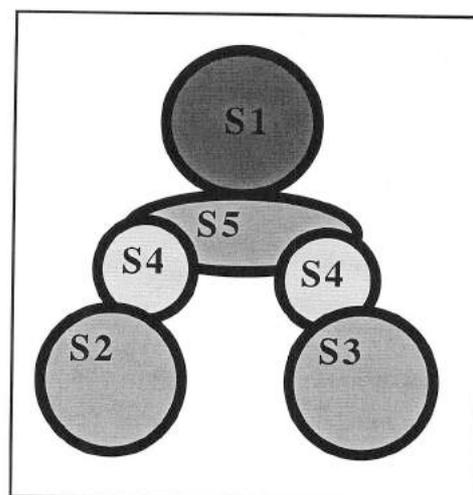


Abb. 1.3: Veraltetes Modell zur Struktur des Pertussis Toxins. Nach Raupach (1993). In diesem Modell wird die Verbindung von A-Protomer und B-Oligomer über die S5 Untereinheit postuliert. Weiterhin bildet das B-Oligomer eine offene Struktur. Das Modell war bis zum Jahr 1994 Grundlage für die Interpretation sämtlicher experimenteller Befunde.

Mit der Verfügbarkeit der exakten Raumstruktur von Pertussis Toxin ist dieses Modell überholt. Das B-Oligomer bildet tatsächlich eine ringförmige Struktur mit einer zentralen Pore aus, in die der C-Terminus des A-Protomers eintaucht. Das A-Protomer steht weiterhin in unmittelbarem Kontakt zu allen Untereinheiten des B-Oligomers (Stein *et.al.* 1994). Abb. 1.4 zeigt das Pertussis Holotoxin in seiner durch die Kristallstrukturanalyse bestimmten, dreidimensionalen Konformation.

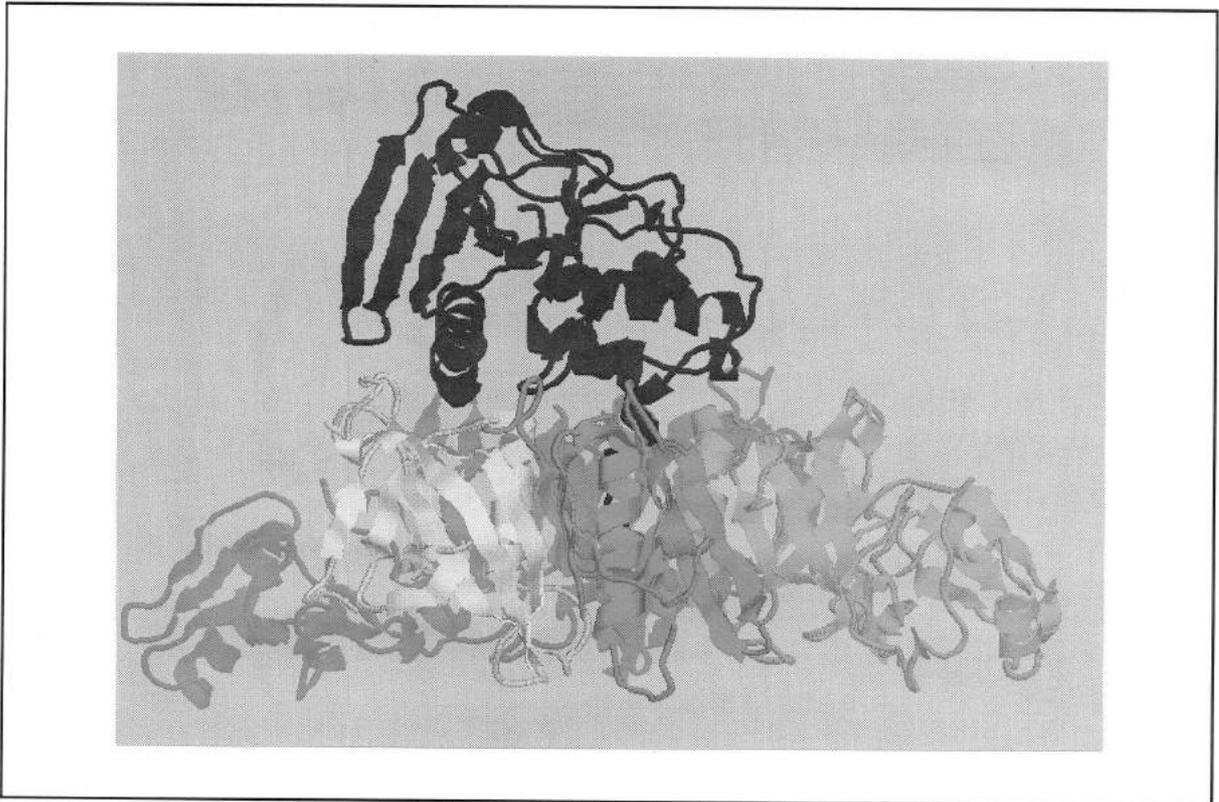


Abb. 1.4: Kristallstruktur von Pertussis Toxin.

Dargestellt ist die seitliche Ansicht von Pertussis Holotoxin in der Rückgratstruktur. Die Darstellung beruht auf den von Stein *et al.* (1994) bestimmten und veröffentlichten Kristallstrukturdaten. Die einzelnen Untereinheiten sind im Modell farblich markiert, um eine einfache Differenzierung zu erlauben (Farbcodierung: S1 - blau, S2 - türkis, S3 - grün, S4 - gelb und hellgrün, S5 - rot).

1.6.2 Funktionen des B-Oligomers von Pertussis Toxin

Eine wichtige Aufgabe des B-Oligomers besteht in der Verankerung von Pertussis Toxin an eukaryotischen Zielzellen und der Induktion der Aufnahme des Toxins. Dazu befinden sich auf der S2 und S3 Untereinheit lectinähnliche Bindungsstellen für Asparagin-gekoppelte Oligosaccharide mit $\alpha(2-6)$ -verknüpften Sialinsäureresten. Die Sequenzen der bindenden Bereiche sind ähnlich, jedoch nicht identisch, so daß die Diskussion über möglicherweise unterschiedliche Bindungsspezifitäten der beiden Untereinheiten noch nicht abgeschlossen ist (van't Wout *et al.* 1992, Nogimori, *et al.* 1984).

Experimente von el Baya *et al.* (pers. Mittlg.) zeigen, daß Pertussis Toxin in sehr viele eukaryotische Zelltypen eindringt, da es viele verschiedene Glykoproteine mit endständigen Sialinsäureresten erkennt. Als Aufnahmemechanismus konnte ein retrograder Transport des Pertussis Toxins mindestens bis zum Golgi-Apparat nachgewiesen werden. (el Baya *et al.* 1997, Xu und Barbieri 1995). Der genaue Eintrittsmechanismus des Toxins in das Cytosol ist dagegen noch ungeklärt.

Das B-Oligomer allein ist für eine Reihe weiterer biologischer und pathogener Effekte von Pertussis Toxin verantwortlich. Es vermittelt u.a. die Lymphocytose (Morse und Morse 1976), zeigt mitogene Effekte auf T- und B-Lymphocyten (Morse und Morse 1976, Kolb *et al.* 1990), hemmt die Makrophagen Migration (Meade *et al.* 1984) und die Hämagglutination von Erythrocyten (Nencioni *et al.* 1991, Nogimori *et al.* 1984).

Aufgrund der Vielzahl der durch das B-Oligomer vermittelten Wirkungen und dabei insbesondere der Vermittlung der Zielzellerkennung und Induktion der Pertussis Toxin-Aufnahme ist es als kritischer Faktor für die Entwicklung einer protektiven Immunantwort anzusehen.

1.6.3 ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch das A-Protomer (S1 Untereinheit) von Pertussis Toxin

Die S1 Untereinheit von Pertussis Toxin stellt mit ihrer Fähigkeit zur ADP-Ribosylierung von G-Proteinen eine für das Pathogen wichtige und den Wirt stark beeinflussende, enzymatische Funktionalität zur Verfügung. Sie wird erst nach der Einschleusung in das Cytoplasma der Wirtszelle aktiviert. Dazu wird im reduktivem Milieu des Cytoplasmas eine Cystin-Gruppe (Cys41-Cys201) gespalten. Diese Bindung hält die S1 Untereinheit laut kristallographischer Analyse bis zu Ihrer Reduktion (Stein *et al.* 1994) in einer Form fest, in der das aktive Zentrum nicht zugänglich ist.

G-Proteine sind wichtige Glieder innerhalb der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen. Es handelt sich dabei um membranlokalisierte, heterotrimere Proteine, die aus je einer α , β und γ Untereinheit bestehen. Sie vermitteln ganz allgemein Signale, die von extrazellulär orientierten Rezeptoren aufgenommen werden, und geben diese an intrazelluläre, membranassoziierte Effektoren weiter (Freissmuth *et al.* 1989). Die Aktivität dieser Signalweiterleitung wird über einen GTP (ein) - GDP (aus) -Schaltermechanismus geregelt. Ein an die α Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins gebundenes GDP wird auf einen Außenreiz hin durch rezeptorvermittelte Induktion gegen GTP ausgetauscht.

Daraufhin ist das heterotrimere G-Protein in der Lage, in α und $\beta\gamma$ Untereinheit zu dissoziieren und sich vom Rezeptor zu entfernen. Die α und $\beta\gamma$ Untereinheiten können dann unabhängig voneinander Signale an membranassoziierte Effektoren weiterleiten. Durch α -G_s wird z.B. als wichtiger Effektor die Adenylatcyclase aktiviert (Stryer 1988).

Der Kreislauf kann sich schließen, nachdem die in der α Untereinheit befindliche GTPase Aktivität von dem gebundenen GTP ein Phosphat abgespalten hat. Die α und $\beta\gamma$

Untereinheit können daraufhin wieder reassoziieren. Mit der Reassoziierung ist die Reizung der Effektoren beendet. Nach einer erneuten Anlagerung an die Rezeptoren kann der Zyklus von neuem beginnen.

Neben den stimulierenden G-Proteinen (G_s) gibt es eine Reihe von inaktivierenden G-Proteinen (G_i). Die α Untereinheiten der G_i Proteine sind strukturell ähnlich denen der G_s Proteine aufgebaut. Die $\beta\gamma$ Untereinheiten beider G-Proteinklassen sind austauschbar. Die G_i -Proteine stellen nach Aktivierung rasch große Mengen an freien $\beta\gamma$ Untereinheiten bereit, die an $\alpha-G_s$ binden und dadurch die Aktivierung der Adenylatcyclase stoppen. Auf diese Weise wird die Feinregulation der Signaltransduktion über zellexterne Reize und Gegenreize ermöglicht. Die Regulation ist sehr effizient, da die G_i -Proteine in der Zelle in deutlichen Überschuß gegenüber G_s vorliegen.

Die S1 Untereinheit von Pertussis Toxin ist in der Lage, die α Untereinheiten einiger G-Proteinklassen zu erkennen und kovalent zu modifizieren, indem es sie ADP-ribosyliert (Sekura *et al.* 1983). Betroffen davon sind nach bisherigem Kenntnisstand neben den α Untereinheiten der G_i -Proteine auch die der G_o -Proteine und weiterhin die des Transducin (Ui 1984, Ui 1990, West *et al.* 1995).

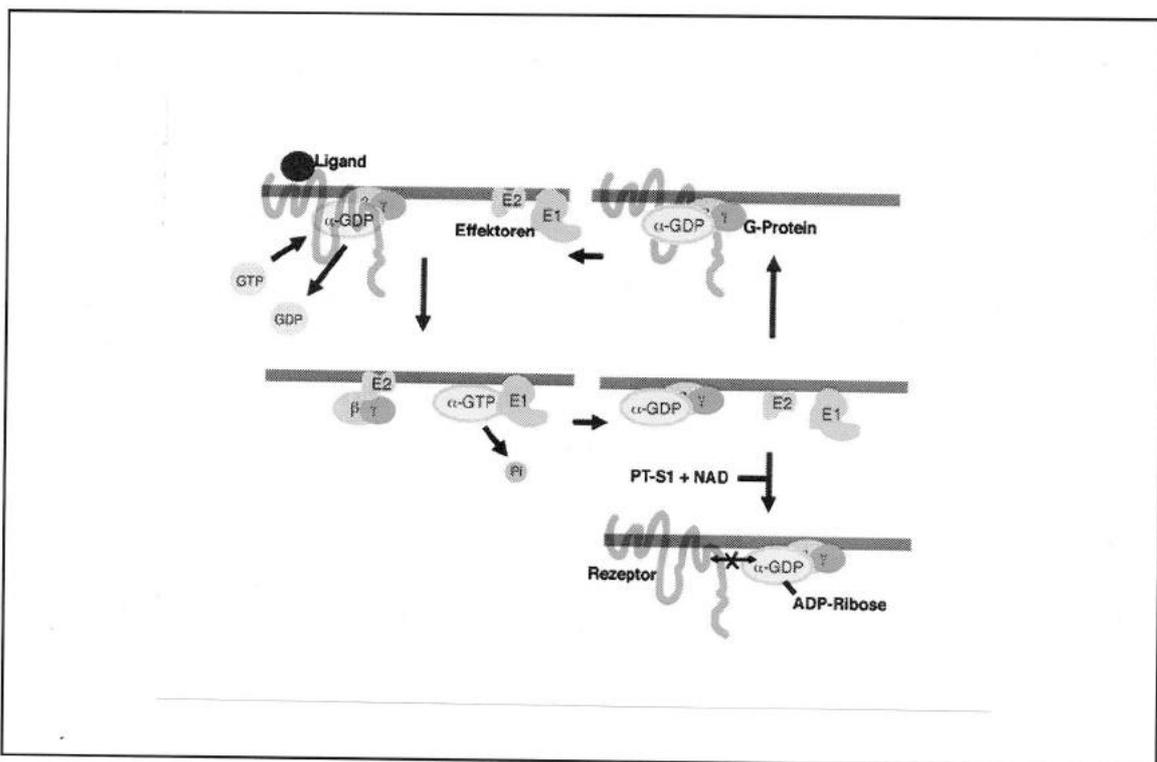


Abb.1.5: Schematische Darstellung eines G-Protein vermittelten Signaltransduktionsvorganges und seiner Blockade durch Pertussis Toxin.

Die durch S1 durchgeführte ADP-Ribosylierung von $\alpha-G_i$ entkoppelt die betroffenen G-Proteine von ihren Rezeptoren. Dies hat z.B. Einflüsse auf das Adenylat Zyklase System und darüber auf die gesamte Signaltransduktion über „second messenger“. Für die Zelle bedeutet das im Effekt eine Blockade der Reizderegulation. Abb. 1.5 zeigt das Prinzip der G-Protein vermittelten Signaltransduktion und den Einfluß von Pertussis Toxin.

Durch Pertussis Toxin wird in allen Fällen ein Cystein an der Position -4 des C-Terminus der jeweiligen α Untereinheit ADP-ribosyliert. Dies wurde erstmals am Beispiel der ADP-Ribosylierung der α Untereinheit von Transducin gezeigt (Kaziro *et al.* 1991, West *et al.* 1995). In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß die C-terminale Sequenz der α Untereinheiten besonders für die Wechselwirkungen zwischen G-Protein und Rezeptor von Bedeutung ist, wobei die Positionen -1 bis -4 offenbar entscheidend für die Rezeptor-Selektivität sind (Conclin *et al.* 1993).

Mittlerweile wird daher angenommen, daß die durch Pertussis Toxin eingeführte Entkopplung auf die Veränderung der rezeptorspezifischen Domäne zurückzuführen ist. Rezeptor und heterotrimeres G-Protein können daraufhin nicht mehr interagieren, und es findet keine Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von GDP gegen GTP statt.

Ursprünglich wurde vermutet, daß die Substrateigenschaft für die Modifikation durch Pertussis Toxin allein vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Cysteins an der Position -4 im C-Terminus bestimmt sei und daß Pertussis Toxin nicht isoliert den C-Terminus, sondern ausschließlich das heterotrimere G-Protein als Substrat erkennt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß auch die direkte Umgebung des modifizierten Cysteins innerhalb der Proteinsequenz die Modifizierbarkeit beeinflusst (Freismuth und Gilman 1989, Osawa *et al.* 1990).

Da die Isolation nativer, nicht durch $\beta\gamma$ Untereinheiten kontaminierter α Untereinheiten aus Gewebeproben nicht unproblematisch ist, wurden entsprechende Untersuchungen an rekombinanten α Untereinheiten durchgeführt, wobei gleichzeitig Fragen nach den tatsächlich auf die ADP-Ribosylierung Einfluß nehmenden Substratfaktoren gestellt wurden. Darüberhinaus wurden auch die Effekte Oligonucleotid gesteuerter Punktmutationen am C-Terminus untersucht.

In den Untersuchungen von Neer *et al.* (1988), Tsuchia *et al.* (1990) und Avigan *et al.* (1992) wurde insgesamt ein Set von 10 Aminosäure-Positionsmutationen und kleineren Deletionen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß drei der vier C-terminalen Aminosäuren innerhalb der α Untereinheit einen Einfluß auf die ADP-Ribosylierung haben.

Weitere Aufschlüsse ergaben sich durch den Einsatz synthetischer Peptide, für die gezeigt werden konnte, daß sie in vielen Fällen die antigenen Eigenschaften selbst komplexer Proteine nachahmen können und auch als Modelle zum Studium bestimmter Aspekte in der Protein-Protein Wechselwirkung geeignet sind.

Eine Folgerung daraus ist, daß weitergehende Untersuchungen an synthetischen C-terminalen Peptiden der α Untereinheiten von G-Proteinen tatsächlich zur Aufklärung der Protein-Protein Wechselwirkungen beitragen können, da sie die natürlichen Verhältnisse simulieren. Dieser Schluss wird durch die von Dratz *et al.* (1993) beschriebene Bindung eines C-terminalen 11mer-Peptides von α -G_i an Rhodopsin und die darauf folgende Stabilisierung der aktiven Form unterstrichen.

Graf *et al.* (1992) konnten mit Untersuchungen an freien Peptiden zeigen, daß Pertussis Toxin nicht, wie früher angenommen, ausschließlich die heterotrimeren G-Proteine erkennt. Vielmehr trifft zu, daß die Spezifität der Erkennung und Modifikation allein innerhalb der C-terminalen 20 Aminosäuren der α Untereinheiten bestimmt wird.

Diese Untersuchungen sind laut dem letztem Übersichtsartikel über ADP-ribosylierende Exotoxine (Krueger und Barbieri 1995) bis zur Veröffentlichung der ersten Teilergebnisse aus dieser Arbeit (von Olleschik *et al.* 1997) die einzigen, in denen die Modifikation synthetisch hergestellter Peptide durch Pertussis Toxin untersucht wurde.

1.7 Impfstoffe gegen Pertussis

Der erste, allgemein zugelassene Impfstoff gegen *B.pertussis* existiert seit den 50er Jahren (Griffiths 1988). Dabei handelt es sich um eine Suspension inaktivierter *B.pertussis*-Zellen in Kombination mit Diphtherie und Tetanus Toxoiden adsorbiert an $Al(OH)_3$.

Diese Ganzzellvakzine wurde zunächst in Nordamerika und dann weltweit eingesetzt (Durbin 1992). Die parentale Anwendung dieser mittlerweile standardisiert hergestellten Ganzzellvakzine verursacht bei Säuglingen häufig Fieber und lokale Rötungen an der Impfstelle die anschwellen und schmerzhaft sind.

Vermutungen, daß die Immunisierung vereinzelt auch darüber hinausgehende, schwere Schädigungen, bis hin zu plötzlichen Todesfällen, verursachen können, gelten mittlerweile als unbegründet.

Die beim Einsatz der Ganzzellvakzine auftretenden realen Nebenwirkungen und die Abnahme der Impfkzeptanz aufgrund der Diskussion um die erwähnten möglichen Zusammenhänge zwischen Impfung und schweren Schädigungen, haben in den letzten Jahren die Entwicklung neuer azellulärer Vakzinen gegen Keuchhusten vorangetrieben und gleichzeitig zur Bereitstellung umfangreicher Ressourcen zur Erforschung der Hauptpathogenitätsfaktoren von *B.pertussis* beigetragen (Wirsing von König und Finger 1995).

An azelluläre Impfstoffe sind einige wichtige Anforderungen zu stellen, damit sie die bisher eingeführten Ganzzellvakzinen ersetzen können:

- Sie müssen eine definierte Zusammensetzung besitzen und
- die enthaltenen toxischen Komponenten müssen irreversibel detoxifiziert sein.
- Es muß so wenig Lipopolysaccharid wie möglich enthalten sein.
- Die Vakzine darf keine oder nur minimale, lokale Nebenwirkungen hervorrufen.
- Sie darf keinerlei systemische Nebenwirkungen hervorrufen,
- muß mindestens ebenso wirksam sein wie die Ganzzellvakzine und
- sollte eine möglichst langandauernde Immunität hervorrufen (Wirsing von König und Finger 1995).

In den neu entwickelten und mittlerweile eingeführten azellulären Vakzinen werden von den *B.pertussis* spezifischen Virulenzfaktoren das Pertussis Toxin (PT), das Filamentöse Hämagglutinin (FHA), das Pertactin und Fimbrien (Fim) eingesetzt. Pertussis Toxin und bis auf eine Ausnahme auch FHA sind in allen neu entwickelten Vakzinen enthalten.

In den letzten Jahren wurden mehrere breit angelegte Impfstudien durchgeführt, um die Erfüllung der oben angeführten Kriterien zu überprüfen.

Eine Reihe von mehr als 100 Pre- und Postimmunseren aus zweier dieser Impfstudien sind in die innerhalb dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zur Detektion linearer und konformeller Epitope auf Pertussis Toxin durch humane Antiseren eingeflossen.

Bei einer dieser Vakzinen handelt es sich um die italienische Vakzine der Firma Chiron-Biocrine (Pizza *et al.* 1989, Rappuoli *et al.* 1992). Sie enthält im Gegensatz zu allen anderen neuen Pertussisvakzinen gentechnisch detoxifiziertes Pertussis Toxin, bei dem in der S1 Untereinheit die Aminosäurepositionen Arg9 und Glu129 gegen Lysin (K9) und Glycin (G129) ausgetauscht wurden. Im so veränderten Toxin ist die enzymatische Aktivität deaktiviert. Durch die Verwendung des bereits detoxifizierten Pertussis Toxins kann die bei allen anderen Vakzinen erforderliche chemische Detoxifizierung entfallen, was vermutlich zur Folge hat, daß die Epitopräsentation des rekombinanten Toxins der natürlichen Situation wesentlich besser entspricht als im Falle des chemisch detoxifizierten Toxins (Rappuoli *et al.* 1995).

Aus diesem Grund kommt die rekombinante Vakzine auch mit einer geringen Menge an Pertussis Toxin (5 µg pro Immunisierung) aus.

Die zweite Gruppe der hier betrachteten Seren stammt aus der in Deutschland durchgeführten Studie mit der Vakzine der Firma SmithKline, Beecham. Hier werden 25 µg chemisch detoxifiziertes Pertussis Toxin pro Dosis verwendet. Tabelle 1.1 zeigt die Zusammensetzung aller azellulären Pertussisvakzinen, die in den zwischen 1985 und 1995 durchgeführten Feldversuchen getestet wurden.

Hersteller - Bezeichnung (Feldversuch)	PT (μg)	FHA (μg)	Peractin (μg)	Fim (μg)	Seren in dieser Arbeit
Amvax (Schweden, Göteborg)	40	-	-	-	
Biocine (Italien)	5	25	2.5	2.5	x
Lederle/Takada (Deutschland, Erlangen)	3.2	34.4	1.6	1.6	
Mérieux (Senegal)	25	25	-	-	
Mérieux/Connaught Nr.1 (Schweden, Stockholm II)	10	5	3	3	
Mérieux/Connaught Nr.2 (Deutschland, München)	7.5	7.5	-	-	
SmithKline, Beecham Nr.1 (Deutschland, Mainz; Italien)	25	25	8	8	x
SmithKline, Beecham Nr.2 (Schweden, Stockholm II)	25	25	-	-	

Tabelle 1.1: Zusammensetzung azellulärer Pertussisvakzinen in den von 1985 bis 1995 durchgeführten Feldversuchen.

Die Vakzinen, die für die Immunisierung der in dieser Arbeit betrachteten Patientenserum verwendet wurden, sind gesondert markiert. Nach Wirsing von König und Finger (1995).

Weitere Ansätze für eine Impfstoffentwicklung sind perspektivisch durch synthetische Vakzinen gegeben, bei denen in der Regel synthetische Peptide an größere Moleküle mit T-Zell-Epitopen gekuppelt und dann für die Vakzinierung verwendet werden.

Als Peptide sind dabei antigene Determinanten aus den jetzt zum Einsatz kommenden azellulären Vakzinen zu verwenden. Hierfür werden Epitope ausgewählt, die unmittelbar Protektivität vermitteln, wenn gegen sie ein ausreichender Antikörpertiter aufgebaut ist.

Um derartige Aussagen zu treffen, ist eine detaillierte Kenntnis der in Frage kommenden Epitope und insbesondere ihre natürliche Erkennung durch das Immunsystem eine wichtige Grundbedingung.

Experimente in diese Richtung wurden bereits vor einigen Jahren durch Askelöf *et al.* (1990) und Schmidt und Schmidt (1989) beschrieben. Auch die Ergebnisse aus dieser Arbeit sollten für die Weiterverfolgung dieses Ansatzes neue Hinweise geben.

Bei allen bisher zum Einsatz kommenden Vakzinen gegen *B.pertussis* handelt es sich um intramuskulär zu applizierende Impfstoffe, die eine vorwiegend systemische IgM- und IgG-Immunantwort stimulieren. Wichtig für eine generelle Verhinderung der Besiedelung des respiratorischen Epithels ist jedoch, daß auch IgA-Antikörper auf den Schleimhäuten vorliegen. Dieses Ziel kann nur durch Entwicklungen von oralen Vakzinen erreicht werden, die auf geeigneten (Lebend-) Vektoren die für die Protektivität wichtigsten Kernepitope präsentieren und eine vollständige Abwehr ermöglichen. Hier gilt, ebenso wie für die azelluläre Impfstoffentwicklung, daß die Grundbedingung für erfolgversprechende Entwicklungen in der genauen Kenntnis der für die protektive Immunität in besonderer Weise relevanten und kritischen Epitope liegt.

1.8 Die Spotsynthese von Peptiden als Hilfsmittel für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beruhen in vielen Teilen auf der Anwendung einer von Ronald Frank (GbF, Braunschweig) etablierten Technik zur simultanen Synthese und Fixierung definierter Peptide an Cellulosemembranen (Frank 1992, Frank und Overwin 1996). Die Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit für den routinemäßigen Einsatz in molekularbiologisch orientierten Laboren optimiert. Die dargestellten Ergebnisse bei Fragestellungen zum Pertussis Toxin und zu einigen der bislang durchgeführten Kooperationsprojekte sollen ihre Potenz als Hilfsmittel bei der Beantwortung verschiedener immunologischer Fragestellungen demonstrieren.

Die Spotsynthese von Peptiden auf Cellulosemembranen basiert auf der Entwicklung spezieller molekularer Anker, mit denen eine Celluloseoberfläche kovalent derivatisiert werden und mit Aminofunktionen beladen werden kann. Mit der Einführung der ersten Aminofunktion ist der Einstieg in eine gezielte Synthese von Peptiden nach dem Prinzip der Fmoc-Synthese (Merrifield 1963 und 1986) möglich.

Ein entscheidender Faktor ist die Stabilität zwischen Anker und Cellulosemembran gegenüber allen während der Synthese der wachsenden Peptidkette und der abschließenden Abspaltung der Seitenschutzgruppen verwendeten Detergenzien und Chemikalien. Dies ist mit dem von Frank (1992) entwickelten β -Alaninanker, die über eine katalysierte Esterbindung kovalent an Hydroxylgruppen der Cellulosemoleküle gekuppelt werden, möglich, wenn der pH-Wert während der Synthese und der nachfolgenden Experimente im neutralen bis schwach sauren Bereich gehalten wird.

Mit der Einführung der Spotsynthesetechnik wird eine Eingrenzung von Struktur-Funktionsbeziehungen zwischen biologisch aktiven Proteinen wie z.B. Enzym-Substrat-Wechselwirkung, einfache Protein-Protein-Wechselwirkung, Antikörpererkennung linearer Epitope und Charakterisierung monoklonaler Antikörper in vielen Fällen überhaupt erst ermöglicht, da sie parallele Untersuchungen an einer Vielzahl von Proben unter identischen Versuchsbedingungen zulässt.

Detaillierte Untersuchungen in dem Bereich molekularer Interaktionen und die Möglichkeit, gezielte Massenmutationen zur Aufklärung intermolekularer Wechselwirkungen durchzuführen, ebenso wie die Möglichkeit des sequenziellen Abtastens eines ganzen Proteins durch einander in der Sequenz überlappende Teilpeptide, sogenannte „Pepscans“ sind für die infektiologische Forschung von großer Bedeutung, wenn es darum geht, wichtige Interaktionen innerhalb einer Wirts-Pathogen-Beziehung aufzuklären und zu verstehen.

1.9 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit hat das Ziel, neue Erkenntnisse für die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen von Pertussis Toxin im Rahmen seiner immunologischen Erkennung

durch humane Antiseren und der Substraterkennung durch die enzymatisch aktive S1 Untereinheit zu gewinnen.

Als Ausgangspunkt dienten die Arbeiten von Bärbel Raupach (1993). Sie hat eine erste, intensive Untersuchung der durch humane Antiseren erkannten linearen Epitope auf der S1 Untereinheit mit Hilfe von synthetischen C-terminal fixierten Peptiden durchgeführt. Die von ihr angewendete Methodik ließ jedoch, aufgrund des Auftretens von unspezifischem Hintergrund, nur eine partielle Abtastung der S1 Untereinheit zu.

Es sollte daher nach effektiven Möglichkeiten gesucht werden, um bei S1 und über alle fünf Pertussis Toxin Untereinheiten hinweg sämtliche immunologisch relevanten linearen B-Zell Epitope zu detektieren, die innerhalb einer durch Vakzinierung hervorgerufenen oder natürlich erworbenen Immunität von humanen Antiseren erkannt werden.

Als vielversprechender Ansatz bot sich eine neu publizierte Methode zur C-terminalen Fixierung und Synthese einer Vielzahl definierter Peptide auf Cellulosefiltern an (Frank 1992). Die Spot-Synthese von Peptiden auf Cellulosefiltern sollte daher als eine neue Technologie eingeführt und für den Routineeinsatz mit großen Probenzahlen optimiert werden.

Ebenso mußte eine Methode entwickelt werden, um die im Rahmen der durchgeführten Arbeiten anfallenden Versuchsergebnisse zumindest semiquantitativ zu bestimmen und vergleichbar darzustellen.

Die Kristallstruktur von Pertussis Toxin war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht publiziert. Da jedoch davon auszugehen war, daß die Kristallstrukturdaten im Verlauf der Arbeit allgemein verfügbar gemacht sein sollten, galt es nach geeigneten Möglichkeiten zu suchen, um die Strukturdaten in die weiterführende Auswertung und Präsentation der Versuchsergebnisse einfließen zu lassen.

Für das Ziel, detailliertere Informationen über sequenzspezifische Faktoren bei der Erkennung und Modifikation der α Untereinheiten von G-Proteinen durch die S1 Untereinheit von Pertussis Toxin zu gewinnen, sollte gleichfalls die Spotsynthese von Peptiden auf Cellulosefiltern eingesetzt werden. Es galt zu prüfen, ob sie sich als Methode zur Untersuchung der Substraterkennung und Modifikation von Peptiden durch Enzyme eignet und helfen mit ihrer Hilfe die bisher vorliegenden Erkenntnisse erweitert werden könnten.

Da die Spotsynthese von Peptiden innerhalb dieser Arbeit als neue Technik für die Beantwortung von Fragestellungen im infektiologischen Umfeld eingeführt wurde, sollten abschließend ggf. weitere, damit zu bearbeitende Fragestellungen aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Gerätebezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Achtkanalpipette (Modell CA-200-8A)	SLT Labinstruments, Crailsheim
Bio Imager Fuji BAS 1000	Raytest, Straubenrath
CovaLink-ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
ELISA-Platten, E.I.A./R.I.A. Flachboden, hohe Bindungskapazität	Costar, Bodenheim
ELISA-Lesegerät, EMAX precision reader	Molecular Devices, Sunydale, USA
Gibson Einkanalpipetten	Abimed, Langenfeld
Hyperfilm-β-max	Amersham, Braunschweig
pH-Meter	Beckman, München
Pipettierroboter, AMS 422	Abimed, Langenfeld
Scanner, UMAX UC 640 und ScanMaker III	Microtek, Eggenstein
Tischzentrifuge Micro-Centaur	MSE Scientific Instruments, Sussex, England
Ultraschallgerät, Modell 5210	Bandelin, Berlin
Cellulosemembran, Whatman 540 Papier, Whatman 3MM	Whatman, Kent, England

Tab. 2.1: Spezielle und häufig verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

2.1.2 Seren

2.1.2.1 Gewinnung von Seren aus Blutproben

Zur Gewinnung von Serum aus Blutproben wird das Blut in 2 ml Plastikreaktionsgefäßen für 1 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der Blutkuchen wird in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 11,6 g abzentrifugiert und das Serum als Überstand entnommen.

Zur Verhinderung von Kontaminationen wird 0,03% NaN₃ zugegeben, die Seren schockgefroren und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.1.2.2 Humanseren nicht geimpfter Kinder

Für Untersuchungen mit Humanseren sind von einer Reihe von Kinderärzten aus der näheren Umgebung von Münster Blutproben nicht immunisierter Kinder mit Keuchhustenverdacht zur Verfügung gestellt worden. Von diesen wird Serum gewonnen und in Aliquots zu jeweils 100 µl bei -20°C gelagert.

Seitens der Kinderärzte liegt eine „Verdachts“-Diagnose, z.T. ein ELISA-Titer sowie eine Geschlechts- und Altersangabe vor. Ein Teil dieser Seren wurde bereits in einer früheren Promotionsarbeit eingesetzt (Raupach 1993). Nähere Angaben zu den gesammelten Seren finden sich im Anhang der Arbeit.

2.1.2.3 Humanseren aus einer italienischen Impfstudie

Die Seren für die Untersuchungen zur Veränderung der Immunantwort gegen lineare Epitope entstammen einer klinischen Studie mit der italienischen rekombinanten azellulären Pertussis Vakzine der Firma Biocine (Podda *et al.* 1994).

Es liegen Patienteninformationen über Geschlecht, interne Testergebnisse über den IgG-Titer, Zeitpunkt der Erstimmunisierung sowie Zeitpunkt der Boosterimmunisierung vor. Die Serumproben repräsentieren den Immunstatus vor und einige Wochen nach der Boosterimmunisierung. Die Daten zu den Seren finden sich im Anhang der Arbeit.

2.1.2.4 Humanseren aus einer deutschen Impfstudie mit APV 50

Weitere Seren für Untersuchungen zur Veränderung der Immunantwort gegen lineare Epitope entstammen einer klinischen Studie mit dem azellulären Impfstoff APV 50 (Wirsing von König pers. Mittlg.). Im Rahmen dieser Studie wurde den Patienten jeweils nach einer Erstimmunisierung und nach einer Boosterimmunisierung Serum entnommen.

Prof. Dr. C.W. Wirsing von König, Städtische Krankenanstalten Krefeld, stellte diese Seren freundlicherweise zur Verfügung. Die Daten zu den Seren finden sich im Anhang der Arbeit.

2.1.2.5 Kaninchenseren

Die verwendeten Kaninchenseren gegen Pertussis Toxin (Holotoxin, Untereinheiten) wurden im Labor von Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt von Frau Bärbel Raupach (Raupach 1993) präpariert und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Peptide

Für die kovalente Fixierung von Peptiden auf ELISA-Platten wurden mehrere synthetische Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest synthetisiert. Die Synthese erfolgte bei Herrn Dr. Rainer Frank (ZMBH, Heidelberg).

Die mit 721-C, 722-C und 723-C bezeichneten Peptide (vgl. Tab. 2.2) entsprechen den von Raupach (Raupach 1993) als potentiell spezifisch für die differentielle Diagnose akuter Infektionen identifizierten Epitopen auf der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position innerhalb von S1</i>
Peptid 721-C	PPATV YRYDS RPPE-C	3-16
Peptid 722-C	DVFQN GFTAW GNND-C	17-30
Peptid 723-C	AMAAW SERAG EA-C	211-222

Tab. 2.2: Synthetische Peptide für die C-terminale Fixierung auf ELISA-Platten.

2.1.4 Proteine, Enzyme, Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft / Hersteller</i>
Pertussis Toxin (0,7 mg/ml)	Institut Mérieux, Lyon
Transducin	von Herrn Dr. P. Gierschick und Frau Dr. M. Champs (Inst. für Pharmakologie; DKFZ - Heidelberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt
Humanes Transferrin HRP-hTf (Peroxidase-conjugated ChromPure Human Transferrin)	Jackson Immuno Research Labs, PA, USA
Anti-Mensch-IgG (H+L) aus Ziege	Jackson Immuno Research Labs, PA, USA
Ziege-anti-Mensch-Antikörper, an alkalische Phosphatase gekuppelt	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, an alkalische Phosphatase gekuppelt	Dianova, Hamburg
monoklonaler anti-S1 Antikörper 6FX1	von Frau Dr. Drusilla Burns (FDA, Bethesda, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Tab. 2.3: Spezielle Proteine, Enzyme und Antikörper

2.1.5 Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft, Hersteller</i>
ABTS-Substratlösung	Boehringer, Mannheim
Aminosäuren und Pfp-Ester	Novabiochem, Bad Soden
Blocking-Puffer (10x)	Genosys, Ismaning
BM blue POD Substrat, präzipitierend	Boehringer, Mannheim
Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz (BCIP)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Citronensäure-1-Hydrat	Roth, Karlsruhe
Diisopropylcarbodiimid	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäureanhydrid (Ac ₃ OH)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Novabiochem, Bad Soden
1-Methylimidazol (MELM)	Merck, Darmstadt
1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Fluka, Neu-Ulm
N,N,-Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
N- α -Carboanhydride (NCAs)	Neosystems, Strassbourg
NaN ₃	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
Piperidin	Fluka, Neu-Ulm
Trifluoressigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Triisobutylsilan (TIBS)	Aldrich, Steinheim
Tween 20	Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden

Tab. 2.4: Häufig eingesetzte Chemikalien und Kurzbezeichnungen.

Tabelle 2.4 enthält die innerhalb der hier beschriebenen Arbeiten regelmäßig eingesetzten Chemikalien. Alle weiteren, in dieser Arbeit genannten und nicht in Tabelle 2.4 aufgeführten Chemikalien wurden von Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) in der jeweils besten, kommerziell erhältlichen Qualität bezogen.

2.1.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Bindungspuffer	5 mM MgCl ₂ , 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
Blockierungslösung	0,05% Tween, 5% Saccharose, 20% Blocking-Puffer, 80% TBS, pH 7.0
BPB-Lösung	1% Bromphenolblau in DMF
Cappinglösung	2% Essigsäureanhydrid in DMF
CBS	0,8% NaCl, 0,02% KCl, 10 mM Citronensäure-1-Hydrat, pH 7
Cova-Puffer	2 M NaCl, 40 mM MgSO ₄ , 0,05% Tween 20 in PBS
Derivatisierungslösung (pro Blatt 3 ml)	140 mg Fmoc-β-Ala-OH in 2,245 ml DMF, 105 μl DICD (10 Minuten Reaktionszeit für die Bildung des Harnstoffderivates), 45 μl MELM
Diethanolaminpuffer	10% Diethanolamin, 5 μM MgCl ₂ , 0,02% NaN ₃ in H ₂ O, pH 9,8
EDC-Lösung	6,5 mM EDC in H ₂ O
Färbelösung (AP)	5 mM MgCl ₂ , 0,4% Stammlösung BCIP, 0,6% Stammlösung MTT in CBS
Färbelösung (AP2)	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris-Base, 0,3% Stammlösung NBT, 0,3% Stammlösung BCIP
Färbelösung-AP	1mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer
PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM NaH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, pH 7,2
Piperidinlösung	20% Piperidin in DMF
Puffer A (Peptidsynthese)	8 M Harnstoff, 1% SDS, 0,5% Mercaptoethanol, pH 7,0 mit Essigsäure
Puffer B (Peptidsynthese)	10% Essigsäure, 50% EtOH, 40% H ₂ O
Stammlösung BCIP	6 % BCIP in DMF (Lagerung -20°C)
Stammlösung MTT	5% MTT in DMF(70%)/H ₂ O (30%) (Lagerung -20°C)
Stammlösung NBT	5% NBT in 70% DMF, 30% H ₂ O (Lagerung 4°C)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
T-TBS	0,05% Tween 20 in TBS
TBS	0,8% NaCl, 0,02% KCl , 50 mM Tris, pH 7,0 mit HCl
TFE-Abspaltlösung	45% CHCl ₂ , 3% TIBS, 50% TFA, 2% H ₂ O
Waschpuffer	0,06% Brij in PBS

Tab.2.5: Häufig eingesetzte Puffer und Lösungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Peptidsynthesen auf Cellulosefiltern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Peptidsequenzen in Form von Pepscans auf Cellulosefiltern synthetisiert, um damit weitere Untersuchungen bezüglich der Erkennung linearer Epitope durch Antikörper, Enzym-Substraterkennung und Protein-Protein-Wechselwirkung durchzuführen. Untersucht wurden Untereinheiten von Pertussis Toxin sowie verschiedene bakterielle Transferrin bindende Proteine.

Grundlage für die Durchführung der Pepscans von Pertussis Toxin bilden die Aminosäuresequenzdaten der fünf Untereinheiten aus der SWISSPROT-Datenbank (Tab. 2.6).

<i>Bezeichnung</i>	<i>SWISSPROT-Sequenz</i>	<i>Zugriffscodes</i>
S1 Untereinheit	TOX1_BORPE	P04977
S3 Untereinheit	TOX2_BORPE	P04978
S3 Untereinheit	TOX3_BORPE	P04879
S4 Untereinheit	TOX4_BORPE	P04980
S5 Untereinheit	TOX5_BORPE	P04981

Tab. 2.6: Pertussis Toxin.

Bezeichnungen der fünf Pertussis Toxin Untereinheiten und der verwendeten Zugriffscodes in der SWISSPROT-Sequenzdatenbank.

Für die Synthese auf den Filtern werden die Sequenzen der 5 Untereinheiten als 12mere mit jeweils 10 Aminosäuren Sequenzüberlappung (bzw. jeweils 2 Aminosäuren Sequenzversatz zwischen den Peptiden) auf Cellulosefiltern synthetisiert.

Die vollständigen Sequenzen sind im Anhang der Arbeit zu finden.

Die Grundlage für die ebenfalls angefertigten Pepscans von humanes Transferrin bindendem Protein und porcines Transferrin bindendem Protein bilden ebenfalls Aminosäuresequenzdaten aus der SWISSPROT-Datenbank. Für den Pepscan der humanes Transferrin bindenden Proteine wurden die kodierenden Bereiche der Vorläufermoleküle (Precursor) des Transfer-

rin bindenden Proteins 2 (TbpB) von *N.meningitidis* der Stämme B16B6 und M982 eingesetzt (Tab. 2.7).

Bezeichnung	SWISSPROT-Sequenz	Zugriffscod
TbpB <i>N. meningitidis</i> Stamm B16B6	TB22_NEIME	Q06988
TbpB <i>N. meningitidis</i> Stamm M982	TB21_NEIME	Q09057

Tab. 2.7: **Transferrin bindendes Protein B (TbpB) aus *N.meningitidis*.**
Bezeichnungen der Proteine und der verwendeten Zugriffscodes in der SWISSPROT-Datenbank.

Für die Synthesen werden die Sequenzen als 18mere mit jeweils 16 Aminosäuren Sequenzüberlappung auf Cellulosefiltern synthetisiert.

Zur Untersuchung der Bindung von porcines Transferrin bindendem Proteins von *A. pleuropneumoniae* (TfbA) werden Pepscans, zusammengesetzt aus 16meren und für die Abschätzung der minimal benötigten Epitoplänge aus 15meren mit jeweils 14 Aminosäuren Sequenzüberlappung, angefertigt.

Die Aminosäuresequenz von TfbA war zum Zeitpunkt dieser Arbeiten noch nicht in der SWISSPROT-Datenbank verfügbar und wurde von Katrin Strutzberg, Tiermedizinische Hochschule Hannover, im Rahmen einer Kooperation zur Untersuchung der Transferrin bindenden Domänen im TfbA zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Sequenzen finden sich im Anhang der Arbeit.

2.2.1.1 Derivatisierung von Cellulosefiltern mit funktionellen NH₂-Gruppen

Damit Cellulosefilter nach dem Prinzip der Fmoc-Synthese mit Peptiden beladen werden können, müssen für den Synthesestart freie Aminofunktionen als Anker für die Synthese zur Verfügung stehen.

Um lineare, nicht immunogene Anker auf dem Filter aufzubauen, werden freie Hydroxylgruppen der Cellulosemoleküle mit β -Alanin verestert.

Die Synthese zum Ester erfolgt nur unter absolut wasserfreien Bedingungen. Ebenso muß das bei der Synthese freiwerdende Wasser konstant aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden, um die Reaktion in Richtung der gewünschten Produkte (Ester) zu verschieben und die Hydrolyse der eingesetzten Aktivester zu vermeiden.

Als Filter werden Whatman 540 Papiere auf eine Größe von 9x13 cm zugeschnitten oder gestanzt und für 24h im Exsikator über Kieselgel getrocknet.

Die Filter werden in einer luftdicht verschlossenen Glaspetrischale mit jeweils 3 ml Derivatisierungslösung für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Kontrolle der Derivatisierungseffizienz wird ein Filterabschnitt von ca. 1 cm² mitbehandelt und nach 2 Stunden dem Reaktionsansatz entnommen.

Der Filterabschnitt wird 4 mal mit jeweils 2 ml DMF für 1 Minute in einem Schnappdeckelglas geschüttelt.

Anschließend wird der Filterabschnitt zum Entschützen der Aminofunktionen für 5 Minuten unter Schütteln in 1 ml Piperidinlösung inkubiert und wiederum viermal mit DMF gewaschen.

Zum Färben des Filterabschnitts werden 2 ml DMF mit 50 µl BPB-Färbelösung versetzt und der Filterabschnitt darin inkubiert, bis er tiefblau gefärbt ist.

Durch dreimaliges Waschen mit EtOH wird der Filterabschnitt entwässert und überschüssige Färbelösung entfernt.

Der Filterabschnitt wird getrocknet und in einem neuen Gefäß mit 2 ml Piperidinlösung geschüttelt, bis er wieder vollständig entfärbt ist.

Der blau gefärbte Überstand wird im Photometer gemessen. Dazu werden für die Meßlösung 100 µl entnommen und mit 2 ml Piperidinlösung in DMF vermischt und in die Meßküvette gegeben. In die Vergleichsküvette werden 2 ml 20% Piperidin in DMF eingefüllt und die OD bei $\lambda = 605$ nm gemessen.

Die Beladung mit Amin berechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$.

Der Extinktionskoeffizient für Bromphenolblau ist: $\epsilon_{605} = 95000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Somit ergibt sich als Formel für die Beladung mit Aminofunktionen:

$$\text{Amin [mmol/cm}^2\text{]} = \frac{\text{OD}_{605} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen Entfärbelösung [ml]}}{95 \times \text{Filterfläche [cm}^2\text{]}}$$

Eine effektive Beladung eines Whatman 540 Filterpapiers liegt vor, wenn mindestens ein Wert von 0,2 µmol/cm² Amin erreicht wird.

Nach 3 Stunden wird der zu beladene Filter auf einem Wipptisch dreimal mit 15 ml DMF (30", 2 x 2') gewaschen, um überschüssige Derivatisierungslösung auszuwaschen.

Durch 20-minütige Inkubation mit Piperidinlösung werden die Aminofunktionen des β -Alanins entschützt. Das Piperidin wird durch viermaliges Waschen mit jeweils 15 ml DMF (30", 3 x 2') wieder ausgewaschen und der Filter zum Dehydrieren dreimal mit 15 ml EtOH (30", 2 x 2') gespült.

Der Filter wird zwischen Whatman 3MM Filterpapier eingelegt, durch kaltes Föhnen getrocknet und über Nacht im Exsikator über Kieselgel inkubiert.

Damit ist der Filter vollflächig mit β -Alanin beschichtet.

Um einen linearen Abstandshalter (Spacer) zu erhalten wird ein zweites β -Alanin im Raster der gewünschten Synthese an die freien Aminofunktionen der β -Alanin-Grundbeschichtung gekuppelt. Dazu wird eine frische 0,3 M Fmoc- β -Ala-OBt Lösung (vgl. Tab. 2.10) angesetzt. Für die nachfolgende Synthese von bis zu 425 Peptiden auf einem Filter werden die Filter mit einem Bleistift beschriftet, eine Ecke abgeschnitten und auf die Haltenadeln der Pipettierplatte des Pipettierroboters gesteckt und so eindeutig und reproduzierbar fixiert.

Mit Hilfe des Pipettierroboters und einer Stahlkanüle werden jeweils 0,2 µl der aktivierten β-Alanin-Derivat Lösungen in einem Raster von 17 x 25 aufgespottet, 10 Minuten Inkubationszeit abgewartet, der Spotvorgang einmal für alle Positionen wiederholt und der Filter dann 45 Minuten ruhen gelassen, um eine ausreichende Reaktionszeit zu gewähren.

Die Kontrolle der Reaktion erfolgt durch die Farbveränderung des in der Spotlösung befindlichen Bromphenolblaus.

Unmittelbar nach dem Aufspotten verfärbt sich die Pipettierposition dunkelblau, was das Vorhandensein freier Aminofunktionen anzeigt.

Im Verlauf der Reaktion verschiebt sich diese Färbung zu grün bis gelb. Dies ist die Folge der Abnahme der freier Aminofunktionen als Folge der Kupplungsreaktion.

Die Intensität des Farbumschlages ist nicht über alle verwendeten Derivate hinweg gleichartig sondern unterschiedlich stark ausgeprägt.

Verbliebene freie Aminofunktionen auf der Filteroberfläche werden im nächsten Schritt mit Essigsäureanhydrid umgesetzt und dadurch blockiert, so daß zwar verkürzte, jedoch keine Fehlketten synthetisiert werden können.

Dazu wird der Filter zweimal für 30 Sekunden und dann für 1 Stunde unter Schwenken in jeweils 15 ml frischer Cappinglösung inkubiert.

Zur Kontrolle der Blockierung wird nach einer Stunde 30 µl 1% BPB in DMF zugegeben. Der Filter darf sich daraufhin gerade noch hellgrün verfärben, andernfalls sind noch zu viele Aminofunktionen nicht blockiert.

Anschließend wird der Filter zweimal für 30 Sekunden und einmal für 2 Minuten in je 15 ml DMF gewaschen.

Abschließend erfolgt dreimaliges Waschen in jeweils 15 ml EtOH (2 x 30", 1 x 2') und Trocknen des Filtern mit Whatman 3MM Filterpapier und kaltem Fönen.

Die Filter werden über Nacht im Exsikator an der Ölpumpe getrocknet, eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt.

Zur Erstentschützung eines neuen Filters (s.o.) wird dieser auf Raumtemperatur erwärmt, aus der Folie entnommen und in eine Reaktionswanne aus Glas, Teflon oder Polypropylen (PP) gelegt.

Zum Entfernen der Schutzgruppen an den terminalen Aminofunktionen der Ankerenden wird der Filter für 5 Minuten in 15 ml Piperidinlösung inkubiert und dann viermal in 15 ml DMF gewaschen (1 x 30", 3 x 2')

Durch dreimaliges Waschen in jeweils 15 ml EtOH (30", 2 x 2') wird das DMF entfernt und der Filter daraufhin zwischen Filterpapier eingelegt und durch kaltes Abfönen getrocknet.

Damit ist der Filter für den Beginn der eigentlichen Spotsynthese der zur fixierenden Peptide vorbereitet.

2.2.1.2 Spotsynthese

Für die Spotsynthese von Peptiden werden die unter 2.2.1.1 beschriebenen, derivatisierten und mit 2mer β -Alaninankern versehenen Filter eingesetzt.

Vor dem Beginn der Synthese werden zunächst die benötigten 0,3 molaren Aktivester- bzw. NCA-Lösungen der benötigten Aminosäuren hergestellt (Tabelle 2.8).

Aminosäurederivat	MG g/mol	eingewogene Menge in mg/ml (0,3M)	zugesezte Menge HOBt in mg/ml
Fmoc-Ala-OPfp-Ester	477,4	143	10
Fmoc-Xys (Acm)-OPfp-Ester	580,6	174	10
Fmoc-Asp (OtBu)-OPfp-Ester	577,5	174	10
Fmoc-Glu (OtBu)-OPfp-Ester	591,6	180	10
Fmoc-Phe-OPfp-Ester	553,5	166	10
Fmoc-Gly-OH	297,3	89	70
Fmoc-His (Trt)-OPfp-Ester	785,8	190	10
Fmoc-Ile-NCA	379,4	190	-
Fmoc-Lys (Boc)-OPfp-Ester	634,6	190	10
Fmoc-Leu-NCA	379,4	190	-
Fmoc-Met-OPfp-Ester	537,5	161	10
Fmoc-Asn (Trt)-OPfp-Ester	762,7	156	10
Fmoc-Pro-OPfp-Ester	503,5	151	10
Fmoc-Gln (Trt)-OPfp-Ester	776,8	161	10
Fmoc-Arg-(Pmc)OH	662,8	459	70
Fmoc-Ser(tBu)-ODhbt	528,6	160	10
Fmoc-Thr-OPfp-ODhbt	542,6	163	10
Fmoc-Val-NCA	356,4	183	-
Fmoc-Trp (Boc)-OPfp-Ester	692,7	208	10
Fmoc-Tyr (tBu)-OPfp-Ester	625,6	190	10

Tab. 2.8: Übersicht über die für die Fmoc-Synthese eingesetzten Aminosäure-derivate und zugegebene Mengen an HOBt.

Die für 1 ml benötigten Mengen an Aminosäurederivaten werden jeweils in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen, die benötigte Menge an HOBt zugewogen und in jeweils 1 ml NMP gelöst.

Die gelösten Derivate werden in Aliquots von 250 μ l abgefüllt, unter Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Je ein Aliquot (250 μ l) der benötigten AS-Lösungen wird zu Beginn eines Synthesetages aufgetaut.

Den Ansätzen mit den zugewogenen PfP-Estern und freien Aminosäuren werden jeweils 7 μ l DICD zugegeben, sorgfältig durchmischt und alle Lösungen abzentrifugiert, um ggf. auskristallisierte AS zu pelletieren. Nach einer Aktivierungszeit von 45 Minuten können die Lösungen verwendet werden.

Die Synthese findet bis zum vollständigen Kettenaufbau in einer immer gleichbleibenden Abfolge statt.

Der frisch entschützte, trockene Filter wird in die Pipettierenebene des Roboters eingelegt und auf den Stecknadeln in seiner Position fixiert.

Je Syntheseschritt werden durch den Pipettierroboter jeweils zweimal 0,2 μ l aktiviertes Aminosäurederivat aufgespottet und mindestens 10 Minuten Reaktionszeit zwischen den beiden Spotzyklen und der anschließenden Weiterbearbeitung abgewartet.

Der gespottete Filter wird aus der Apparatur entnommen und in eine DMF-resistente Wanne gelegt. Alle folgenden Schritte werden unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch durchgeführt.

Die Blockierung nicht abgesättigter Aminofunktionen erfolgt durch zweimaliges Inkubieren in je 15 ml Cappinglösung (1 x 30", 1 x 10').

Nach dreimaligem Waschen in je 15 ml DMF (1 x 30", 2 x 2') werden die Fmoc-Schutzgruppen der verlängerten Ketten abgespalten. Dazu wird der Filter für 10 Minuten in 10 ml Piperidinlösung inkubiert.

Das Piperidin wird im nächsten Schritt durch viermaliges Waschen in je 15 ml DMF (1 x 30", 3 x 2') vollständig ausgewaschen.

Die entschützten Aminofunktionen der Kettenenden werden durch Inkubation in Bromphenolblau-Lösung (100-fach verdünnt in DMF) blau angefärbt und abschließend DMF und überschüssiges BMP durch dreimaliges Waschen in EtOH entfernt (1 x 30", 2 x 2').

Der Filter wird aus dem Reaktionsgefäß entnommen, zwischen Filterpapier vorgetrocknet, kalt trockengeföhnt und wieder in die Pipettierenebene eingelegt. Weitere Synthesezyklen schließen sich an.

Die gesamte Kettenverlängerung erfolgt jeweils wie oben beschrieben und wird erst nach der Kupplung der letzten Aminosäure des längsten Peptids einer Syntheserie leicht abgewandelt.

Im letzten Zyklus wird der Filter nach dem Spotten direkt dreimal mit 15 ml DMF gewaschen (1 x 30", 2 x 2') und dann wie oben beschrieben mit Piperidinlösung entschützt, gewaschen und gefärbt.

Vor dem abschließenden Waschen in EtOH wird ein Endcappingsschritt mit zweimal 15 ml Cappinglösung (1 x 30", 1 x 10') einführt und nochmals dreimal in je 15 ml DMF gewaschen (1 x 30", 2 x 2').

2.2.1.3 Entschützen der Seitenketten

Vor der Verwendung des Filters sind die Schutzgruppen der Seitenketten mit Trifluoressigsäure abzuspalten.

Dazu werden in einer verschließbaren Reaktionswanne unter vorsichtigem Schwenken 20 ml der TFE-Abspaltlösung angesetzt. Der trockene Filter wird in die Abspaltlösung eingelegt und die Reaktionswanne sofort luftdicht verschlossen, um das Verdampfen des Dichlormethans in der Abspaltlösung zu verhindern.

Nach einer Inkubationszeit von 1h auf dem Schüttler wird die TFE-Abspaltlösung durch frische Lösung ersetzt und der Filter für eine weitere Stunde inkubiert.

Der Filter wird nach dem Abspaltvorgang zunächst viermal in je 15 ml CHCl_2 (1 x 30", 3 x 2') und dann dreimal in jeweils 15ml DMF (1 x 30", 2 x 2') gewaschen, um die TFE-Abspaltlösung auszuwaschen.

Falls in der Kette Fmoc-Trp-(Boc)-Schutzgruppen eingesetzt wurden, werden diese durch dreimaliges Inkubieren des Filters in 15 ml 1 M Essigsäure (1 x 30", 2 x 5') abgespalten.

Abschließend wird der Filter dreimal in EtOH (1 x 30", 2 x 2') gewaschen.

Der ethanolfeuchte Filter kann direkt verwendet werden. Alternativ wird er getrocknet, in Kunststoffolie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Bindung und Nachweis der Bindung von Human- und Kaninchenserum an Pepsicans von Pertussis Toxin

Für die Detektion der Bindung von Antiserum an die Pepsicans von Pertussis Toxin wird der trockene Filter mit dem zu untersuchenden Pepsican in Ethanol getränkt, um hydrophobe Wechselwirkungen zu neutralisieren, und dann das Ethanol durch dreimaliges Waschen mit TBS ausgewaschen.

Der Filter wird in einer verschließbaren Reaktionswanne über Nacht in 15 ml Blockierungslösung inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen in T-TBS (1 x 30", 2 x 2') wird der Filter für 4 Stunden mit 10 ml des zu untersuchenden Humanserums (1:100 verdünnt in Blockierungslösung) inkubiert.

Anschließend wird der Filter wiederum dreimal mit T-TBS gewaschen und der Filter mit dem Zweitantikörper (Ziege-anti-Mensch IgG(H+L) F(ab')₂-Fragmente, gekuppelt an alkalische Phosphatase, 1:5000 verdünnt in Blockierungslösung) inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wird er nochmals dreimal mit T-TBS (1 x 30", 2 x 2') und danach zweimal mit CBS (2 x 2') gewaschen.

Die Farbentwicklung erfolgt für 30 Minuten durch Überschichten mit Färbelösung-AP.

Vor der Signaldetektion wird die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit CBS beendet und der feuchte Filter im Flachbettscanner eingescannt.

Um ein Stripping und Wiederverwenden des Antikörpers zu ermöglichen, wird der Filter feucht und für maximal 24h bei 4°C gelagert.

Zur Kontrolle einer möglichen Kreuzreaktion des 2. Antikörpers mit den Peptiden wird das beschriebene Verfahren ohne Antiserum durchgeführt.

Die in dieser Kontrollreaktion auftretenden Kreuzreaktionen werden ggf. für die spätere Auswertung notiert und anschließend der Filter gestrippt.

2.2.1.5 Bindung und Nachweis der Bindung von humanem Transferrin an Pepsans von Transferrin bindendem Protein

Die Bindung von humanem Transferrin an Pepsans von Transferrin bindendem Protein erfolgt wie für die Bindung von Human- und Kaninchenseren mit den im folgenden beschriebenen Änderungen.

Für die Bindung werden die Filter mit je 10 ml Blockierungslösung mit 30 mg/ml HRP-hTf für 2 Stunden inkubiert.

Der letzte Waschschrift vor der Färbung erfolgt nicht mit CBS sondern mit PBS. Für die Färbung selbst wird BM blue POD-Substrat nach Angabe des Herstellers unverdünnt eingesetzt und die Reaktion nach 1, 3 oder maximal 20 Minuten durch mehrmaliges Waschen in H₂O abgebrochen und der feuchte Filter im Flachbettscanner eingescannt.

2.2.1.6 Quantifizierung von Farbreaktionen auf Membranen

Zur Quantifizierung der Farbreaktionen auf Membranen werden die Filter als Farbbilder mit einem UMAX UC840 Desk Top Scanner, angeschlossen an einen farbkalibrierten Apple Macintosh Power PC in einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und für die weitere Verarbeitung in Graustufenbilder (8 bit) konvertiert und im Tiff-Format gespeichert.

Zur Bestimmung der relativen Intensität wird die im „Public Domain“ befindliche Grafiksoftware „NIH Image 1.61“ (URL = <ftp://zippy.nimh.nih.gov/pub/nih-image/>) von Wayne Rasband (Rasband und Bright 1995) eingesetzt. Diese Software ermöglicht den direkten Bildimport über dem Scanner zugehörige Adobe Photoshop-kompatible PlugIn-Scan-Module oder über die integrierten Grafikimportfilter.

Die auszumessenden Bereiche werden nicht in Form von Einzelpunktmessungen, sondern als Serie gleichgroßer Flächen (Rechtecke, Kreise) bestimmt. Die Software erfaßt die Intensität dieser Bereiche als relative Intensität/mm².

Die Ergebnisse liegen in Form von ganzzahligen Werten zwischen 1 und 255 (8-bit Graustufen) als exportierbare Tabellen vor.

Die Weiterverarbeitung kann mit jeder Grafikverarbeitungssoftware erfolgen, die in der Lage ist, wissenschaftliche Daten in Tabellenform zu importieren. Als gut geeignet für die graphische und mathematische Weiterverarbeitung hat sich das Programm „DeltaGraphPro 4.04“ (Statistical Products & Service Solutions Inc. (SPSS), Chicago) erwiesen.

Alternativ zur Auswertung mit der NIH Image Software wird die Quantifizierung in einigen Fällen auch mit dem Auswertungsmodul der „Fuji MacBAS“ Bioimager-Software durchgeführt.

2.2.1.7 Antikörperstripping von Pepsans

Zum Strippen von Pepsans, die mit Antikörpern beladen sind, wird der feuchte Filter in eine DMF-stabile Kunststoffwanne gelegt und zweimal für 2 Minuten mit jeweils 15 ml H₂O gewaschen. Zum Entfernen des Farbstoffs wird der Filter anschließend einmal für 2 Minuten mit DMF vorgewaschen. Das gebrauchte DMF wird durch frisches DMF ersetzt und die Wanne im Ul-

traschallbad bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis die Farbe vollständig aus dem Filter herausgelöst ist. Das DMF wird erneut durch frisches ersetzt und der Filter darin wieder für 2 Minuten gewaschen.

Zur Vorbereitung der Umpufferung wird der Filter dreimal mit je 15 ml H₂O (30", 2 x 2') gewaschen.

Zur Destabilisierung und Ablösung der Antikörper wird dreimal für 10 Minuten mit Puffer A gewaschen. Dabei wird jeweils für die ersten 5 Minuten der Filter in auf 40°C erhitztem Puffer A im Ultraschallbad bei 40°C und für die restliche Zeit des Waschschrilles bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert.

Im nächsten Schritt wird der Filter zu Restabilisierung dreimal für jeweils 5 Minuten mit jeweils 15 ml Puffer B gewaschen.

Abschließend wird er noch dreimal (1 x 30", 2 x 2') in jeweils 15 ml EtOH gewaschen und dann entweder naß weiterverwendet oder zwischen Filterpapier eingelegt und kalt trocken-gefönt. Der trockene Filter wird in Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 ELISA-Methoden

2.2.2.1 Kovalente Fixierung von Peptiden an ELISA-Platten

Für die kovalente Fixierung von Peptiden an ELISA-Platten werden diese über ihre Carboxylgruppen an Abstandshaltermoleküle (Spacer) mit sekundären Aminofunktionen gekuppelt. Bei den verwendeten Platten vom Typ CovaLink (Nunc, Roskilde, Dänemark) liegen entsprechende Abstandshalter bereits in einer Länge von 2 nm fixiert an die Polystyroloberfläche der ELISA-Platten vor.

Zur Kupplung von Peptiden an die Abstandshaltermoleküle wird wie folgt vorgegangen (vgl. Staros 1986):

Die zu kuppelnden Peptide werden als Stammlösung in einer Konzentration von 12 mg/ml in 40% H₂O und 60% DMSO gelöst.

Zu je 250 µl Peptidstammlösung werden 46 mg Sulfo-NHS und 2,5 ml H₂O gegeben und jeweils 50 µl der Peptid/NHS-Lösung in jede zu beschichtende Vertiefung der CovaLink ELISA-Platten einpipettiert.

Anschließend wird in jede Vertiefung 50 µl EDC-Lösung pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Kupplung erfolgt über die Aktivierung der Carboxylgruppe des Peptids durch die Carbo-diimidgruppe des EDC (Übergangsprodukt ist ein O-Acyl-Harnstoff) und deren Austausch durch Angriff der Hydroxylgruppe des NHS.

Das so aktivierte, weitgehend gegen Hydrolyse stabilisierte Peptidderivat reagiert mit der sekundären Aminogruppe des Linkers zu einem sekundären Säureamid unter Freisetzung von NHS.

Nach Abschluß der Kupplungsreaktion werden die Vertiefungen entleert und dann dreimal mit jeweils 200 µl Cova-Puffer gespült, der Puffer nach dem dritten Waschschrift für 15 Minuten in den Vertiefungen belassen und dann abgesaugt.

Die Platten mit den beschichteten Vertiefungen werden anschließend direkt für die Detektion der Peptide durch Antiseren eingesetzt.

2.2.2.2 Detektion von Pertussis Toxin Peptiden und Holotoxin durch Kaninchen- und Humansenen im ELISA

Für die Detektion von Peptiden und Holotoxin werden zunächst ELISA-Platten mit dem zu analysierendem Antigen beschichtet. Dazu werden in jede ELISA-Platte pro Vertiefung 100 µl einer Antigenverdünnung in PBS pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nicht gebundenes Antigen wird durch dreimaliges Waschen mit je 250 µl Waschpuffer entfernt.

Um frei gebliebene Antigenbindungsstellen und den oberen Bereich der Vertiefung abzusättigen, werden in jede Vertiefung 250 µl 5% BSA in PBS pipettiert und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die zu untersuchenden Antiseren werden in 0,1% BSA verdünnt und von jeder Antikörperverdünnung jeweils 100 µl einpipettiert. Die Inkubation erfolgt für 1,5 h bei 37°C .

Anschließend werden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen mit je 250 µl Waschpuffer entfernt.

Die Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgt durch einstündige Inkubation mit an alkalische Phosphatase gekuppelten Ziege-anti-Spezies-(Mensch/Kaninchen)-Antikörper (1:5.000 in PBS verdünnt).

Nach der Inkubation wird jede Vertiefung abschließend dreimal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen, jeweils 100 µl 1mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer zupipettiert und nach 30 Minuten die optische Dichte bei 405 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.2.2.3 Bestimmung von IgG-, IgM- und IgA-Titern mit dem Testkit der Firma Viramed

Der einzige, zum Zeitpunkt der Untersuchungen verfügbare, kommerzielle ELISA-Testkit zum Nachweis von anti-*B. pertussis*-Antikörpern war der „*Bordetella Pertussis* ELISA IgA, IgG, IgM“ der Firma Viramed.

Die Verwendung und Ermittlung der Extinktionswerte der einzelnen Proben erfolgt nach der Anleitung des Herstellers.

Bei diesem Testsystem werden anhand mitgelieferter Kontrollseren, die mit dem System negativ, schwach positiv und positiv reagieren, die Reaktionen gegen mit speziell präparierten *B.pertussis*-Zellen beschichtete Mikrotiterplatten über einen zweiten, mit alkalischer Phosphatase gekuppelten Antikörper und anschließende Farbreaktion gemessen.

Parallel zu den zu untersuchenden Proben werden jeweils eine Pufferkontrolle, dreimal das schwach positive Kontrollserum, ein negatives und ein stark positives Kontrollserum im Test mitgeführt.

Der Mittelwert der Extinktionen der drei mitgeführten schwach positiven Kontrollseren ergibt den „Cut off“-Wert. Die Ratio wird dann als Quotient aus gemessener Probenextinktion und dem „Cut off“-Wert ermittelt.

Ein Experiment wird als auswertbar angesehen, wenn:

1. die Ratio der negativen Kontrolle kleiner als 0,6 ist,
2. die Ratio der stark positiven Kontrolle größer als 1,5 ist und
3. die Extinktion der Pufferkontrolle kleiner oder gleich 0,07 ist.

In der weiteren Auswertung gelten dann die in Tabelle 2.9 aufgelisteten Ratio für die diagnostische Beurteilung der Proben.

<i>Untersuchung</i>	<i>negativ</i>	<i>grenzwertig</i>	<i>positiv</i>
IgG-ELISA	≤ 0,8	> 0,8 bis < 1,1	≥ 1,1
IgA-ELISA	< 0,9	0,9 bis < 1,1	≥ 1,1
IgM-ELISA	< 0,9	0,9 bis < 1,1	≥ 1,1

Tab 2.9: Diagnostische Beurteilung der ermittelten Ratio im Viramed ELISA-Test

2.2.3 Arbeiten mit Pertussis Toxin

2.2.3.1 Aktivierung von Pertussis Toxin

Zur Aktivierung von Pertussis Toxin muß zunächst die Disulfidbrücke der S1 Untereinheit, die das A-Protomer in der inaktiven Form hält, reduziert werden.

Die Reduktion erfolgt in 50 mM DTT, 100 mM Tris-HCl bei pH 8,0 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

2.2.3.2 Modifikation von Transducin durch Pertussis Toxin mit ³²P markiertem NAD

Um die enzymatische Aktivität und Spezifität des später für die Modifikation C-terminal fixierter Peptide verwendeten Pertussis Toxins zu kontrollieren, wurde zunächst die Modifikation der isolierten α Untereinheit von Transducin untersucht.

In einem Gesamtvolumen von 50 μ l werden 0,1 μ g/ml Transducin in 100 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM DTT, 2 mM ATP, 8 μ g/ml aktiviertes Pertussis Toxin und 10 μ Ci/ml ³²P-NAD (ca. 100.000 cpm) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum qualitativen Nachweis wird dem Inkubationsansatz 50 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt und die Proteine gleichzeitig denaturiert.

Die Proteine werden im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese erfolgt dabei wie von Laemmli (1970) beschrieben.

Es werden Sammelgele bestehend aus 5% Acrylamid in 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 mM Na₂EDTA, 0,1% SDS und Trenngele mit 10-15% Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 2 mM Na₂EDTA verwendet. Zur Polymerisation werden die Lösungen entgast und 0,1% APS sowie 0,0625% TEMED zugesetzt. Die Gesamtabmessungen der Gele betragen 10x8x0,75 cm. Als Laufpuffer dient 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3. Die Elektrophoresen werden bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt.

Nach der Elektrophorese werden die Gele in einer Glaspetrischale mit einer Lösung aus 3,3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 25% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und anschließend in 10% Methanol, 7% Essigsäure entfärbt.

Färbe- und Entfärbvorgang werden durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle beschleunigt. Zur Visualisierung der radioaktiv markierten α Untereinheit des G-Proteins wird das Gel für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Fuji Imaging Platte inkubiert (BAS-III) und diese danach mit dem Bio-Imager (Fuji BAS 1000) gescannt.

Zur quantitativen Analyse wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Bindungspuffer gestoppt und die Proteine über einen Nitrocellulosefilter abgesaugt. Das Reaktionsgefäß wird noch weitere zweimal mit jeweils 2 ml Bindungspuffer gespült und über den Nitrocellulosefilter abgesaugt. Abschließend wird der Nitrocellulosefilter dreimal mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen.

Der Filter wird in ein Szintillationsröhrchen überführt, in 1 ml Ethylenglykolmonoethylether aufgelöst, mit 3 ml Quickszint 501 versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

2.2.3.3 Modifikation C-terminal fixierter Peptide durch Pertussis Toxin mit ³²P markiertem NAD

Für die ADP-Ribosylierung C-terminal fixierter Peptide werden die 9x13 cm großen Filter in Ethanol getränkt.

Wenn nicht anders angegeben, finden alle Inkubationen bei Raumtemperatur statt. Der Filter wird durch dreimaliges Spülen für jeweils 5 Minuten in 15 ml TBS, pH 7, umgepuffert und kann dann für die ADP-Ribosylierung eingesetzt werden.

Die Filter werden für 2 Stunden in 5 ml einer ADP-Ribosylierungslösung, bestehend aus 0,9 µg/ml aktiviertem Pertussis Toxin, 25 mM DTT, 100 mM Tris pH 7,0, 2 mM ATP und 10 µCi/ml ³²P-NAD inkubiert. Daraufhin wird die Membran dreimal für 2 Minuten mit jeweils 15 ml 5% Tween-TBS, anschließend 30 Minuten bei 60°C in 15 ml 5% Tween-TBS und abschließend mehrfach bei Raumtemperatur in jeweils 15 ml H₂O gewaschen, bis im Überstand keine Radioaktivität mehr nachweisbar ist.

Zur Messung der verbleibenden ^{32}P -Aktivität werden die Filter für bis zu 1,5 Stunden auf einer Fuji Imaging Platte inkubiert (BAS-III) und diese mit dem Bio-Imager (Fuji BAS 1000) gescannt.

Die Auswertung erfolgt mit der zum System gehörenden „Fuji MacBAS“-Bildverarbeitungs- und Quantifizierungssoftware, wobei zur graphischen Darstellung und zum Vergleich die gerätespezifischen Meßeinheiten (PSL/cm^2) der Quantifizierungssoftware verwendet werden.

2.2.3.4 Bindung von Pertussis Toxin an C-terminal fixierte Peptide

Um Hinweise auf eine potentielle Eignung von Peptiden als inhibitorische Hemmstoffe der Pertussis Toxin-induzierten ADP-Ribosylierung zu erhalten, wurde die Bindung von Pertussis Toxin an Peptide, die von den Sequenzen verschiedener $G\alpha$ -Proteine abgeleitet wurden, untersucht.

Dazu wird der Filter zunächst in EtOH getränkt und das EtOH durch wiederholtes Waschen gegen PBS ausgetauscht, um hydrophobe Wechselwirkungen beim Rehydrieren zu minimieren.

Der Filter wird für 1h in 5% BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und danach dreimal für 10 Minuten mit 0,05% Tween in PBS gewaschen.

Die Inkubation mit nicht-reduziertem bzw. reduziertem Pertussis Toxin erfolgt in einer Konzentration von $1\ \mu\text{g}$ Pertussis Toxin/ml in PBS und in Parallelansätzen unter reduzierenden Bedingungen mit bzw. ohne ATP (25 mM DTT und 2 mM ATP bzw. nur 25 mM DTT).

Es wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wird der Filter dreimal mit 0,05% Tween in PBS gewaschen.

Für den immunologischen Nachweis wird als 1. Antikörper ein monoklonaler Antikörper gegen die S1 Untereinheit (6FX1) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS eingesetzt, für eine Stunde inkubiert und erneut dreimal für 10 Minuten wie oben beschrieben gewaschen.

Als 2. Antikörper wird Ziege-anti-Maus Antikörper, gekuppelt an alkalische Phosphatase (1:5000 verdünnt in PBS), eingesetzt und der Filter damit für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Abschluß der Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgt dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten mit 0,05% Tween in PBS.

Die Bindung des 2. Antikörpers wird durch Entwickeln mit einer geeigneten Menge Färbelösung (AP2) nachgewiesen, die Reaktion nach 30 Minuten durch Waschen mit PBS gestoppt und der gefärbte, feuchte Filter eingescannt und anschließend getrocknet.

2.2.4 Quantifizierung serieller Verdünnungen von ^{32}P - und Proteinkonzentrationen auf Western Blots

Der Linearitätsbereich der scannergestützten Auswertung von Farbreaktionen auf Membranen sollte mit denen laserdensitometrischer oder Bio Imager-gestützter Quantifizierungsver-

fahren verglichen werden. Dazu wurden serielle ^{32}P -Verdünnungen mit den verschiedenen Methoden ausgewertet.

Für die ^{32}P -Verdünnung werden 500 nCi/ μl ^{32}P -GTP seriell verdünnt und in 1 μl großen Aliquots auf Cellulose Papier aufpipettiert.

Nach dem Trocknen wird das in Haushaltsfolie eingeschlagene Blatt 15 h auf einem Hyperfilm- β -max exponiert und der Film nach der Entwicklung mit dem Laserdensitometer ausgemessen bzw. mit dem Desktopscanner (UMAX UC 640) eingescannt und mit der NIH-Image Software ausgewertet.

Alternativ wird der radioaktive Filter für 1 h auf eine Fuji-Imaging-Platte (Typ BAS-III) aufgelegt und anschließend im Bio-Imager detektiert und analysiert.

2.2.5 Datenbankrecherchen

Für die Suche nach homologen Sequenzen bei der Analyse der von Humanseren erkannten Epitope auf Pertussis Toxin Untereinheiten sowie die Suche nach weiteren zu $\alpha\text{-G}_{13}$ homologen Proteinsequenzen wird die BLASTP-Analyse eingesetzt.

Diese Analyse beruht auf dem BLAST-Algorithmus von Altschul *et al.* (1990) und ist modifiziert für die Anwendung auf Proteinsequenzen und Datenbanken.

Die zu analysierenden Peptid-Sequenzen werden dazu als ASCII-Dateien auf den GENIUS-Rechner am DKFZ in Heidelberg übertragen und die Analyse mit dem entsprechenden Programmmodul des HUSAR (Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources) 4.1 Programmpakets (1996) durchgeführt.

Eine BLASTP-Analyse liefert als Ergebnis sogenannte „High-scoring Segment Pairs“ (HSP), welche die gefundene Homologie (von Teilbereichen) der untersuchten Sequenzen und der zu vergleichenden Sequenzen sowie die Erwartung für das zufällige Auftreten dieser Homologien innerhalb der betrachteten Datenbank beschreiben.

Ein HSP ist ein Paar von Segmenten, eines aus der zu untersuchenden Sequenz und eines als Teilsequenz der recherchierten Datenbank. Dabei wird ein positiver „Cut off“ als bedingender Parameter vorgegeben, der den Mindestgrad an geforderter Homologie zwischen den Segmenten beschreibt.

Die Bewertung findet jeweils für jede Aminosäureposition statt und für die Bewertung der Homologie an dieser Stelle wird eine PAM (Pair Alignment Matrix) herangezogen.

Die standardmäßig verwendete PAM 120 (Pair Alignment Matrix für Sequenzen) beschreibt die evolutive Wertigkeit von Mutationen an einer bestimmten Position gegenüber der Ausgangssequenz in Form positiver und negativer ganzzahliger Werte für die einzelnen Aminosäuren und die Effekte von Austausch (Dayhoff 1978).

Die Summe aller PAM-Matrix Werte für ein zur untersuchenden Sequenz identisches Element innerhalb der analysierten Datenbank ist der maximal erreichbare Treffer-Wert für ein HSP. Er wird auch als MSP (Maximal-scoring Segment Pair) bezeichnet.

Anhand der Größe der untersuchten Datenbank und der Länge der Sequenz wird die Erwartung für zufällig auftretende Sequenzen, die identisch zur untersuchten Sequenz sind, als Erwartungswert bei verschiedenen Treffer-Werten beschrieben.

Zur statistischen Absicherung der Werte wird bei der BLASTP-Analyse jeweils eine Poisson-Statistik berechnet, um beurteilen zu können, ob ggf. eine Sequenz mit höherem erwartetem Auftreten als tatsächlich beobachtet dennoch signifikant ist.

2.2.6 Raum-Struktur-Berechnungen und dreidimensionale Darstellung

2.2.6.1 Dreidimensionale Visualisierung von Epitopen auf der Raumstruktur von Pertussis-Toxin

Für die dreidimensionale Visualisierung von Epitopen auf kristallographisch bekannten Raumstrukturen wird die Software „RASMol 2.6“ von (Sayle und Millner-White 1995) eingesetzt. Diese ermöglicht das Hervorheben bzw. die Projektion von Markierungen auf bestimmte Sequenzbereiche von Proteinen, deren Atomkoordinaten in Form von pdb-Einträgen bekannt sind. Die Projektionen sind am Computer frei dreh- und skalierbar, wodurch eine gute räumliche Vorstellung von der Lage der betrachteten Sequenzbereiche erreicht wird.

Die dreidimensionale Projektion ermöglicht für diese Untersuchungen insbesondere die Identifikation konformeller Epitope bei der Erkennung von Proteinen durch Antisera im Rahmen der PepScan Untersuchungen an Pertussis Toxin.

Weiterhin gibt die Lage einer Sequenz im dreidimensionalen Modell Informationen über ihre Zugänglichkeit im nativen, nichtdenaturierten Protein.

2.2.6.2 Modellrechnungen zur Strukturbestimmung und Energieminimierung von Peptiden

Die C-terminalen Strukturen der G_{α} -Untereinheiten sind zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen kristallographisch noch nicht exakt bestimmbar, so daß keine Vorgabe bezüglich der angenommenen dreidimensionalen Konfiguration gemacht werden kann.

Um dennoch Hinweise auf mögliche sterische Ursachen für die beobachteten Effekte des positionellen Aminosäureaustauschs zu erhalten, werden die C-terminalen Peptide im Computer als dreidimensionale Modelle simuliert und eine rechnerische Energieminimierung vorgenommen.

Die Effekte positioneller Aminosäureaustausche auf die kalkulierten Strukturveränderungen geben Anhaltspunkte für die Diskussion der experimentell beobachteten Veränderungen in der ADP-Ribosylierungseffizienz der Substrate.

Für die Simulation wird die Software „MacSPARTAN 1.1“ (Wavefunction Inc. 1996) eingesetzt.

Da keine Informationen über die tatsächliche Konfiguration, insbesondere nicht auf ein Vorkommen von β -Faltblattstrukturen, vorliegen, erhält das Programm als Vorgabe die zu untersuchende Peptidsequenz als α -Helix und berechnet daraus eine energieminierte Konfigura-

tion. Dazu wird eine SYBYL-Kraft-Feld Berechnung durchgeführt (Clark *et al.* 1989) und die Konfiguration des Moleküls in bis zu 6000 Energieminimierungsschritten optimiert. Das Ergebnis wird als pdb-Datensatz gespeichert und kann am Bildschirm in dreidimensionaler Darstellung oder im Ausdruck mit den Ergebnissen für Positionsmutanten verglichen werden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit mußten zunächst die Voraussetzungen geschaffen werden, um die Spotsynthese von Peptiden auf Celluloseoberflächen zu etablieren. Wie sich herausstellte, war es dazu erforderlich, die Methode in einigen Punkten zu optimieren. Weiterhin mußten Verfahren geschaffen werden, um die bei den anschließenden Versuchen voraussichtlich anfallenden großen Datenmengen erfassen und auswerten zu können.

Erst nach diesen methodischen und verfahrenstechnischen Entwicklungen konnten die eigentlichen Arbeiten zur Struktur-Funktionsanalyse von Pertussis Toxin aufgenommen werden.

Neben den Untersuchungen zur Detektion linearer, von humanen Antisera erkannten, Epitope auf Pertussis Toxin sollte auch die Substraterkennung C-terminaler Peptide der α Untereinheiten von G-Proteinen durch Pertussis Toxin näher untersucht werden.

Die erstmalige Einführung der neuen Technik innerhalb eines infektiologisch orientierten Labors führte zur Initiierung einiger Anschlußarbeiten und Kooperationsprojekte bei denen das breite Anwendungsspektrum und das Potential der Spotsynthesemethode deutlich wurde.

3.1 Optimierung der Peptidsynthese mit dem Robotersystem

Ein Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Spot-Synthese festphasengebundener Peptide besteht darin, daß sehr einfach und kostengünstig eine Vielzahl verschiedener Peptide (max. 425) auf einer Cellulosefilterfläche von 9x13 cm synthetisiert werden kann (Abb. 3.1).

Voraussetzung für den effizienten, reproduzierbaren Einsatz der Methode ist die Verfügbarkeit einer zumindest halbautomatischen, robotergestützten Synthese der Peptide. Nur mit diesem Hilfsmittel kann die geforderte Spotdichte sowie ein fehlerfreies Pipettieren über den gesamten Syntheszyklus hinweg sichergestellt werden.

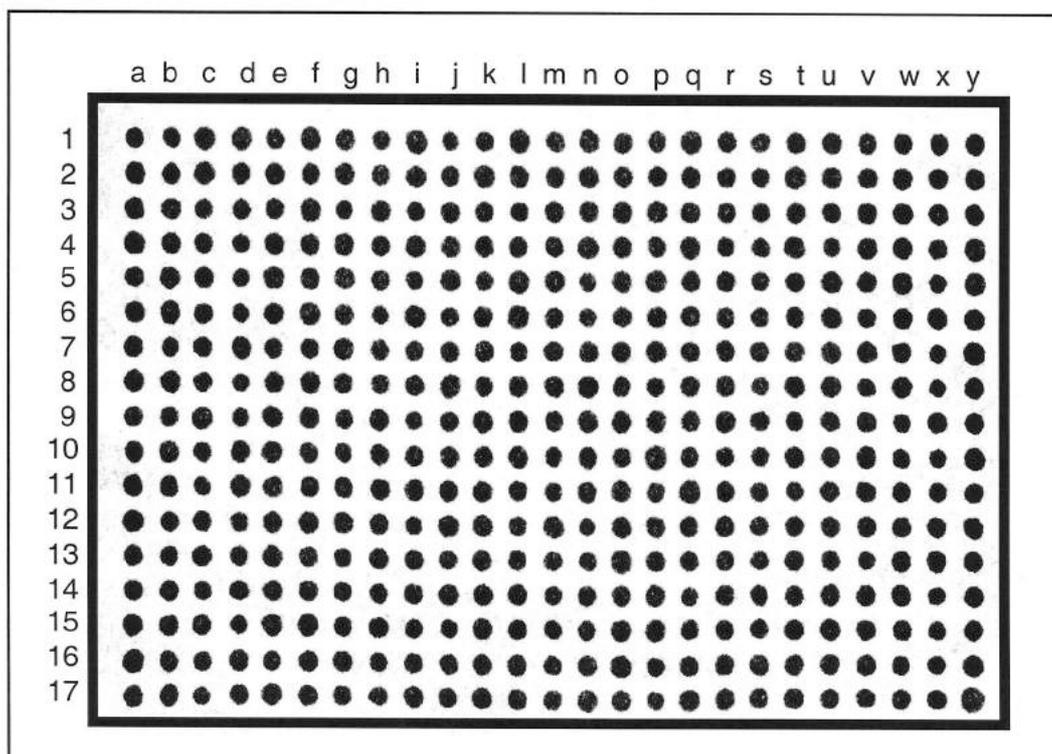


Abb. 3.1: Scan eines Filters mit Peptidankern.

Auf der Filterfläche von 9x13 cm sind 17x25 (425) 2mer β -Alanin Peptidanker aufgebracht, die als Startposition für die Peptidsynthese dienen. Die einzelnen Spots sind hier sichtbar, weil die freie Aminofunktion des Ankers bereits geschützt und mit Bromphenolblau angefärbt ist.

Als problematisch erwiesen sich in der Praxis weniger die Chemie der Synthesereaktionen als vielmehr gerätetechnische Faktoren, welche die Präzision und Effizienz der Synthese stark beeinflussen können. Das zur Verfügung stehende Gerät war der erste Prototyp des Herstellers Abimed (Langenfeld). Praktische Tests wurden beim Hersteller zuvor nur unter den Realitäten der Synthese wenig entsprechenden Bedingungen durchgeführt, da für dessen eigene Tests im Hause nur mit nichtderivatisierten Filtern und angefärbtem DMF als Pipettierlösung gearbeitet wurde.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden eine Reihe von Optimierungen am System durchgeführt, die mittlerweile beim Hersteller in die weitere Produktion und den Geräteaufbau eingeflossen sind.

Veränderungen an der Apparatur

Bei dem eingesetzten Pipettierroboter handelt es sich um eine Konfiguration, die gewöhnlich für die automatisierte Festphasensynthese von Peptiden an Harzkugeln nach dem Prinzip der Fmoc-Synthese (Merrifield 1963) eingesetzt wird.

Für die spezielle Anwendung der von Ronald Frank (1992) entwickelten Spotsynthese, die ursprünglich rein manuell durchgeführt wurde, war das Gerät speziell erweitert. Es wurde mit neuer Software sowie einer Edelstahlplatte als Pipettierebene ausgerüstet und als Prototyp von der Firma Abimed (Langenfeld) erworben. Erste Syntheseversuche zeigten, daß für eine

effiziente Synthese und zum präzisen Arbeiten unbedingt weitere Optimierungsschritte durchgeführt werden mußten.

- **Viskosität der Reagentienlösungen**

Die verwendeten Aminosäurederivatlösungen sind mit 0,3 M Aminosäureester in NMP derivatabhängig zum Teil gegenüber reinem NMP oder DMF hoch viskos, ein physikalischer Parameter, dessen Einfluß seitens des Herstellers zuvor noch nie untersucht wurde.

In der ursprünglichen Konfiguration des Gerätes wird eine 1 ml Glasspritze verwendet und die Flüssigkeit mit Hilfe eines Schrittmotors über den angeschlossenen Schlauch und eine Stahl-Kanüle mit eingesetzter Kunststoffspitze angesaugt (vgl. Abb. 3.2).

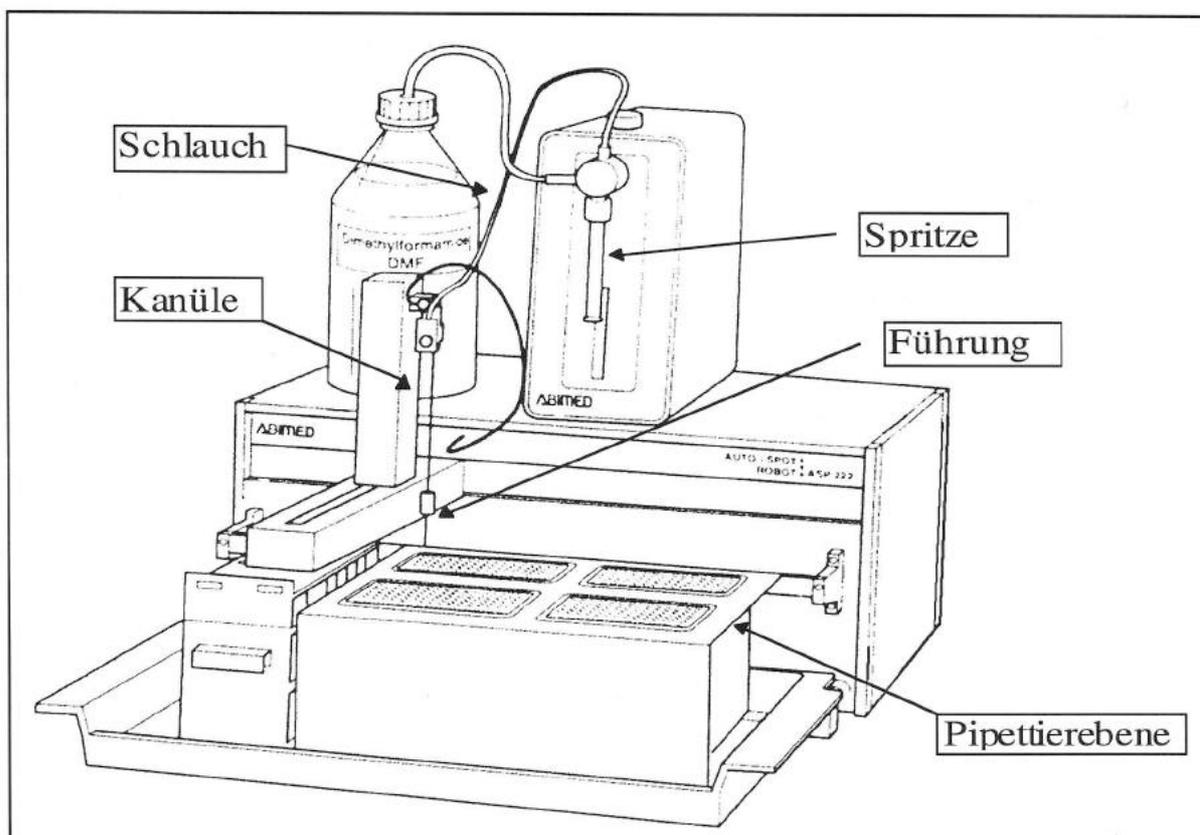


Abb. 3.2: Schema der für die Spotsynthese eingesetzten Komponenten des Roboters.

Mit Pfeilen markiert sind alle Komponenten, an denen Veränderungen vorgenommen wurden.

Bei den für diese Untersuchungen erforderlichen Synthesen mußten häufig gleichartige Peptide verschiedener Länge synthetisiert werden. Die in diesen Fällen pro Pipettierschritt aufzusaugende Derivatmenge war häufig so hoch, daß ein Aufsaugen der hoch viskosen Derivatlösungen nicht innerhalb der mit dem Pipettiersystem möglichen, minimalen Ansauggeschwindigkeit abgeschlossen war und daher in der Glasspritze ein Vakuum erzeugt wurde. Dieses Vakuum konnte sich erst beim Austauschen der Kanüle aus der Derivatlösung ent-

spannen wobei Luft angesaugt wurde. Dadurch verliefen regelmäßig die ersten Pipettierungen bei einigen Derivaten fehlerhaft.

Dieses Problem konnte durch Austausch der Spritze gegen eine solche mit halbiertem Volumen (0,5 ml) bei gleicher Länge und entsprechend verdoppelten Ansaugzeiten beseitigt werden.

- **Kapillarkräfte**

Als weiteres Problem erwies sich der Innendurchmesser der zum Pipettieren verwendeten Kanüle, für die methodisch eine Volumengenauigkeit der Pipettierschritte von 0,1 μl gefordert wird. Beim Auftreffen der Kanüle und dem dadurch hergestellten Kontakt der Derivatlösungen mit dem Filterpapier wirken auf die Derivatlösung zwei entgegengesetzte Kräfte.

Einerseits wirkt die Kapillarkraft der Kanüle und der zum Pipettieren eingesetzten Schlauchverbindung, die die Flüssigkeit am Austreten hindert. Andererseits, wirken in genau entgegengesetzter Richtung, die Kapillarkräfte des Filterpapiers.

Nur wenn beide Kräfte im Gleichgewicht stehen, ist eine hinreichende, dem tatsächlichen Vorschub des Kolbens innerhalb der Glasspritze entsprechende Pipettiergenauigkeit gegeben.

In der zunächst eingesetzten Kombination erwies sich die vom Filter entwickelte Kapillarkraft als so stark, daß sie allein bereits mehr als die zu pipettierenden 0,2 μl in den Filter sogen. Das hatte zur Folge, daß die jeweils nächsten angefahrenen Punkte nur eine geringere bis überhaupt keine Derivatmenge erhielten, wodurch die Synthese insgesamt unzuverlässig und der Filter unbrauchbar wurde.

Zur Lösung dieses Problems wurde der die Glasspritze mit der Stahlkanüle verbindende Schlauch gegen einen unterdruckbeständigen ausgetauscht und der Innendurchmesser der Kanüle an Ihrer Spitze nochmals verkleinert, indem an der Spitze der Kanüle der ursprünglich eingesetzte Teflonschlauch mit seiner nichtbenetzbaren Oberfläche gegen eine sich verjüngende Metallspitze mit kleinerem Innendurchmesser ausgetauscht wurde.

Durch diese relativ einfache Veränderung konnten die Kapillarkräfte so weit erhöht werden, daß die für die zu erreichende Spotdichte pro Filter geforderte Pipettiergenauigkeit und Zuverlässigkeit der Minimalvolumina bis 0,1 μl eingehalten werden.

- **Genauigkeit der Positionierung des Pipettierarms**

Als drittes Problem erwies sich die Positionierungsgenauigkeit des Systems. Rein mechanisch ist der Roboterarm in der Lage, einen beliebigen Punkt innerhalb seines xyz-Navigationsbereichs mit einer Positionsgenauigkeit von 0,1 mm anzufahren.

Ein entscheidender Faktor war daher die exakte Positionierung des Synthesefilters auf der Pipettierebene.

In der vom Hersteller angebotenen Variante wird mit Filtern gearbeitet, die in underivatisierter Form vorgestanzt wurden. Zu den kreisrunden Ausstanzungen komplementär sind auf der Pipettierebene Haltezyylinder aufgeschraubt, über die die Filter geschoben und dann mit einem umlaufenden Metallrahmen fixiert werden.

Im Zuge der Derivatisierung stellte sich allerdings heraus, daß das eingesetzte Cellulosepapier unter den Bedingungen der Peptidsynthese zu Schrumpfung neigt.

Das führt dazu, daß die Filter nicht mehr exakt auf die Haltezyylinder passen. Werden diese Filter dennoch verwendet, muß die vorgestanzte Aussparung vergrößert werden, wodurch die Position der Filter mechanisch nicht mehr über mehrere Zyklen hinweg konstant gehalten werden kann.

Es zeigte sich, daß der Schrumpfungsvorgang nach erfolgter Grundderivatisierung, also der gleichmäßigen Veresterung freier Hydroxylgruppen der Cellulose mit β -Alanin, zu vernachlässigen ist.

Aus diesem Grund wurden statt vorgestanzten Filtern ungestanzte Filter für die Derivatisierung verwendet und auf der Pipettierebene an Stelle der Haltezyylinder kleine Nadeln angebracht. Auf diese Nadeln wurden die bereits derivatisierten Filter aufgeschoben und dadurch in ihrer Position über die gesamte Synthese hinweg zuverlässig fixiert.

- **Begrenzung der Reagentien auf das Syntheseareal**

Bei den pro Spotvorgang eingesetzten geringen Derivatmengen von 0,1-0,2 μ l war es wichtig, eine optimale Benetzung des Filters innerhalb des jeweiligen Syntheseareals zu erzielen, um eine maximale Umsetzung und Ausbeute an verlängertem Peptid pro Syntheseschritt zu gewährleisten.

Die Pipettierebene des Roboters besteht beim ausgelieferten Modell aus einer Edelstahlplatte. Diese wird teilweise von der Derivatlösung benetzt und zieht damit einen Teil der Lösung wieder aus dem Filter heraus.

Das hat zur Folge, daß die aufgebrachten Reagentien möglicherweise nicht in den benötigten Konzentrationen zur Synthese zur Verfügung stehen und dadurch die Reproduzierbarkeit der Synthese beeinträchtigt werden könnte.

Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde auf die Metallplatte eine 1 mm starke, nichtbenetzbare Teflon-Platte aufgesetzt. Dies bewirkt, daß die Derivatlösung während der gesamten Reaktionszeit vollständig im Filter verbleibt.

Abbildung 3.3 zeigt eine Photographie der an entscheidenden Punkten optimierten Syntheseapparatur und kennzeichnet die durchgeführten Veränderungen (Pfeile).

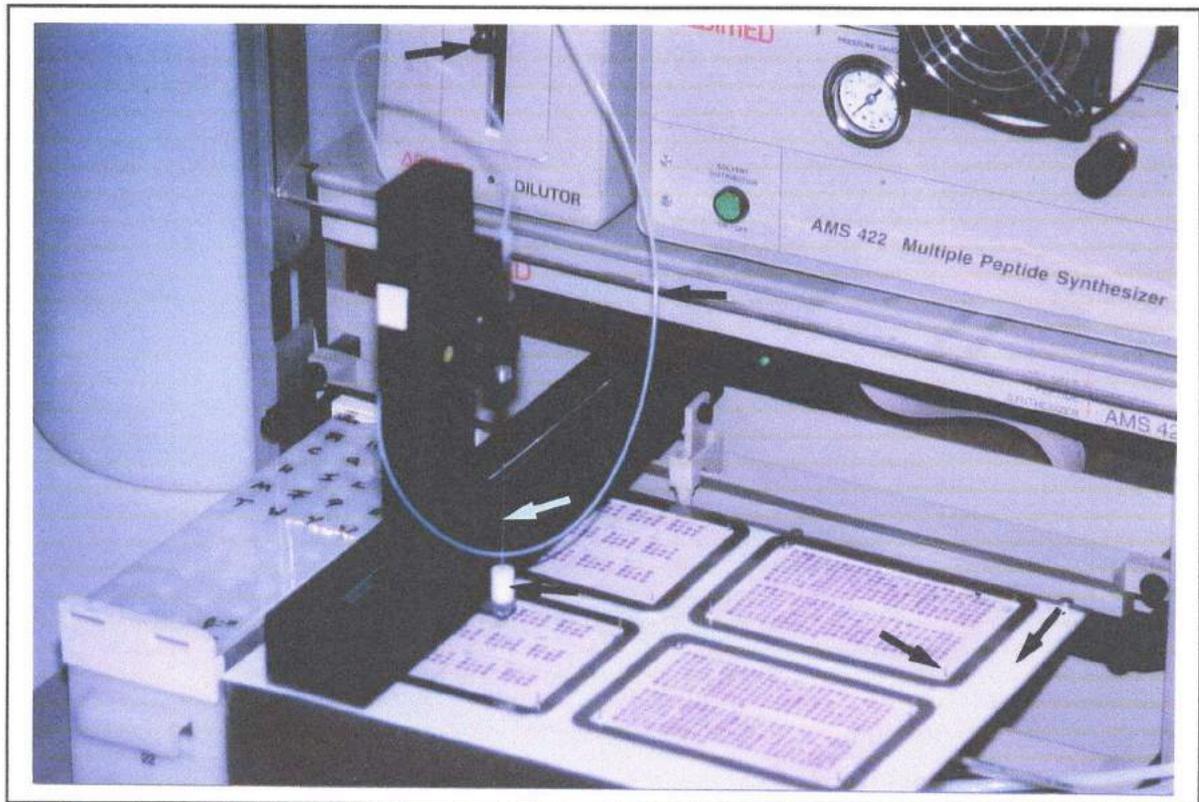


Abb. 3.3: Modifiziertes Spotsynthesesystem auf Basis des Abimed ASP-222. Das Foto zeigt die eingesetzte Syntheseapparatur nach allen durchgeführten Optimierungen. Die Elemente, an denen die im Text beschriebenen Veränderungen vorgenommen wurden, sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

3.2 Etablierung eines Verfahrens zur Auswertung von Farbreaktionen auf Peptidspot-Filtern

Die Ergebnisse der Experimente der mit einer Vielzahl von synthetischen Peptiden beladenen Filter werden in der Regel in Form unlöslicher Farbniederschläge detektiert. Über Antikörpererkennung oder Protein-Protein-Wechselwirkung findet innerhalb eines Bindungsexperiments die Anlagerung von Molekülen (Antikörper, Proteine), die wiederum an alkalische Phosphatase oder Peroxidase gekuppelt sind, statt. Geeignete Substrate werden durch die enzymatische Reaktion in unlösliche, gefärbte Produkte umgewandelt, die am Ort der Reaktion präzipitieren. Die Intensität der Färbung bis zum Erreichen der optischen Farbsättigung ist dabei proportional zur Menge an angelagertem Enzym. Somit ist sie analog der Schwarzfärbung eines Röntgenfilms in Folge einer Entwicklung nach Autoradiographie.

Zu Beginn dieser Untersuchungen war die Quantifizierung derartiger Versuchsergebnisse ohne größeren Aufwand noch nicht möglich. Häufig mußte man sich damit begnügen behelfsmäßig subjektive und beschreibende Abschätzungen vorzunehmen.

Falls möglich, werden vergleichbare Versuchsansätze mit Hilfe von ELISA-Tests durchgeführt, da mit den dann einsetzbaren, kommerziell erhältlichen ELISA-Auswertegeräten (ELISA-

Reader) und der jeweils dazugehörigen Auswertungssoftware die Auswertung und Quantifizierung weitgehend problemlos und allgemein akzeptiert ist.

Für die Auswertung der hier vorgestellten Ergebnisse ist jedoch zumindest eine Möglichkeit zur semiquantitativen Auswertung von Farbniederschlägen auf einer Membran unerlässlich.

Es mußte daher ein Verfahren entwickelt werden, das es gestattete, die Versuchsergebnisse möglichst optisch zu detektieren und in einem zweiten Schritt zu digitalisieren, um sie in Form von Intensitäten auch quantifizierbar und damit vergleichbar zu machen.

Dazu wurde routinemäßig der Einsatz digitaler Flachbettscanner etabliert und für die Auswertung eingescannter Versuchsergebnisse die Verwendung von allgemein verfügbarer kommerzieller und „Public Domain“-Software geprüft.

3.2.1 Einsatzmöglichkeiten von Flachbettscannern in Kombination mit Graphikbearbeitungssoftware zur Quantifizierung von Farbreaktionen auf Membranen

Die Digitalisierung der Signale auf den Membranen ist nach einer erfolgten Farbreaktion mit Hilfe eines Scanners ist über die jeweils mitgelieferte Software, in diesem Fall das Microtec „ScanWizzard plug-in“ (Microtek 1997), technisch gesehen problemlos möglich. In einer Beispielanwendung wurde die Erkennung von C-terminal verankerten synthetischen Peptiden aller Pertussis Toxin Untereinheiten durch einen humanen Antikörper ausgewertet.

Der Scan eines mit Antiserum inkubierten Filters ist im Vergleich mit einer Negativkontrolle in Abb. 3.4 dargestellt.

Die flexibelste Unterstützung der Auswertung lieferte die im „Public Domain“ befindliche Software „NIH-Image“ (Rasband und Bright 1995).

Die Messung der Spotintensitäten kann mit diesem Programm auf einer beliebig großen, kreisförmigen oder rechteckigen Fläche erfolgen.

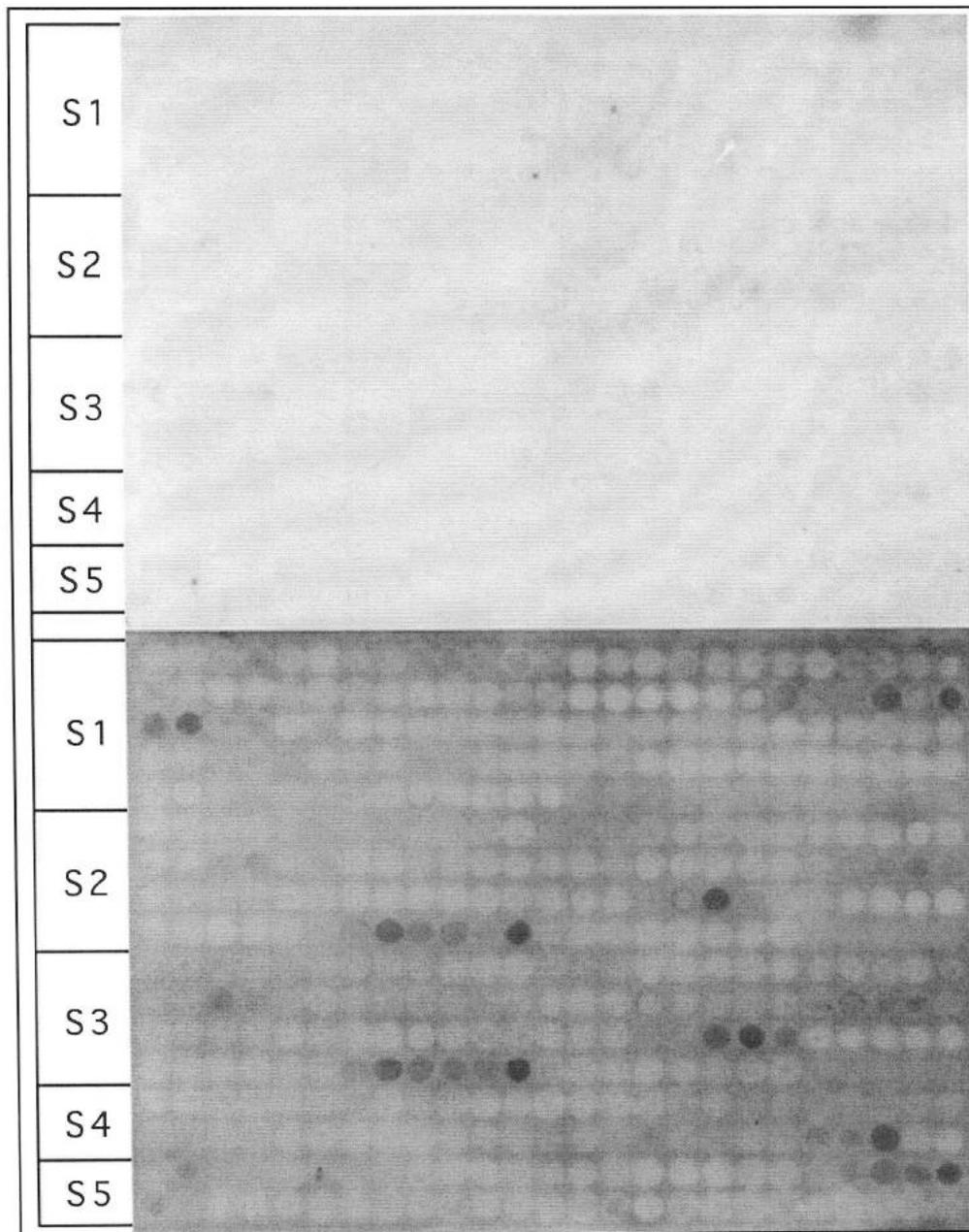


Abb. 3.4: Flachbettscan von Peptidfiltern mit Pepscaans von Pertussis Toxin.

Gezeigt ist ein Pepscaan der Pertussis Toxin Untereinheiten S1 bis S5.

Der obere Filter zeigt die Kontrolle ohne humanes Antiserum. Der zweite Filter zeigt einen Filter mit identischen Peptiden, inkubiert mit dem Serum S128. Jeder Spot entspricht einem 12mer Peptid. Links gekennzeichnet sind jeweils die Grenzen der durch die Spots repräsentierten PT-Untereinheiten. Visualisiert wurde die Antikörper-Bindung wie beschrieben durch einen sekundären, alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper und anschließende Farbreaktion.

Für die in Abb. 3.5 gezeigte, graphische Auswertung wurde eine kreisrunde Auswertungsfläche gewählt. Mittels der Software wird die gemessene Intensität über die Fläche gemittelt und bei Bedarf kann mit der gesamten Meßreihe bereits innerhalb der grafikverarbeitenden und -auswertenden Software eine Reihe statistischer Berechnungen durchgeführt werden.

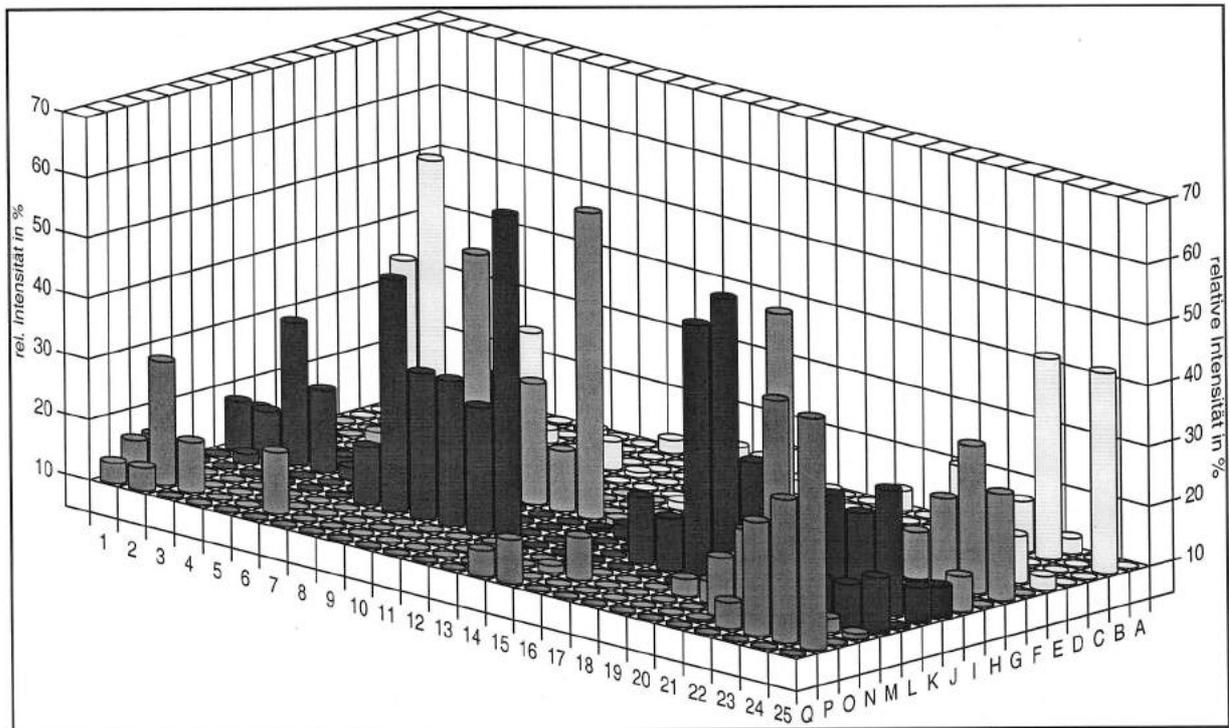


Abb. 3.5: Graphische Auswertung des eingescannten Filters aus Abb. 3.4. Die Meßwerte für die Spots sind hier in relativen Intensitäten (max. 100%) angegeben. Die Spots für die verschiedenen PT-Untereinheiten sind durch verschiedene Graustufen gekennzeichnet: S1 Reihe A-E, S2 Reihe F-I, S3 Reihe J-M, S4 Reihe N-O, S5 Reihe P-Q.

Die Ergebnisse aus der Auswertung können in Form einer Tabelle exportiert und beliebig weiterverarbeitet werden.

Für die Vergleichbarkeit der Werte und ihre Unabhängigkeit von der Graustufentiefe des eingesetzten Scanners hat es sich in einigen Anwendungen als sinnvoll erwiesen, die Messwerte in Prozent der maximal erreichbaren Intensität anzugeben und als relative Intensitäten zu bezeichnen.

In dieser Art wurde im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen mit den Daten aus allen über Farbreaktionen auf Membranoberflächen quantifizierten Versuchsergebnissen verfahren.

Für die in dieser Arbeit benötigten Auswertungen ist eine semiquantitative Auswertemöglichkeit bereits ausreichend. Wie sich aus weiteren vergleichenden Untersuchungen ergab (vgl. 3.2.2 und Diskussion) ist das Verfahren innerhalb eines eingeschränkten Linearitätsbereiches jedoch auch zur quantitativen Auswertung einzusetzen (von Olleschik-Elbheim *et al.* 1996).

3.2.2 Linearitätsbereiche und Anwendungsspektrum der scannergestützten Quantifizierung im Vergleich mit alternativen Quantifizierungsmethoden

Für die Auswertung der Versuche zur immunologischen Reaktion der Pepsans von Pertussis Toxin mit Antikörpern war die semiquantitative Auswertbarkeit der Versuchsergebnisse für die Vergleichbarkeit der beobachteten Immunreaktionen im Pre- und Post-Immunserum bzw. Pre-

Booster- und Post-Booster-Immunsorum zu fordern. Darüberhinaus sollte geklärt werden, inwieweit die entwickelte Quantifizierungsmethode andere Methoden ersetzen kann.

Dazu wurde der Linearitätsbereich der scannergestützten Quantifizierungen mit den Auswertungen verglichen, die auf einer Datenerfassung mit Hilfe des Phosphoimagers oder mit Hilfe eines Laser-Densitometers beruhen. Bei der Phosphoimagerauswertung wurde direkt eine ^{32}P -GTP Verdünnungsreihe gemessen. Für die beiden anderen Methoden wurde zunächst eine Autoradiographie durchgeführt und der Röntgenfilm nach der Entwicklung im Laserdensitometer bzw. Flachbettscanner abgetastet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt. Hier zeigt sich, daß wie erwartet die Auswertung mit dem Phosphoimager den größten Linearitätsbereich aufweist.

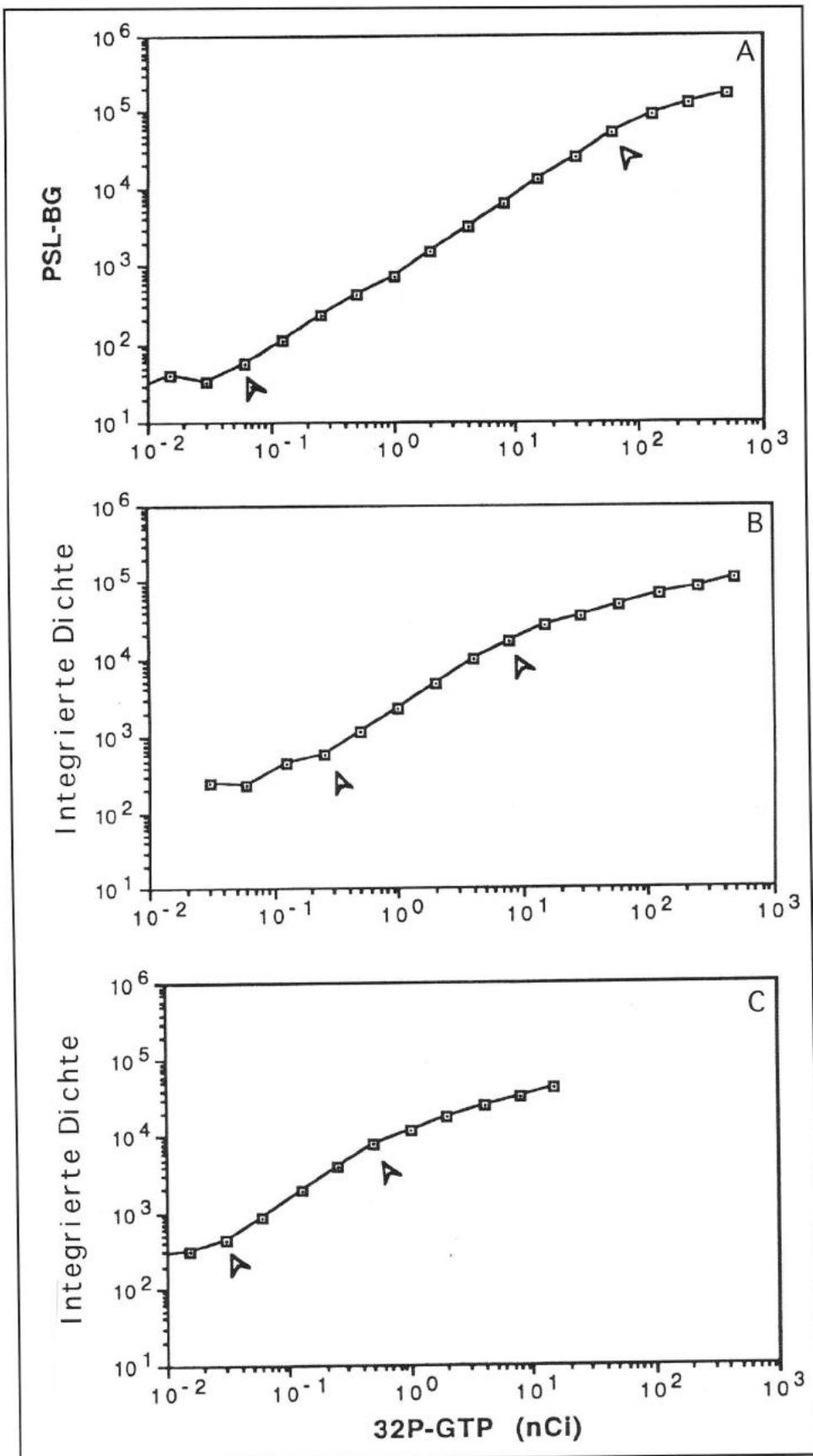


Abb. 3.6: Vergleich der Linearitätsbereiche verschiedener Quantifizierungsmethoden.

A - Phosphoimager, B - Laserdensitometer, C - Flachbettscanner. Gemessen wurde im Phosphoimager eine $^{32}\text{P-GTP}$ Verdünnungsreihe. Für die beiden anderen Methoden wurde eine Autoradiographie des Filters von den Scannern (Laserdensitometer, Flachbettscanner) abgetastet.

Der Linearitätsbereich des Laserdensitometers fällt dagegen deutlich ab, ist aber selbst wiederum nur wenig größer als bei der scannergestützten Auswertung.

Um das weitere Einsatzspektrum der scannergestützten Auswertung auch für die Quantifizierung von Proteinbanden in Gelen oder auf Blots zu erproben, wurden Verdünnungsreihen von vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Quantifizierung mit der hier entwickelten Methode auch für diese Form von Versuchsergebnissen prinzipiell geeignet ist (Ergebnisse nicht dargestellt).

Nachdem mit den oben beschriebenen Methoden die Grundlagen gelegt waren, um umfangreiche Untersuchungen mit C-Terminal fixierten Peptiden durchführen und vergleichbar auszuwerten zu können, konnten jetzt die eigentlichen Fragestellungen zur Lokalisation linearer, antigener Epitope auf den Pertussis Toxin Untereinheiten untersucht werden

3.3. Antigene Epitope in den Pertussis Toxin Untereinheiten

Die Ausgangsfragestellung der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungsergebnisse war, ob und mit welcher Methodik innerhalb der fünf Pertussis Toxin Untereinheiten lineare Epitope, gegen die eine Immunantwort nach erfolgter Impfung mit einem Pertussis Toxin enthaltenden Impfstoff bzw. nach einer Infektion mit *B.pertussis* induziert wird, nachweisbar sind.

Die generelle Eignung von fixierten Peptiden für diese Fragestellung konnte bereits in einer zurückliegenden Arbeit von Raupach (1993) im Rahmen Ihrer Untersuchungen zum S1-Protomer anhand einiger Seren gezeigt werden.

Aus ihrer Arbeit ergeben sich Hinweise darauf, daß eine Immunreaktion gegen bestimmte lineare 12mer Peptide mit den Bezeichnungen 721, 722 und 723, entsprechend den Aminosäurepositionen 5-16, 19-30 und 211-222 innerhalb der kodierenden Aminosäuresequenz der S1 Untereinheit von PT reproduzierbar in Zusammenhang mit einer zeitlich nur kurz zurückliegenden Infektion steht.

Die Untersuchungen wurden daher derart angelegt, daß sie die Voruntersuchungen von Bärbel Raupach (1993) aufgreifen, sie weiterführen und ggf. absichern sowie auch alle fünf Untereinheiten des Pertussis Toxins mit einzubeziehen.

3.3.1 Nachweis von anti-Pertussis-Toxin-Antikörpern in den eingesetzten Humanseren in ELISA-Tests mit Holotoxin und immobilisierten Peptiden

ELISA-Tests auf das Vorhandensein ausreichender Mengen von anti-Pertussis-Toxin-Antikörpern, die zu einer diagnostischen Aussage für den Arzt beitragen könnten, waren zum

Zeitpunkt dieser Untersuchungen kaum verfügbar. Die Ergebnisse der hier untersuchten Fragestellungen könnten daher unter anderem in die Entwicklung neuer Testsysteme einfließen.

Für die zur Verfügung stehenden Seren mußten in vielen Fällen zunächst die spezifischen Antikörpertiter bestimmt werden, da die Proben zu einem großen Teil nur aufgrund einer möglicherweise wenig verlässlichen symptomatischen Diagnose des Arztes genommen worden waren und auch noch nicht immunologisch voruntersucht waren.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen mit Hilfe des unter 2.2.2.2 beschriebenen ELISA wurden geeignete Seren für die weitere Identifizierung und Analyse erkannter Epitope auf den Pepsans von Pertussis Toxin ausgewählt.

Eine Reihe von Seren wurde mit dem verfügbaren Testsystem der Firma Viramed (vgl. 2.2.2.3) auf IgG-, IgM-, und IgA-Antikörper untersucht. Die diagnostische Auswertung dieser Tests wird hier eigenen Untersuchungen im ELISA gegen Pertussis Toxin sowie den Ergebnissen im Pepsan gegenübergestellt und im Rahmen der Diskussion vergleichend bewertet.

Als Vorarbeiten für die Entwicklung eines ELISA-basierenden Testsystems mit immobilisierten Peptiden wurde weiterhin nach geeigneten Möglichkeiten zur Präsentation von Peptiden gegenüber humanen Antiseren gesucht.

3.3.1.1 Reaktionen gegen Pertussis Toxin

Für einen Teil der in dieser Arbeit untersuchten Seren konnten von den verschiedenen Laboratorien und niedergelassenen Ärzten, die uns die Seren zur Verfügung gestellt hatten, keine immunologischen Angaben gemacht werden.

Um für die nachfolgenden Untersuchungen der Seren im Pepsan der Pertussis Toxin Einheiten Daten über das generelle Vor- oder Nichtvorliegen von IgG-Antikörpern gegen Pertussis Toxin zu erheben, wurde daher eine Reihe von Seren im ELISA gegen immobilisiertes Pertussis Toxin untersucht.

Weiterhin sollten die hier gewonnenen Ergebnisse in die Bewertung des kommerziellen Testsystems (vgl. 3.3.1) bezüglich seiner Aussagekraft für das Vorhandensein einer effizienten Immunantwort gegenüber Pertussis Toxin einfließen. Tabelle 3.1 zeigt die im ELISA-Test gegen Pertussis Toxin ermittelten IgG-Titer.

Serum	IgG-Titer	Serum	IgG-Titer
S 1	1600	S 12	3200
S 2	800	S 13	200
S 3	-	S 14	3200
S 4	3200	S 15	3200
S 5	400	S 16	3200
S 6	3200	S 17	3200
S 7	-	S 18	800
S 8	400	S 19	400
S 9	100	S 20	3200
S 10	200	S 21	400
S 11	800		

Tab. 3.1: IgG-Titer der humanen Antiseren S1-S21 gegenüber Pertussis Toxin.

3.3.1.2 Reaktionen der Kaninchen- und Humansen im Viramed Testsystem

Für den Vergleich der rein symptomatischen ärztlichen Diagnose mit verschiedenen Pertussis Toxin spezifischen Testmethoden und als Grundlage für die Diskussion der generellen diagnostischen Relevanz der im Pepscan detektierten linearen immunogenen Epitope wurde ein kommerziell erhältlicher Test der Firma Viramed (Planegg-Martinsried) mit diagnostischer Auswertung zur Untersuchung von Seren nicht geimpfter Patienten eingesetzt.

Bei diesem Test werden die Reaktionen von IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern gegenüber einer immobilisierten Präparation von ganzen *Bordetellen* im Rahmen eines ELISA-Tests differenziert und im Vergleich zu vom Hersteller ausgewählten negativen sowie schwach und stark positiven Kontrollseren ausgewertet.

Aus dem Vergleich mit den Kontrollseren ergibt sich für jede Immunglobulin-Klasse ein spezifisches Verhältnis (Ratio), das das betreffende Serum charakterisiert und Rückschlüsse auf akute oder zurückliegende Infektionen zulässt.

Die Bewertung der Proben erfolgte nach Berechnung der Ratio wie in Tabelle 3.2 angegeben.

ELISA-Test	Grenzen für die berechneten Ratio		
	negativ (-)	positiv (+)	grenzwertig
IgG	≤ 0,8	0,8 - < 1,1	≥ 1,1
IgA	< 0,9	0,9 - < 1,1	≥ 1,2
IgM	< 0,9	0,9 - < 1,1	≥ 1,1

Tab. 3.2: Grenzwerte für die berechneten Verhältnisse (Ratio) für Humansen der ELISA-Tests mit dem Viramed Testsystem.

Eingetragen ist jeweils der Bereich, in dem die berechnete -Verhältnisse als negativ, positiv oder grenzwertig bewertet werden (vgl. 2.2.2.3).

Tabelle 3.3 zeigt die berechneten Verhältnisse (Ratio) für die untersuchten Seren und die nach dem Vergleich mit den Testseren nach diesen Kriterien zu stellende Diagnosen.

Serum	Ratio (Diagnose)			Serum	Ratio (Diagnose)		
	IgG	IgA	IgM		IgG	IgA	IgM
25/1833	0,80 (-)	1,01 (?)	2,49 (+)	63/401991	0,54 (-)	0,29 (-)	0,60 (?)
27/1323	2,15 (+)	1,31 (+)	2,62 (+)	6391	2,25 (+)	0,70 (-)	2,75 (+)
28/3243	1,41 (+)	1,11 (+)	2,45 (+)	64/515284	1,02 (?)	1,30 (+)	2,01 (+)
29/3373	3,71 (+)	1,47 (+)	3,01 (+)	6420	1,53 (+)	1,20 (+)	2,24 (+)
31/3319	3,74 (+)	1,50 (+)	2,99 (+)	65/515030	0,80 (-)	0,82 (+)	1,34 (+)
32/3426	1,60 (+)	1,76 (+)	2,00 (+)	66/401900	0,73 (-)	0,51 (+)	1,91 (+)
33/3444	1,38 (+)	1,30 (+)	1,57 (+)	67/401861	1,09 (?)	0,15 (-)	0,27 (-)
34/3312	1,04 (+)	1,52 (+)	0,79 (-)	6705	2,33 (+)	1,01 (-)	2,77 (+)
35/506041	1,30 (+)	1,30 (+)	1,55 (+)	6746	0,53 (-)	0,96 (-)	0,58 (-)
36/410353	2,21 (+)	1,40 (+)	1,94 (+)	6758	0,36 (-)	0,28 (-)	0,70 (-)
37/410617	1,16 (+)	1,10 (+)	0,96 (+)	6777	1,01 (+)	1,50 (+)	2,21 (+)
38/409849	0,88 (?)	1,00 (?)	0,56 (-)	6778	1,31 (+)	1,10 (+)	0,88 (-)
39/410790	2,67 (+)	1,50 (+)	0,95 (+)	6782	2,52 (+)	0,47 (-)	1,22 (+)
40/410806	1,82 (+)	1,10 (+)	2,26 (+)	68/402102	0,25 (-)	0,17 (-)	3,26 (+)
402008	2,44 (+)	0,68 (+)	1,94 (+)	70/402005	0,39 (-)	0,18 (-)	0,71 (+)
41/505727	0,58 (-)	0,50 (-)	1,12 (+)	GW	0,80 (-)	1,19 (+)	0,98 (+)
42/410016	1,24 (+)	1,30 (+)	0,66 (-)	S01	0,78 (-)	1,07 (?)	1,20 (+)
43/410172	2,44 (+)	1,50 (+)	1,05 (+)	S02	0,47 (-)	0,22 (-)	0,98 (+)
44/409649	2,45 (+)	1,20 (+)	2,50 (+)	S03	0,77 (-)	0,23 (-)	2,30 (+)
45/1	1,55 (+)	0,36 (-)	0,37 (-)	S04	1,60 (+)	0,72 (-)	2,81 (+)
46/2	0,87 (-)	0,66 (+)	0,75 (-)	S05	0,67 (-)	0,56 (-)	0,30 (-)
47/3	1,78 (+)	0,87 (+)	0,64 (?)	S06	1,76 (+)	1,13 (+)	1,67 (+)
48/4	0,17 (-)	0,19 (-)	0,69 (+)	S07	3,62 (+)	1,24 (+)	1,82 (+)
49/5	1,75 (+)	0,98 (+)	1,31 (+)	S08	2,50 (+)	1,04 (?)	2,77 (+)
50/6	1,50 (+)	0,59 (+)	0,62 (?)	S09	0,38 (-)	0,18 (-)	0,30 (-)
51/7	1,72 (+)	0,97 (+)	1,92 (+)	S10	0,34 (-)	0,27 (-)	0,10 (-)
52/8	1,52 (+)	0,56 (+)	0,94 (+)	S11	0,37 (-)	0,10 (-)	0,44 (-)
53/9	1,99 (+)	1,04 (+)	1,14 (+)	S12	0,61 (-)	1,54 (+)	2,45 (+)
54/10	1,80 (+)	0,93 (+)	1,24 (+)	S13	0,35 (-)	0,16 (-)	0,16 (-)
55/11	1,78 (+)	0,99 (+)	0,33 (-)	S14	4,96 (+)	1,40 (+)	2,73 (+)
56/12	1,47 (+)	0,71 (+)	0,48 (-)	S15	2,17 (+)	0,84 (?)	2,07 (+)
57/13	2,27 (+)	1,53 (+)	1,10 (+)	S16	1,54 (+)	1,22 (+)	1,76 (+)
58/14	1,60 (+)	0,90 (+)	1,14 (+)	S17	3,94 (+)	1,08 (+)	2,71 (+)
59/15	1,30 (+)	0,67 (+)	0,72 (+)	S18	5,12 (+)	1,35 (+)	2,57 (+)
60/515130	0,21 (-)	0,15 (-)	2,72 (+)	S19	2,16 (+)	0,45 (-)	2,22 (+)
61/401840	1,71 (+)	0,35 (-)	3,29 (+)	S20	2,22 (+)	1,55 (+)	2,01 (+)
62401860	1,29 (+)	1,57 (+)	3,56 (+)	S21	0,40 (-)	0,44 (-)	0,85 (-)
6265	2,32 (+)	1,23 (+)	2,86 (+)	S22	3,12 (+)	1,10 (+)	2,86 (+)
6277	1,94 (+)	1,57 (+)	2,83 (+)	S23	0,41 (-)	0,35 (-)	0,61 (-)
6293	3,28 (+)	1,22 (+)	2,83 (+)	S24	0,76 (-)	0,87 (?)	2,45 (+)

Tab. 3.3: Viramed-Test.

Die Verhältnisse (Ratio) und die daraus abgeleiteten Diagnosen der im Viramed ELISA-Test untersuchten Humanseren für IgG-, IgA- und IgM-Antikörper gegenüber *B.pertussis*. Die jeweilige Diagnose ist in Klammer angegeben. (+) = positiv, (-) = negativ, (?) = grenzwertig.

3.3.1.3 Reaktionen gegen immobilisierte Peptide von Pertussis Toxin

Im Rahmen der Arbeiten von Bärbel Raupach (Raupach 1993) wurden drei Peptide innerhalb der S1-Untereinheit von Pertussis Toxin ermittelt, die potentiell von diagnostischer Relevanz bei der Unterscheidung zwischen akuten und zurückliegenden Infektionen bzw. Impfungen mit *B.pertussis* (-Vakzinen) sind.

Für einen diagnostischen Einsatz ist im allgemeinen die Entwicklung eines ELISA-Tests anzustreben, da hierbei große Probenzahlen routinemäßig weitgehend standardisiert und automatisiert untersucht werden können.

In einem ersten Ansatz wurden die Peptide, wie auch beim ELISA-Test gegen Pertussis Toxin, durch einfache Adhäsion an ELISA-Platten gebunden und die beschichteten Platten mit positiven und negativen Kontrollseren inkubiert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine Erkennung der Peptide durch Humansenen.

Die Ursache für dieses negative Ergebnis kann darin begründet liegen, daß die Peptide wie in Abb. 3.7 a) gezeigt im wesentlichen längsgestreckt an der Polystyroloberfläche der ELISA-Platte anhaften und dadurch keine freie dreidimensionale Struktur einnehmen können.

Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, um diesen Effekt auszuschließen.

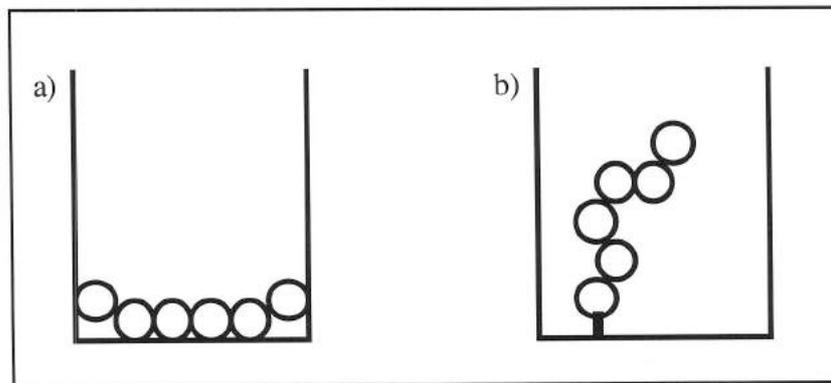


Abb. 3.7: Präsentation von Peptiden auf Elisa-Platten.

Schematisch dargestellt ist die unterschiedliche Präsentation von Peptiden, die an einer ELISA-Platte adhären a), gegenüber solchen, die über einen an die ELISA-Platte gekoppelten Spacer gebunden sind b). Im Falle der adhären Peptide ist von einer flachen Anlagerung an die Kunststoffoberfläche auszugehen, wohingegen die Kupplung an einen Spacer eine freiere Präsentation und die Möglichkeit zum Aufbau einer dreidimensionalen Konformation zuläßt.

Ein bereits von Bärbel Raupach untersuchter Ansatz ist die kovalente Kupplung der zu exponierenden Peptide über eingefügte Cystein-Gruppen an Biotin.

Die derart gekuppelten Peptide wurden in zuvor mit Avidin oder alternativ Streptavidin beschichteten ELISA-Platten über die Biotin-Avidin Wechselwirkung gebunden. In beiden Fällen zeigten sich jedoch nicht zu unterdrückende Wechselwirkungen des IgGs der eingesetzten Seren mit der Grundbeschichtung (Avidin bzw. Streptavidin) der Platten.

Der daraus resultierende Hintergrund ließ eine Auswertung unmöglich werden.

Das Ziel, die zu exponierenden Peptide in freier, dreidimensionaler Konfiguration zu präsentieren, kann auch erreicht werden, indem oberflächlich derivatisierte und mit Spacern versehene ELISA-Platten (vgl. Abb. 3.7b) eingesetzt werden.

Die hierfür im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten CovaLink-ELISA-Platten befanden sich zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch im Entwicklungsstadium. Sie ermöglichen, die zu präsentierenden Peptide über ihre C-terminalen Carboxylgruppen an etwa 2 nm lange Spacer zu koppeln, die ihrerseits an der Polystyroloberfläche fixiert vorliegen.

In diesen Experimenten wurden die bereits für direkte Bindungsnachweisversuche und für die Kupplung an Biotin verwendeten Peptide 721-C, 722-C, 723-C (vgl. 2.1.3) eingesetzt.

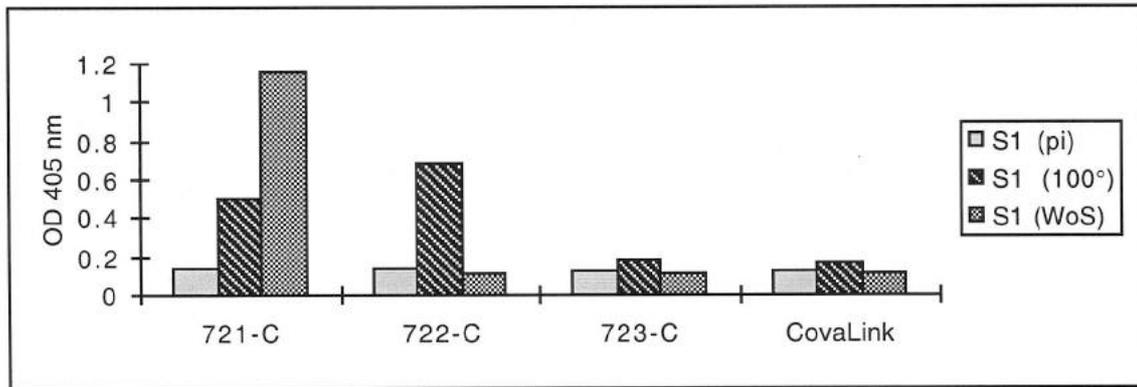


Abb. 3.8: Bindung von Kaninchenserum an die an CovaLink-Platten gekuppelten Peptide 721-C, 722-C und 723-C.

Nachweis von gebundenem IgG im ELISA. Die Säulengruppen eins bis drei zeigen Wechselwirkungen mit den jeweiligen Peptiden. Die vierte Gruppe zeigt die Wechselwirkung der Seren mit der CovaLink-Platte selbst. Dargestellt sind die bei 405 nm gemessenen optischen Dichten (OD) der Versuchsansätze nach 30' Inkubation mit dem Farbstoff. Die Ausgangsverdünnung der Seren liegt bei 1:1.000 bei S1(WoS), 1:50 beim Präimmunserum S1 (pi) und 1:50 bei S1(100°).

Die ersten Tests wurden mit den zur Verfügung stehenden anti-S1 Kaninchenserum (S1(100°), generiert gegen denaturierte S1 Untereinheit, dem Präimmunserum S1(Pi) und S1(WoS), generiert gegen die nicht-denaturierte S1 Untereinheit) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 dargestellt.

Das Peptid 723-C wird hierbei von keinem Serum erkannt.

Das Präimmunserum S1(pi) zeigt in einer Verdünnung von 1:50 mit keinem der Peptide eine deutliche Wechselwirkung.

Serum S1(100°) erkennt in dieser Verdünnung die Peptide 721-C und 722-C. Das um den Faktor 1:1000 verdünnte Serum S1(WoS) schließlich erkennt nur das Peptid 721-C. Eine schwache Wechselwirkung der Seren mit der CovaLink-Platte selbst ist vorhanden. Eine Auswertung könnte davon zum Teil beeinflusst werden, da schwache Reaktionen möglicherweise nicht mehr festgestellt werden können.

Als Ergebnis der Untersuchungen von Bärbel Raupach (1993) finden sich Reaktionen gegenüber den Peptiden 721-C in allen und gegen 722-C in vielen Seren von Patienten mit akuter oder zurückliegender Infektion. Antikörper gegen das Peptid 723-C hingegen finden sich nur in den Seren akut infizierter Patienten. Das bedeutet, daß die Nichtreaktion mit dem Peptid 723-C auch für alle Kaninchenserum erwartet werden konnte.

Der bereits bei den Kaninchenserum merkliche (negative) Einfluß der CovaLink-Plattenbeschichtung auf die Nachweisgrenze des ELISA-Tests erwies sich beim Einsatz von humanen Testserum als grundsätzliches Problem.

Bei allen 40 ausgewählten humanen Serumproben war der allein von der Wechselwirkung des IgGs im humanen Serum mit der Beschichtung oder dem zur Blockierung eingesetzten

BSA hervorgerufene Hintergrund sehr hoch. Er betrug im Mittel etwa das zehnfache der auf die Wechselwirkung von Beschichtung und zweitem Antikörper zurückzuführenden Effekte.

Die auf die Wechselwirkung mit den fixierten Peptiden zurückzuführenden Extinktionen lagen durchweg höher als die Wechselwirkung zwischen Serum und Beschichtung allein.

Da jedoch auch bei dem in allen anderen Tests negativen Kontrollserum S 13 vergleichsweise deutliche Extinktionsanstiege auftraten, war die Auswertung unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen insgesamt in Frage zu stellen.

Als Ansatz zur Eindämmung des Hintergrunds wurde die Versuchsvorschrift abgewandelt und erst nach der Blockierung der Oberfläche mit BSA erstmals mit Detergenz gewaschen, wodurch eine verbesserte Belegung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA erreicht werden sollte.

Nochmalige Vergleiche mit der Reaktion der Kaninchenserum zeigten, daß die Differenzierbarkeit durch diese Maßnahme leicht verbessert werden kann, für die Humanserum jedoch weiterhin schwierig ist.

Dieser Vergleich wird in Abb. 3.9 dargestellt. Die Reaktionen der Humanserum finden sich mit allen Peptiden und heben sich nur wenig vom unspezifischen, durch das Serum selbst verursachten Hintergrund ab, so daß eine zuverlässige Signal-Hintergrund-Differenzierung nicht möglich ist.

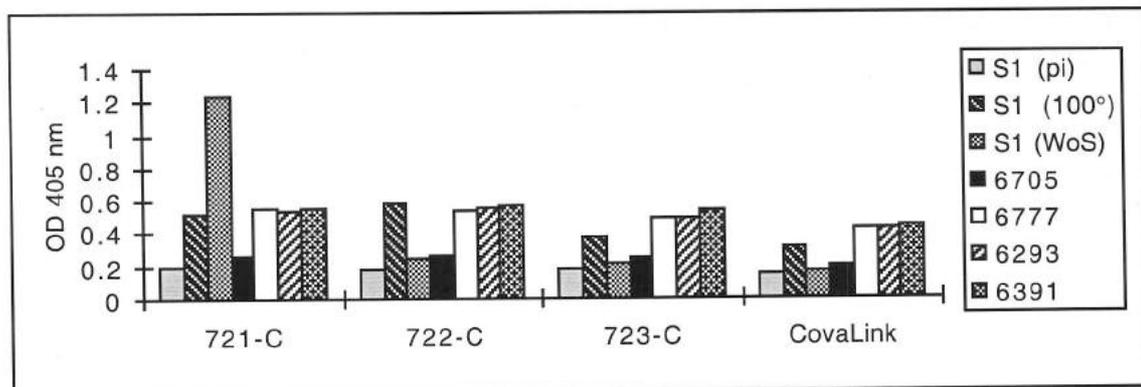


Abb. 3.9: Bindung von humanen und Kaninchenserum an die an CovaLink-Platten gekuppelten Peptide 721-C, 722-C und 723-C.

Nachweis von gebundenem IgG. Die vierte Säulengruppe zeigt die Wechselwirkung der Seren mit der CovaLink-Platte selbst. Dargestellt sind die bei 405 nm gemessenen optischen Dichten (OD) der Versuchsansätze nach 30' Inkubation mit dem Farbstoff. Die Ausgangsverdünnung der Seren liegt bei 1:1.000 bei S1(WoS). Bei allen anderen Seren beträgt sie 1:50.

Die Kupplung von Peptiden an CovaLink-Platten scheint aufgrund dieser experimentellen Ergebnisse für die hier geforderte Differenzierbarkeit nicht geeignet zu sein. Diese Methode der Präsentation der Peptide wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.3.2 Der Einsatz von Pepscans zur Identifizierung linearer, humaner Epitope des Pertussis Toxin

Ziel der Versuche zur Detektion immunogener Epitope innerhalb der fünf Untereinheiten von Pertussis Toxin sollte die Identifizierung linearer (kontinuierlicher) und ggf. auch konformeller (diskontinuierlicher) Epitope sein, gegen die regelmäßig während einer humanen Immunantwort Antikörper gebildet werden.

Kenntnisse über Aufbau und Struktur dieser Epitope sind hilfreich für die Entwicklung neuer Diagnoseverfahren, die spezifische Antikörpertiter gegen immunologische Schlüssepitope des zu betrachtenden Antigens bestimmen. Mit derart differenzierten Tests sind voraussichtlich weit bessere Aussagen über Ausprägung und Status der individuellen Immunität eines Patienten als derzeit möglich.

Generell lassen sich die durch Antikörper erkannten Protein-Epitope in zwei Gruppen einteilen.

Zur ersten Gruppe gehören die linearen (kontinuierlichen) Epitope, die aus einem fortlaufenden Teilpeptid der Zielproteinsequenz gebildet werden.

Die zweite Gruppe besteht aus konformellen (diskontinuierlichen) Epitopen. Sie bestehen aus einer dreidimensionalen Struktur im gefalteten Protein, die in der Sequenz des betreffenden Proteins „diskontinuierlich“ angeordnet sind und die erst durch die dreidimensionale Faltung der Polypeptidkette in räumliche Nähe gerückt werden.

Eine Epitop-Bindungsstelle in einem Antikörper besitzt jeweils 2 bindende Bereiche mit verschiedenen Bindungsaffinitäten, die gemeinsam die Epitoperkennung sicherstellen. Für ein lineares Epitop bestehen diese Affinitäten für nahtlos aneinanderschließende oder zwei nah aufeinanderfolgende Teilbereiche der linearen Sequenz, die sich bei der Bindung sterisch optimal an die bindenden Bereiche anlagern können.

Bei der Antikörperbindung an konformelle Epitope bedarf es hingegen Affinitäten gegenüber nichtlinear aufeinanderfolgende Teilbereiche der erkannten Struktur insgesamt. Dabei ist es möglich, daß diese Teilbereiche wiederum kleinen, linearen Abschnitten entsprechen.

Ist in diesen Fällen die Bindung gegen eine der linearen Teilsequenzen ausreichend hoch, so kann ein Antikörper gegen ein konformelles Epitop mit verminderter Affinität auch ein oder mehrere Teilsequenzen erkennt.

Im Pepscan gegen lineare Epitope können daher also auch einige, im Prinzip konformelle, Epitope auf dem Zielprotein erkannt werden. Die Antikörper reagieren hierbei charakteristischerweise gegen ein oder mehrere, in der linearen Peptidkette deutlich voneinander getrennten Teilpeptide, die jedoch innerhalb der nativen, dreidimensionalen Struktur eng benachbart vorliegen.

Bei der Untersuchung humaner Immunreaktionen in Folge einer Infektion oder Impfung wird immer die Reaktion aller gegen das Antigen auftretenden Antikörper-Subpopulationen einer Antikörperklasse, also deren kollektive Erkennung des Antigens bzw. seiner Fragmente, betrachtet.

Immunologisch bedeutsame konformelle Epitope kennzeichnen häufig einen charakteristischen und konservierten Molekülbereich: etwa die Rezeptorbindungsdomänen oder ein reaktives Zentrum im Protein.

Insbesondere bei den hier untersuchten polyklonalen Antiseren ist zu erwarten, daß diese Bereiche in Seren erfolgreich immunisierter Patienten durch mehrere Antikörper-Subpopulationen abgedeckt sind.

Der Umstand, daß hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit kollektive Erkennung beobachtet wird, die nicht weiter differenziert werden kann, hat wichtige Auswirkungen auf die Erwartung des Umfangs und der scharfen Abgrenzung der einzelnen Epitope.

Ein von mehreren Antikörper-Subpopulationen gemeinsam oder überlappend erkanntes lineares oder konformes Epitop kann insgesamt größer sein, als ein von einem einzelnen Klon allein detektierbares. Weiterhin kann die Beobachtung eines „scheinbar“ konformellen Epitops tatsächlich in der Erkennung eines ausgedehnten, immunologisch wichtigen Bereichs durch mehrere Antikörpersubpopulationen, die wiederum lineare Epitope erkennen, bestehen. Dieser Effekt wird noch weiter verstärkt, wenn - wie in diesem Fall - eine größere Gruppe von Seren betrachtet wurde.

3.3.2.1 Kontrollen und nicht-reaktive Seren

Für die Untersuchungen zur Detektion linearer Epitope sollten durch den Einsatz von Negativkontrollen die unspezifischen Reaktionen der Peptide mit humanem IgG und mit dem eingesetzten sekundären Antikörper aufgeklärt werden.

Zusätzlich sollten als Negativkontrollen unter den verwendeten Humansenen solche gefunden werden, die mit dem Pepscan von Pertussis Toxin nicht reagieren und für die laut symptomatischer, ärztlicher Diagnose eine zurückliegende Infektion mit *B.pertussis* nicht bekannt bzw. diagnostiziert ist. Aus den mit diesen Seren erhaltenen Reaktionen mit den synthetischen Peptiden auf den Spots wurden Kriterien für die Definition einer unspezifischen Hintergrundreaktion entwickelt. Zur Bestimmung der spezifischen Reaktionen der jeweiligen Testseren wurde der Wert der unspezifischen Hintergrundreaktion von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen.

Eine Kontrolle hinsichtlich möglicher unspezifischer Reaktionen der Peptide mit dem zweiten Antikörper gegen humanes IgG wurde für alle angefertigten Filterserien durchgeführt. Innerhalb der für die Proben mit humanen Seren verwendeten Standard-Inkubationszeit von 30 Minuten zeigte sich in keinem Fall ein detektierbarer Hintergrund. Nach einer maximalen Entwicklungszeit von einer Stunde war in keiner der hergestellten Filterserien eine über dem Hintergrund liegende Reaktion des 2. Antikörpers mit einem der Peptide festzustellen (Abb. 3.10).

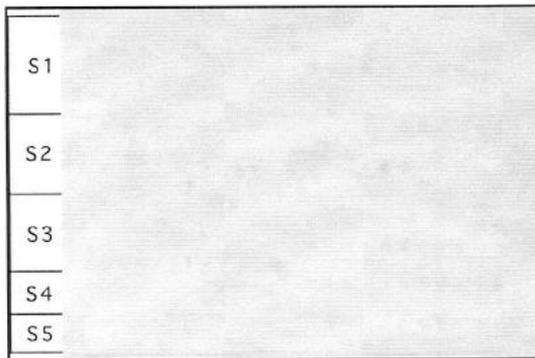


Abb. 3.10: Negativkontrolle im Pepsan gegen Pertussis Toxin.

Inkubiert wurde ein Standard 12mer Pertussis Toxin Pepsan mit allen 5 Untereinheiten nur mit dem in den Tests mit humanem Antiseren als zweitem Antikörper verwendeten anti-hIgG. Nach einer Inkubationsdauer von 1 Stunde mit dem Farbreagenz zeigt sich über einem allgemeinen Hintergrund lediglich eine sehr schwache Reaktion mit einigen Peptiden der weitgehend identischen S3 und S4 Untereinheiten.

Die Suche nach Negativkontrollen innerhalb der Sammlung zu untersuchender Humansenen erwies sich als unerwartet schwierig, da jedes dieser Seren zumindest eine schwache Reaktion in den durchgeführten ELISA-Tests gegen das Pertussis Holotoxin zeigte.

Weiterhin zeigte sich bei der Mehrzahl der untersuchten humanen Seren bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit eine leichte Hintergrundfärbung an den nicht durch Spots belegten Filterstellen.

Hierbei handelt es sich offenbar um eine unspezifische Reaktion der Seren mit dem verwendeten Blockingreagenz, die auch durch stringenteres Waschen und dem Wechsel des Blockingreagenzes nicht unterdrückt werden konnte. Die beobachteten Unterschiede in der Ausbildung des unspezifischen Hintergrunds ist wahrscheinlich eine Folge der unterschiedlichen immunologischen Vorgeschichte der Seren.

Im Gegensatz dazu verlief die Reaktion mit den synthetischen Peptiden auf den eigentlichen Peptidspotbereichen selbst ohne wesentlichen Hintergrund.

Nicht oder schwach reagierende Peptide zeigten durchweg eine deutlich hinter dem allgemeinen Hintergrund zurückbleibende Farbstoffreaktion auf den jeweiligen Spots und traten daher eher als „ungefärbte“ Spots in Erscheinung.

Dieses Ergebnis liegt vermutlich in der durchgängigen Beladung des Filters mit Peptid an den Spotpositionen begründet, so daß sich dort keine, bzw. kaum Bestandteile des Blockingreagenzes anlagern konnten.

Die Beschaffung negativ diagnostizierter, humaner Seren von Kleinkindern (Alter unter 1 Jahr) war nur eingeschränkt möglich. Die an der Sammlung der Seren beteiligten Kinderärzte stellten Seren von Kindern unter einem Jahr nur dann zur Verfügung, wenn es im Umfeld der Kinder einen akuten Pertussis Fall gab und die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen mit in die Entscheidung für eine Antibiotikabehandlung einfließen sollten.

In diesen Fällen war es jedoch stets fraglich, ob der in vielen Fällen beobachtete Antikörpertiter nicht schon Folge einer, insbesondere im Kleinkindstadium häufig untypisch verlaufenden, beginnenden oder zurückliegenden Pertussis Infektion war (Sotomayor *et al.* 1995, Cherry *et al.* 1989).

In der gesamten zur Verfügung stehenden Kollektion humaner Antiseren von laut Diagnose nichtinfizierten und nichtgeimpften Kindern konnte mit S13 nur ein einziges Serum (Abb. 3.11a) gefunden werden, das wirklich nur extrem schwach mit dem Pepscan von Pertussis Toxin reagierte.

Im ELISA-Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Pertussis Toxin wurde das Serum zwar als negativ diagnostiziert, jedoch zeigte auch dieses Serum eine schwache Reaktion mit PT. In diesem Test wurde, wie bereits erwähnt, über die gesamte humane Serenkollektion hinweg kein Serum identifiziert, das überhaupt keine Reaktion im ELISA mit adhäriertem Pertussis Toxin aufwies. Einige weitere Seren aus der Sammlung von Seren aus der italienischen und deutschen Impfstudie reagierten ebenfalls extrem schwach mit dem Pepscan.

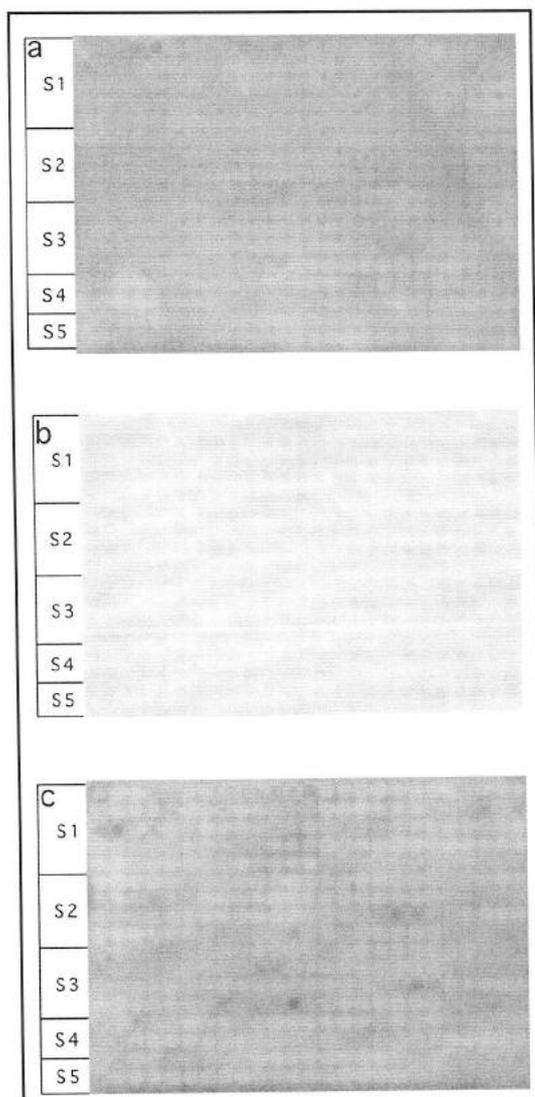


Abb. 3.11: Pepscan der Pertussis Toxin Untereinheiten 1 bis 5 inkubiert mit dem schwach reagierenden humanen Antiserum S13, 4499 und It156(pre).

Verwendet wurde ein 12mer Pepscan der fünf Untereinheiten mit jeweils 2 AS Sequenzversatz zwischen den Peptiden. a) zeigt die Inkubation mit dem Serum S13, b) die Inkubation mit dem Serum 4499 und c) die Inkubation mit dem Preimmunserum It156(pre).

Bei den zur Verfügung stehenden Seren aus den beiden Impfstudien handelt es sich, wie bei Humanseren üblich, in keinem Falle um echte Präimmunsere. Alle Humanseren besitzen aufgrund zurückliegender Infektionen, passiver oder aktiver Immunisierungen eine mehr oder weniger umfangreiche - und leider auch unbekannte - immunologische Vorgeschichte.

Für die Kinder aus der italienischen Impfstudie ist davon auszugehen, daß bereits alle als Kleinkinder gegen Pertus-

sis geimpft worden waren. Auch für die Immunisierungsversuche mit der azellulären Pertussis Vakzine APV 50 erfolgte die erste Blutentnahme offenbar erst nach der Grundimmunisierung. Dennoch wurden unter den Seren aus der deutschen APV 50-Studie und der italienischen Impfstudie mit der rekombinanten Vakzine einige gefunden, bei denen ein niedriger Titer im ELISA gegen Pertussis Toxin mit einer extrem schwachen Reaktion im Pepscan korrelierte.

Als Beispiele für diese Beobachtung dient Serum 4499 (Abb. 3.11 b) für die Seren aus der Studie mit APV 50 sowie das Serum It156(pre), ein Präimmunserum aus der italienischen Impfstudie (Abb. 3.11 c). Nach der Zweitimmunisierung war dann auch bei diesen Seren eine deutliche Reaktion im Pepscan zu beobachten.

Im Pepscan wurde häufiger das Auftreten von bereits nach der Erstimmunisierung im Pepscan reaktiven Seren mit laut ELISA-Diagnose jedoch nur geringem und daher vermutlich nichtprotektivem anti-PT Titer beobachtet. Als Beispiel dient das Serum 4367 (Abb. 3.12) aus der Studie APV 50. Dieses Serum zeigt in der Inkubation mit dem Pepscan von Pertussis Toxin jeweils schwache Reaktion mit einer Reihe von Peptiden aus allen Pertussis Toxin Untereinheiten mit Ausnahme der S4 Untereinheit.

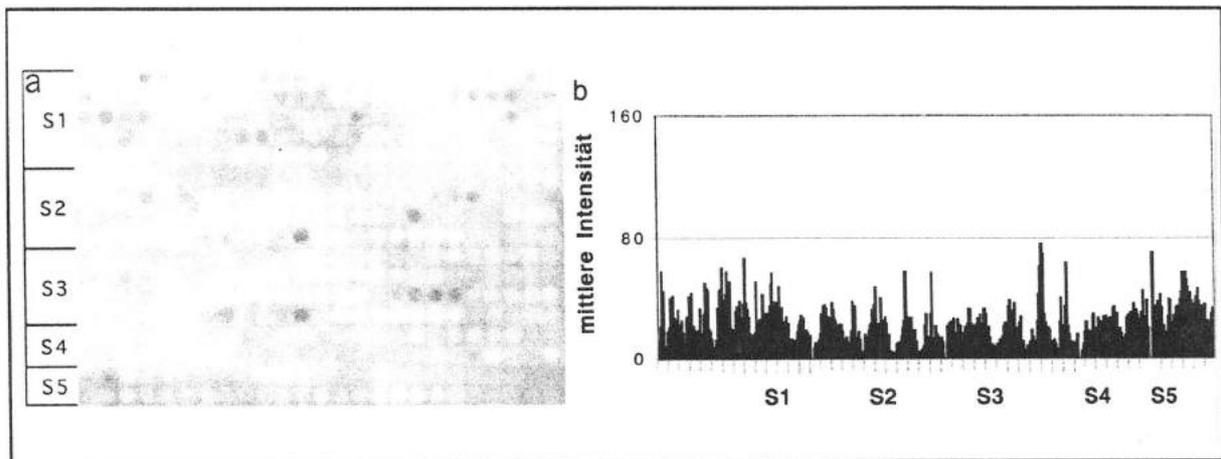


Abb 3.12: Pepscan der Pertussis Toxin Untereinheiten 1 bis 5 inkubiert mit dem Humanserum 4367.

Verwendet wurde ein 12mer Pepscan der fünf Untereinheiten mit jeweils 2 AS Sequenzversatz zwischen den Peptiden. Das Serum 4367 ist ein Präimmunserum aus der Impfstudie zur APV 50-Vakzine. a) Zeigt den Filter mit schwachen Reaktionen mit einigen Peptiden in allen Pertussis Toxin Untereinheiten mit Ausnahme von S4. b) zeigt die Intensitäten der Farbreaktionen auf den einzelnen Peptidspots. In keinem Fall wird ein Wert von 80 (erreichbares Maximum ist 255) für die Intensität überschritten.

Die für die Reaktion des Serums 4367 bestimmten Intensitäten der durch Farbreaktion detektierten Antikörpererkennung überschreiten für kein Peptid den Wert 80 (Abb. 3.12 b).

Somit ist festzustellen, daß eine negative Reaktion mit den 12mer Peptiden der fünf Pertussis Toxin Untereinheiten für Seren von (angeblich) nicht-infizierten Patienten nicht immer die Regel ist. Vielmehr werden auch bei - laut ELISA-Diagnose und aufgrund des anzusetzenden Hintergrund-Abzugs - negativen Seren schwache Reaktionen mit einer Reihe von Peptiden verschiedener Untereinheiten beobachtet.

Daraus folgt, daß allein das generelle Vorliegen von im Pepscan nachweisbaren Antikörpern gegen lineare Peptide aus Pertussis Toxin nicht unmittelbar auch auf eine protektive Immunität gegen Pertussis Toxin schließen läßt.

3.3.2.2 Mit Hilfe des Pepscan von Pertussis Toxin identifizierte, lineare Epitope

Die Detektion linearer Epitope auf Pertussis Toxin erfolgte für jedes Serum individuell auf Pepscans mit allen 5 Pertussis Toxin Untereinheiten. Für Aussagen bezüglich der Charakteristika einer nachgewiesenen Immunantwort wurde zunächst innerhalb der Gruppe von im ELISA gegen Pertussis Toxin eindeutig positiven Seren sowie bei Seren immunisierter Patienten nach gemeinsam erkannten Epitopen gesucht. Die Ergebnisse sind im folgenden, aufgeschlüsselt nach den einzelnen Untereinheiten, dargestellt. In die Auswertung der kollektiv erkannten Epitope wurden insgesamt 38 Postimmun-Seren aus den Impfstudien einbezogen. Auf spezielle Beobachtungen innerhalb der Gruppen der Seren aus den Impfstudien und der Humanseren natürlich infizierter Patienten wird in gesonderten Abschnitten eingegangen. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch zwei der mit Postimmunseren inkubierten Filter nach erfolgter Farbreaktion.

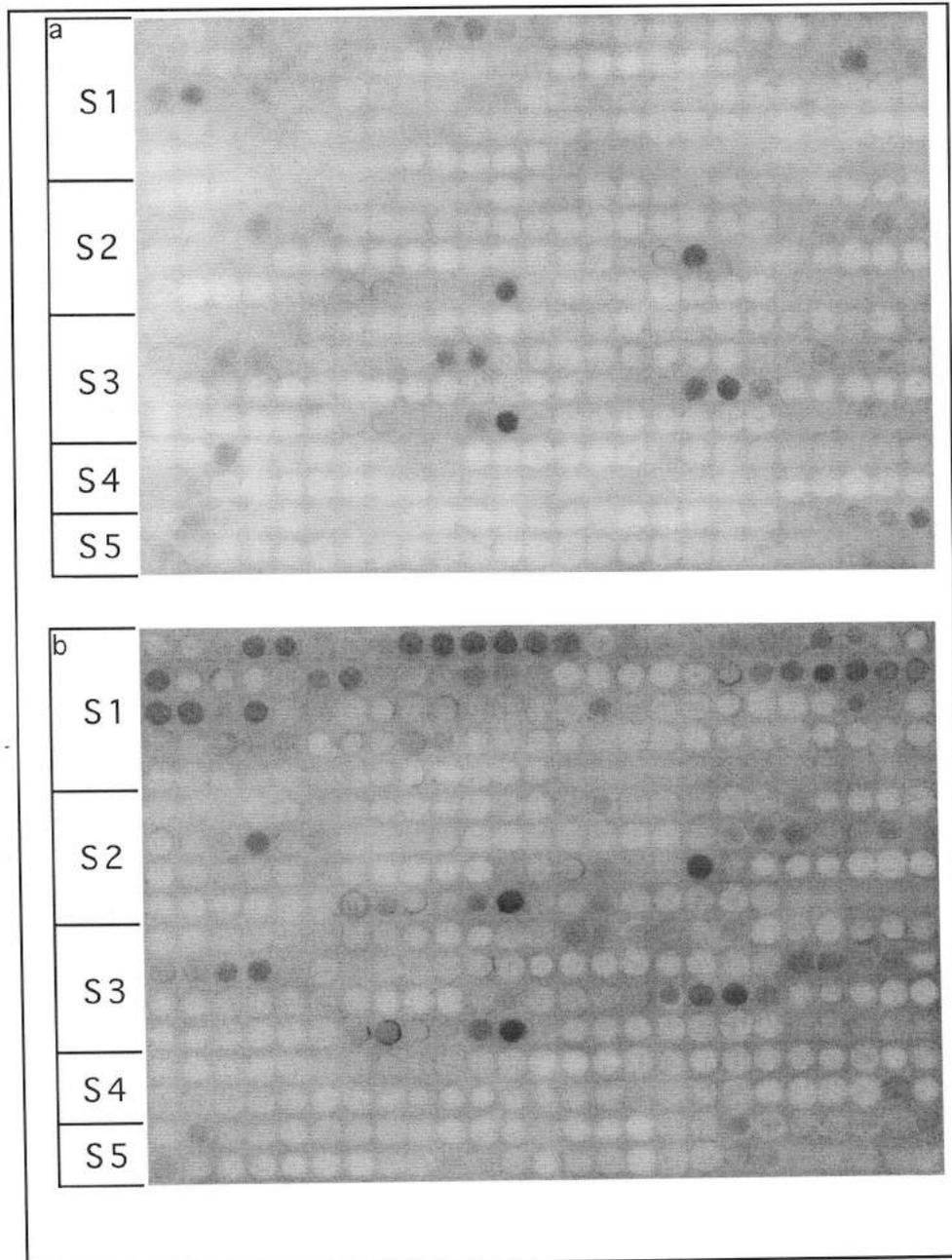


Abb. 3.13: Reaktionen der Immunseren im Pepsan gegen die Untereinheiten S1 - S5 von Pertussis Toxin.

a) Inkubation mit dem Serum It156(post), einem Postimmunserum aus der italienischen Impfstudie. b) Inkubation mit dem Serum 5306, einem Postimmunserum aus der APV 50-Studie.

Für eine semi-quantitative und vergleichende Auswertung wurden die aufgetretenen Farbreaktionen wie beschrieben digitalisiert und in Graustufenwerte umgewandelt. Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt und als sicher erkannte Epitope nur solche eingeschlossen und ausgewertet, die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten (120 von 255).

Der nicht zu berücksichtigende Hintergrund-Abzug wurde, basierend auf den maximal erreichten Intensitäten von im Pepsan bereits reagierenden, jedoch negativ diagnostizierten

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S1/1	P4	7-18	VYRYD SRPPE DV	12
S1/2	P10-13	19-36	FQNGF TAWGN NDNVL DHL	18
S1/3	P22-26	43-62	VGSSN SAFVS TSSSR RYTEV	20
S1/4	P36-38	71-86	AVEAE RAGRG TGHFI G	16
S1/5	P47-54	93-118	ADNNF YGAAS SYFEY VDTYG DNAGR I	26
S1/6	P73	145-156	TRVYH NGITG ET	12

Tab. 3.5: Durch Immunseren erkannte Epitope innerhalb des Pepsans der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt. In die Auswertung wurden nur solche Epitope eingeschlossen, die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten. Die Spalte „Position“ beinhaltet die Position des Epitops innerhalb der Peptidsequenz von S1.

Reaktionen mit der S2 Untereinheit

Die S2 Untereinheit trägt eine der für die Rezeptorbindung wichtigen Domänen innerhalb des B-Oligomers von Pertussis Toxin. Diese ist wichtig für die Einschleusung des Holotoxins in den retrograden Transportweg (el Bayâ *et al.* 1997). Im Pepscan gegen überlappende 12mere auf der S2 Untereinheit wurden insgesamt 5 Epitope mit ausgeprägter Erkennung identifiziert. Die Erkennung der einzelnen Peptide ist in Abbildung 3.15 und Tabelle 3.6 dargestellt.

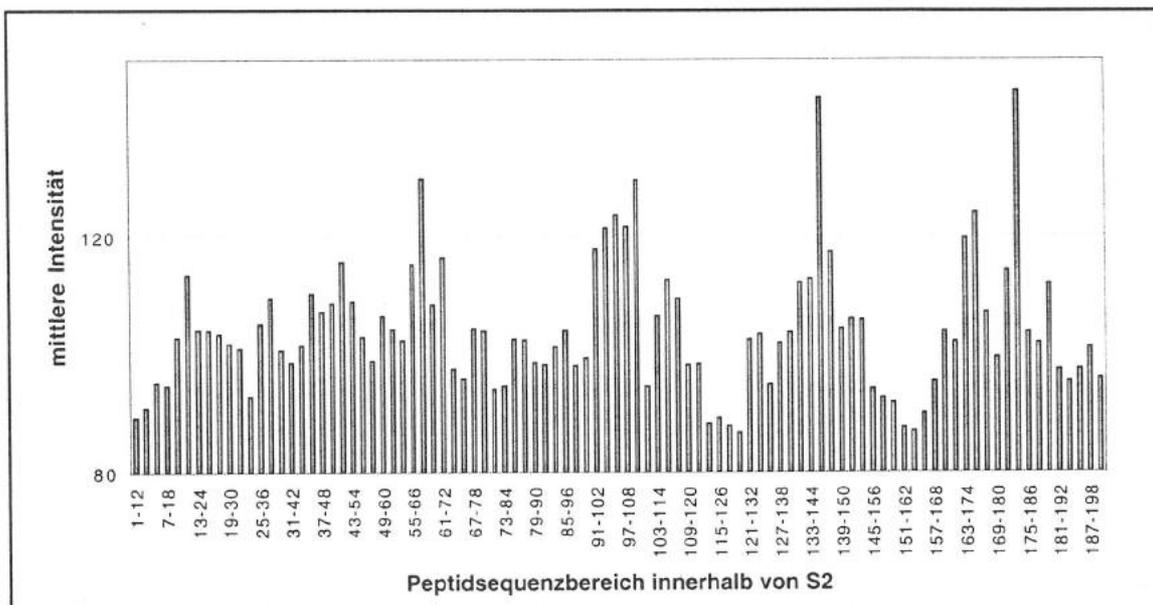


Abb. 3.15: Reaktionen der Immunseren im Pepscan gegen die S2 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Alle Peptide, deren mittlere Intensität den Wert 120 erreicht oder überschreitet, wurden als charakteristisch erkannte Epitope gewertet. Die dargestellten Werte sind gemittelt aus den Ergebnissen mit insgesamt 54 Postimmunseren.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S2/1	P29	57-68	LYDGT YLGGE YG	12
S2/2	P47-50	93-110	NTGQP ATDHY YSNVT ATR	18
S2/3	P68	135-146	TSPYD GKYWS MY	12
S2/4	P83	165-176	VHVSQ EEQYY DY	12
S2/5	P87	173-184	YYDYE DATFE TY	12

Tab. 3.6: Durch Immunsereen erkannte Epitope innerhalb des Pepscans der S2 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt. In die Auswertung wurden nur Epitope eingeschlossen, die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten. Die Spalte „Position“ beinhaltet die Position des Epitops innerhalb der Sequenz von S2.

Reaktionen mit der S3 Untereinheit

Die S3 Untereinheit von Pertussis Toxin trägt, analog zur S2 Untereinheit, eine der für die Rezeptorbindung wichtigen Domänen innerhalb des B-Oligomers von Pertussis Toxin. Zwischen S2 und S3 Untereinheit besteht eine hohe strukturelle Homologie (Stein *et al.* 1994). Diese zeigte sich auch im Pepscan. Es wurden ebenso wie in der S2 Untereinheit 5 Epitope mit ausgeprägter Erkennung identifiziert.

Die Erkennung der einzelnen Peptide ist in Abbildung 3.16 und Tabelle 3.7 dargestellt.

Innerhalb der Reaktionen der Antiseren mit Peptiden von S2 und S3 werden von den Seren innerhalb der Primärsequenz positionell gleiche Bereiche erkannt. Die tatsächlich erkannten Peptidsequenzen stimmen jedoch nur für das jeweils vierte Epitop überein. Alle anderen erkannten Epitope sind in ihrer Sequenz zwar ähnlich, jedoch nicht identisch.

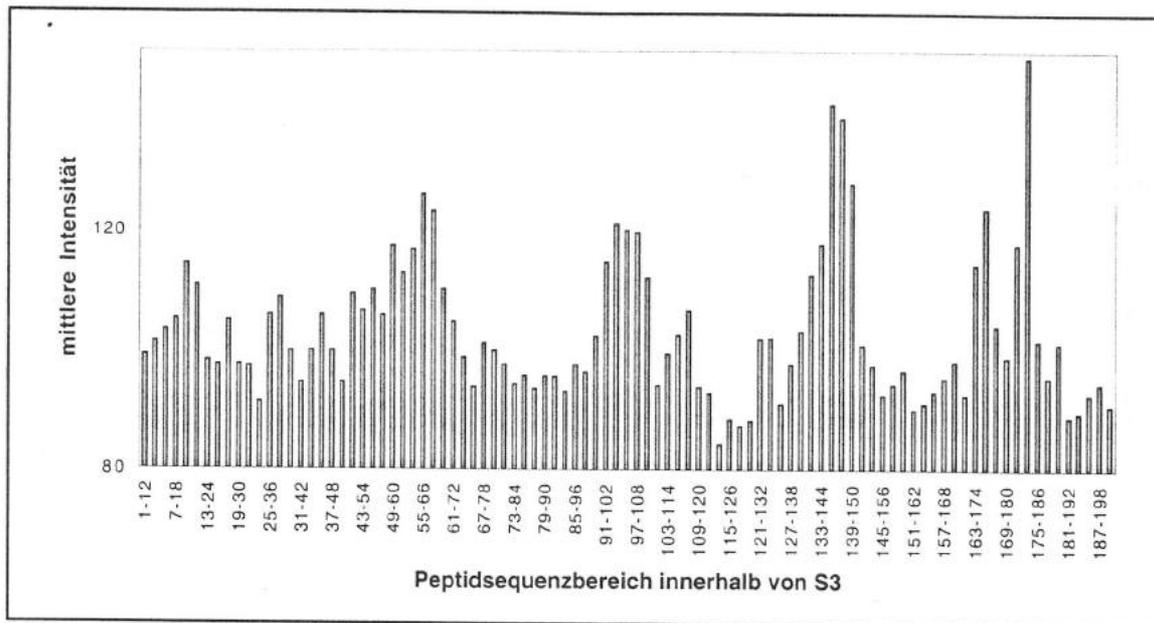


Abb. 3.16: Reaktionen der Immunseren im Pepsan gegen die S3 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Alle Peptide, deren mittlere Intensität den Wert 120 erreicht oder überschreitet, wurden als charakteristisch erkannte Epitope gewertet. Die dargestellten Werte sind gemittelt aus den Ergebnissen mit insgesamt 54 Postimmunseren.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S3/1	P28-29	55-68	YGLYD GTYLG QAYG	14
S3/2	P47-48	93-106	KTGQP AADHY YSKV	14
S3/3	P68-70	135-150	ASPYE GRYRD MYDAL R	16
S3/4	P83	165-176	VHVS K EEQYY DY	12
S3/5	P87	173-184	YYDYE DATFQ TY	12

Tab. 3.7: Durch Immunseren erkannte Epitope innerhalb des Pepskans der S3 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt. In die Auswertung wurden nur Epitope eingeschlossen, die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten. Die Spalte „Position“ beinhaltet die Position des Epitops innerhalb der Sequenz von S3.

Reaktionen mit der S4 Untereinheit

Die S4 Untereinheit ist ein strukturelles Element innerhalb des B-Oligomers von Pertussis Toxin. Als einzige Untereinheit tritt sie innerhalb des vom B-Oligomer gebildeten Ringes zweimal auf.

Im Pepsan wurde innerhalb der S4 Untereinheit nach den für die anderen Untereinheiten angelegten Kriterien kein Epitop identifiziert. Erst nach Erniedrigung der Grenze für Epitope mit ausgeprägter Erkennung auf eine mittlere Intensität von 120 auf 110 konnte ein Epitop eingegrenzt werden.

Die Erkennung der einzelnen Peptide ist in Abbildung 3.17 und Tabelle 3.8 dargestellt.

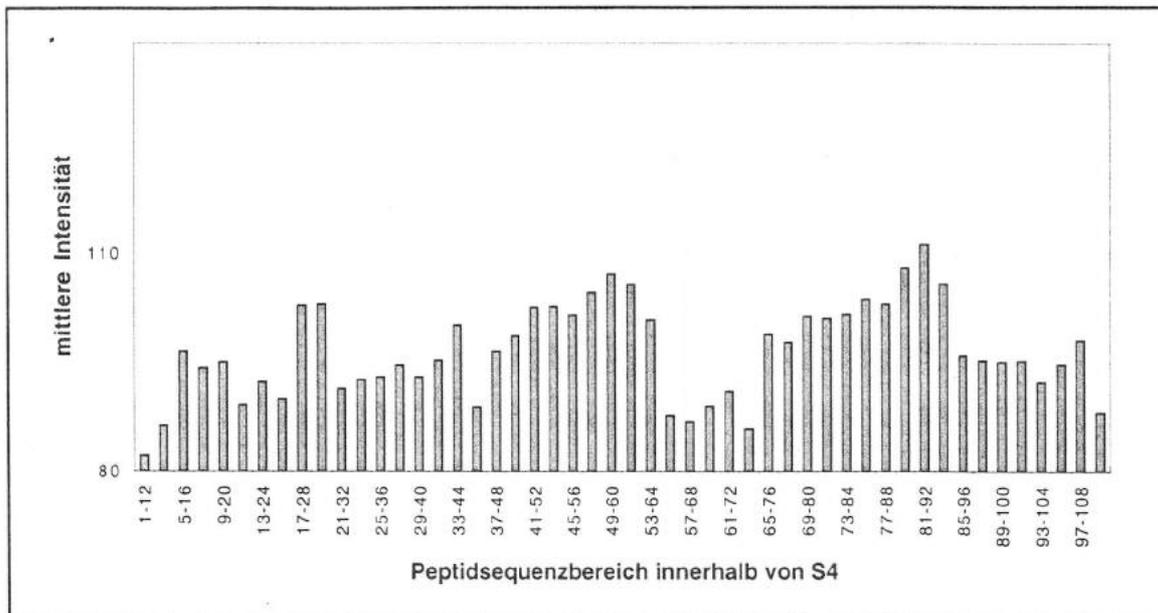


Abb. 3.17: Reaktionen der Immunseren im Pepscan gegen die S4 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Alle Peptide, deren mittlere Intensität den Wert 110 erreicht oder überschreitet, wurden als charakteristisch erkannte Epitope gewertet. Die dargestellten Werte sind gemittelt aus den Ergebnissen mit insgesamt 54 Postimmunseren.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S4/1	P41	81-92	FLGPK QLTFE GK	12

Tab. 3.8: Durch Immunseren erkanntes Epitop innerhalb des Pepscans der S4 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt. In die Auswertung wurden nur Epitope eingeschlossen, die diesen Wert um das 1,4-fache überschreiten. Die Spalte „Position“ beinhaltet die Position des Epitops innerhalb der Sequenz von S4.

Reaktionen mit der S5 Untereinheit

Ebenso wie S4 ist die S5 Untereinheit von Pertussis Toxin ein strukturelles Element innerhalb des B-Oligomers.

Im Pepscan wurde innerhalb der S5 Untereinheit nur ein Epitop mit ausgeprägter Erkennung nach den genannten Kriterien (mittlere Intensität mindestens 120) identifiziert. Die Erkennung der einzelnen Peptide ist in Abbildung 3.18 und Tabelle 3.9 dargestellt.

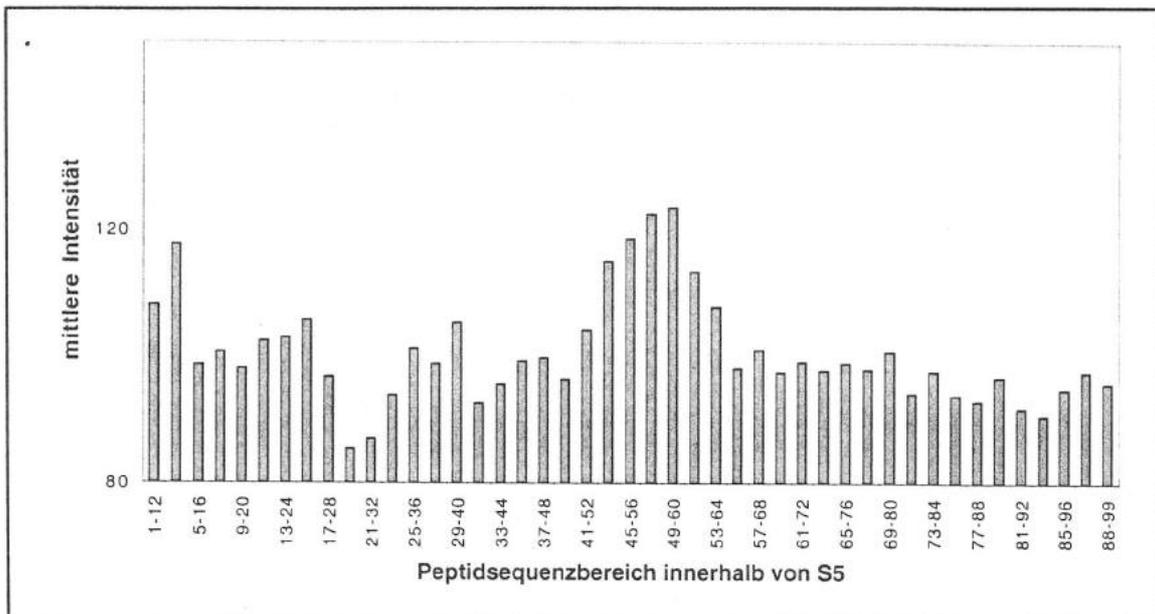


Abb. 3.18: Reaktionen der Immunseren im Pepscan gegen die S5 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Alle Peptide, deren mittlere Intensität den Wert 120 erreicht oder überschreitet, wurden als charakteristisch erkannte Epitope gewertet. Die dargestellten Werte sind gemittelt aus den Ergebnissen mit insgesamt 54 Postimmunseren.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S5/1	P24-25	47-60	HEHDT WFDTM LGFA	14

Tab. 3.9: Durch Immunseren erkanntes Epitop innerhalb des Pepscans der S5 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrund-Abzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt. In die Auswertung wurden nur Epitope eingeschlossen die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten. Die Spalte Position beinhaltet die Position des Epitops innerhalb der codierenden Sequenz von S5.

3.3.2.3 Die Erkennung humaner B-Zell Epitope in der dreidimensionalen Darstellung

Für die weitere Analyse der strukturellen Zusammenhänge ist eine dreidimensionale Projektion der experimentell gefundenen Epitope auf die Kristallstruktur der Untereinheiten von Pertussis Toxin ein wichtiges Hilfsmittel. Dadurch werden weitergehende Aussagen zu den auf einzelnen Untereinheiten von Pertussis Toxin detektierten und nach den angelegten Kriterien immunologisch charakteristischen Epitope möglich. Insbesondere die Bestimmung möglicherweise immunologisch relevanter konformeller Epitope und genereller Zielregionen einer Immunabwehr ist nur auf diesem Wege möglich.

Wichtigste Basis für diese Auswertungen und Analysen sind die Kristallstrukturdaten von Pertussis Toxin, die vor kurzem von Stein *et al.* (1994) bestimmt und veröffentlicht wurden. Aus dem das gesamte Pertussis Toxin beschreibenden Brookhaven Datenbankeintrag wur-

den zunächst die Daten für die einzelnen Untereinheiten isoliert und auf diesen die Ergebnisse der beschriebenen Epitop-Analyse mit Hilfe des Computerprogrammes RasMol (Sayle und Milner-White 1995) die detektierten Sequenzbereiche identifiziert und hervorgehoben. Die resultierenden Daten stehen am Computer als dreidimensionale Modelle der markierten Untereinheiten frei dreh- und skalierbar zur Verfügung. Die Abbildungen 3.19 bis 3.23 zeigen Projektionen der Untereinheiten S1 bis S5 des Toxins mit überlagerten, erkannten Epitopen.

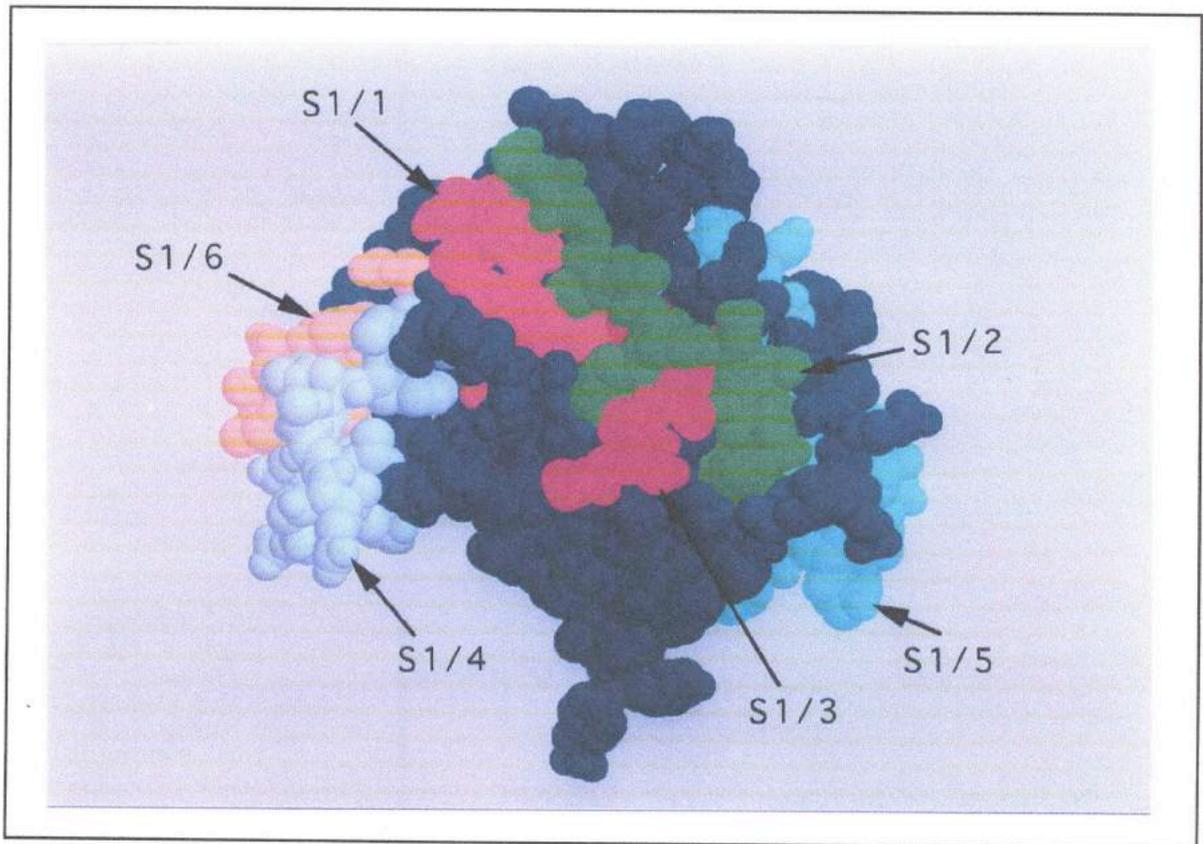


Abb. 3.19: Kristallstruktur der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin mit überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen.

Die dargestellte Projektion zeigt das S1 Molekül als Kalottenmodell. Die auf S1 durch Postimmunsereen erkannten Epitope S1/1 - S1/6 (vgl. Tab. 3.5) sind farblich hervorgehoben. Nicht als Epitope identifizierte Bereiche sind dunkelblau dargestellt.

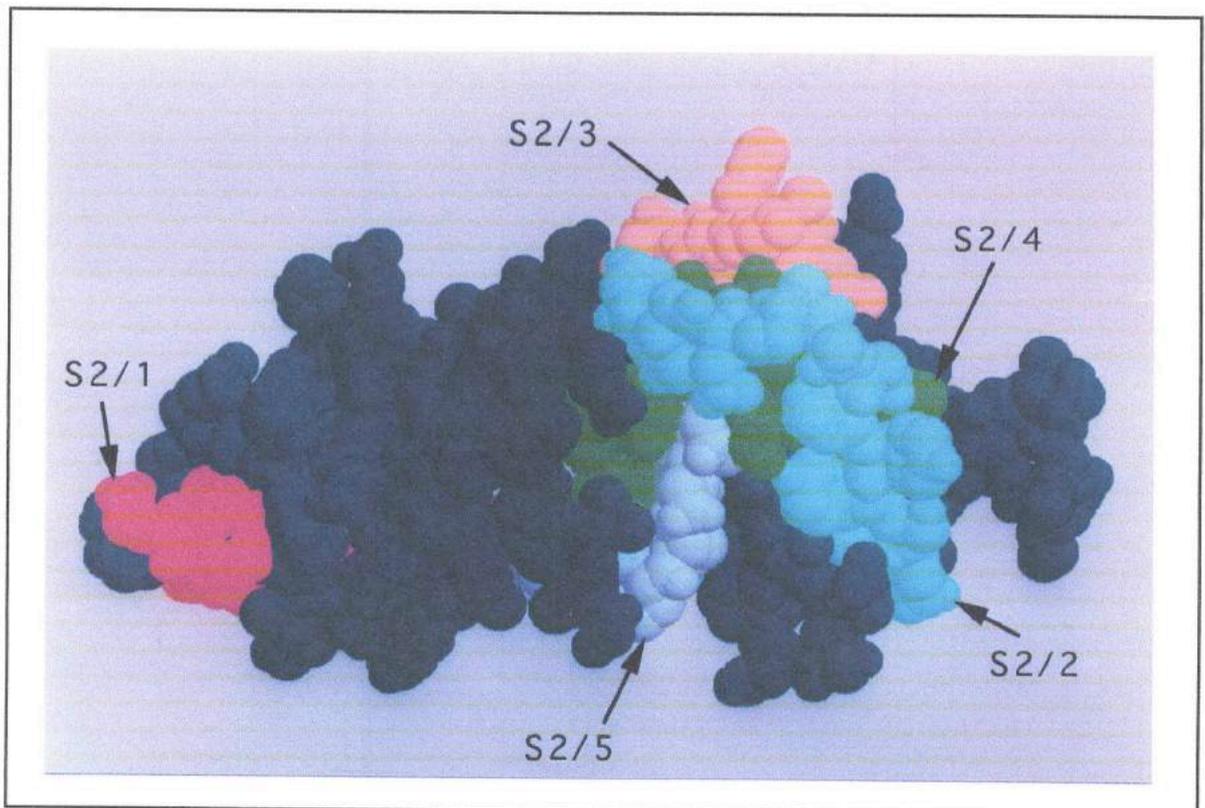


Abb. 3.20: Kristallstruktur der S2 Untereinheit von Pertussis Toxin mit überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen.
Die dargestellte Projektion zeigt das S2 Molekül als Kalottenmodell. Die auf S2 durch Postimmunsereen der Impfstudien erkannten Epitope S2/1 - S2/5 (vgl. Tab. 3.6) sind farblich hervorgehoben.

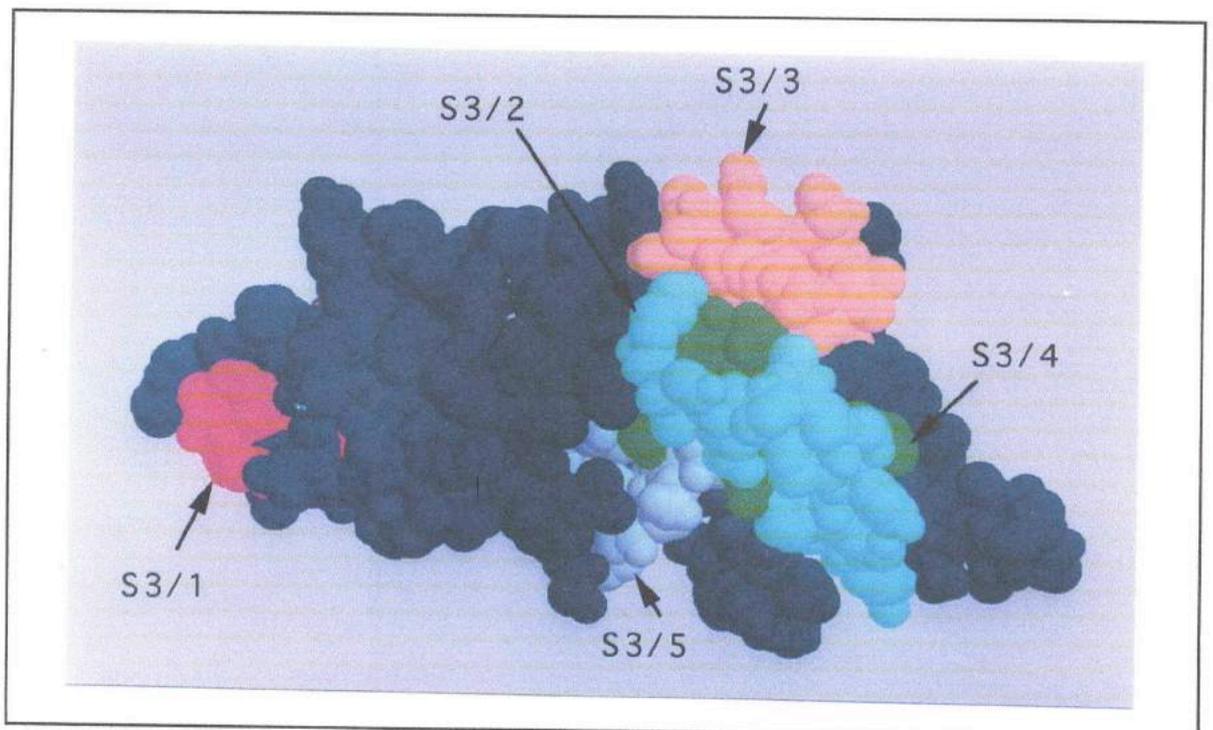


Abb. 3.21: Kristallstruktur der S3 Untereinheit von Pertussis Toxin mit überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen.
Die dargestellte Projektion zeigt das S3 Molekül als Kalottenmodell. Die auf S3 durch Postimmunsereen der Impfstudien erkannten Epitope S3/1 - S3/5 (vgl. Tab. 3.7) sind farblich hervorgehoben.

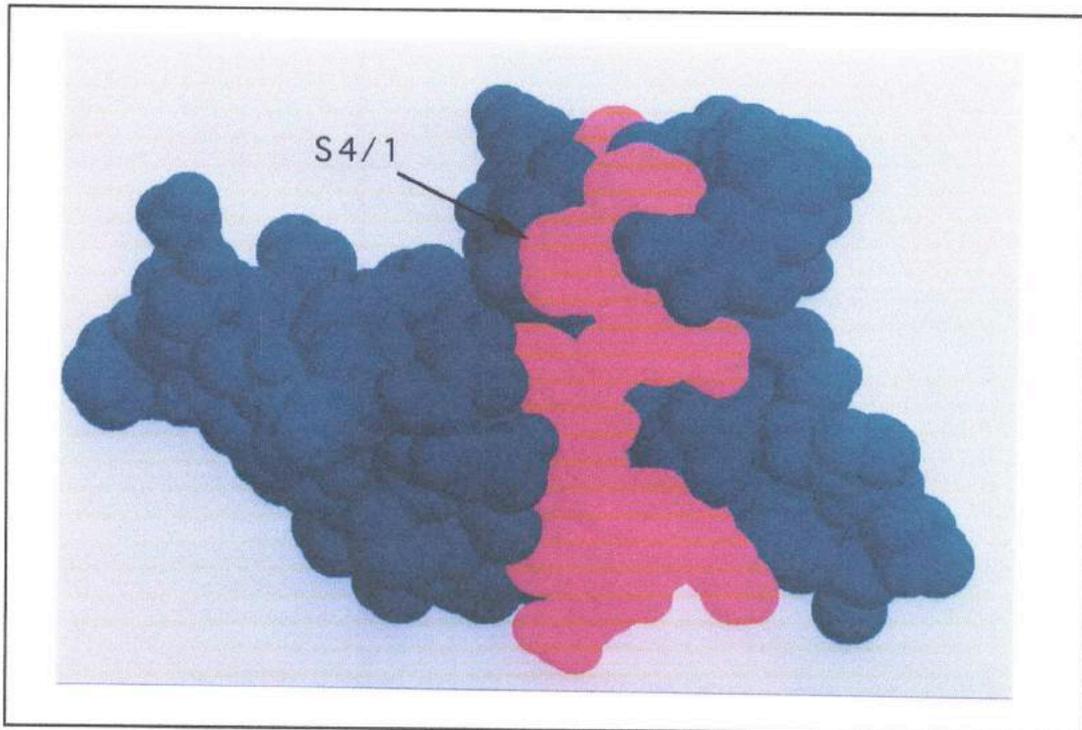


Abb. 3.22: Kristallstruktur der S4 Untereinheit von Pertussis Toxin mit dem überlagerten, immunologisch erkannten Epitop.
 Die dargestellte Projektion zeigt das S4 Molekül als Kalottenmodell. Das auf S4 durch Postimmunseren der Impfstudien erkannte Epitop S4/1 (vgl. Tab. 3.8) ist farblich hervorgehoben.

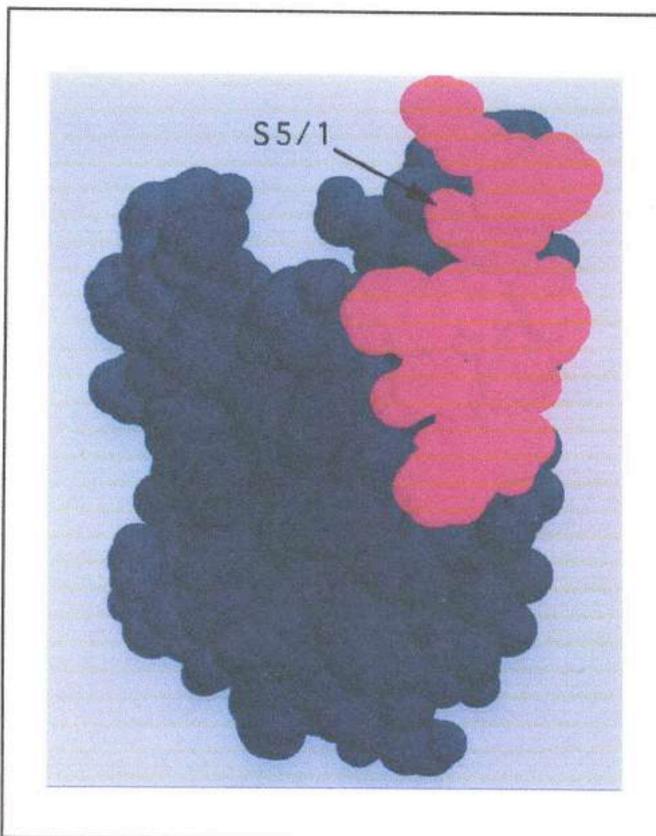


Abb. 3.23: Kristallstruktur der S5 Untereinheit von Pertussis Toxin mit dem überlagerten, immunologisch erkannten Epitop S5/1.

Die dargestellte Projektion zeigt das S5 Molekül als Kalottenmodell. Das auf S5 durch Postimmunseren der Impfstudien erkannte Epitop S5/1 (vgl. Tab. 3.9) ist farblich hervorgehoben.

Wie sich aus den Abbildungen 3.19 - 3.23 ergibt, sind die durch Postimmunseren identifizierten Epitope auf den isolierten Untereinheiten im wesentlichen an der Moleküloberfläche frei

zugänglich. *In vivo* sind die Antikörper jedoch in der Regel nicht mit isolierten Untereinheiten sondern vielmehr mit dem Holotoxin konfrontiert, das nach bisherigem Kenntnisstand erst nach der Aufnahme in die Zielzellen und nachfolgender, reduktiver Aktivierung am Ende des retrograden Transports in A-Protomer und B-Oligomer zerfällt. Die Kontaktstellen der einzelnen Untereinheiten im Holotoxin sind für die Antikörper daher nicht zugänglich. Somit wäre das Auftreten einer Antikörperreaktion gegen diese Bereiche vermutlich von untergeordneter Bedeutung für eine protektive Immunität.

Um zu klären, ob derartige Epitope von den Seren detektiert werden, wurde die in Abbildung 3.24 gezeigte Projektion der Kristallstruktur mit der Überlagerung sämtlicher gefundener Epitope angefertigt.

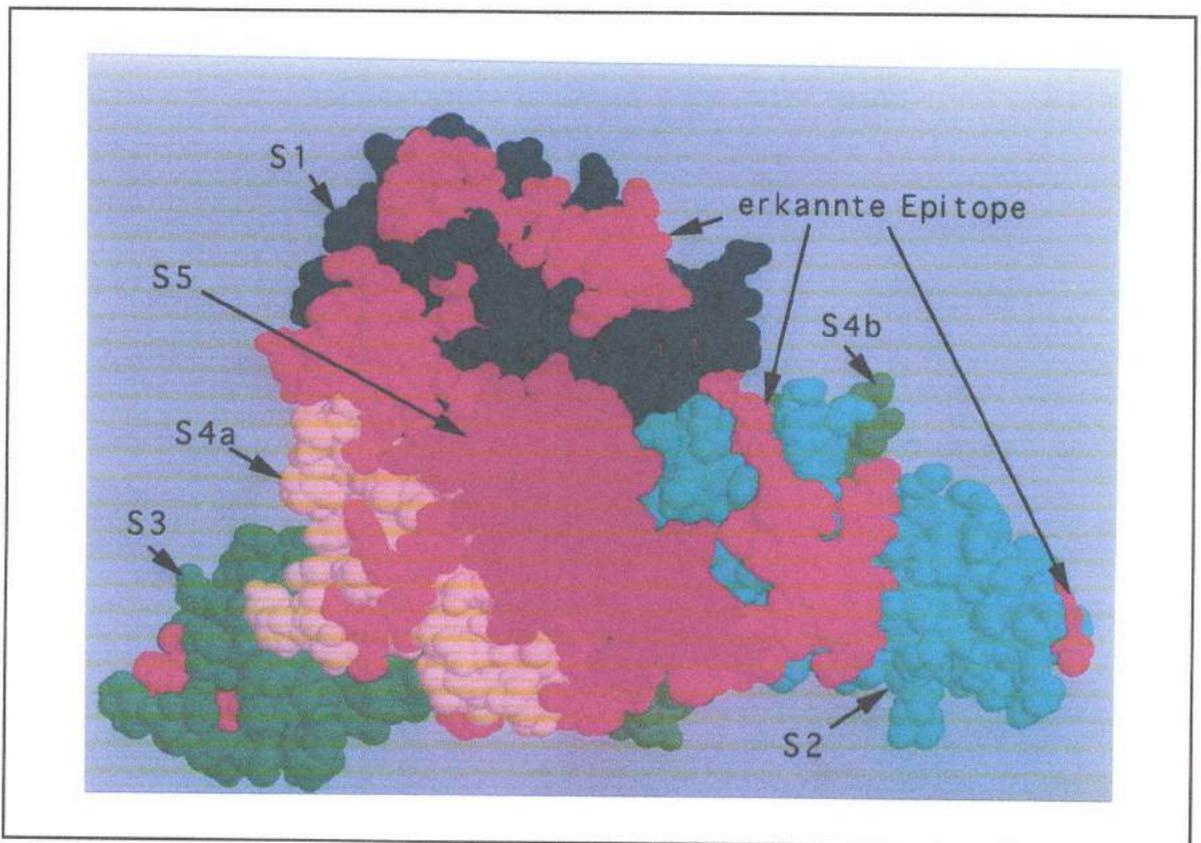


Abb. 3.24: Kristallstruktur von Pertussis Holotoxin mit überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen.

Die dargestellte Projektion zeigt das Pertussis Holotoxin als Kalottenmodell. Die auf den Untereinheiten durch Postimmunseren der Impfstudien erkannten Epitope und ebenso die einzelnen Untereinheiten S1 - S5 sind farblich (orange) hervorgehoben (Farbcodierung: S1 - blau, S2 - türkis, S3 - grün, S4 gelb und hellgrün, S5 rot).

Mit Ausnahme des Einzelepitops S5/1 sind alle hier identifizierten Epitope an der Oberfläche des Holotoxins zugänglich, so daß die Erkennung durch Antikörper auch *in vivo* möglich ist. Das Epitop S5/1 ist nur an der Unterseite des B-Oligomers, im Bereich der zentralen Pore, zugänglich. Der detektierte Bereich überspannt etwa die Hälfte der α -Helix dieser Untereinheit, die am Aufbau der Pore beteiligt ist.

In der in Abbildung 3.24 dargestellten Projektion ist am Bildschirm weiterhin die Suche nach konformellen Epitopen möglich, die strukturelle Grenzbereiche zwischen den Untereinheiten erfassen.

Ein dafür zu förderndes nahes Beieinanderliegen zweier Epitope aus verschiedenen Untereinheiten ist in der Tat an zwei Stellen zu beobachten. Die Epitope S2/3 und S5/1 sowie S3/2 und S4/1 sind im Holotoxin unmittelbar nebeneinander lokalisiert, so daß die Möglichkeit besteht, daß es sich dabei um Epitope handelt, die von Antikörpersubpopulationen übergreifend als konformell erkannt werden.

Bei der Analyse der Molekülmodelle mit überlagerten immunogenen Epitopen (Abb. 3.19-23) lassen sich auch für die einzelnen Untereinheiten eine Reihe konformeller Epitope identifizieren.

Auf der S1 Untereinheit betrifft dies die unmittelbar aneinanderliegenden β -Faltblattbereiche der Epitope S1/4 und S1/6 und die daran anschließenden exponierten Schleifen. Die großen, formal linearen Epitope S1/2 und S1/5 überspannen weite Bereiche an der Oberfläche von S1 und sind in der Projektion strukturell deutlich differenziert, so daß es sich hierbei vermutlich um mehrere, unmittelbar aneinandergrenzende Epitope handelt, die von polyklonalen Antikörpersubpopulationen gemeinsam erkannt werden.

Eine Sonderrolle nimmt das Epitop S1/3 ein. Es umfaßt einen transmolekularen Bereich, dessen terminale Ausläufer an der Oberfläche von S1, jedoch auf gegenüberliegenden Seiten lokalisiert sind. Somit handelt es sich bei dem im Pepscan als lineares Epitop erkanntem S1/3 immunologisch tatsächlich um zwei getrennte Teilepitope für die Erkennung der intakten S1 Untereinheit. In der Auswertung der Reaktionen mit S1 fällt auf, daß die Erkennung innerhalb des Epitops entsprechend zwei Maxima aufweist (vgl. Abb 3.14). Dies wird dadurch erklärlich, wenn man bedenkt, daß ein kurzer zentraler Teil des Epitops nicht an der Oberfläche liegt, sondern unter einem anderen Teilstrang hindurchgeführt wird.

Ebenso wie S1/3 zeigt auch das Epitop S1/5 innerhalb des Pepscans eine deutlich verminderte Erkennung im zentralen Bereich. Die in Abb. 3.25 gezeigte tatsächliche Situation der Oberflächenzugänglichkeit des Epitops S1/5 macht deutlich, daß es sich auch hierbei um zwei unmittelbar aneinander grenzende Epitope handelt, die durch einen transmolekularen Bereich verbunden sind, der in der Region der verminderten Erkennung im Pepscan lokalisiert ist.

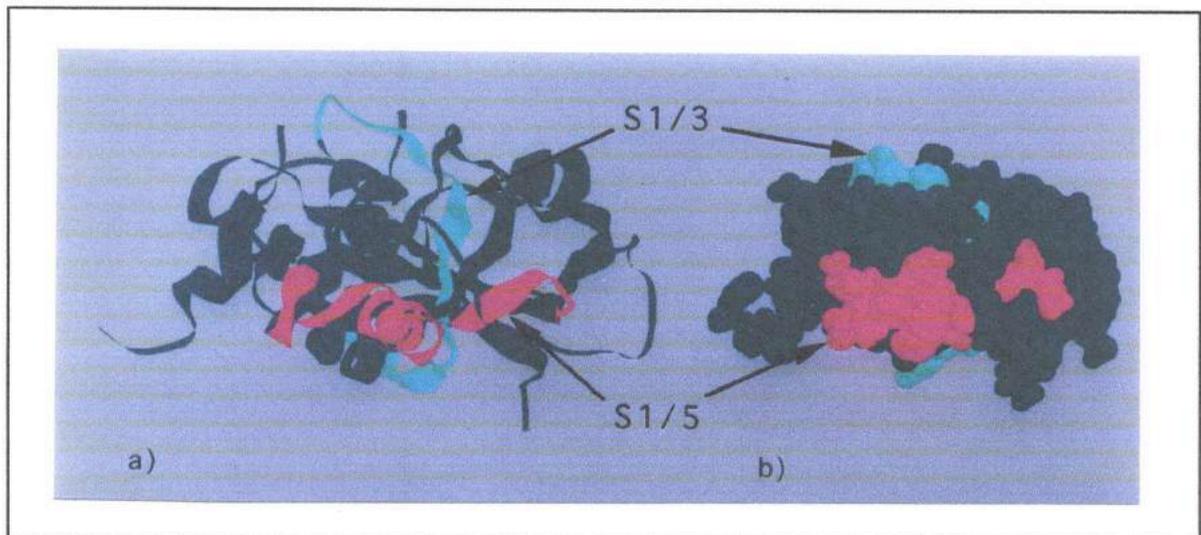


Abb. 3.25: Kristallstruktur der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin mit den überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen S1/3 und S1/5. Die dargestellte Projektion zeigt das S1 Molekül in der Rückgrat-Projektion (a) und als Kalottenmodell. Die auf S1 durch Postimmunseren der Impfstudien erkannten Epitope S1/3 und S1/5 (vgl. Tab. 3.5) sind farblich hervorgehoben. In der Projektion ist zu erkennen, daß S1/3 sowie S1/5 transmolekulare Abschnitte besitzen, die wie im Kalottenmodell zu sehen, an der Oberfläche nicht zugänglich sind.

Daß bei S1/5 und ebenso S1/3 die Trennung der Epitope im Pepscan nicht noch deutlicher sichtbar wurde, liegt vermutlich darin begründet, daß die gewählte Länge von 12 sequenzspezifischen Aminosäuren pro Peptid in diesem Fall zu groß ist, um die Bereiche voneinander weiter zu differenzieren.

Eine vergleichbare Situation zeigt sich für die S2 Untereinheit beim Epitop S2/1. Auch in diesem Fall wird ein kurzer Teil der detektierten Sequenz von einem darüberliegenden Peptidstrang verdeckt (Abb. 3.26).

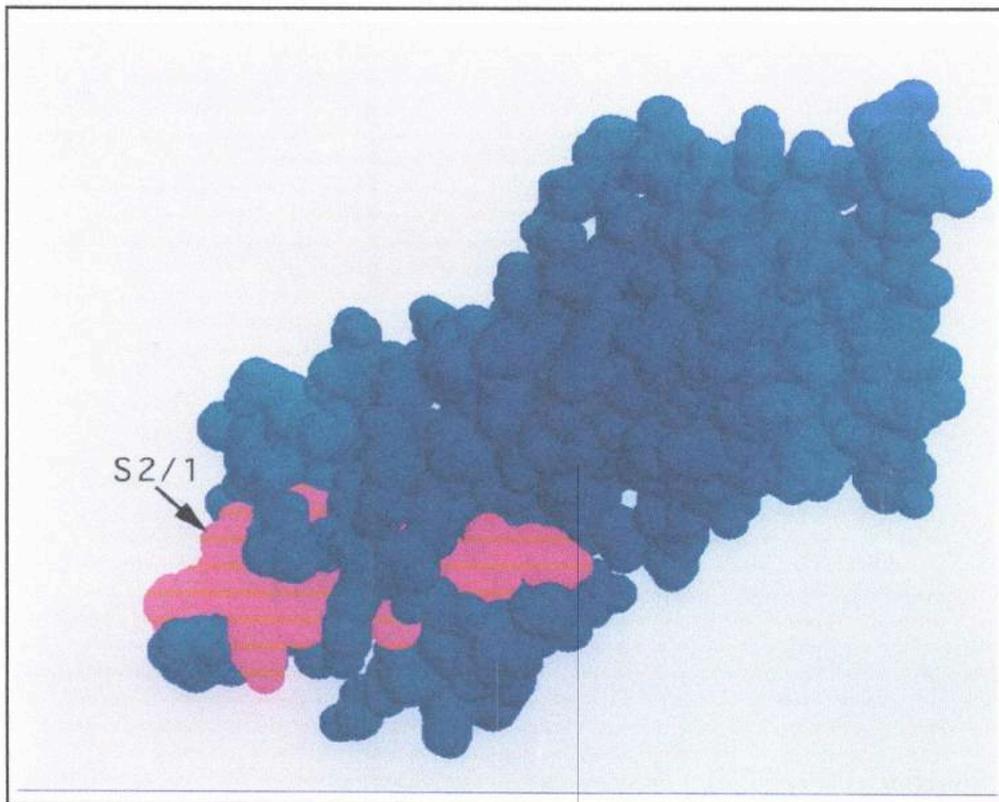


Abb. 3.26: Kristallstruktur der S2 Untereinheit von Pertussis Toxin mit dem überlagertem, immunologisch erkanntem Epitop S2/1.

Die dargestellte Projektion zeigt das S2 Molekül als Kalottenmodell. Das auf S2 durch Postimmunseren der Impfstudien erkannte Epitop S2/1 (vgl. Tab. 3.6) ist farblich hervorgehoben. In der Projektion ist zu erkennen, daß ein kurzer Abschnitt innerhalb des S2/1 Epitops unter anderen Peptidsträngen hindurchgeführt wird und somit an der Oberfläche nicht zugänglich ist.

Für die S2 Untereinheit läßt das Molekülmodell (Abb. 3.20) weiterhin ein unmittelbares Nebeneinanderliegen der Epitope S2/2 und S2/4 erkennen. Angrenzend befinden sich die Epitope S2/3 und S2/5. Der von diesen vier ausgedehnten Epitopen abgedeckte Oberflächenbereich wird von den polyklonalen Antiseren kooperativ als konformelles Epitop erkannt. Nicht auszuschließen ist, daß einzelne Antikörper insbesondere im Grenzbereich von S2/3-S2/5 auch kleinere, konformelle Epitope, bestehend aus nichtlinear aufeinanderfolgenden Teilsequenzen der beteiligten linearen Bereiche, erkennen.

Die als S2/4 und S2/5 bezeichneten Epitope liegen innerhalb der linearen Sequenz unmittelbar aneinander angrenzend vor. Wie bereits für S1 beschrieben, tritt auch hier der Effekt einer verminderten Erkennung des zentralen Bereiches auf. Auch in diesem Fall ergibt die Projektion der Epitope auf die Kristallstruktur von S2, daß der schlecht erkannte Übergangsbereich einen transmolekularen Sequenzabschnitt kennzeichnet und das S2/5 Epitop dadurch in der immunologischen Erkennung von S2/4 abgesetzt ist (Abb. 3.27).

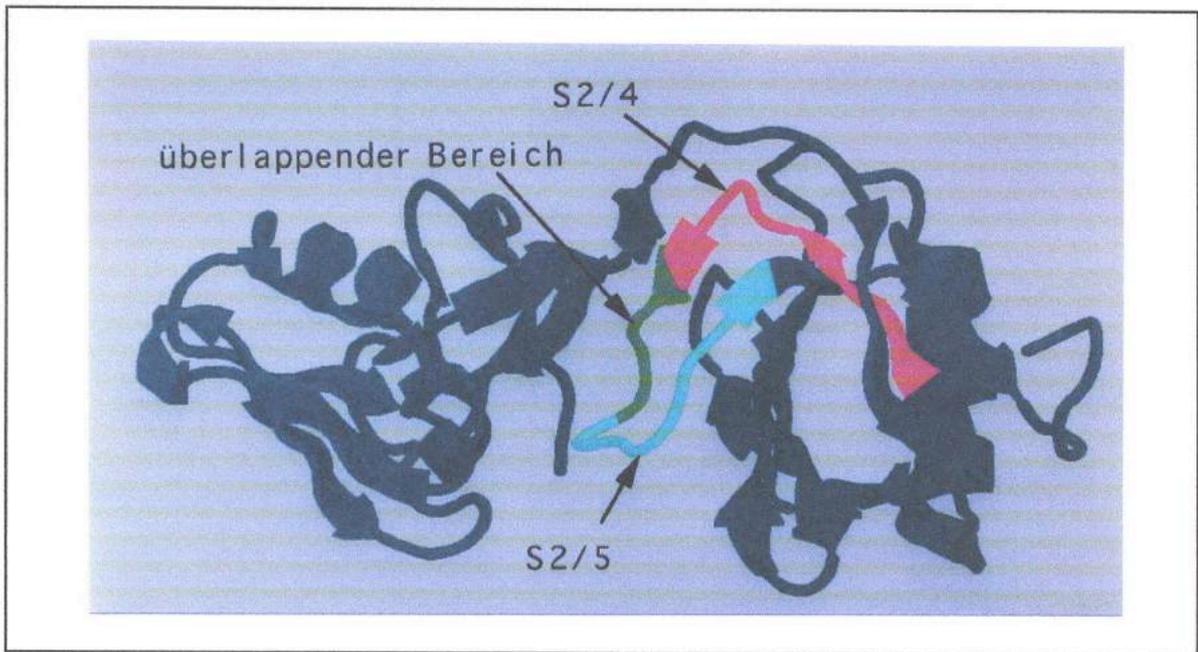


Abb. 3.27: Kristallstruktur der S2 Untereinheit von Pertussis Toxin mit den überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen S2/4 und S2/5. Die dargestellte Projektion zeigt das S2 Molekül in der Rückgrat Projektion. Die auf S2 durch Postimmunsereen der Impfstudien erkannten Epitope S2/4 und S2/5 (vgl. Tab. 3.6) sind farblich hervorgehoben. Sie grenzen unmittelbar aneinander an. In der Projektion ist zu erkennen, daß der überlappende Grenzbereich (grün) beider Epitope aus einem kurzen, transmolekularen Abschnitt mit offenbar verminderter Erkennung besteht.

Wie bereits gezeigt, werden innerhalb der S3 Untereinheit strukturell und von der Position her gleiche Epitope wie innerhalb der S2 Untereinheit erkannt. Die für S2 beschriebenen Verhältnisse finden sich hier, trotz abweichender Primärstruktur, in gleicher Weise wieder.

Innerhalb der im B-Oligomer zweimal vorkommenden S4 Untereinheit wird (erstaunlicherweise) nur ein Epitop von den Antisereen erkannt (Abb 3.22). S4/1 ist vollständig an der Oberfläche zugänglich und umspannt an einer Flanke etwa das halbe Molekül. Lokalisiert ist es an der „Unter“-Seite des B-Oligomers, an der auch die zentrale Pore im B-Oligomer zugänglich ist.

Auch innerhalb der S5 Untereinheit ist nur ein Epitop vorhanden, das zur immunologischen Erkennung beiträgt. S5/1 ist in unmittelbarer Nähe der zentralen Pore lokalisiert und bildet mit seinem α -Helixanteil einen Teil der Pore selbst.

3.3.2.4 Immunologische Bedeutung der von den Postimmunsereen detektierten Epitope auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin

Da für die einzelnen Untereinheiten eine spezifische Erkennung oft in bestimmten, räumlichen Teilbereichen erfolgt, schließt sich die Frage an, ob die erkannten Bereiche mit den für die Funktionalität des Toxins wichtigen Bereichen wie etwa den Bindungsstellen oder dem aktivem Zentrum korrelieren. In diesem Fall ginge mit der Detektion des Toxins gleichzeitig eine für den abwehrenden Organismus relevante Detoxifizierung des Toxins einher.

Für diesen Effekt wichtige Bereiche sind möglicherweise die ADP-Bindungsstelle, das aktive Zentrum der ADP-Ribosylierung innerhalb der S1 Untereinheit sowie die Rezeptor bindenden Domänen innerhalb von S2 und S3.

An der Bindung von ATP, einem Signal für den Eintritt des Toxins in das Zytoplasma und einem wichtigen Faktor in der Destabilisierung der Bindung von A- und B-Untereinheit sind nach den Untersuchungen am Pertussis Toxin-ATP Komplex (Hazes *et al.* 1996) alle Untereinheiten des B-Oligomers beteiligt. Alle beteiligten Aminosäurefunktionen sind innerhalb der zentralen Pore lokalisiert. In keinem Fall werden die beteiligten Aminosäuren durch eines der detektierten Epitope überspannt.

Wichtige Aminosäuren für die katalytische Aktivität innerhalb der ADP-Ribosylierung durch S1 sind Arg9, His35, Ser52 und Glu129 (Stein *et al.* 1995, Hazes *et al.* 1996).

Abbildung 3.28 zeigt die Lokalisation dieser Positionen innerhalb von S1. Mit Ausnahme von Glu 129 werden diese Positionen von den Epitopen S1/1, S1/2 bzw. S2/3 überspannt, so daß das aktive Zentrum von S1 durch die Antikörpererkennung abgedeckt ist.

Für die Seren aus der italienischen Impfstudie ist zu berücksichtigen, daß an Position 129 der S1 Untereinheit des im Impfstoff enthaltenen Pertussis Toxins kein Glutamat, sondern eine rekombinantes Molekül mit Glycin (Pizza *et al.* 1989) an dieser Stelle vorliegt. Jedoch zeigen auch die Seren von mit nichtrekombinanter Vakzine Geimpften und die Seren nichtgeimpfter, aber Pertussis positiver Patienten keine Erkennung im unmittelbaren Bereich von Glu129, so daß durch die Modifikation Glu129/Gly kein für die Erkennung des Toxins in der humanen Immunantwort wichtige Epitop zerstört wurde.

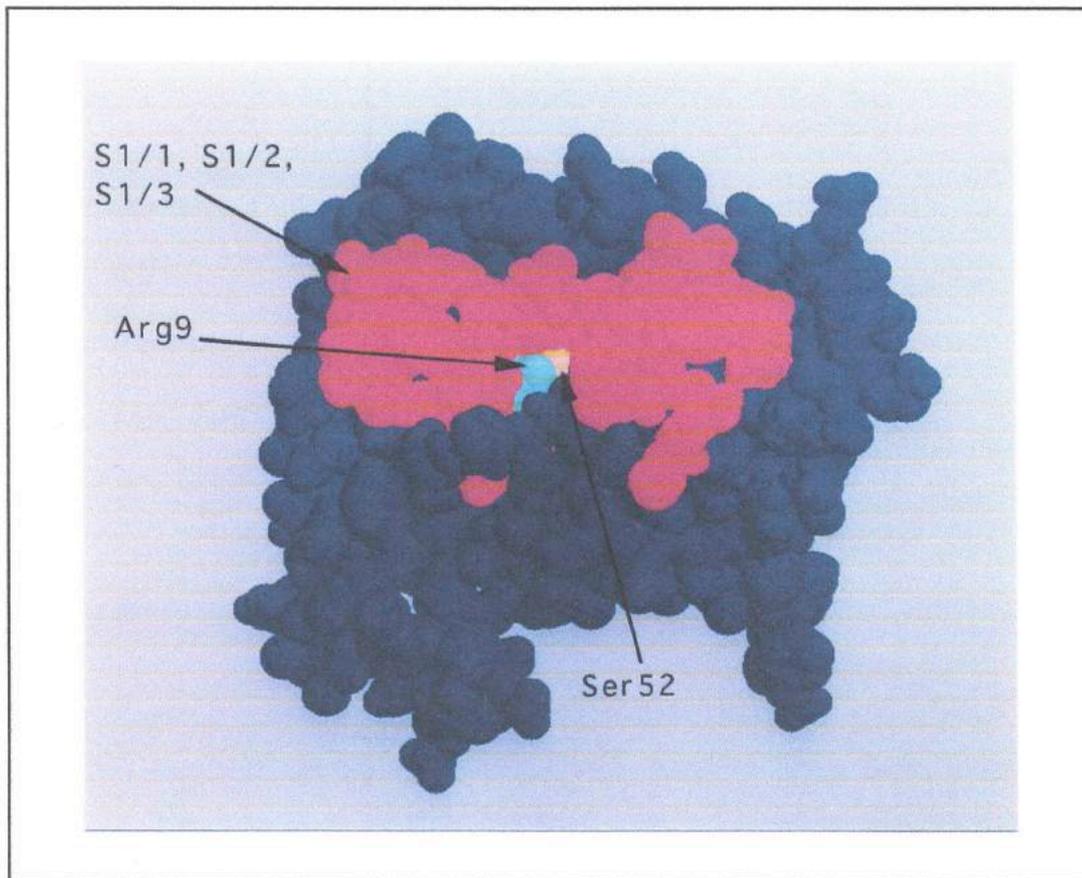


Abb. 3.28: Kristallstruktur der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin mit überlagerten, immunologisch erkannten Epitopen S1/1, S1/2 und S1/3.

Die dargestellte Projektion zeigt das S1 Molekül als Kalottenmodell. Die für die ADP-Ribosylierung wichtigen Aminosäurefunktionen Arg9 (türkis) und Ser52 (gelb) sind in der Abbildung hervorgehoben. Die Positionen His35 und Glu 129 liegen ebenfalls innerhalb der in diesem Bereich befindlichen aktiven Tasche, sind jedoch in der dargestellten Ansicht verdeckt. Die eingetragenen, durch Postimmunseren erkannten Epitope S1/1, S1/2 und S1/3 (orange) überspannen diese Positionen mit Ausnahme des Glu129.

Wesentlich bedeutsamer als die Erkennung des aktiven Zentrums auf S1 oder der ATP-Bindungsstellen auf dem B-Oligomer ist sicherlich die Blockade der Sialinsäure bindenden Domänen auf S2 und S3, da diese *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Aufnahme des Toxins durch die Zielzellen spielen.

Wichtige, an der Sialinsäurebindung beteiligte Positionen sind die polaren bzw. geladenen Funktionen der Reste Tyr102, Ser104 und Arg125 auf S2 und ebenso S3. Weiterhin bestehen Wechselwirkungen zum aromatischen Ring im Tyr103 (Stein *et al.* 1994).

Die beteiligten Positionen Tyr102, Tyr103 sowie Ser104 werden von den Postimmunseren bei beiden Untereinheiten innerhalb der Epitope S2/2 und S3/2 erkannt.

Abbildung 3.29 zeigt die relevanten Aminosäuren und das erkannte Epitop auf S2 und S3.

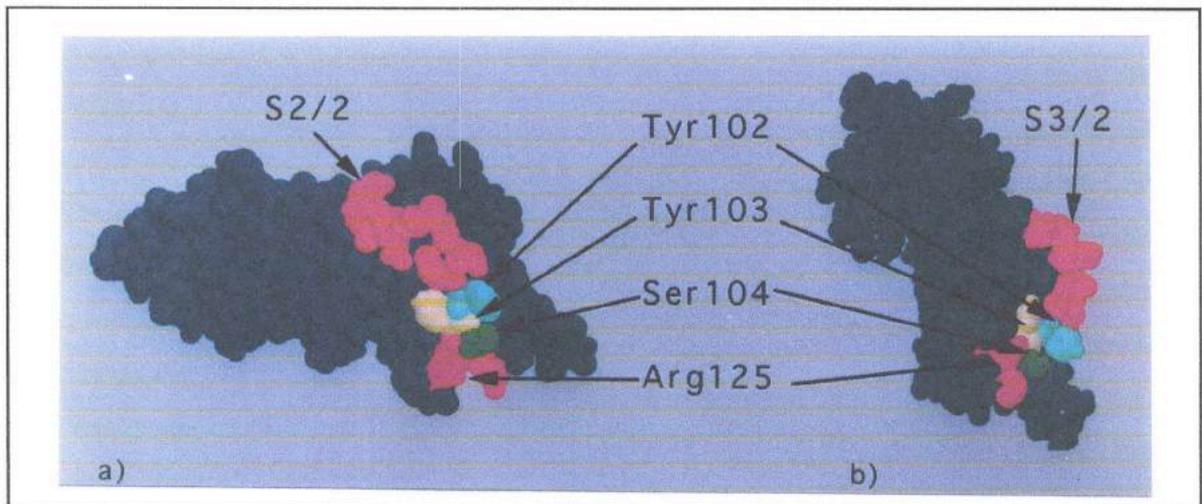


Abb. 3.29: Immunologische Erkennung der Sialinsäure bindenden Bereiche auf den Pertussis Toxin Untereinheiten S2 und S3 innerhalb der Epitope S2/2 und S3/2.

Die dargestellte Projektion zeigt die S2 (a) und S3 (b) Moleküle als Kalottenmodelle. Die Epitope S2/2 und S3/2 und die Position der an der Sialinsäurebindung beteiligten Aminosäurefunktionen sind farblich hervorgehoben.

Da bereits gezeigt werden konnte, daß eine Modifikation dieser Reste zu einer reduzierten Zell-Adhäsions-Aktivität führt, sind die Reaktionen gegen diese beiden Epitope vermutlich auch *in vivo* für den verteidigenden Organismus von besonderer Bedeutung für die aktive Abwehr einer Besiedelung des Respirationstrakts und insbesondere der Aufnahme von Pertussis Toxin in die Zielzellen.

3.3.2.5 Veränderungen bei der Erkennung linearer Epitope von Pertussis Toxin im Verlauf der Immunisierung

Innerhalb der hier dargestellten Untersuchungen wurden Postimmunseren aus zwei verschiedenen Impfstudien eingesetzt. Für beide Impfstoffe zeigte sich in Folge der Immunisierung eine charakteristische Erkennung der gleichen Epitope. Abbildung 3.30 zeigt vergleichend die Reaktionen der untersuchten Postimmunseren aus den beiden Studien.

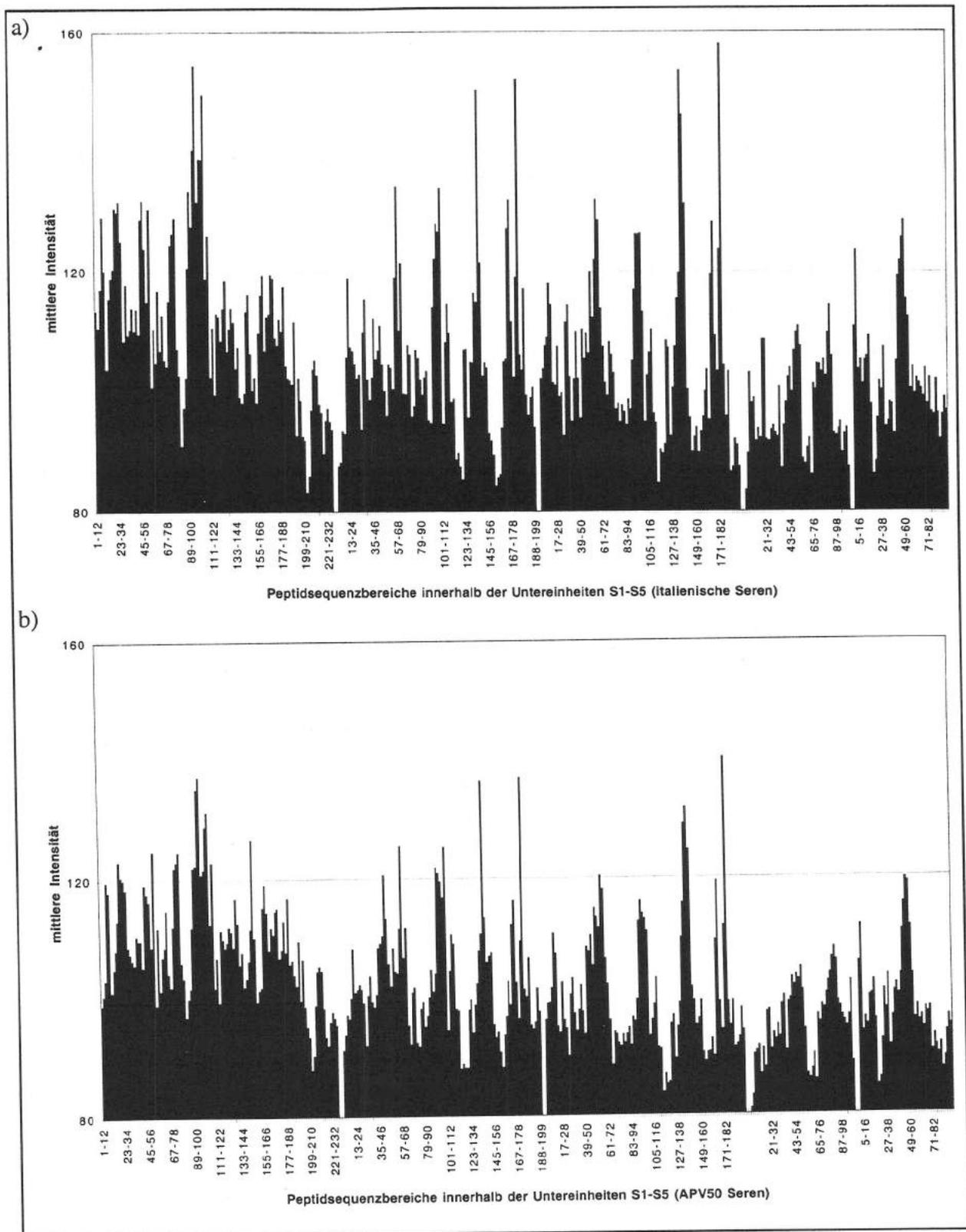


Abb. 3.30: Erkennung antigener Epitope durch die Postimmunsereen der italienischen (rekombinante Vakzine) a) und deutschen Impfstudie (APV 50) b).

Dargestellt ist die Erkennung der Peptide auf den Pepscans von Pertussis Toxin über alle fünf Untereinheiten (S1 - S5) hinweg.

Insgesamt gesehen war die Epitoperkennung der Seren von mit rekombinantem Toxin Vakzinierten durchweg besser als die der Postimmunseren von Patienten, die mit der azellulären Vakzine immunisiert worden waren. Die Erkennung der Peptide auf dem Pepscan von Pertussis Toxin war bei den jeweiligen Serumpaaren für die Postimmun- bzw. Postboosterseren durchweg deutlich erhöht, in der Regel war jedoch die generelle Erkennung der Epitope schon in den zur Verfügung stehenden Erstseren gegeben.

In einigen Fällen zeigte sich auch innerhalb der Erstseren eine intensive Erkennung von Pertussis Toxin, jedoch wurden regelmäßig einige der hier aufgeführten Epitope nicht oder nur schwach erkannt.

In diesen Fällen zeigte sich im Postimmunserum ein Komplettierung der erkannten Epitope. Beispielhafte Seren zur Veranschaulichung dieses Effekts sind die Pre- und Postimmunseren It128 und It160 (Abb. 3.31).

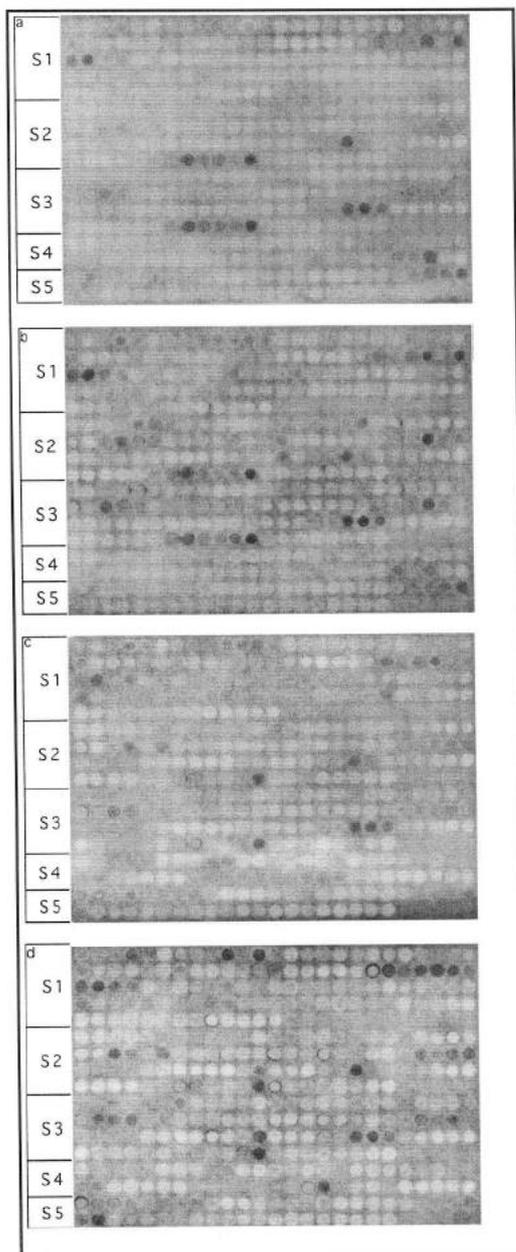


Abb. 3.31: Komplettierung erkannter Epitope im Pepscan von Pertussis Toxin innerhalb der Immunisierung mit der rekombinanten italienischen Vakzine.

Gezeigt sind die Pepscans der Pre- und Postimmunseren der Patienten It128 (a, b) und It160 (c, d). In jedem der Postimmunseren werden zuvor nicht erkannte Epitope detektiert.

Die deutlich erkennbare, zusätzliche Erkennung bezieht sich im Falle von It128 auf zwei Sequenz-bereiche innerhalb von S2 und S3 sowie bei It160 auf Bereiche innerhalb von S1.

3.3.2.6 . Epitoperkennung durch Humanseren, deren Immunreaktion gegen Pertussis Toxin in Folge einer natürlichen Infektion aufgebaut wurde

Eine relevante Fragestellung für die Bewertung der durch Immunisierungen mit Vakzinen erzielten Antikörperreaktionen ist der Vergleich mit der Immunantwort natürlich infizierter Personen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden für die Seren von mit *B.pertussis* infizierten Kindern grundsätzlich dieselben Epitope gefunden, die auch als Folge einer Immunisierung mit einer der beiden Vakzinen auftreten. Dabei können drei Gruppen von Seren unterschieden werden:

Die erste Gruppe umfaßt Seren, die, wie das Serum S13 (vgl. Abb 3.14), nicht oder nur schwach mit dem Pepscan reagieren. Bei diesen bleiben die Reaktionen mit sämtlichen Untereinheiten deutlich unterhalb der als Hintergrund-Abzug definierten Grenzen (vgl. Abb. 3.32).

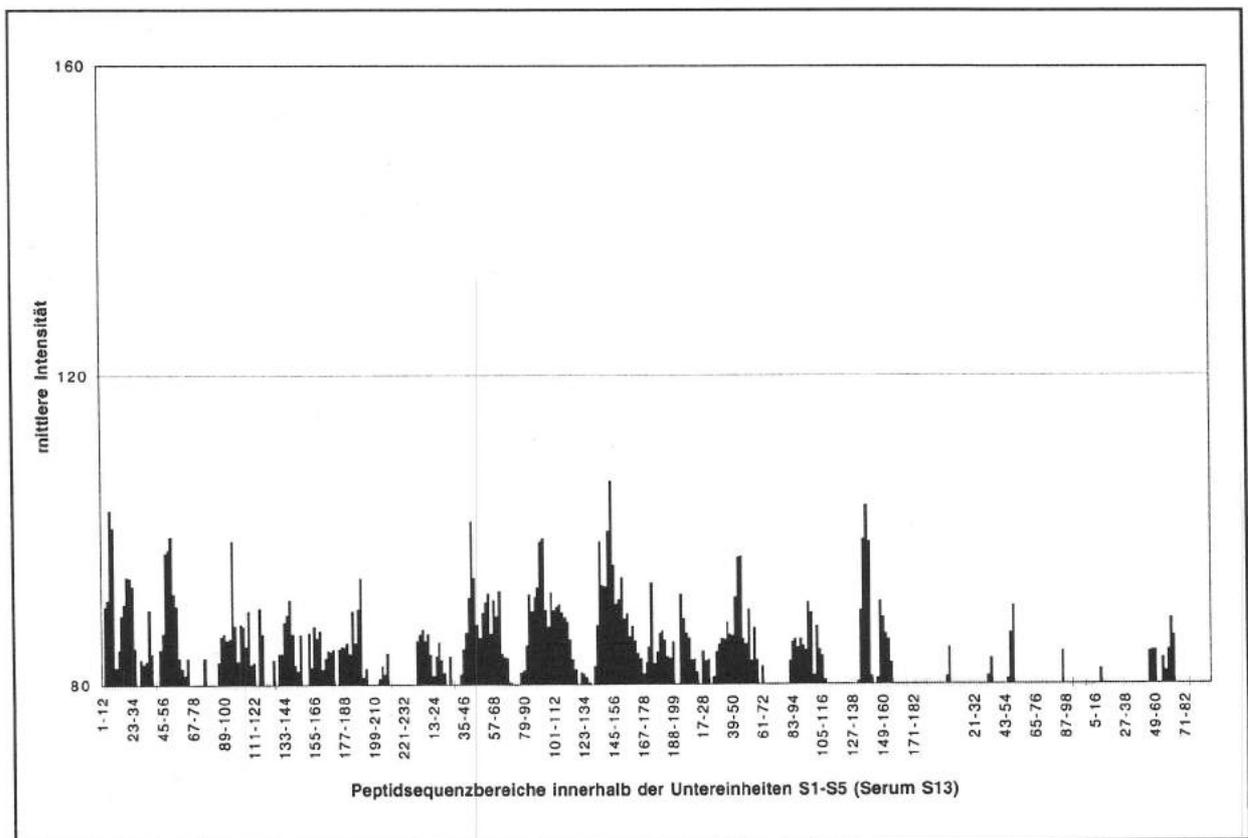


Abb.3.32: Erkennung des Pepscans von Pertussis Toxin durch das humane Antiserum S13.

Dargestellt ist die Erkennung der Peptide auf den Pepscans von Pertussis Toxin über alle fünf Untereinheiten (S1 - S5) hinweg.

Zur zweiten Gruppe gehören Seren wie das S6778 ohne zuverlässig diagnostizierte oder im ELISA eindeutig nachweisbare Pertussis Infektion, die aber mit einigen der auch von den Postimmunsereen erkannten Epitopen des Pepscans reagieren.

Abb. 3.33 zeigt die Reaktion von S6778 mit den Pertussis Toxin Untereinheiten S1 bis S5. Nach den für die Postimmunseren angelegten Kriterien werden von diesem Serum lediglich die Epitope S1/3, S3/3 und S4/1 erkannt.

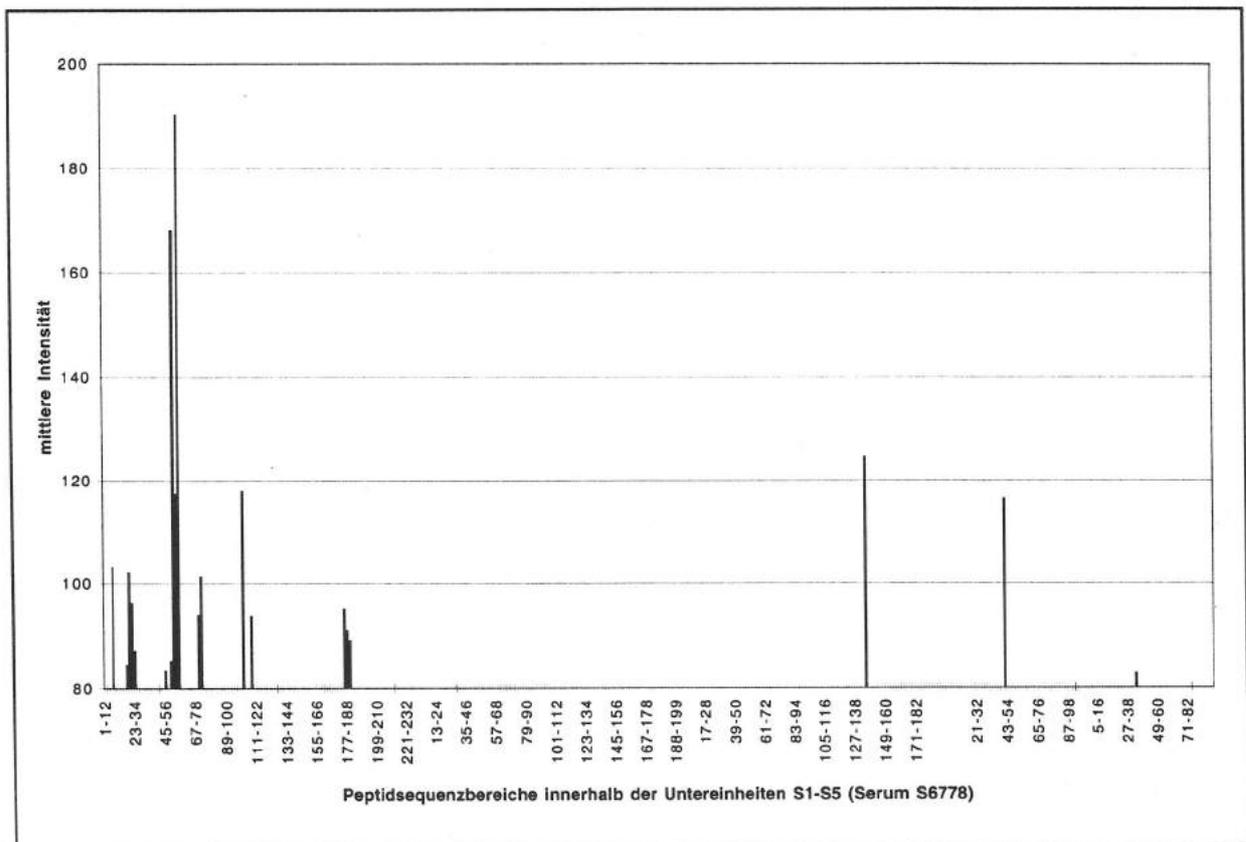


Abb. 3.33: Erkennung des Pepskans von Pertussis Toxin durch das humane Antiserum S6778.

Dargestellt ist die Erkennung der Peptide auf den Pepskans von Pertussis Toxin über alle fünf Untereinheiten (S1 - S5) hinweg.

Die letzte Gruppe bilden Seren wie das z.B. Serum S6705, die positiv diagnostiziert sind und gleichzeitig starke Reaktionen mit den Pepskans von Pertussis Toxin aufweisen. Diese Seren zeigen insgesamt eine stark erhöhte Erkennung sämtlicher, auch durch Postimmunseren detektierter Epitope bei insgesamt erhöhtem Hintergrund.

Bemerkenswert ist in diesen Fällen auch das regelmäßige Auftreten eines zusätzlich erkannten Epitops auf der S1 Untereinheit.

Abb. 3.34 zeigt die Reaktionen der Pepskans von S1 mit den positiv reagierenden Humansen nicht immunisierter Kinder. Das zusätzliche Epitop S1/h1 überspannt den Bereich der Aminosäuren 175-190 innerhalb von S1 (Tab. 3.10).

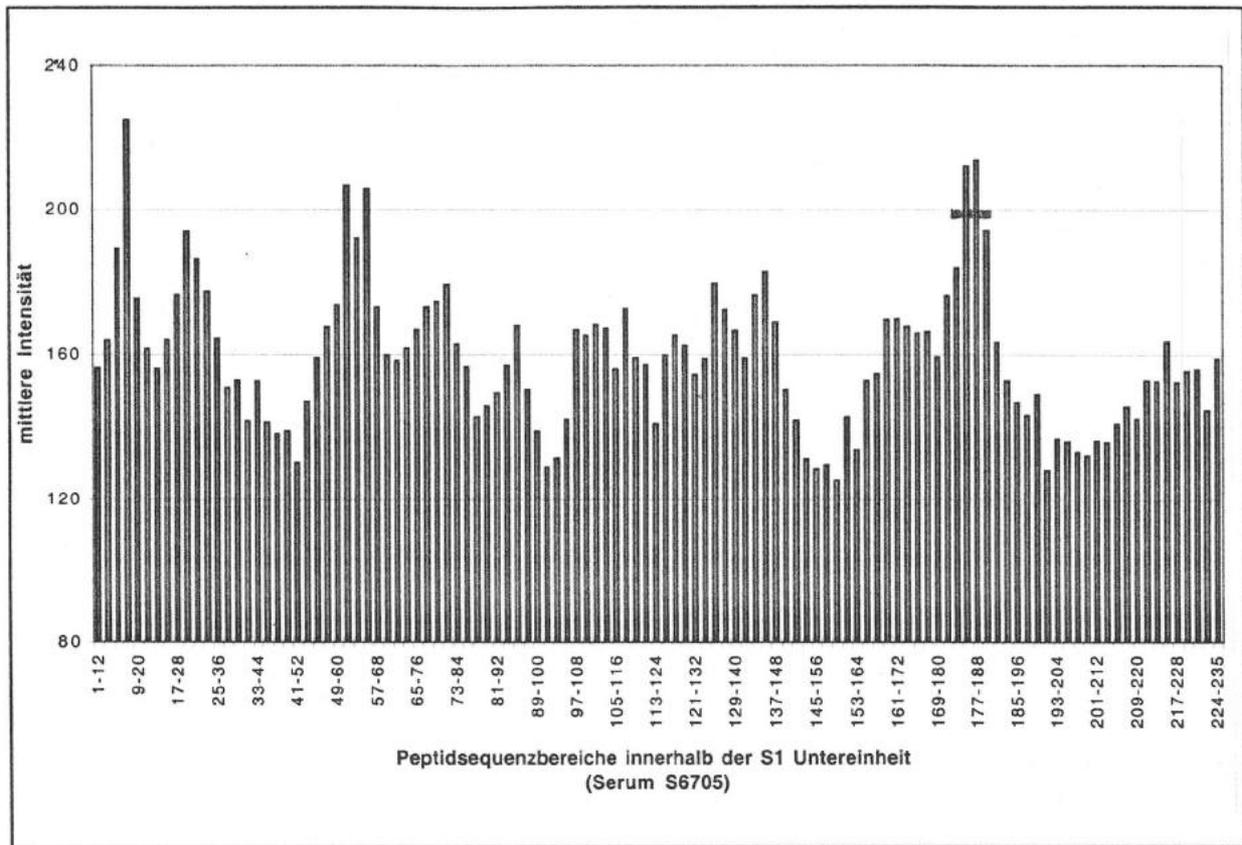


Abb. 3.34: Erkennung des Pepscans von Pertussis Toxin durch das humane Antiserum S6705.

Dargestellt ist die Erkennung der Peptide auf dem Pepscan der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin Untereinheiten (S1 - S5). Das gegenüber den Postimmunsereen aus den Impfstudien zusätzlich erkannte Epitop S1/h ist in der Abbildung durch einen Querbalken gekennzeichnet.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S1/h	P 88-90	175-190	PNPYT SRRSV ASIVG T	16

Tab. 3.10: Durch Humanseren von natürlich mit *B. pertussis* infizierten Patienten zusätzlich erkanntes Epitop innerhalb des Pepscans der S1 Untereinheit von Pertussis Toxin.

Als genereller Hintergrundabzug wurden 30% der theoretisch maximal erreichbaren Intensität (80 von 255) gewählt und in die Auswertung nur Epitope eingeschlossen, die diesen Wert um das 1,5-fache überschreiten (120 von 255). Die Spalte „Position“ beinhaltet die Position der Sequenz innerhalb der kodierenden Sequenz von S1.

3.3.2.7 Kreuzreaktionen in der Erkennung gruppenspezifischer Peptide von Virulenzfaktoren

Wie beschrieben wird durch die untersuchten Humanseren eine begrenzte Zahl von insgesamt 18 als charakteristisch einzustufenden und mit den angelegten Kriterien eindeutig vom Hintergrund abzugrenzenden Epitopen innerhalb der fünf Untereinheiten von Pertussis Toxin erkannt. Es stellt sich die Frage, ob all diese Epitope das Vorliegen einer

immunologischen Erkennung von Pertussis Toxin, hervorgerufen durch erfolgreiche Vakzinierung oder natürlichen Kontakt mit dem Pathogen, darstellen.

Vor dem Hintergrund der Beobachtung, daß die Mehrzahl der betrachteten Humansenen negativ diagnostizierter oder im ELISA nur schwach positiv reagierender Patienten deutlich mit diesen Epitopen reagieren, sollte überprüft werden, ob möglicherweise im Pepscan Kreuzreaktionen mit Epitopen anderer Antigene, also falsch-positive Seren detektiert wurden. Dazu wurden BLASTP-Recherchen (Altschul *et al.* 1997) für sämtliche auf den Untereinheiten gefundenen Epitope durchgeführt.

Für alle (insgesamt 18) detektierten Epitope zeigten sich in den BLASTP-Recherchen Sequenzhomologien zu Epitopen aus den mit *B.pertussis* eng verwandten Species *B.parapertussis* und *B.bronchiseptica*. Da bei diesen jedoch die Pertussis Toxin Gene stumm sind und kein Pertussis Toxin exprimiert wird, ist es unwahrscheinlich, daß eine Reaktion im Pepscan auf einen Kontakt mit einem dieser Erreger zurückzuführen ist.

Ein davon abweichendes Bild zeigte sich für das Epitop S1/1 (Peptidpositionen 7-18). Hier bestehen Sequenzverwandtschaften zu mehreren Proteinen anderer Pathogene, u.a. zu Cholera Toxin (CTX A), dem Hitze labilen Enterotoxin von *E.coli* (LT-A), einer Teilsequenz aus *Mycoplasma pneumoniae* und dem inneren Virushüllprotein des Blauzungens Virus (VP3) (Daten der BLASTP-Recherche im Anhang). Die Reaktion gegen diese Epitope ist daher nicht als charakteristisch für eine Immunität gegen *B.pertussis* einzustufen, ist jedoch möglicherweise ein notwendiger Faktor innerhalb der protektiven Immunantwort.

Es könnte sich bei S1/1 um eine oder einen Teil einer gruppenübergreifenden antigenen Struktur handeln, die mehreren Pathogenen gemeinsam als funktionales oder strukturelles Element dient.

In diesem Fall wäre mit S1/1 ein für die protektive Immunantwort pathogenübergreifend wichtiges Epitop charakterisiert.

Es bleibt festzustellen, daß die Reaktion mit den beobachteten Epitopen auf den Untereinheiten von PT, mit Ausnahme von S1/1, nach bisherigen Erkenntnissen auf den zurückliegenden, direkten Kontakt mit Pertussis Toxin zurückzuführen ist und damit einen Infektion bzw. eine erfolgreiche Immunisierung kennzeichnet.

Negativ zu diagnostizierende Seren konnten auch im Pepscan identifiziert werden. Das relativ seltenen Auftreten negativer Seren, ist vermutlich weniger auf eine unspezifische Reaktion mit dem Pepscan als vielmehr auf eine anderweitig nicht eindeutig diagnostizierte, zurückliegende oder akute Pertussis Infektion mit untypischem Krankheitsverlauf zurückzuführen.

3.4 Untersuchungen zu Substratwechselwirkungen von Pertussis Toxin: ADP-Ribosylierung C-terminaler Peptide der α Untereinheiten von G-Proteinen durch Pertussis Toxin

Pertussis Toxin ist in der Lage, α Untereinheiten bestimmter inhibitorischer heterotrimerer G-Proteine in spezifischer Weise an der Position -4 des C-Terminus durch ADP-Ribosylierung zu modifizieren. Diese kovalente Modifikation beeinflußt die Funktion der α Untereinheit des G-Proteins als molekularer Schalter. Es verhindert die Reassoziaton von α und $\beta\gamma$ Untereinheiten, was wiederum die Deregulation der Signalantwort der Zelle verhindert. Weiterhin ist bekannt, daß sowohl die α als auch die $\beta\gamma$ Untereinheiten in der dissoziierten Form unabhängig voneinander Signale weiterleiten (Clapham und Neer 1993, Lopez-Illasaca *et al.* 1996, Simon *et al.* 1991, De Waard *et al.* 1997). Speziell für die C-terminale Sequenz der α Untereinheit konnte gezeigt werden, daß sie innerhalb der G-Protein beeinflussten Signaltransduktionswege eine kritische Rolle einnimmt (Rarik *et al.* 1992).

Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von Pertussis Toxin und synthetischen Peptiden mit C-terminalen Sequenzen der α Untereinheiten von G-Proteinen sind bisher nur sehr eingeschränkt durchgeführt worden (Krueger und Barbieri 1995). Gleichwohl sind diese Untersuchungen sehr interessant, da sie Aufschlüsse über Mindestanforderungen an die Substraterkennung durch Pertussis Toxin geben.

Weiterhin helfen sie, Einflüsse von Punktmutationen innerhalb der erkannten Peptidsequenz aufzuklären. Neben der Klärung genereller Fragen zur Substraterkennung von Pertussis Toxin können diese Untersuchungen perspektivisch zur Entwicklung experimentell oder therapeutisch einsetzbarer kompetitiver Hemmstoffe der ADP-Ribosylierung führen.

Die etablierten Methoden zur Untersuchung weitergehender Fragestellungen, etwa durch die Synthese freier Peptide (Graf *et al.* 1992), lassen derart breitangelegte Untersuchungen an hunderten von Längenvariationen und Punktmutationen nur mit großem Zeit- und Kostenaufwand zu.

Aus diesem Grund lag es nahe, die Möglichkeiten der Spotsynthese für weitergehende Untersuchungen auch in diesem Bereich einzusetzen. Bei genereller Anwendbarkeit der Methodik auf diese Fragestellung sollte es möglich sein, in vergleichsweise kurzer Zeit Ergebnisse zur Substraterkennung zu erhalten.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, mußte zunächst geklärt werden, ob die zur Verfügung stehende Methodik überhaupt für die Untersuchung der Enzym - Substrat Wechselwirkungen geeignet ist. Dazu mußten die von Graf *et al.* (1992) mit freien Peptiden begonnenen Untersuchungen überprüft und bestätigt werden, um darauf aufbauend mit weitergehenden Untersuchungen zu beginnen.

3.4.1 Substrateigenschaften C-terminaler Sequenzen der α Untereinheiten von G-Proteinen

Wie von Graf *et al.* (1992) beschrieben, sind frei lösliche, synthetische 15mer und 20mer Peptide, die von den C-Termini der α Untereinheiten natürlicher Zielproteine abgeleitet sind, grundsätzlich als Substrate für die ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin geeignet.

Für die C-terminal fixierten Peptide mußte diese Eignung jedoch erneut gezeigt werden, um auszuschließen, daß die den natürlich vorliegenden Bedingungen mit freiem C-Terminus widersprechende Fixierung die Substrateigenschaften grundsätzlich verändert.

Daher wurden zunächst C-terminale 16mer Peptide eines typischen Pertussis Toxin-Substrates, des α -G₁₃, und zur Kontrolle die eines Nicht-Substrats, des α -G_s, einer ADP-Ribosylierung unterzogen.

Wie in Abbildung 3.35 gezeigt, wird das C-terminal verankerte Peptid von G₁₃ tatsächlich im ADP-Ribosylierungsansatz erkannt und modifiziert, während G_s nicht als Substrat für Pertussis Toxin dient.

Das α -G₁₃ 16mer wurde daraufhin in den folgenden Experimenten immer wieder als positive Kontrolle und exemplarischer Akzeptor eingesetzt.

In anschließenden Experimenten, deren Ergebnisse ebenfalls in Abbildung 3.35 abgebildet sind, wurde die Zielaminosäure Cystein gegen Tyrosin ausgetauscht, woraufhin das modifizierte Peptid seine Substrateigenschaft verlor.

Dies bestätigt die Untersuchungen von Tsuchia *et al.* (1990), die zeigen, daß das Vorhandensein von Cystein essentiell für die Substratfunktionalität ist. Mit diesem Experiment werden ebenfalls die Experimente von Kaziro *et al.* (1991) und West *et al.* (1985) bestätigt. Sie konnten in von der hier vorgestellten Methodik unabhängigen experimentellen Ansätzen zeigen, daß das Cystein in Position -4 den Akzeptor für die durch Pertussis Toxin von NAD transferierte ADP-Riboseeinheit darstellt.

Wie zu erwarten, wurde das C-terminale 16mer des Cholera Toxin Substrats α -G_s, bei dem an der Position -4 ein Tyrosin Rest steht, nicht durch Pertussis Toxin modifiziert.

Auch der Austausch des Tyrosins gegen Cystein vermochte diese Sequenz nicht zum Substrat zu verändern. Daraus folgt, daß neben dem Vorhandensein des Cysteinrests in der Zielsequenz auch die umliegenden Aminosäuren die Substrateigenschaften entscheidend mitbestimmen.

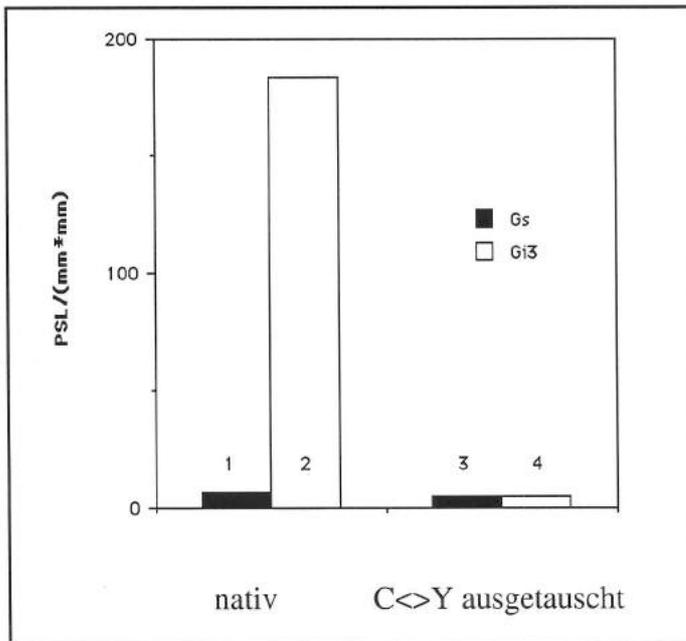


Abb. 3.35: ADP-Ribosylierung C-terminal fixierter 16-mere von α-G₁₃ und α-G_s durch PT.

Die Balken 1 und 2 repräsentieren die beobachtete ADP-Ribosylierungseffizienz der nativen Sequenzen des natürlichen Substrats α-G₁₃ und des Nicht-Substrats α-G_s. In den durch die Balken 3 und 4 wiedergegebenen Experimenten sind die Aminosäurefunktionen an der Position -4 wechselseitig gegen Cystein bzw. Tyrosin ausgetauscht.

3.4.2 Einfluß von Sequenz, Aufbau und Länge des Abstandmoleküls (Spacers) und der Zielpeptidsequenz auf die ADP-Ribosylierungseffizienz

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die C-terminal fixierten Peptide von Pertussis Toxin mit der gleichen Spezifität wie freie Peptide oder eine vollständige G-Protein α Untereinheit erkannt und ADP-ribosyliert werden, sollte der Einfluß der äußeren, vom experimentellen Ansatz vorgegebenen Bedingungen auf eine effektive ADP-Ribosylierung beurteilt werden.

Insbesondere die für den Einsatz filtergebundener Peptide notwendige C-terminale Verknüpfung könnte die von den Peptiden eingenommene Konformation gegenüber der natürlichen beeinflussen. Weiterhin kann die C-terminale Fixierung generell einen die Substraterkennung und Umsetzung behindernden Faktor darstellen, da dadurch in diesem Punkt genau umgekehrte Verhältnisse zu der *in vivo* vorliegenden Situation mit einer am frei beweglichen C-Terminus des Proteins bestehen.

Da bereits generell gezeigt wurde, daß die C-terminal fixierten Peptide als Substrat erkannt werden, wurden im nächsten Schritt in zwei Ansätzen der Einfluß des Abstands der Peptidkette von der Cellulosemembran und Einfluß des Abstandsmolekül-Aufbaus auf die ADP-Ribosylierungseffizienz untersucht.

Einfluß des physikalischen Abstands zur Cellulosemembran

Zum einen wurde der Einfluß der Länge des Abstandsmolekül auf die ADP-Ribosylierungseffizienz betrachtet, indem zusätzlich zu dem generell vorgegebenen Dimer des β-Alanin Spacers insgesamt tri bis pentamere β-Alanine zwischen Zielpeptid und Filter synthetisiert wurden. In den ADP-Ribosylierungsreaktionen, die mit Peptiden mit unterschied-

lich langen Abstandshaltermolekülen durchgeführt wurden, zeigte sich kein meßbarer Einfluß auf die Effizienz der Reaktion.

Einfluß der Identität der als Abstandshalter eingesetzten Aminosäuren

Zum anderen wurde statt einer Verlängerung des β -Alanin Abstandsmoleküls eine wachsende Anzahl von α -Alaninen eingefügt. Dies hatte einen deutlich meßbaren Rückgang der ADP-Ribosylierungseffizienz zur Folge (Abb. 3.36). Der Grund für diesen Abfall liegt vermutlich in der Neigung von α -Alanin-Peptiden zur Helixbildung (Arnot und Wonacott 1966) und daraus resultierend einer verringerten Flexibilität des Abstandshalters gegenüber einem ebensolchen aus langgestreckten und damit vergleichsweise flexiblen β -Alanin-Peptiden.

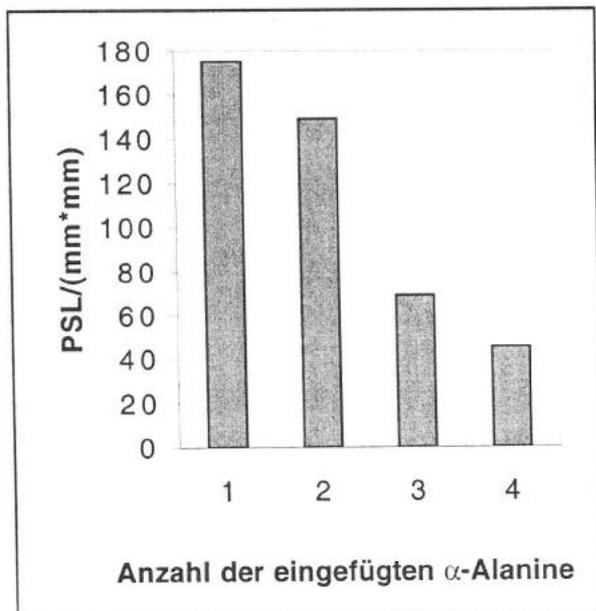


Abb. 3.36: Effekte der Abstandsmolekülverlängerung mit α -Alanin auf die ADP-Ribosylierungseffizienz des α -G₁₃ 20-mers.

Die wachsende Zahl an α -Alaninresten ist zwischen dem 2mer β -Alanin-Abstandsmolekül und der C-Terminalen Peptidsequenz des α -G₁₃ 20mers eingefügt. Dargestellt ist der Effekt dieses Einbaus auf die ADP-Ribosylierungseffizienz.

Für die weiteren Untersuchungen wurden, basierend auf diesen Ergebnissen daher stets β -Alanin Dimere als Abstandsmoleküle gewählt.

Einfluß der Peptidlänge auf die ADP-Ribosylierung

Um die Effekte der Längenvariation einer Peptidzielsequenz zu identifizieren, wurden Längenvariationen aller Sequenzen der in Tabelle 3.11 aufgelisteten Substrat- und Nicht-Substrat-Sequenzen als 12mere bis 20mere auf Filtern synthetisiert.

G-Protein α -Untereinheit	C-terminale Sequenz -20	-1	natürliches Substrat	SWISSPROT Zugriffscod
α -G _s	VFNDC RDIIQ RMHLR QYELL		nein	P04895
α -G _{i1/i2}	VFDAV TDVII KNNLK DCGLF		ja	P31871
α -G _{i3}	VFDAV <u>TDVII</u> KNNLK <u>ECGLY</u>		ja	P08754
α -G _{o1}	VFDAV TDVII AKNLR GCGLY		ja	P09471
α -G _{o2/ox1}	VFDAV TDVII AKNLR GCGLY		ja	P29777
α -T _{rod} / α -G _t	VFDAV TDIII KENLK DCGLF		ja	P11488
α -G _{o11}	VFAAV KDTIL QLNLK EYNLV		nein	P21279

Tab. 3.11: C-terminale Sequenzen der untersuchten α Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine.

Die unterstrichenen Aminosäurepositionen innerhalb der Sequenz von α -G_{i3} kennzeichnen die konservierten Positionen in den α Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der untersuchten natürlichen PT-Substrate. Das fett markierte Cystein an der Position -4 ist das Ziel der PT vermittelten ADP-Ribosylierung innerhalb der Substratsequenz.

Bei den synthetischen Peptiden, die den Sequenzen von α -G_{o2/ox} und α -G_{i3} entsprechen, konnte eine eindeutige Korrelation der ADP-Ribosylierungseffizienz mit der Länge der Zielsequenzen gezeigt werden (Abb. 3.37). Die C-terminalen Peptide von α -G_{o2/ox} zeigten unter den gegebenen Bedingungen die besten Substrateigenschaften und ein Optimum für die ADP-Ribosylierung bei einer Länge von 17 Aminosäuren (Abb. 3.37). Die Peptide von α -G_{i3}, der zweitbesten Zielsequenz in diesem Versuch, zeigten ein ADP-Ribosylierungsoptimum bei einer Peptidlänge von 16 und eine erneute Steigerung der Effizienz bei 19 und 20 Aminosäuren.

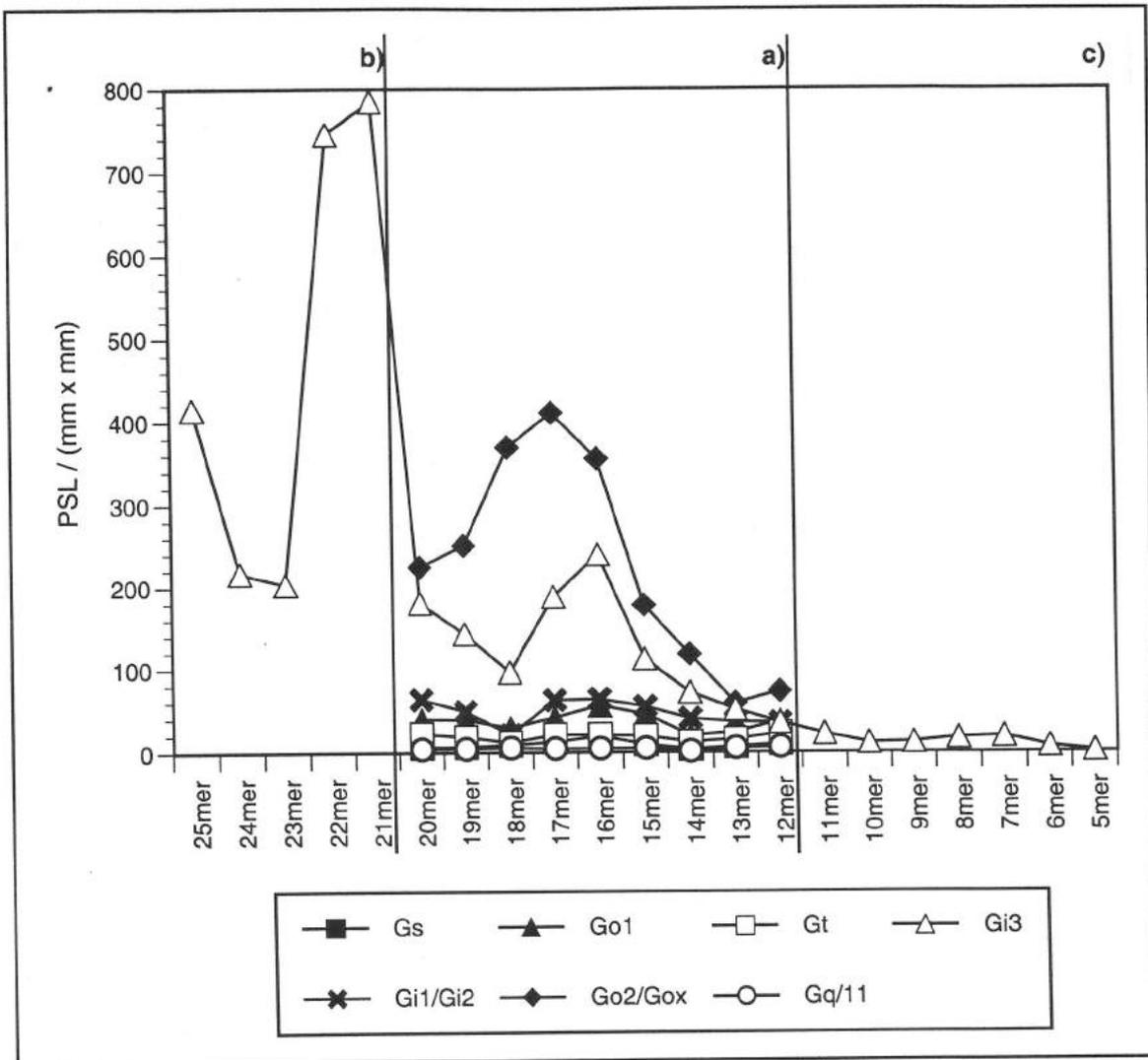


Abb. 3.37: ADP-Ribosylierung C-terminal fixierter Peptide durch Pertussis Toxin. Die C-terminalen Sequenzen von α -G_s, α -G_{o1}, α -T_{rod}, α -G_{i3}, α -G_{i1}/ α -G_{i2}, α -G_{o2}/ α -G_{ox} und α -G_{q/11} wurden als 12mere bis 20mere C-terminal fixiert einer ADP-Ribosylierungsreaktion mit Pertussis Toxin ausgesetzt. a) Dargestellt ist die jeweils beobachtete, mit Hilfe eines Bioimagers (Fuji BAS 1000) ermittelte ADP-Ribosylierungseffizienz. In weiteren Experimenten wurde die Länge für die von α -G_{i3} abgeleiteten Peptide bis auf 25mere verlängert b) sowie bis auf 5mere verkürzt c).

Um festzustellen bei welcher Peptidlänge das tatsächliche 2. Maximum der α -G_{i3} Sequenz liegt, wurden in weiteren Versuchen noch längere Sequenzen untersucht und mit diesen das zweite Maximum für die von α -G_{i3} abgeleitete Zielsequenz bei einer Länge von 21 Aminosäuren detektiert (Abb 3.37 b).

Untersuchungen an kürzeren Peptidsequenzen, beginnend bei 12meren von α -G_{i3} bis zu einer minimalen Länge von 5 Aminosäuren, zeigten weiterhin, daß die Mindestsubstratlänge einer Zielsequenz unter den gewählten Versuchsbedingungen bei 11 Aminosäuren liegt (Abb. 3.37 c).

3.4.3 Identifizierung der C-terminalen Sequenz von α -G_n als effizientes Pertussis Toxin-Substrat

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Sequenzen eingesetzt, die den natürlichen C-Termini bekannter α Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine entsprechen. Eine aus den diesen Versuchen resultierende Frage war, ob diese oder ähnliche Sequenzmuster auch in anderen, bisher nicht als Pertussis Toxin-Substrat identifizierten Proteinen vorkommen. Dazu wurde eine BLASTP-Suche (Altschul *et al.* 1990) gegen den zum Zeitpunkt dieser Arbeiten verfügbaren Sequenzbestand in der SWISSPROT- und SWISSPIR-Datenbanken durchgeführt, wobei in der SWISSPIR-Datenbank auch Fragmente von bisher nicht eindeutig identifizierten Proteinen enthalten sind.

Als Vergleichssequenz wurden die C-terminalen 12mer und 16mer Peptide von α -G₃ (vgl. Tab. 3.11) als Repräsentanten der kürzesten noch zuverlässig modifizierten und einer besonders gut erkannten Zielsequenz gewählt.

Neben den α Untereinheiten der bereits untersuchten G-Proteine wurden dabei vorwiegend solche von verwandten Species gefunden.

Darüberhinaus ergab die Analyse jedoch auch eine neue Sequenz, nämlich das C-terminale 16mer der α -G_n Untereinheit „LTDVI IKNNL RNCGL F“, verfügbar als SWISSPIR-Eintrag mit dem Zugriffscode B25888 (Sequenz siehe Anhang).

Weitere bisher nicht als Pertussis Toxin-Substrat identifizierte Sequenzen wurden nicht gefunden.

Das C-terminale 16mer von α -G_n zeigte in der BLASTP-Analyse eine Identität von 75% mit dem entsprechenden α -G₁₃ Peptid, dabei 93% funktions- und struktureneutrale (positive) Aminosäureaustausche sowie ebenfalls ein Cystein an der Position -4.

Diese Sequenz wurde von Michel *et al.* (1986) als neues, vermutlich regulatorisches GTP-bindendes Protein beim Rind beschrieben. Unbekannt war jedoch, ob diese Sequenz auch ein Pertussis Toxin-Substrat darstellt.

Das Peptid wurde daraufhin von uns in einem Versuch parallel mit 16mer Sequenzen von α -G_s, α -G₁₃ und α -G_{o2/ox} eingesetzt.

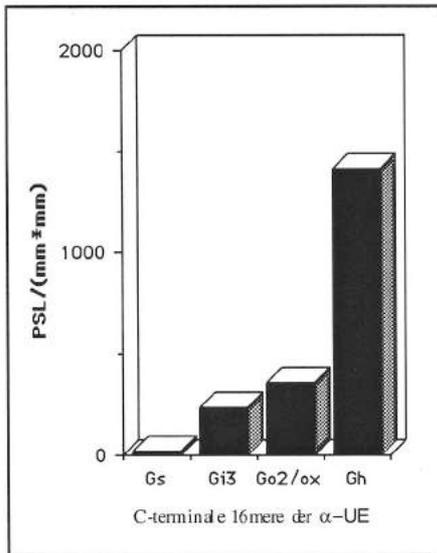


Abb. 3.38: Vergleich der ADP-Ribosylierungseffizienzen der C-terminalen 16mere der G-Protein α Untereinheiten von G_s , G_{i3} , G_o und G_h .

Dargestellt ist die jeweils beobachtete, mit Hilfe eines Bio-Imagers (Fuji BAS 1000) ermittelte ADP-Ribosylierungseffizienz.

Es zeigte sich, daß die ADP-Ribosylierungseffizienz des 16mers von α - G_h mehr als dreimal so hoch ist, wie die des bei dieser Länge besten Pertussis Toxin Substrates α - $G_{o2/ox}$ (Abb. 3.38). Damit erwies sich die C-terminal Sequenz des Gh Proteins als das Beste aller hier untersuchten Pertussis Toxin-Substrate.

3.4.4 Auswahl einer „Muster“-Sequenz für weitere Untersuchungen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß unter den von natürlichen Substraten abgeleiteten Sequenzen die C-terminalen Peptide von α - $G_{o2/ox}$, abgesehen von der neu gefundenen Substratsequenz in α - G_h , dessen Funktion jedoch noch nicht abschließend geklärt ist (Michel *et al.* 1986), die besten Substrateigenschaften zeigten.

Die von α - G_{i3} abgeleiteten Sequenzen zeigten ebenfalls sehr gute, gegenüber der α - $G_{o2/ox}$ Untereinheit jedoch deutlich zurückbleibende ADP-Ribosylierungseffizienzen.

In den weiteren Untersuchungen zu Effekten von Punktmutationen auf die ADP-Ribosylierungseffizienz wurde dennoch als Ausgangssequenz das C-terminale 16mer von α - G_{i3} verwendet, da aufgrund der suboptimalen Substrateigenschaft zu erwarten war, daß sowohl positive als auch negative Einflüsse der Mutationen in Form von deutlich detektierbare Veränderungen der ADP-Ribosylierungseffizienz auftreten sollten.

Ziel dieser Untersuchungen sollte es sein, weitere für Substraterkennung und Umsetzung wichtige Positionen im C-Terminus der Substratproteine zu identifizieren und die Wirkung von Aminosäureaustauschen zu charakterisieren.

3.4.5 Effekte von Aminosäureaustauschen im G_{i3} 16mer auf die Pertussis Toxin-Substrateigenschaften der Peptidsequenzen

Die hier bisher vorgestellten, ebenso wie auch frühere Untersuchungen (von Kaziro *et al.* 1991, West *et al.* 1985) zeigen, daß die Existenz eines Cysteins an Position -4 eine not-

wendige Voraussetzung für die Erkennung und ADP-Ribosylierung der Pertussis Toxin-Substrate ist. Da jedoch innerhalb der Untersuchungen mit Längenvarianten der fixierten Peptide sowie auch in unabhängigen Arbeiten (Neer *et al.* 1988, Tsuchia *et al.* 1990, Avigan *et al.* 1992) bereits Hinweise auf die Beteiligung weiterer Aminosäurepositionen gefunden wurden, wurde eine Bibliothek von Punktmutationen des C-terminal fixierten α -G₁₃ 16meren in Form von Peptidfeldern auf Cellulosefeldern synthetisiert, um den Einfluß dieser Sequenzvarianten auf die ADP-Ribosylierungseffizienz zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde das C-terminale 16mer von α -G₁₃ an bestimmten Positionen modifiziert und die dort natürlich stehende Aminosäure gegen alle anderen 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht.

Die Austausche wurden aufgrund von Sequenzvergleichen zwischen Substrat- und/oder Nicht-Substratsequenzen in mehreren Gruppen vorgenommen.

Die erste Gruppe enthält die Modifikationen an den Positionen -1, -9 und -10. Diese Stellen repräsentieren Aminosäuren, die innerhalb der bekannten natürlichen Substratsequenzen nicht konserviert sind.

Eine weitere Gruppe von Peptiden wurde für die Position -14 synthetisiert. Diese Position ist sowohl für die Substrate als auch die Nicht-Substrate streng konserviert.

Die dritte Gruppe enthält Modifikationen an den Positionen -3 und -6. An diesen Stellen sind sowohl die bisher bekannten natürlichen Substratsequenzen als auch das neu gefundene α -G_h konserviert.

Die vierte und letzte Gruppe beinhaltet die Modifikationen an den Positionen -15 und -16. Auch diese Positionen sind innerhalb der bisher bekannten Substratsequenzen konserviert. Wie die bereits dargestellten Experimente (vgl. Abb. 3.37) zeigen, beeinflussen diese Positionen die ADP-Ribosylierungseffizienz der Substratpeptide in erheblichem Maße.

Diese Peptid-Bibliothek wurde einer ADP-Ribosylierungsreaktion mit Pertussis Toxin ausgesetzt und die Veränderungen der ADP-Ribosylierungssequenz im Vergleich zum unveränderten α -G₁₃ 16mer bestimmt.

Tabelle 3.12 zeigt die Gesamtauswertung der in den folgenden Unterpunkten beschriebenen Ergebnisse dieser *in vitro* ADP-Ribosylierung.

Um die einzelnen Effekte untereinander vergleichen zu können, wurde jeweils die ADP-Ribosylierungseffizienz des unveränderten α -G₁₃ 16mers als 100% angenommen und alle anderen ADP-Ribosylierungseffizienzen in Relation dazu in Bezug gestellt.

Der Einfluß der Aminosäure-Austausche wird nachstehend für jede einzelne ausgetauschte Position gesondert besprochen

Aminosäure	Position der Einzelaminosäureaustausche							
	-1 (Y)	-3 (G)	-6 (K)	-9 (N)	-10 (K)	-14 (D)	-15 (T)	-16 (V)
A (ala)	28.8	11.6	8.9	138.2	13.6	57.3	50,2	39.0
C (cys)	29.2	16.1	9.4	84.1	14.4	74.7	106.8	50.9
D (asp)	8.8	2.9	2.5	15.7	8.5	100	37.8	31.0
E (glu)	17.2	4.0	4.7	21.7	6.8	17.3	45.2	54.5
F (phe)	233.7	23.3	34.16	65.9	24.9	24.4	253.9	409.3
G (gly)	35.6	100	9.2	38.9	9.4	44.4	110.0	91.1
H (his)	23.8	16.3	7.9	111	12.0	36.4	117.0	89.5
I (ile)	99.9	11.4	18.9	44.7	19.1	27.5	120.1	324.1
K (lys)	103.4	83.9	100	738.5	100	61.9	195.5	189.6
L (leu)	145.0	21.7	22.7	63.1	25.1	22.1	262.6	429.7
M (met)	28.8	19.9	12.0	99.6	9.4	21.2	54.2	56.3
N (asn)	15.1	13.3	9.2	100	7.6	20.2	46.7	54.8
P (pro)	10.5	4.5	6.6	25.5	8.4	35.7	53.8	70.5
Q (gln)	20.9	20.1	34.4	294.6	25.4	21.0	49.2	50.4
R (arg)	168.1	110.6	192.2	995.8	84.7	61.9	136.2	135.7
S (ser)	37.7	16.6	24.1	105.6	23.8	28.3	95.1	56.6
T (thr)	37.9	5.0	6.8	53.8	9.3	22.4	100	53.2
V (val)	63.5	5.1	7.6	26.0	9.6	18.1	66	100
W (trp)	53,4	16.4	14.2	155.2	41.0	21.5	186.5	121.8
Y (tyr)	100	10.6	21.6	121.0	10.4	18.4	170.4	161.3

Tab. 3.12: ADP-Ribosylierungseffizienzen punktmutierter C-terminaler 16mer Peptide von α -G₁₃.

Die Aminosäurereste der Peptide wurden jeweils an den angegebenen Positionen gegen alle anderen natürlichen L-Aminosäurereste ersetzt und in einem ADP-Ribosylierungsexperiment mit PT die relative ADP-Ribosylierungseffizienz gegenüber dem auf 100% gesetzten, unveränderten Ausgangspeptid bestimmt. Über jeder Spalte ist neben der Position der durchgeführten Punktmutation in Klammern die an dieser Position natürlich auftretende Aminosäure angegeben.

Austausche an Position -1 (Tyr)

Austausche des Tyrosins gegen Isoleucin und Lysin zeigten nur geringen Einfluß auf die ADP-Ribosylierungseffizienz an diesem Peptids. Leucin, Arginin und Phenylalanin erhöhen die Effizienz der Reaktion jeweils um die Faktoren 1,5, 1,7 bzw. 2,3. Alle anderen Austausche an dieser Position führen zu einer deutlichen Reduktion der ADP-Ribosylierungseffizienz. Dabei werden die stärksten Abfälle beim Austausch gegen Aspartat (15,1%) und Prolin (10,5%) erzielt.

Austausche an Position -3 (Gly)

Ein Austausch des Glycins an Position -3 gegen Arginin resultiert in einer geringfügigen Verbesserung (110,6%) und der Austausch gegen Lysin in einem geringen Abfall (83,9%) der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Jeder andere Austausch führt hingegen zu einem Abfall bis auf unter 24% der ADP-Ribosylierungseffizienz des unmodifizierten Substrats, mit einem Minimalwert von 2,9% im Fall des Austausches gegen Aspartat.

Austausche an Position -6 (Lys)

Ein Austausch von Lysin an Position -6 gegen Arginin führt mit 198% fast zur Verdoppelung, jeder andere Austausch hingegen zu einem starken Abfall der beobachteten ADP-Ribosylierungseffizienz (< 35%).

Wie auch an den Positionen -3 und -1 führt der Austausch gegen Aspartat zum stärksten Abfall in der Substraterkennung und Umsetzung, nämlich auf 2,5%.

Austausche an Position -9 (Asn)

An Position -9 zeigen sich innerhalb aller durchgeführten Punktmutationen die größten positiven Effekte von Einzelaustauschen auf die ADP-Ribosylierungseffizienz.

Beim Austausch des natürlich an dieser Position stehenden Asparagins gegen Glutamin, Lysin oder Arginin steigert sich die ADP-Ribosylierungseffizienz auf das drei-, sieben- bzw. zehnfache des Ausgangswerts.

Abgesehen vom Austausch gegen Glutamin, der bezogen auf die Ladung neutral ist, führen die beiden anderen Austausche eine zusätzliche positive Ladung ein. Der Haupteffekt könnte jedoch vor allem auf die Verlängerung der Seitenketten zurückzuführen sein, da dadurch die Oberflächenpräsentation der funktionellen Gruppen verbessert wird, was bei einer Beteiligung dieser Positionen an H-Brückenbindungen im Verlauf der Reaktion von Vorteil wäre.

Auffallend ist weiterhin, daß innerhalb der untersuchten Punktmutationen nur an Position -9 ein Austausch gegen Glutamin zur deutlichen Steigerung der ADP-Ribosylierungseffizienz führt.

Ein Austausch des Asparagins an Position -9 gegen Histidin äußert sich lediglich in einer geringfügigen Steigerung der ADP-Ribosylierungseffizienz (111,0%), wohingegen Austausche gegen Alanin oder Tryptophan zu deutlichen Steigerungen auf 138,2% bzw. 155,2% führen. Die Austausche, die die Einführung einer negativen Ladung beinhalten, nämlich Aspartat und Glutamat, führen zur deutlichen Verringerung der ADP-Ribosylierungseffizienzen auf 11,4% bzw. 19,5%.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das Vorkommen eines positiv geladenen Aminosäurerestes an Position -9 einen ausgewiesenen steigernden Effekt auf die Pertussis Toxin - Substrat Wechselwirkung ausübt.

Austausche an Position -10 (Lys)

Jeder Austausch von Lysin gegen eine beliebige andere Aminosäure führt an Position -10 zu einem Abfall der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Dies ist für keine andere der untersuchten nichtkonservierten Positionen der Fall, so daß dieser Position im C-terminalen 16mer von α -G₃ eine besondere Bedeutung zukommt.

Mit Ausnahme des Austauschs gegen Arginin (84,7%) und Tryptophan (41,1%) sinkt die ADP-Ribosylierungseffizienz auf jeweils unter 30% und dabei mehrfach unter 10%. Der Austausch gegen Aspartat zeigt wiederum einen starken Abfall auf (9,8%). Nur der Austausch mit Glutamat zeigt mit 6,8% eine noch niedrigere Effizienz.

Austausche an Position -14 (Asp)

Die Position -14 ist innerhalb aller untersuchten Substrat- und Nicht-Substrat-Peptide konserviert. Ein Austausch an dieser Position führt in allen Fällen zum Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Auffällig ist, daß an dieser Position im Ausgangspeptid Aspartat vorliegt, eine Aminosäure, deren Einbau an allen anderen untersuchten Positionen in der Regel zu einem starken Rückgang der ADP-Ribosylierungseffizienz führt.

Austausche an Position -15 (Thr)

An Position -15 führen die Austausche von Threonin gegen die drei Aminosäuren Phenylalanin (253,9%), Leucin (262,6%) und Lysin (195,5%) zu einer 2- bis 2,5-fachen Erhöhung, alle anderen vorgenommenen Austausche hingegen zu einem Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Auch an dieser Stelle findet sich der stärkste Rückgang der ADP-Ribosylierungseffizienz beim Austausch von Threonin gegen Aspartat (37,8%).

Austausche an Position -16 (Val)

Die Austausche von Valin an Position -16 führen in einigen Fällen zu sehr starken Steigerungen der ADP-Ribosylierungseffizienz.

An diesem „freien“, d.h. vermutlich besonders gut exponierten N-Terminus des 16mers resultiert ein Austausch gegen Leucin, Phenylalanin und Isoleucin jeweils in Steigerungen der ADP-Ribosylierungseffizienz auf 429,7%, 409,3% bzw. 324,1%.

Der stärkste beobachtete Abfall der ADP-Ribosylierungseffizienz findet sich auch hier mit nur 31% Resteffizienz beim Austausch von Valin gegen Aspartat.

Bei den durchgeführten Punktmutationen wurden für den Positionen -9, -15 und -16 zum Teil stark steigernde Effekte auf die ADP-Ribosylierungseffizienz gefunden. Die Experimente zur Veränderung der ADP-Ribosylierungseffizienz in Abhängigkeit von der wachsenden Peptidkette (Abb. 3.37) haben gezeigt, daß die Position -15 und noch in stärkerem Maße -16 deutlichen Einfluß auf die Effizienzen der α -G₃ und α -G_{02/ox1} zeigen.

Der experimentelle Befund, daß ein Einfügen von Leucin an Position -16 zu einer starken Steigerung der ADP-Ribosylierungseffizienz führt, wird weiterhin durch die authentische Sequenz des α -G_n C-Terminus bestätigt. In der α -G_n-Sequenz, die als besonders gutes Substrat identifiziert wurde, steht ebenfalls ein Leucin an der Position -16 (Abb. 3.38).

3.4.6 Simulation der sterischen Effekte der Positionsaustausche im α -G₁₃ 16mer in energieminierten, dreidimensionalen molekularen Modellen

Im Rahmen der Untersuchungen an punktmultierten Peptiden von C-terminalen α -G₁₃ 16mer Peptiden wurden eine Reihe von Positionen identifiziert, an denen ein Austausch mit bestimmten Aminosäuren zum Teil zu drastischen Effekten auf die ADP-Ribosylierungsreaktion führt.

Mögliche Ursachen dieser Effekte können zum Beispiel Ladungsveränderungen und insbesondere auch unmittelbar strukturverändernde Einflüsse der Mutationen auf die Konformation der Peptide sein.

Um Hinweise für die eventuell möglichen Veränderungen der Konformation der Peptide durch die Einführung der fraglichen Austausche zu erhalten, wurden für einige dieser experimentell untersuchten Austausche im Rahmen von Computersimulationen Energieminimierungen der dreidimensionalen Peptidstrukturen berechnet.

Ausgehend von einer im Modell angenommenen α -Helix-Struktur wurde eine dreidimensionale Konformation des nächst erreichbaren stabilen Energieminimums des jeweiligen Peptids berechnet und als Grafik dargestellt.

Abb. 3.39 zeigt die Ergebnisse von 8 durchgeführten Berechnungen für das unveränderte Peptid sowie für verschiedene Austausche an den Positionen -6, -10 und -14.

Die Peptide sind jeweils so ausgerichtet, daß die Cysteinreste an Position -4 zur Deckung gebracht werden können, wodurch sich eine vergleichbare Betrachtungsperspektive ergibt.

Bei einer ersten Betrachtung fällt auf, daß bei allen Simulationen die modifizierten Peptide nach der Energieminimierung nicht mehr mit der energieminierten Darstellung des α -G₁₃ 16mers in Deckung zu bringen sind. Somit ist also für dieses Peptid in der Simulation bereits eine Punktmutation ein die Struktur zumindest minimal verändernder und in der Projektion auch optisch erkennbarer Faktor.

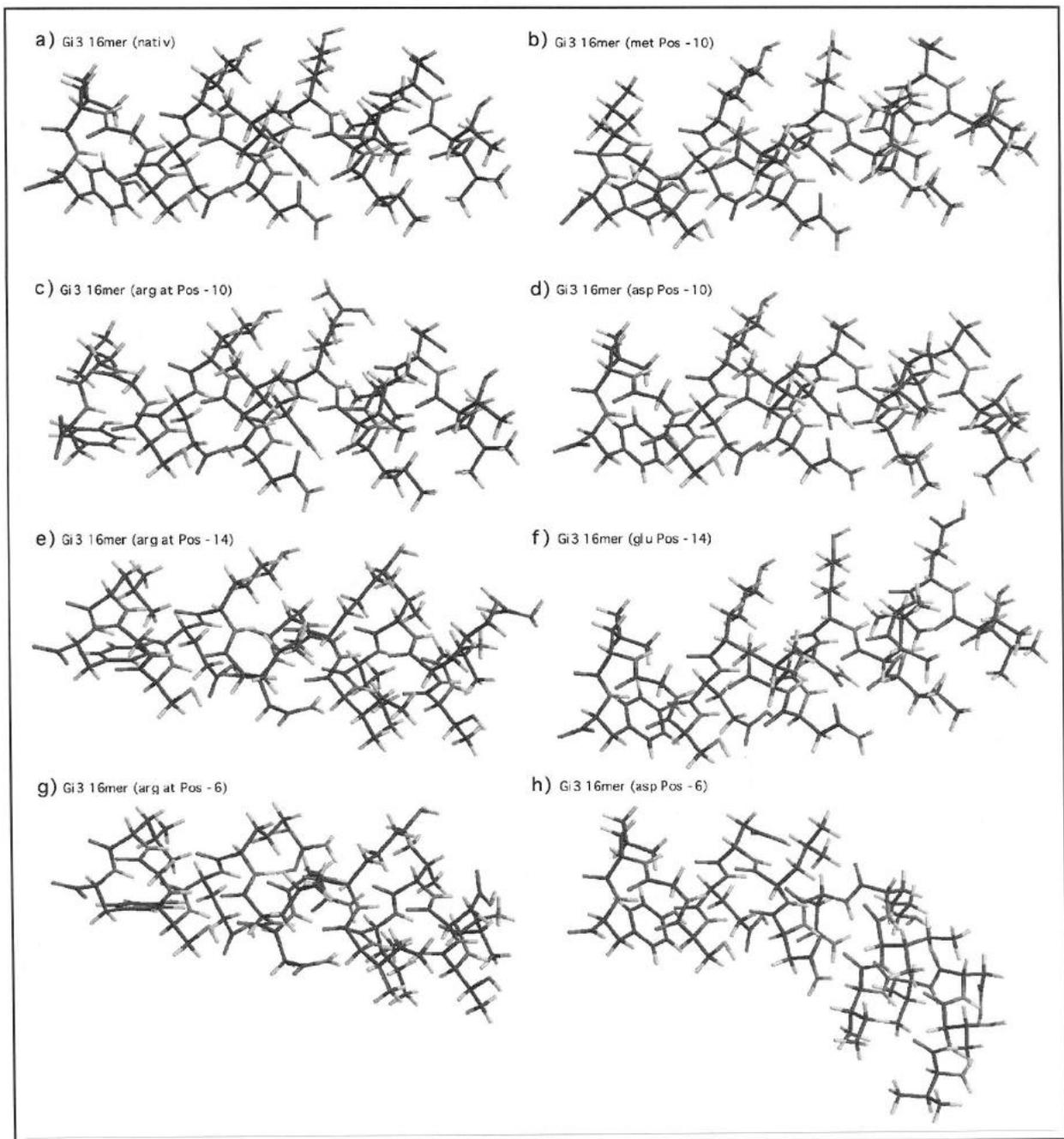


Abb. 3.39: Computersimulation der sterischen Effekte von Positionsaustauschen im C-terminalen α -G_{i3} 16mer.

In der Computersimulation, durchgeführt mit der Software MacSPARTAN 1.1 (Wavefunction 1996), wurden nach dem SYBYL-Kraft Feld energieminierte, dreidimensionale Strukturen ausgehend von einer angenommenen (als Ausgangskonformation erzwungenen) α -Helixstruktur in bis zu 6.000 Optimierungszyklen berechnet. Bei den Teilabbildungen ist jeweils die ausgetauschte Position angegeben. Die einzelnen Moleküle sind derart ausgerichtet, daß der vom PT im Rahmen der ADP-Ribosylierung zu erkennende und modifizierende Cystein-Rest (Schwefel = grün eingezeichnet) deckungsgleich ausgerichtet ist, wodurch ein Vergleich auch in der zweidimensionalen Projektion möglich wird.

Bei den durchgeführten Austauschen läßt sich der Einfluß auf die berechneten Konformationsmodelle wie folgt zusammenfassen:

Position -10

Ein Austausch an der Position -10 führt experimentell (vgl. Tab. 3.12) in jedem Fall zu einem Sinken der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Der Austausch mit dem geringst abschwächenden Effekt ist hier Lysin gegen Arginin, ein, bezogen auf die Gesamtladung, neutraler Austausch.

Die höchsten Absenkungen werden dagegen experimentell beim Austausch gegen Aspartat oder Methionin beobachtet.

Dieser Austausch geht mit einer Ladungsverschiebung einher. Ein Effekt auf die berechnete dreidimensionale Konformation in der Simulation ist beim Austausch gegen Arginin kaum zu erkennen, beim Austausch gegen Methionin ist er hingegen auch in der zweidimensionalen Projektion zu erkennen.

Position -6

Die Austausche in Position -6 wirken sich experimentell nur im Falle von Arginin steigend auf die ADP-Ribosylierungseffizienz aus. Im Falle von Aspartat zeigt sich für diesen Austausch hingegen ein maximal abschwächender Effekt.

In diesem Fall beobachtet man auch in der Simulation eine besonders deutliche Veränderung der dreidimensionalen Peptidstruktur, die zu einem „Abknicken“ führt.

Abb. 3.40 zeigt zur Verdeutlichung des in der Simulation durch den Lysin - Aspartat Austausch bewirkten Effekts Kalottenmodelle der unmodifizierten und modifizierten Peptide.

Der Austausch Lysin gegen Arginin an der Position -6 hat dagegen keine Ladungsverschiebung und in der Simulation nur geringe Strukturveränderung zur Folge.

Position -14

Bei der dritten in der Simulation betrachteten Position -14 findet man experimentell in jedem Fall nach einem Austausch einen Rückgang der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Hier fällt auf, daß der Austausch mit dem größten negativen Effekt, nämlich Aspartat gegen Glutamat, nicht mit einer Ladungsveränderung einhergeht. Andererseits hat ein Austausch stark abweichender Aminosäuren, hier Aspartat gegen Arginin, nur zu einem geringen Abfall der Substrateigenschaften geführt.

In beiden Fällen sind in der Simulation die konformellen Effekte dieser Austausche nur gering.

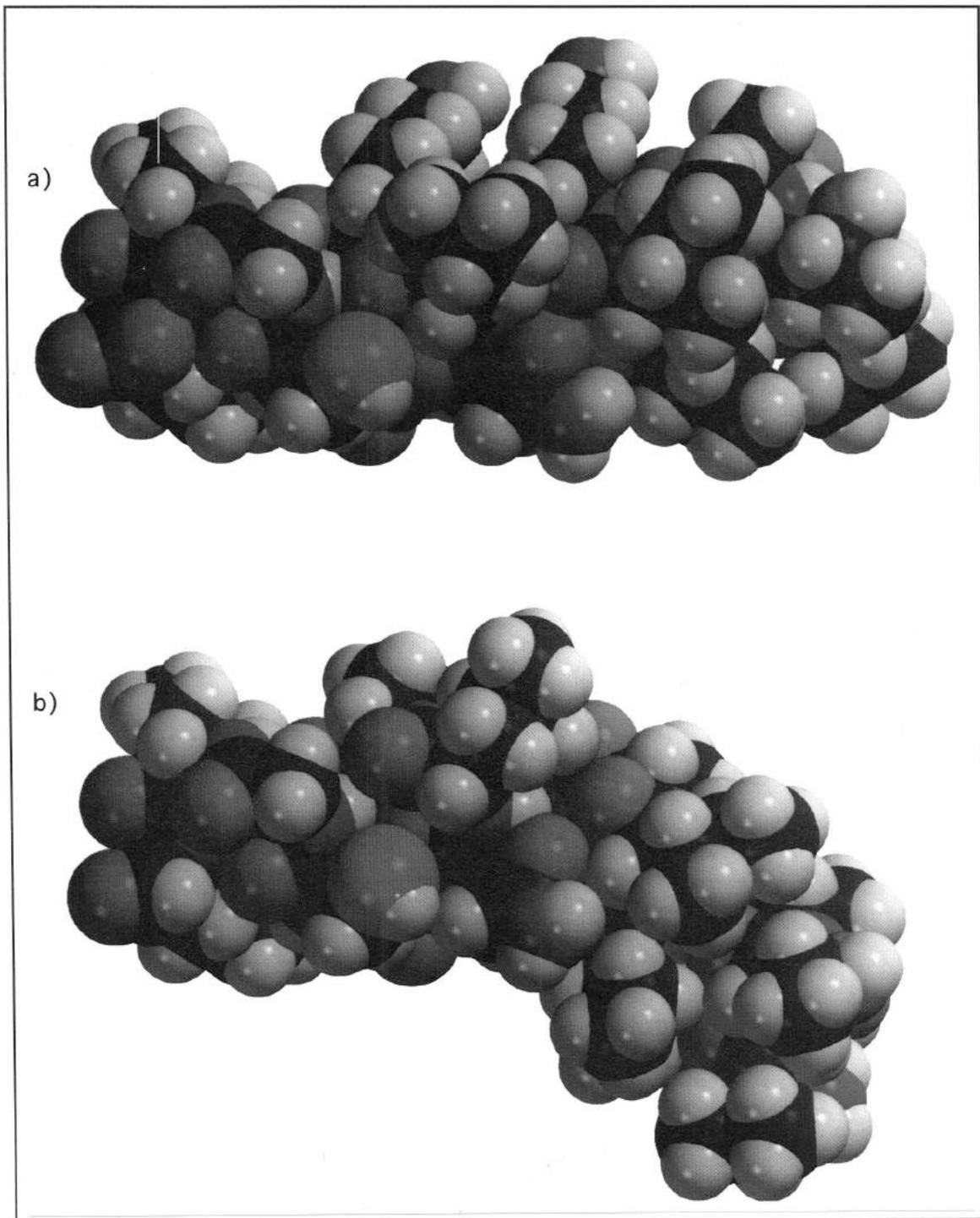


Abb. 3.40: Computersimulation der sterischen Effekte eines Positionsaustausches im C-terminalen α -G₁₃ 16mer.

In der Computersimulation, durchgeführt mit der Software MacSPARTAN 1.1 (Wavefunction 1996), wurden nach dem SYBYL-Kraft Feld energieminierte, dreidimensionale Strukturen ausgehend von einer angenommenen (als Ausgangskonformation erzwungenen) α -Helixstruktur in bis zu 6.000 Optimierungszyklen berechnet. Hier sind anhand der Kalottenmodelle des mutierten b) und nichtmutierten a) Peptids die Effekte des Positionsaustauschs von Lysin gegen Aspartat an der Position -6 dargestellt. Die einzelnen Moleküle sind derart ausgerichtet, daß der vom PT im Rahmen der ADP-Ribosylierung zu erkennende und modifizierende Cystein-Rest deckungsgleich ausgerichtet ist (Schwefel = grün), wodurch die Veränderungen in der Konformation auch in der zweidimensionalen Projektion deutlich sichtbar werden.

3.5 Weitere Einsatzmöglichkeiten der Spotsynthese zur Klärung molekularer Ursachen bei infektiologischen Fragestellungen

Im Rahmen dieser Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Einsatzbereiche der Spotsynthesemethode sehr weitreichend sind und daß es sich bei diesem Verfahren um ein für viele Fragestellungen auch innerhalb der molekularen Infektiologie hervorragend geeignetes Werkzeug handelt, das vergleichsweise schnell zu aussagekräftigen Ergebnissen führt.

In den vorangegangenen Abschnitten wurde insbesondere die Anwendbarkeit des mit Hilfe der Spotsynthese erzeugten „Peptid-Feldes“ zur Analyse von „Enzym - Substraterkennung“ sowie zur Charakterisierung der „Antikörper-Peptiderkennung“ anhand der Untersuchungen an Pertussis Toxin gezeigt.

In weiteren Projekten und Kooperationen wurden parallel dazu auch andere Anwendungsmöglichkeiten erprobt.

Es stellte sich heraus, daß der Pepscan eine hervorragende Methode ist, um z.B. die von monoklonalen Antikörpern detektierten linearen Epitope auf Transferrin-bindenden Proteinen von *N.meningitidis* klar abzugrenzen. Diese Thematik wurde daraufhin in einer eigenen Arbeit (Grün 1997) bearbeitet.

Weiterhin konnte in Kooperation mit der Tiermedizinischen Hochschule (Strutzberg 1996) gezeigt werden, daß C-terminal an Cellulose fixierte Peptide bei Mäusen effizient als Immungene zur Gewinnung hochtitriger anti-Peptid-Seren eingesetzt werden können.

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse sollten zeigen, ob neben der hier bereits gezeigten Anwendbarkeit des Verfahrens auf Untersuchungen zur Epitoperkennung durch Antikörper oder Substraterkennung auch Fragestellungen zu „Protein-Peptid“ Wechselwirkungen mit Hilfe der C-terminal fixierten Peptide angegangen werden können.

Detektion von Protein-Peptid Wechselwirkungen am Beispiel Transferrin - Transferrin-bindendes Protein (Tbp)

Die Bindungsdomänen Transferrin-bindender Proteine pathogener Mikroorganismen sind wichtige Ansatzpunkte für die Wirtsabwehr und Impfstoffentwicklung.

Gelingt es dem Wirt, eine Immunantwort gegen diese Bereiche aufzubauen, ist das Pathogen von der Eisenzufuhr abgeschnitten und innerhalb der Wirtsumgebung nicht mehr überlebensfähig.

Im Rahmen von Kooperationen mit der Tiermedizinischen Hochschule in Hannover (Strutzberg *et al.* 1995) und dem Institute Pasteur Mérieux Connaught in Frankreich (Renauld-Mongenie *et al.* 1997) wurde die Suche nach den jeweils die Bindung vermittelnden Domänen mit Hilfe der Pepscan-Methode angegangen.

3.5.1 Bindung von tierischem Transferrin an Pepscans von Transferrin-bindendem Protein TfbA aus *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Ausgangspunkt für diese Untersuchung sind die Arbeiten von Katrin Strutzberg, in denen sie versucht hat, die Transferrin-bindenden Bereiche des TfbA Proteins von *A. pleuropneumoniae* zu bestimmen (Strutzberg *et al.* 1995, Strutzberg 1996).

Mit Hilfe von Transposonmutagenese-Versuchen konnte sie zeigen, daß die Transferrin-bindende Domäne in der aminoterminalen Hälfte innerhalb der ersten 289 Aminosäuren lokalisiert vorliegt.

Für die weitergehenden Untersuchungen wurden überlappende 16mere dieser Sequenz als Pepscans angefertigt und diese mit biotinyliertem Schweine-Transferrin inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine Farbreaktion nach Inkubation des gebundenen Schweine-Transferrins mit an Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase.

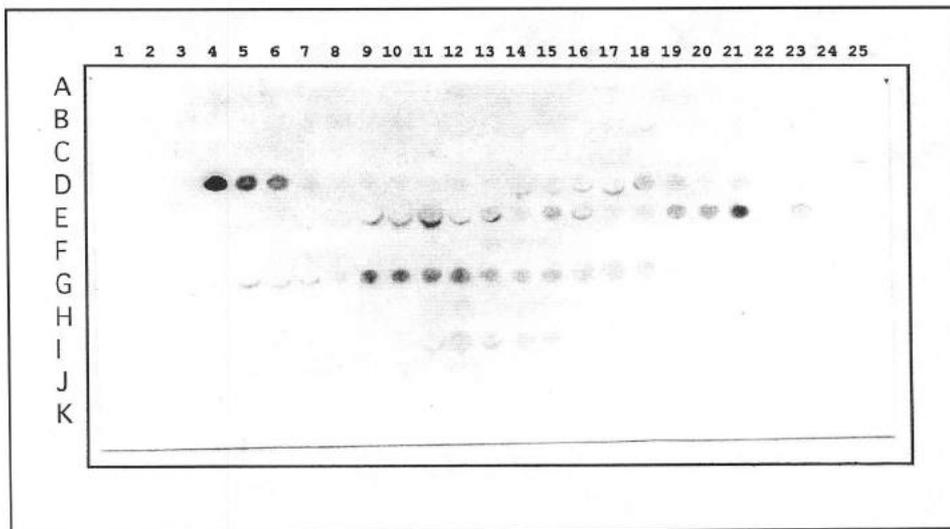


Abb. 3.41: Bindung von biotinyliertem Schweine-Transferrin an C-terminal fixierte Peptide von Transferrin-bindendem Protein aus *A. pleuropneumoniae*.

Pepscan mit überlappenden 16meren (Überlappung 15 AS) des aminoterminalen 30kD-TfbA-Halb moleküls. Der Nachweis der Bindung erfolgt über an alkalische Phosphatase gekoppeltes Streptavidin mit Hilfe einer anschließenden Farbreaktion.

Abb. 3.41 zeigt das Ergebnis eines Bindungsexperiments. Die drei reproduzierbar detektierbaren Domänen sind durch die Spots D4 bis D6 (Domäne 1), E19 bis E 21 (Domäne 2) und G9 bis G12 (Domäne 3) repräsentiert. Die zugehörigen Sequenzen sind in Tab. 3.13 dargestellt.

Domäne	Position innerhalb des reifen Proteins	Länge (AS)
1 (D1-6)	79-96 (81-94)	18 (14)
2 (E19-21)	119-136 (121-134)	18 (14)
3 (G9-12)	159-177 (162-174)	19 (13)

Tab. 3.13: **Transferrin-bindende Domänen auf dem TfbA Protein von *A. pleuropneumoniae*.**

Angegeben sind die von den Peptiden insgesamt überspannten Bereiche. In Klammern eingetragen sind jeweils die Domänenlängen, die die kleinste überlappende Region zwischen den Peptiden darstellen.

Die bindenden Domänen bestehen im Experiment aus überlappenden Peptidbereichen.

Bei der Eingrenzung einer Peptid - Antikörper-Wechselwirkung wird üblicherweise davon ausgegangen, daß in einem bindenden Bereich aus überlappenden Peptiden die kleinste gemeinsame Sequenz der benachbarten Peptide das eigentliche Epitop darstellt, das in der Regel zwischen 6-12 Aminosäuren umfaßt

Im Falle der hier gezeigten Protein - Peptidbindung ist dies zumindest hier nicht der Fall, denn weitere Experimente mit 15mer Peptiden (Daten nicht gezeigt), die die bindenden Regionen weiter eingrenzen sollten, zeigten keine detektierbare Bindung von Schweine-Transferrin.

Es handelt sich daher vermutlich bei den gesamten, vom Transferrin detektierten Bereichen um die bindenden Domänen. Diese dürfen nicht unter ein Mindestmaß (16mer) verkürzt werden, um noch eine reproduzierbare Bindung zuzulassen.

3.5.2 Bindung von humanem Transferrin an Pepscans von Transferrin-bindendem Protein TbpB aus den *Neisseria meningitidis* Stämmen M928 und B16B6

Bei den humanpathogenen Stämmen M983 und B16B6 von *N.meningitidis* wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur Mérieux Connaught (Renaul-Montgenie *et al.* 1997) Untersuchungen zur Detektion von Transferrin-bindenden Domänen durchgeführt.

Hierfür wurden überlappende 18mere der beiden Transferrin-bindenden Proteine (TbpB) als Pepscan auf Filtern synthetisiert und mit humanem, direkt an Peroxidase gekoppeltem Transferrin inkubiert und die Bindung anschließend mit Hilfe von „BM blue“ als Substrat detektiert.

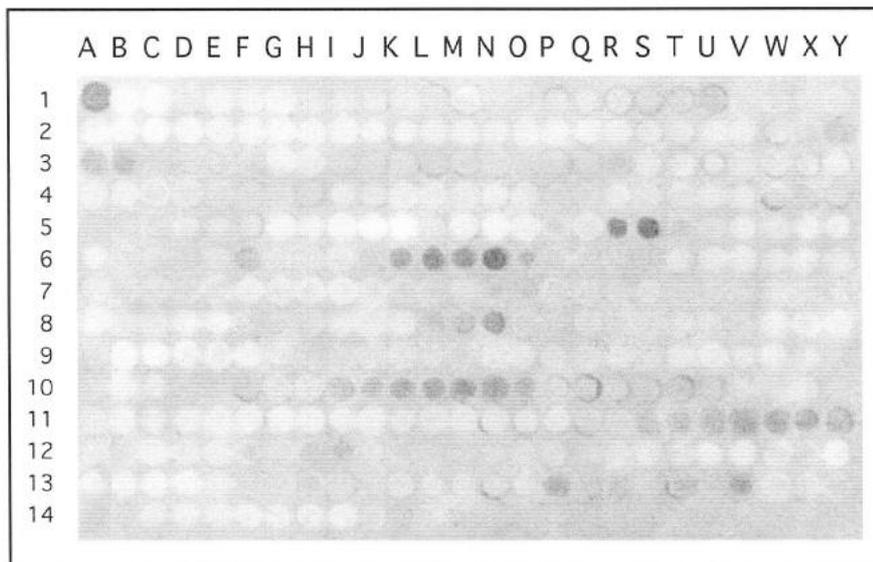


Abb. 3.42: Bindung von Peroxidase gekuppeltem, humanem Transferrin an C-terminal fixierte 18mer Peptide von Transferrin bindendem Protein TbpB aus *N.meningitidis* M986.

Der Pepskan besteht aus um jeweils 2 AS überlappenden 18meren des Proteins. Die Farbreaktion erfolgte durch 20 minütige Inkubation mit BM blue. Der Filter wurde eingescannt und die Spots quantifiziert.

Die Abbildungen Abb. 3.42 und 3.43 zeigen jeweils die Filter nach der Farbreaktion von 20 Minuten. Auch in diesem Fall konnten bindende Domänen gefunden werden.

Die Ergebnisse für den Stamm M982 sind in Tabelle 3.14, die für den Stamm B16B6 in Tabelle 3.15 zusammengefaßt.

Domäne	Sequenz innerhalb von TbpB	Länge	Affinität
1 (1A)	1-18	18	+
2 (5R-S)	235-254	20	++
3 (6K-N)	271-294	24	++
4 (8N)	377-394	18	++
5 (10K-N)	471-494	24	+
6 (11U-X)	541-566	24	+
7 (13P)	631-648	18	+
8 (14V)	643-660	18	+

Tab. 3.14: Bindung von humanem Transferrin an C-terminal fixierte Peptide von Transferrin-bindendem Protein aus *N.meningitidis* M986.

Die mit hoher Affinität (++) markierten Bereiche konnten bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten identifiziert werden. Die weiteren Bereiche wurden nach einer verlängerten Inkubation von 20 Minuten, die auch in Abb. 3.42 gezeigt ist, identifiziert. Dabei wird ein Peptid dann als affin bezeichnet, wenn die Intensität der Farbreaktion mit BM blue nach 20 Minuten in der Quantifizierung mit dem Scanner mindestens das 2,5-fache des Hintergrunds beträgt.

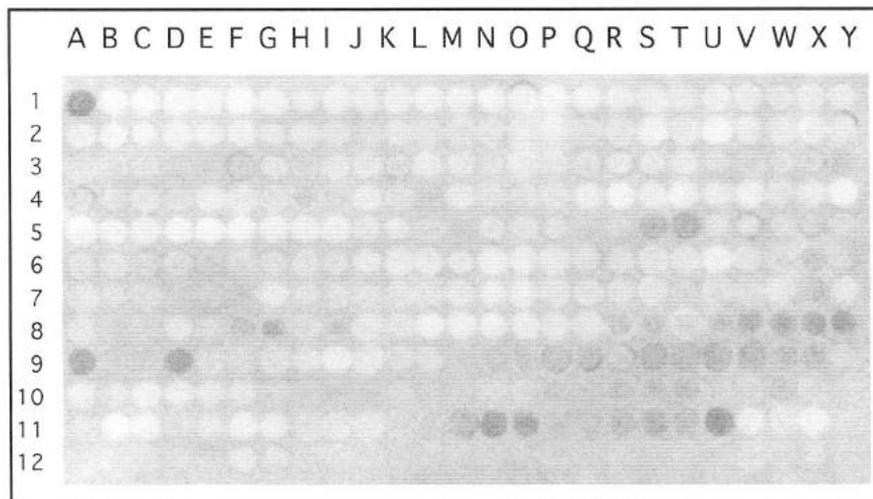


Abb. 3.43: Bindung von Peroxidase gekuppeltem, humanem Transferrin an C-terminal fixierte 18mer Peptide von Transferrin bindendem Protein TbpB aus *N.meningitidis* B16B6.

Der Pepsican besteht aus um jeweils 2 AS überlappenden 18meren des Proteins. Die Farbreaktion erfolgte durch 20 minütige Inkubation mit BM blue. Der Filter wurde eingescannt und die Spots quantifiziert.

Domäne	Sequenz innerhalb von Tbp	Länge	Affinität
1 (1A)	1-18	18	++
2 (5S-T)	237-256	20	+
3 (8F-G)	361-380	20	+
4 (8V-9A)	393-418	28	+, nur 401-418 ++
5 (9D)	407-424	18	++
6 (9S-X)	437-464	28	+
7 (12M-O)	525-546	22	+, nur 527-544 ++
(12S-U)	537-554	22	+, nur 541-558 ++

Tab. 3.15: Bindung von humanem Transferrin an C-terminal fixierte Peptide von Transferrin bindendem Protein aus *N.meningitidis* B16B6.

Die mit hoher Affinität (++) markierten Bereiche konnten bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten identifiziert werden. Die weiteren Bereiche wurden nach einer verlängerten Inkubation von 20 Minuten die auch in Abb. 3.44 gezeigt ist, identifiziert. Dabei wird ein Peptid dann als affin bezeichnet, wenn die Intensität der Farbreaktion mit BM blue nach 20 Minuten in der Auswertung mit dem Scanner mindestens das 2,5-fache des Hintergrundes beträgt.

Die Untersuchungen am Tbp2 aus *N.meningitidis* M982 konnten im Rahmen der Zusammenarbeit die bereits vorliegenden Befunde zur Bindung von humanem Transferrin an verkürzten Fusionsproteinen (Renauld-Montgenie *et al.* 1997) für die drei Peptide mit hoher Bindungsaffinität bestätigen und den jeweils bindenden Bereich genauer eingrenzen.

Vergleichbare Untersuchungen für den Stamm B16B6 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden und sollen sich in Kürze anschließen.

4 Diskussion

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur detaillierteren Struktur- und Funktionsanalyse von Pertussis Toxin. Die dabei vorwiegend eingesetzte Spotsynthesetechnik von Peptiden mußte, ebenso wie die Auswertung der damit erzielten Versuchsergebnisse, zunächst als verlässliche und reproduzierbare Methode etabliert und entsprechend optimiert werden. Erst danach konnten die zentralen Arbeiten zur Epitopkartierung auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin und der Erkennung von Zielsubstratsequenzen durchgeführt werden.

Um die erhaltenen Erkenntnisse aus der Detektion der Bindungsreaktionen oder der Reaktionen der ADP-Ribosylierung der Auswertung und Interpretation zuführen zu können, mußten erst Verfahren zur Aufnahme und Analyse entwickelt werden.

Die für eine räumliche Darstellung der Versuchsergebnisse in Form von Überlagerungen der detektierten immunodominanten Epitope auf Kristallstrukturen geeigneten Softwareprodukte mußten evaluiert und eingeführt werden. In gleicher Weise mußten Hilfsmittel für computergestützte *ab initio* Berechnungen potentiell strukturverändernder Einflüsse von Positionsmutationen auf Peptidkonformationen evaluiert werden. Erst dadurch war es überhaupt möglich, die umfangreichen Rohdaten aus den Experimenten umfassend zu interpretieren und zu veranschaulichen.

Die Einführung der Spotsynthesetechnik verlässliche Methode zur Darstellung von Peptidfeldern in größerem Maßstab innerhalb eines infektiologisch orientierten Labors gab darüber hinaus den Anstoß zu einer Reihe von weiteren Teilprojekten und Kooperationen, mit denen die Potenz dieser Methodik bei Untersuchungen von bakteriellen Virulenzfaktoren in ganz unterschiedlichen Arbeitsfeldern aufgezeigt werden konnte (Strutzberg *et al.* 1995, Grün 1997, Renauld-Mongenie *et al.* 1997).

Eine Reihe von zurückliegenden Arbeiten auch anderer Arbeitsgruppen konnte mit Hilfe der vorgenommenen Untersuchungen in ihren Kernaussagen nachvollzogen und bestätigt werden. Aufgrund der neuen Möglichkeiten und der großen Leistungsfähigkeit der robotergestützten Spotsynthese, bei der parallelen Durchführung von Versuchen, die vorher nur eingeschränkt durchgeführt werden konnten, sind darüber hinaus in mehreren Bereichen die vorliegenden Erkenntnisse umfangreich erweitert worden.

Sowohl in Bezug auf die detektierten immunodominanten Epitope auf den Pertussis Toxin Untereinheiten als auch für die Zielsequenzerkennung innerhalb der Substrate von Pertussis Toxin konnten anwendungsorientierte Ansätze für Diagnose und Therapie aufgezeigt werden, denen nunmehr in aufbauenden Folgearbeiten nachgegangen werden kann.

4.1 Spotsynthese von Peptiden mit dem Abimed System

Die halbautomatisierte, robotergestützte Spotsynthese von Peptiden auf Cellulosefiltern wurde vor einigen Jahren (Frank 1992, Frank und Overwin 1996) publiziert und verfügbar

gemacht. Erste Anwendungen dieser Methode mit einer Eigensynthese der Peptidfilter außerhalb des entwickelnden Labors von Ronald Frank (GBF, Braunschweig) fanden im Rahmen der hier dargestellten Arbeiten statt. Dabei erwies sich die Derivatisierung der Cellulosefilter mit β -Alaninankern und die nachfolgende, Fmoc-basierte Synthese der wachsenden Peptidketten bei genauer Einhaltung der von Frank optimierten Protokolle (pers. Mittlg.) als unproblematisch.

Die kommerzielle Entwicklung des robotergestützten Pipettiersystems AMS 422 (Abimed, Langenfeld) war zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Arbeiten noch in der Prototypphase befindlich. Spotsynthesen innerhalb einer realistischen Versuchsumgebung konnten beim Hersteller Abimed (Langenfeld) selbst nicht durchgeführt werden. Stattdessen wurde mit Ersatzfarblösungen (z.B. DMF mit Bromphenolblau) gearbeitet, bei deren Einsatz zwar der mechanische Ablauf der Pipettiervorgänge simuliert werden konnte, material- und kleinstvolumenabhängige Faktoren jedoch unberücksichtigt blieben. Aus diesem Grund mußten zu Beginn dieser Arbeit an dem zur Verfügung stehenden Pipettierrobotersystem eine Reihe von Optimierungen im praktischen Betrieb vorgenommen werden.

Einige der notwendigen Änderungen ließen sich auf die besonderen physikalischen Eigenschaften der für die Synthese verwendeten Aminosäurederivate zurückführen. Ihre vergleichsweise hohe Viskosität verlangt spezielle Rahmenbedingungen:

- Es muß eine sehr niedrige Ansauggeschwindigkeit eingehalten werden, um nicht das Risiko eines Vakuumaufbaus oberhalb der angesaugten Flüssigkeit einzugehen. Wird dies nicht berücksichtigt, so führt das beim Ansaugvorgang aufgebaute Vakuum regelmäßig zu einem Luftestrom in die Kanüle nach dem Austauschen aus der Derivatlösung und daraus resultierenden Pipettierfehlern.
- Bei den für die geforderten Spotdichten von 425 Spots auf einer Fläche von 9 x 13 cm zu pipettierenden, geringen Flüssigkeitsmengen übt das Material und der Innendurchmesser der zum Pipettieren verwendeten Kanüle wesentliche Einflüsse auf die Pipettiergenauigkeit aus. Ebenso ist unter diesen Bedingungen die Materialbeschaffenheit der Kontaktflächen, auf und mit der pipettiert wird, ein wichtiger Faktor.
- Um die von Seiten des Cellulosepapiers auf die Derivatlösung ausgeübte Saugkraft zu neutralisieren und zuverlässig zu verhindern, daß mehr als die pro Spot zu verteilenden 0,2 μ l Flüssigkeit auf den Filter gelangen, mußte der Durchmesser der pipettierenden Kanüle verringert werden. Die Teflonschlauchspitze mit ihrer nichtbenetzenden Oberfläche, die ursprünglich am Kanülenende vorgesehen war, wurde durch eine fein ausgezogene Stahlspitze ersetzt, um dadurch auch die Kapillarkraft an der Kanülenspitze zu steigern.
- Ein kritisches Problem für die Anwendung im Routinebetrieb stellte weiterhin die Schrumpfung des eingesetzten Cellulosepapiers dar. Die vom Hersteller für die

Spotsynthese vorgesehenen und bereits vorgestanzten Filter erwiesen sich nach der Derivatisierung in vielen Fällen nicht zuverlässig positionierbar. Es zeigte sich jedoch in Vorversuchen, daß die Schrumpfung des Filters nach den ersten Derivatisierungsschritten fast zum Stillstand kam. Filter, die erst nach der Derivatisierung gestanzt oder mit Positionierungslochern versehen wurden, konnten auch über lange Syntheserien hinweg genau positioniert werden.

Die beschriebenen Optimierungen sind alle in die Weiterentwicklung des Geräts und des Versuchsprotokolls beim Hersteller Abimed eingeflossen. Auch die für die Beladung verwendeten Cellulosefilter werden mittlerweile ausschließlich in bereits derivatisiertem und somit mechanisch stabilisiertem Zustand gestanzt und ausgeliefert. Mit diesen Modifikationen ist die zuverlässige Positionierung und Mengenkontrolle der zu pipettierenden Derivate gegeben, so daß die halbautomatische Spotsynthese von Peptiden ohne Schwierigkeiten als routinemäßige Labormethode zu nutzen ist.

4.2 Quantifizierung immunologischer Farbreaktionen mit Hilfe von Flachbettscannern

Im Rahmen dieser Arbeit bestand eine der Aufgaben darin, eine einfache, flexibel und routinemäßig zu nutzende Quantifizierungsmöglichkeit für Farbreaktionen auf Membranoberflächen zu entwickeln. Dies war eine notwendige Voraussetzung für die im Rahmen der Versuche zu Reaktionen humaner Antiseren mit Pepsicans von Pertussis Toxin zu fordernde vergleichende Auswertung der Versuchsergebnisse aus den Experimenten mit C-terminal verankerten Peptiden.

Die breit eingeführte, ELISA-basierte Auswertung von Farbreaktionen in Lösung ist in den letzten Jahren aufgrund ihres intensiven Einsatzes in der Umweltdiagnostik und Laboratoriumsmedizin immer weiter verbessert, automatisiert und rationalisiert worden.

Die Auswertung von Farbreaktionen auf festen Oberflächen oder in Gelen ist dagegen noch immer keine Routinemethode, und die für diese Zwecke verwendeten Laserdensitometer sind zwar sehr leistungsfähig, aufgrund der hohen Kosten jedoch nicht allgemein verfügbar.

Die in dieser Arbeit gezeigte Anwendbarkeit von frei verfügbarer Grafik-Software in Kombination mit meist preiswerten Desktop-Scannern macht die quantifizierbare und vergleichende Signal-detektion auf Filtern oder Membranen für einen breiten Anwenderkreis zugänglich.

Die Methode weist gegenüber den durchgeführten Vergleichen der Laserdensitometrie einen kaum verringerten Linearitätsbereich auf (vgl. Abb 3.6), und auch der Anwendungsbereich ist im Prinzip identisch.

Verglichen mit einer Phospho- bzw. Bio-Imager basierten Signalauswertung ist der Linearitätsverlust hingegen deutlich größer, wobei diese Methodik andererseits nur eingeschränkt, nämlich ausschließlich für die Quantifizierung radioaktiver Signale, anzuwenden ist.

Ein weiteres Problem für die Desktop-Scanner basierte und gleichermaßen die Laserdensitometrische Auswertung stellen farbintensive Signale dar.

Auf der Oberfläche der Membran kann, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen ggf. noch deutlich vor Erreichen der theoretisch maximalen Umsetzung, eine Farbsättigung eintreten. Dieses Problem ist auch von der Quantifizierung der Farbreaktionen in flüssigen Phasen (ELISA-Tests) bekannt, und ihm wird hier durch geeignete Verdünnung der Reaktionslösung begegnet. Diese Möglichkeit besteht auf dem Filter nicht, so daß die Reaktion rechtzeitig zu beenden ist, bevor ein Eintritt in die Phase der Farbsättigung erreicht wird.

Abgesehen von den genannten Einschränkungen, die jedoch bei geeigneter Wahl der experimentellen Rahmenbedingungen und entsprechenden Vorversuchen kein praktisches Problem darstellen, ist die (semi-)quantitative Erfassung von Farbreaktionen auf festen Oberflächen mit Hilfe von Desktop-Scannern zusammenfassend als sehr flexibel und zuverlässig anzusehen (von Olleschik *et al.* 1996 und 1998).

4.3 Präsentation fixierter Peptide für immunologische Tests zum Nachweis einer Pertussis Infektion

Für Untersuchungen zur Serologie und Diagnose von Pertussis wurden in der Labormedizin drei verschiedene Methoden etabliert, nämlich die direkte Immunfluoreszenz, der Immunoblot und der ELISA (Rapp und Enders 1994). Sie geben Auskunft über akute Infektionen sowie über den allgemeinen Immunstatus gegenüber dem Pathogen.

Die seit einigen Jahren innerhalb der Pertussis-Diagnostik ebenfalls eingesetzten PCR-Methoden, dienen hingegen lediglich dem direkten Erregernachweis (Qiushui *et al.* 1993, Olcen *et al.* 1992). Sie sind hilfreich innerhalb der Frühdiagnose einer Infektion, zu einem Zeitpunkt also, in dem in der Regel noch kein nachweisbarer Antikörpertiter aufgebaut ist, erlauben jedoch keine Aussage über eine bestehende Immunität gegenüber dem Pathogen.

Klassische ELISA-Tests zur Bestimmung des Immunstatus eines Patienten gegenüber einem Pathogen weisen in der Regel Antikörpertiter gegenüber dem gesamten, immobilisierten Bakterium oder einem nach Ultraschallbehandlung gewonnenen Rohextrakt nach (für *B.pertussis* z.B. nach der Methode von Frank und Parker [1984]).

Bei dem hier verwendeten, kommerziellen ELISA-Test der Firma Viramed (Planegg-Martinsried) zur Bestimmung der Antikörpertiter gegenüber *B.pertussis* in humanen Antiseren handelt es sich um speziell präparierte und dann in den Kavitäten der Testplatten fixierte Bordetellen-Zellen (Viramed, Mittlg. des Herstellers). Die diagnostische Beurteilung der Antikörpertiter gegen diese fixierten, komplexen Antigene erfolgt anhand direkter Vergleiche mit den Reaktionen positiver und negativer Testseren, die speziell für dieses System ausgewählt wurden.

Dieses Vorgehen beinhaltet generell das Risiko falschpositiver Ergebnisse, die z.B. auf Kreuzreaktionen mit Antigenen von verwandten Erregern beruhen. ELISA-Tests, bei denen

B.pertussis Rohextrakte als Antigen eingesetzt werden, kreuzreagieren beispielsweise oft mit Antikörpern gegen *B.parapertussis* (Rapp und Enders 1994).

Für eine Verbesserung der immunologischen Tests ist daher anzustreben, den Immunstatus noch gezielter zu überprüfen. Für *B.pertussis* bietet sich an, die Beurteilung des Immunstatus anhand der Reaktion von Patientenserum gegenüber Pertussis Toxin durchzuführen. Idealerweise sollte der Immunstatus direkt durch Messung von Antikörpertitern gegenüber protektiven Epitopen diagnostiziert werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Identifikation linearer Epitope auf Pertussis Toxin haben eine Reihe von dafür geeigneten Epitopen auf den Pertussis Toxin Untereinheiten detektiert. Bereits in einer vorangehenden Arbeit war von Raupach (1993) der Versuch unternommen worden, immundominante Peptide der S1-Untereinheit in geeigneter Weise in ELISA zu präsentieren. Sie konnte zeigen, daß die direkte Beladung der Kavitätsoberfläche mit Peptid nicht zu einer Präsentation des Peptids führt, diese also nicht durch spezifische anti-Peptid-Antiseren erkannt werden. Die Ursache für diesen Befund liegt vermutlich in der Adsorption der Peptide an die Kunststoffoberfläche, wodurch die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen verhindert wird (vgl. Abb 3.7).

In einem weiteren Ansatz wurden die S1-spezifischen Peptide an Biotin gekuppelt. Mit diesen modifizierten Peptiden wurden dann mit Avidin beschichtete ELISA-Platten beladen. Mit dieser Präsentation konnte sichergestellt werden, daß die Peptide frei präsentiert werden und dreidimensionale Strukturen ausbilden können. Versuche mit Kaninchenserum ermöglichten in diesem Fall eine eindeutige Identifizierung der durch die Peptide repräsentierten Epitope. Die Inkubation mit Humanserum führte jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen, da starke Kreuzreaktionen zwischen Humanserum und der Avidin-Beschichtung der Oberflächen auftraten (Raupach 1993).

In der hier vorgestellten Arbeit wurde versucht, die Präsentation der Peptide durch direkte Kupplung an derivatisierte Kunststoffoberflächen von CovaLink ELISA-Platten (wie von Söndergaard-Andersen *et al.* [1990] beschrieben), zu realisieren. Auch in diesem Fall gelang die Identifizierung der durch die Peptide repräsentierten Epitope durch Kaninchenserum (vgl. Abb. 3.8). Die Reaktion der Epitope mit humanen, Pertussis Toxin reaktiven Antiseren hob sich auch bei dieser Form der Präsentation nur geringfügig vom bereits durch die derivatisierten Platten allein hervorgerufenen Hintergrund ab, so daß sich keine Perspektive für eine Anwendung in der Praxis aufzeigen ließ.

Wie jedoch die in dieser Arbeit dargestellten Versuche zur Erkennung linearer Epitope auf Pepscans deutlich gezeigt haben, findet eine spezifische und reproduzierbare Erkennung von linearen Peptiden sehr wohl statt, wenn es gelingt, die Peptide frei zugänglich zu präsentieren. Auch eine C-terminale Fixierung der Peptide, wie auf den Cellulosefiltern gezeigt, behindert diese Reaktion nicht. Die bisherigen Versuche, die Peptidpräsentation in einer für einen ELISA geeigneten Versuchsanordnung, durchzuführen, scheiterten somit nicht an der fehlenden Erkennung der Epitope durch die Humanserum. Sie scheiterten vielmehr

daran, daß die für die frei zugängliche Fixierung erforderliche Derivatisierung der Kunststoffoberfläche oder die verwendeten Abstandsmoleküle (Spacer) zu Kreuzreaktionen führten.

Wichtig für die Routineanwendung der Pertussis-Diagnose im diagnostischen Labor ist die Möglichkeit zur Analyse großer Probenzahlen, also der weitgehenden Automatisierung von Inkubation und Detektion.

Für diesen Zweck ist daher anzustreben, bei der Pertussis-Diagnostik mit ELISA-Platten arbeiten zu können und die abschließende Auswertung im ELISA-Platten-Lesegerät (ELISA-Reader) durchführen zu können.

Da die Präsentation und Detektion der Peptide auf Cellulosefiltern, verglichen mit den bisherigen Versuchen zur direkten Präsentation auf ELISA-Platten, nur geringe Probleme bereitet, könnte eine der möglichen Lösungen darin bestehen, ELISA-Platten mit kreisförmig gestanzten und bereits mit Peptid beladenen Filtern zu beladen, dann die Serum-Inkubation und sämtliche Waschschrte durchzuführen und den Cellulosefilter unmittelbar vor dem Auswerten der Farbreaktion aus der Kavität zu entnehmen. Geeignete Filterhalterungen aus Kunststoff, die Einsetzen und Entnahme der Cellulosefilter für eine ganze ELISA-Platte in einem Schritt ermöglichen, wodurch gleichzeitig auch der genau definierte Stop der Farbreaktion gewährleistet wäre, sollten dann ohne Probleme herzustellen sein.

Alternativ könnte auch versucht werden, die ELISA-Platten mit Filter-Zylindern zu bestücken, die nach unten geöffnet sind, so daß vor der Auswertung keine Entnahme mehr erfolgen muß. Die für diese Zwecke prinzipiell geeigneten Peptide innerhalb der Pertussis Toxin Untereinheiten sind im Rahmen dieser Arbeit bestimmt worden, so daß konkrete Versuche in diese Richtung unternommen werden können.

4.4 Pepscans von Pertussis Toxin als Hilfsmittel zur Identifizierung immunrelevanter linearer und konformeller Epitope in humanen Antiseren

Eine Immunisierung gegen *B.pertussis* erfolgt derzeit entweder mit detoxifizierter Ganzzellvakzine oder mit einer der neu entwickelten Komponentenvakzinen (von König 1995). Das Pertussis Toxin als einer der Hauptvirulenzfaktoren ist in jedem Fall ein Bestandteil der Vakzinierung (vgl. Tab 1.1).

Es ist bekannt, daß die Immunität gegenüber Pertussis in der Regel nur von begrenzter Dauer ist und eine Reinfektion im Abstand von einigen Jahren erfolgen kann. Bei Erwachsenen ist davon auszugehen, daß im Mittel jeder vierte beobachtete, langandauernde Husten auf eine Reinfektion mit *B.pertussis* zurückzuführen ist (Robertson *et al.* 1987, Trollfors und Rabo 1981). Im Gegensatz zur besonders kritischen Erstinfektion im Kleinkindalter sind diese Zweit- und Folgeinfektionen im klinischen Bild in den meisten Fällen nicht zu erkennen, was u.a. die Weiterverbreitung der Erreger begünstigt und zu einem bislang nicht einzudämmenden Pool innerhalb der Bevölkerung führt (Cherry *et al.* 1989).

Ganz ähnlich verliert zum Beispiel auch die Immunisierung gegen Tetanus im zeitlichen Verlauf ihre Schutzwirkung (Schröder und Kuhlmann 1991). Da die Infektion mit diesem Erreger bei Nichtbehandlung lebensgefährlich ist, wurde der Verlauf des Absinkens der protektiven Immunität anhand von Zeitreihen genau untersucht und es stehen sogenannte „Goldstandards“ zur Verfügung. Dabei handelt es sich um Seren, deren Protektivität gegenüber dem Erreger eindeutig nachgewiesen ist und die zu Vergleichszwecken, insbesondere zur Entwicklung von Testsystemen, herangezogen werden können.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen zur humanen Immunität gegenüber Tetanus existieren bisher keine entsprechenden, frei zugänglichen Serenkollektionen und Zeitreihen für eine Untersuchung der Pertussis-Immunität. Die in der Labormedizin eingeführten und von den Laboren zum Teil selbst entwickelten Tests auf bestehende, protektive Immunität gegen Pertussis führen in etwa 20% der Fälle zu falschpositiven Aussagen (Rapp und Enders 1988). In diesen Fällen liegt häufig eine Immunität gegenüber *B.parapertussis*, jedoch keine vollständige Protektivität gegenüber *B.pertussis* vor. *B.parapertussis* ist eng mit *B.pertussis* verwandt und kann zwar ebenfalls Erkältung mit Husten, jedoch nicht den eigentlichen Keuchhusten hervorrufen. Weiterhin exprimiert es ebenso wie alle weiteren Vertreter der Gattung *Bordetella* im Gegensatz zu *B.pertussis* kein Pertussis Toxin.

Für spezifische Tests ist es daher wichtig, gezielt den Immunstatus gegenüber Pertussis Toxin zu bestimmen, um Aussagen über eine protektive Immunität treffen zu können. Besonders empfindlich und aussagekräftig sind immunologische Tests, wenn sie gezielt die Immunität gegenüber Kombinationen einzelner, als protektiv oder typisch für eine bestehende protektive Immunantwort bewerteter Epitope bestimmen.

Wenn dies für das Pertussis Toxin gelingt, besteht die Möglichkeit, einfache und kostengünstige Testsysteme zu entwickeln, die die Immunität verfolgen lassen und zeitliche Veränderungen in Zusammenhang mit einzelnen Epitopen detektieren.

Diese Epitope könnten darüber hinaus auch gezielt als Bausteine in neu zu entwickelnden Auffrischungsvakzinen präsentiert werden, um den Immuntiter wieder auf ein protektives Niveau zu erhöhen. Derartige Vakzinen bieten die Perspektive, mit einer einzigen Immunisierung hochspezifisch gleich gegen mehrere, protektive Epitope verschiedener Erreger zu immunisieren, da sie gezielt die Immunität gegenüber frei kombinierbaren immunodominanten Epitopen erhöhen. Sie ermöglichen weiterhin in Kombination mit besonders stimulierenden T-Zellepitopen die Induktion hoher und idealerweise persistierender Antikörpertiter gegen die eigentlichen Hauptepitope von immunologischer Relevanz.

Es ist wahrscheinlich, daß ein Teil der Epitope, gegen die im Rahmen der natürlich aufgebauten Immunität in Folge einer Infektion oder nach Vakzinierung mit Ganzzell- oder Komponentenvakzinen eine Immunantwort induziert wird, für die Protektivität gegenüber dem Pathogen eher von untergeordneter Bedeutung sind. Das Immunsystem selbst kann nur die

„Fremdheit“ eines Epitops, jedoch nicht seine „Protektivität“ erkennen, so daß vermutlich weit mehr Epitope erkannt werden, als für eine protektive Antwort notwendig wären.

Mit gezielten Impfungen gegen protektive Epitope könnte daher eine Konzentration der Abwehrkräfte auf die kritischen Angriffspunkte des Pathogens erreicht und das Immunsystem gleichzeitig entlastet werden.

Ein weiterer Grund für Vorstöße und Vorarbeiten zur Entwicklung epitopspezifischer Vakzinen ist die perspektivische Verminderung des Risikos allergischer Reaktionen bei Auffrischungsimpfungen.

Dieses Problem ist wiederum bereits von den regelmäßig erforderlichen Nachimpfungen gegen Tetanus bekannt. Dabei kommt es gelegentlich zu einer direkten allergischen Reaktion gegen das Tetanus-Toxoid. Daher wird mittlerweile empfohlen, den Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung nicht nach einem festgelegten Zeitraum, sondern erst nach individueller Sero-Diagnose des Immunstatus durchzuführen (Schröder *et al.* 1992). Idealerweise sind Epitope, die eine allergische Reaktion auslösen können, in den oben genannten, neu zu entwickelnden, epitopspezifischen Impfstoffen nicht vorhanden, so daß die Immunität nur gegenüber nichtallergenen, jedoch ausgewiesenermaßen protektiven Epitopen aufgefrischt würde.

Um die gegenüber einem Pathogen - bei Erkennung - protektiven Epitope zu definieren, müssen zunächst einmal alle Epitope bekannt sein, die überhaupt eine Rolle in der spezifischen Immunantwort spielen und für deren Nachweis ein reproduzierbarer, experimenteller Ansatz vorliegt.

Innerhalb der hier vorgestellten Arbeiten konnten auf allen Untereinheiten von Pertussis Toxin immunodominante Epitope identifiziert werden. Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenstellung aller gefundenen Epitope. Besonders breit ausgeprägt ist die Erkennung von S1, S2 und S3. Sechs bzw. jeweils fünf immunodominante Epitope werden auf diesen Untereinheiten nach den angelegten Kriterien in der Regel von einem Postimmunserum oder dem Serum eines rekonvaleszenten Patienten erkannt.

Die immunologische Erkennung der Untereinheiten S4 und S5 ist hingegen insgesamt geringer, und es konnte jeweils nur ein Epitop als immundominant identifiziert werden.

Epitop	Peptide	Position	erkannte Sequenz	Länge
S1/1	P4	7-18	VYRYD SRPPE DV	12
S1/2	P10-13	19-36	FQNGF TAWGN NDNVL DHL	18
S1/3	P22-26	43-62	VGSSN SAFVS TSSSR RYTEV	20
S1/4	P36-38	71-86	AVEAE RAGRG TGHFI G	16
S1/5	P47-54	93-118	ADNNF YGAAS SYFEY VDTYG DNAGR I	26
S1/6	P73	145-156	TRVYH NGITG ET	12
S1/h	P 88-90	175-190	PNPYT SRRSV ASIVG T	16
S2/1	P29	57-68	LYDGT YLGGE YG	12
S2/2	P47-50	93-110	NTGQP ATDHY YSNVT ATR	18
S2/3	P68	135-146	TSPYD GKYWS MY	12
S2/4	P83	165-176	VHVS K EEQYY DY	12
S2/5	P87	173-184	YYDYE DATFE TY	12
S3/1	P28-29	55-68	YGLYD GTYLG QAYG	14
S3/2	P47-48	93-106	KTGQP AADHY YSKV	14
S3/3	P68-70	135-150	ASPYE GRYRD MYDAL R	16
S3/4	P83	165-176	VHVS K EEQYY DY	12
S3/5	P87	173-184	YYDYE DATFQ TY	12
S4/1	P41	81-92	FLGPK QLTFE GK	12
S5/1	P24-25	47-60	HEHDT WFDTM LGFA	14

Tab. 4.1: Durch Postimmunsereen erkannte Epitope innerhalb der Pepscans mit 12mer Peptiden auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin.

Stark grau unterlegt sind Epitope, die nach der Projektion auf das Modell der Kristallstruktur vermuten lassen, daß es sich aufgrund transmolekularer oder verdeckter Bereiche um zwei Einzelepitope handelt, die im Pepscan nicht aufgelöst wurden. Das Epitop S1/h1 wird in der geforderten Intensität nur von rekonvaleszenten Humanseren erkannt, deren Immunität auf einer natürlichen (möglicherweise akuten) Infektion mit *B.pertussis* beruht.

Mit diesen Daten liegen Informationen zu sämtlichen, auf Pertussis Toxin vorhandenen immunodominanten, linearen Epitope vor.

Es ist wahrscheinlich, daß außer den hier detektierten linearen Epitopen weitere existieren, deren Erkennung jedoch ausschließlich konformell erfolgt. Ebenso gilt für eine Reihe der in Tabelle 4.1 aufgeführten, linear erkannten Epitope, daß sie selbst Teile von konformellen Epitopen sein können, die gleichzeitig linear erkannt werden. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der Projektion der Epitope auf die Kristallstruktur der Untereinheiten (vgl. 3.3.2.3). Hier wird in der dreidimensionalen Anordnung der Epitope deutlich, daß einige lineare Epitope unmittelbar aneinander angrenzen und daher die Erkennung im Pepscan auch eine bereits für die Bindung ausreichende Teilerkennung eines eigentlich konformellen Epitops anzeigt.

Die auf den Pepscons detektierten, linearen Epitope sind teilweise sehr ausgedehnt. Im Vergleich mit Ergebnissen der parallel durchgeführten Arbeit von Grün (1997) zur Bestimmung der Länge linearer, durch monoklonale Antikörper erkannter Epitope sind sie im Prinzip bereits zu groß, um durch eine einzelne Antikörpersubpopulation erkannt zu werden. Grün (1997) konnte für eine Reihe monoklonaler Antikörper gegen lineare Epitope auf Transferrin-bindendem Protein von *N.meningitidis* zeigen, daß die genauen Längen der von ihr untersuchten Epitope zwischen 3 und 8 Aminosäuren betragen.

Bei der hier vorliegenden Auswertung ist allerdings zu beachten, daß die Betrachtung nicht von Einzelseren ausgeht, sondern die gemeinsame Epitoperkennung einer großen Gruppe von Seren mit unterschiedlicher immunologischer Vorgeschichte beschreibt. Identifiziert werden also neben Einzelepitopen potentiell auch „immunodominante Regionen“ innerhalb des Toxins, die von verschiedenen Antikörperklonen kumulativ erkannt werden.

Bei den 12mer Epitopen, die im Pepscan von Einzelseren (vgl. Abb. 3.13) jeweils bei den unmittelbar benachbarten Peptiden keine spezifische Bindung von Antikörpern aufweisen, besteht die Möglichkeit, daß vom Antiserum genau das 12mer oder ein 11mer als Epitop erkannt wird und jegliche Verkürzung zum Verlust der Erkennung führt. Ein lineares Epitop, das in den durchgeführten 12mer Pepscons mit jeweils 10 Aminosäuren Überlappung zwischen den Spots nur in einem Spot erkannt wird, ist entweder genau ein 12mer oder ein 11mer, da andernfalls auch eine Erkennung in den benachbarten Spots - mit jeweils 2 Aminosäuren Sequenzversatz - zu beobachten sein müßte.

Für die linearen Epitope auf Pertussis Toxin, deren Gesamtlänge mit deutlich mehr als 12 Aminosäuren bestimmt wurde, könnte theoretisch die Reduzierung auf den kleinsten, gemeinsam überspannten Bereich das eigentliche Epitop darstellen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die experimentellen Ergebnisse im Pepscan die Immunantwort mehrerer Antikörpersubpopulationen gegen einen ausgedehnten immunodominanten Bereich oder zwei in der Tertiärstruktur räumlich getrennte, in der Primärstruktur jedoch unmittelbar aufeinanderfolgende Sequenzbereiche kennzeichnen, die dann wiederum kurze Einzelepitope enthalten.

Letzteres konnte beispielsweise für die ausgedehnten Epitope S1/3 und S1/5 in der Projektion auf die Kristallstruktur der Untereinheiten gezeigt werden (vgl. Abb 3.25). Diese Epitope enthalten kurze, transmolekulare Bereiche, die oberflächlich nicht zugänglich sind. Die beiden in der Sequenz zusammenhängenden Epitope sind darüber hinaus an verschiedenen Seiten des Moleküls lokalisiert.

Im Pepscan konnten diese Epitope aufgrund ihrer Überlappung im 12mer Peptidraster nicht aufgetrennt werden. Es zeigte sich jedoch in beiden Fällen eine zunächst unerklärliche, verminderte Erkennung im zentralen Bereich des linearen Epitops (vgl. Abb. 3.14).

Erst in der Projektion auf die Kristallstruktur wurde deutlich, daß der im Pepscan vermindert erkannte Bereich auch hier einer transmolekularen Region entspricht, was die schwächere Erkennung unmittelbar erklärt.

Ebenso wurden Epitope detektiert, die im Pepscan deutlich voneinander getrennt sind, jedoch in der Sequenz einander überlappen. Beispiele hierfür sind die Epitope S2/4 und S2/5 und ebenso S3/4 und S3/5 (vgl. Abb. 3.15 und 3.16). Die Epitope stoßen in der Sequenz unmittelbar aneinander und dennoch ist die Erkennung im überlappenden Bereich so stark vermindert, daß die entsprechenden Peptide nach den angelegten Kriterien nicht mehr deutlich vom Hintergrund differenzierbar sind. Auch hier zeigte die Projektion, daß der zentrale, überlappende Bereich der Epitope einen transmolekularen Abschnitt im Molekül darstellt (vgl. Abb. 3.27).

Das beobachtete Phänomen der verminderten Erkennung zentraler Bereiche innerhalb aufeinander folgender Sequenzen und der Korrelation zur tatsächlichen Oberflächenpräsentation macht deutlich, daß die beobachteten Immunreaktionen tatsächlich eine Reaktion gegenüber den intakten und nicht etwa den denaturierten Untereinheiten darstellen, da andernfalls das „Tal der verminderten Erkennung“ nicht aufträte.

Vergleichbare Arbeiten zur systematischen Identifizierung linearer Epitope sind bisher nur von Raupach (1993) durchgeführt worden. Sie hat im Rahmen eines Pepscans mit überlappenden Peptiden nach immunodominanten Epitopen auf der S1-Untereinheit von Pertussis Toxin gesucht. Die Präsentation der Peptide erfolgte dabei jedoch nicht C-terminal fixiert an Cellulosefiltern, sondern die Peptide waren über Abstandsmoleküle (Spacer) an Polyethylenstäbchen (Pins) gekuppelt. Bindung und Nachweis der Antikörper erfolgten durch Anordnung der Pins im 96-Lochraster von ELISA-Platten und Eintauchen der peptidbeladenen Pins in mit Serumverdünnungen bzw. Zweitantikörpern und Farbreagenzien gefüllten Kavitäten von 96-Loch ELISA-Platten.

Durch dieses Vorgehen war die Induktion der Farbreaktion in einer Flüssigphase möglich, und die abschließende Auswertung der Reaktionen konnte im ELISA-Lesegerät erfolgen. Ein kritisches Problem war, daß in Kombination mit den Kunststoff-Pins die Verwendung von an alkalische Phosphatase gekuppeltem Ziege-anti-Spezies-Antikörper einen hohen Hintergrund hervorrief, der eine Auswertung unmöglich machte. Daher wurde von Raupach auf an alkalische Phosphatase gekuppeltes Protein A ausgewichen, um den Nachweis der gebundenen Antikörper durchzuführen. Auch hierbei kam es zu einer starken Interaktion des Protein A mit Teilen der mit S1-Peptiden beladenen Kunststoffstäbchen, so daß die Auswertung nur in einem eingeschränkten Bereich möglich war.

Die von Raupach (1993) identifizierten, immunodominanten Epitope auf der S1 Untereinheit liegen in den Sequenzbereichen 3-16, 17-30 und 211-222. Das C-terminale Epitop (211-222) wurde nach ihren Beobachtungen nur bei einem Teil der Seren, nämlich solchen von als „frisch infiziert“ eingestuft Patienten, erkannt.

Die beiden von ihr detektierten N-terminalen Epitopen auf S1 überschneiden sich mit den in dieser Arbeit detektierten Epitopen S1/1 (AS 7-18) und S1/2 (AS 19-36) und konnten als immunodominant bestätigt werden.

Die Reaktion mit Peptiden im Sequenzbereich 211-222 konnte hingegen im Pepscan auf Cellulosefiltern nicht reproduziert werden. Stattdessen wurde benachbart dazu mit S1/h ein

Epitop detektiert, das ebenfalls ausschließlich in Humanseren frisch infizierter Patienten zu finden ist. Der Bereich dieses Epitops liegt innerhalb des von Raupach aufgrund der Wechselwirkungen mit dem Protein A nicht auszuwertenden Bereichs, so daß seine Detektion in ihrer Arbeit (vermutlich) aufgrund der technischen Limitierungen nicht möglich war. Abb. 3.34 zeigt die Reaktion des Serums S6705, das auch in der Arbeit von Raupach eingesetzt wurde und mit dem sie das C-terminale Epitop (AS 211-222) detektierte. Dabei fällt auf, daß die Gesamtreaktion dieses Serums gegenüber der S1-Untereinheit verglichen mit den durchschnittlich beobachteten Intensitäten sehr hoch ist, dieses Serum also insgesamt sehr intensiv mit Pertussis Toxin reagiert.

Bis vor einigen Jahren standen noch keine Techniken zur Verfügung, die die hier dargestellten Untersuchungen ermöglicht hätten. Darüber hinaus war die Kristallstruktur von Pertussis Toxin unbekannt. Aus diesem Grund wurde in zurückliegenden Arbeiten üblicherweise versucht, einzelne immunologisch zugängliche Epitope zunächst rechnerisch zu postulieren und dann im experimentellen Nachweis zu überprüfen.

Dazu wurden in der Regel Computerberechnungen zur Sekundärstrukturvorhersage angestellt, und z.B. nach der Wahrscheinlichkeit für β -Schleifen, für α -Helices, für Hydrophobizität, Oberflächenwahrscheinlichkeit oder Antigenizität innerhalb der Sequenzen gesucht. Sequenzbereiche, für die rechnerisch mehrere Faktoren zutreffen, die auf eine mögliche immunologische Relevanz schließen ließen, wurden dann näher untersucht.

Nach der Auswahl der potentiell immunologisch relevanten linearen Epitope werden üblicherweise zunächst synthetische Peptide, die diesen Epitopen entsprechen, hergestellt. In Immunisierungsversuchen werden diese Peptide an größere Trägermoleküle gekuppelt und dann z.B. in Kaninchen oder Mäuse appliziert. Die gewonnenen Antiseren werden auf Erkennung von Pertussis Toxin geprüft. Eine darüber hinausgehende Prüfung auf Protektivität kann erfolgen, indem Pertussis Toxin mit den Postimmunseren präinkubiert und anschließend im CHO-Test (Halperin *et. al.* 1990) überprüft wird, ob die Antikörperreaktion den Eintritt in die Zielzellen verhindert.

Nachdem bekannt war, daß die Bindung von Pertussis Toxin an seine Zielzellen durch die S2 und S3 Untereinheiten vermittelt wird, ist beispielsweise von Marzillier (1992) gezielt nach Peptiden und Peptidkombinationen gesucht worden. Sie suchte nach Peptidsequenzen für die einerseits basierend auf Computerberechnungen immunologische Relevanz postuliert werden konnte und die gleichzeitig kompetitiv eine Bindung von Pertussis Toxin an die CHO-Zellen inhibieren. Es gelang ihr für die S3 Untereinheit einen Einfluß der Sequenzbereiche AS 91-106 sowie AS 120-130 zeigen. Der erste dieser beiden Bereiche wird auch tatsächlich von den in dieser Arbeit untersuchten Postimmunseren spezifisch erkannt und ist hier als Epitop S3/2 bezeichnet (AS 93-106).

4.4.1 Immunologische Bedeutung der durch Antiseren erkannten Epitope auf Pertussis Toxin

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auf jeder Untereinheit von Pertussis Toxin eine spezifische Erkennung linearer Epitope durch Postimmunseren stattfindet. Um diese Information für die diagnostische Bestimmung protektiver Titer gegenüber einer Pertussis Infektion und ebenso für die gezielte Induktion einer protektiven Immunantwort nutzen zu können, war zu klären, ob die identifizierten Epitope eindeutig auf eine Immunreaktion gegen Pertussis Toxin schließen lassen.

Weiterhin sollte abgeschätzt werden, ob und welche Epitope auch für eine unmittelbar detoxifizierende Immunantwort relevant sind. Die BLASTP-Recherche nach identischen oder homologen Sequenzen innerhalb aller bekannter Proteine und Proteinfragmente zeigte nur für das Epitop S1/1 Sequenzverwandtschaften zu Toxinen und Antigenen anderer Pathogene an, die möglicherweise zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegenüber diesen Pathogenen führen können (vgl. Anhang). Alle weiteren Epitope zeigten lediglich Homologien zu den stummen Genen der mit *B.pertussis* verwandten Arten aus der Gattung *Bordetella*.

Somit weisen Immunantworten gegen alle hier detektierten Epitope (vgl. Tab. 4.1) mit Ausnahme von S1/1 eindeutig auf einen zurückliegenden Kontakt des Organismus mit Pertussis Toxin hin, falls nicht zukünftig Sequenzen weiterer Proteine gefunden werden, die Kreuzreaktivität vermuten lassen.

Aus diesem Ergebnis läßt sich darüber hinaus schließen, daß generell bei peptidreaktiven Seren auch nicht-immunisierter Patienten davon auszugehen ist, daß tatsächlich ein Kontakt mit *B.pertussis* stattgefunden hat, auch wenn bei ihnen zu keinem Zeitpunkt das Krankheitsbild des Keuchhustens diagnostiziert wurde und die Serumdiagnose gegen *B.pertussis* Extrakte kein positives Ergebnis zeigte.

Eine Diagnose, die auf der Identifizierung der Immunreaktion gegenüber Einzelepitopen beruht, ist daher nicht nur hochspezifisch sondern zugleich auch hochempfindlich.

Für die weitergehende Frage nach einer Bedeutung der erkannten Epitope für die unmittelbare Detoxifizierung von Pertussis Toxin wurden die von den Untereinheiten S2-S5 gebildete ATP-Bindungsstelle in der zentralen Pore, das reaktive Zentrum der ADP-Ribosylierung auf S1 und die beiden Rezeptor bindenden Domänen auf den S2 und S3 Untereinheiten betrachtet.

Die innerhalb der zentralen Pore von allen Untereinheiten des B-Oligomers gemeinsam gebildete ATP-Bindungsstelle (Hazes 1996) wird von keinem der detektierten Epitope abgedeckt.

Das reaktive Zentrum der ADP-Ribosylierung mit den Aminosäureresten Arg9, His35, Ser53 und Glu129 (Pizza *et al.* 1988, Barbieri und Cortina 1988) wird hingegen von allen untersuchten Postimmunseren mit den Epitopen S1/1, S1/2 und S1/3 erkannt (vgl. Abb. 3.28).

Da eine Blockade der ADP-Bindungsstelle, ebenso wie die des reaktiven Zentrums, für die Detoxifizierung erst nach Eintritt des Toxins in die Zielzelle von Bedeutung ist, ist die vermutlich effektivste Detoxifizierung durch eine Erkennung der Bindungsstelle für Sialinsäure auf S2 und S3 gegeben. Wie Abb. 3.29 zeigt, werden drei von vier der an der Bindung beteiligten Aminosäuren durch die Epitope S2/3 bzw. S3/2 erkannt. Nach Lobet *et al.* (1993) und Loosmore *et al.* (1993) führt eine Modifikation in diesen Bereichen nachweislich zu einer reduzierten Bindungsfähigkeit des Toxins. Somit spielt die Erkennung dieser beiden Epitope vermutlich eine kritische Rolle bei der aktiven Abwehr der Aufnahme von Pertussis Toxin in seine Zielzellen.

Ihre Erkennung kann daher zu den wichtigsten Faktoren für den Aufbau einer protektiven Immunantwort gerechnet werden.

4.4.2 Beobachtungen zur Epitoperkennung an Impfseren

In dieser Arbeit wurden Reaktionen von Postimmunseren aus Impfstudien mit einer in Deutschland getesteten Vakzine von SmithKline, Beecham, und einer in Italien getesteten Vakzine der Firma Biocine betrachtet (vgl. Tab. 1.1). In beiden Fällen handelt es sich um Komponentenvakzinen mit Pertussis Toxin, FHA, Pertactin und Fimbrien. Der wesentliche Unterschied liegt in der Herkunft des eingesetzten Pertussis Toxins. Während das Pertussis Toxin bei der in Deutschland verwendeten Vakzine chemisch detoxifiziert ist, wurde der italienischen Vakzine gentechnisch modifiziertes Toxin zugegeben, das durch zweifachen Aminosäureaustausch an der S1 Untereinheit (K9/G129) detoxifiziert wurde (Rappuoli *et al.* 1995). Ein weiterer Unterschied besteht in der Menge an zugesetztem Pertussis Toxin. Während die SmithKline Vakzine 25 µg Toxin enthält, sind der Biocine Vakzine lediglich 5 µg zugefügt.

Die Postimmunseren beider Studien erkennen gleiche Epitope auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin (vgl. Abb. 3.30). Auch die Modifikation an der S1 Untereinheit zeigt im Vergleich keinen Einfluß auf die Spezifität der Epitoperkennung. Unterschiede wurden hingegen in der Intensität der induzierten Immunreaktion festgestellt. Die Postimmunseren der Patienten, denen gentechnisch verändertes Toxin verabreicht wurde, weisen im Pepscan eine in den immunodominanten Epitopen deutlich erhöhte Intensität der Erkennung gegenüber der Vakzine mit chemisch detoxifiziertem Toxin auf. Die spezifische Erkennung von Pertussis Toxin ist hier also offenbar verbessert. Die Ursache für diesen Effekt liegt vermutlich in der „natürlicheren“ Präsentation des gentechnisch detoxifizierten Toxins gegenüber dem chemisch detoxifizierten bei gleichzeitig verringertem Antigeneinsatz.

Daraus läßt sich folgern, daß die mit dieser Vakzine erstmals gezeigte erfolgreiche Anwendung einer gentechnisch detoxifizierten Variante des Pertussis Toxins auch ein erfolgversprechender Ansatz für die Entwicklung weiterer Vakzinen ist, die auf chemische Detoxifizierung verzichten.

4.4.3 Epitoperkennung nach natürlicher Infektion

Die Untersuchungen zur Epitoperkennung durch natürlich infizierte, nicht-immunisierte Patienten haben gezeigt, daß die Reaktion gegenüber Pertussis Toxin im wesentlichen der Reaktion des Serums eines geimpften Patienten entspricht. Das bedeutet für die Protektivität der Vakzinierung, daß sie vermutlich der durch natürliche Immunisierung hervorgerufenen, zumindest in Bezug auf die erkannten, linearen Epitope, entspricht.

Seren von Patienten, die keinen Kontakt mit dem Pathogen hatten, weisen geringe Reaktionen mit den Peptiden des Pepscons auf. Jede Einzelreaktion bleibt deutlich unterhalb des festgelegten Grenzwertes für ein immunodominant erkanntes Epitop (vgl. Abb. 3.22).

Für eine Reihe von Seren nicht-immunisierter Patienten wurde durch die untersuchenden Ärzte keine bestehende oder zurückliegende Pertussis Infektion diagnostiziert. Auch der routinemäßig durchgeführte ELISA-Test zeigte kein eindeutig positives Ergebnis. Dennoch zeigten sich teilweise im Pepscon dominante Reaktionen mit Peptiden von Pertussis Toxin, insbesondere aus der S1 Untereinheit (vgl. Abb. 3.33).

Die Erklärung für diese Beobachtung ist nicht eindeutig. Zunächst einmal könnte das Vorliegen einer Kreuzreaktion mit homologen Epitopen anderer Antigene postuliert werden. Wie die Datenbankrecherchen gezeigt haben, sind jedoch alle Reaktionen, abgesehen von Reaktionen mit dem Epitop S1/1, eindeutig spezifisch für einen Kontakt mit Pertussis Toxin (vgl. 3.3.2.7). Daher ist der Schluß zu ziehen, daß auch bei den nur mit wenigen Epitopen reagierenden Seren ein zurückliegender Kontakt mit dem Toxin eingetreten sein muß.

Nicht unwahrscheinlich ist, daß es sich in diesen Fällen jeweils um den Aufbau uncharakteristischer Immunitäten in Folge einer der häufig beobachteten untypisch verlaufenden Pertussis Infektionen handelt, die jedoch nie als Keuchhusten diagnostiziert wurden (Cherry 1989).

Für Seren von Patienten, bei denen eine charakteristische Keuchhusteninfektion diagnostiziert wurde, konnte für alle auch in den Impfseren detektierten Epitope eine spezifisch erhöhte Erkennung festgestellt werden. Diese Seren reagieren im Vergleich zu den Impfseren mit einem erhöhten Hintergrundtiter gegenüber den Peptiden des Pepscons.

Auffällig war weiterhin die Erkennung des zusätzlichen Epitops S1/h durch die Seren (vgl. Tab 3.10) rekonvaleszenter Patienten. Da dieses Epitop von keinem der Impfseren erkannt wurde, könnte es möglicherweise zur differentiellen Analyse der Immunität aufgrund einer natürlichen Infektion und einer Immunität als Folge einer erfolgreichen Vakzinierung herangezogen werden.

Da mittlerweile jedoch auch in Deutschland wieder allgemein bei Säuglingen eine Vakzinierung mit einer Komponentenvakzine gegen Pertussis Toxin empfohlen und in der Regel auch durchgeführt wird, wird dieses Ergebnis sich wahrscheinlich nicht in einer praktischen Maßnahme niederschlagen.

4.5 Untersuchungen zu Substratwechselwirkungen von Pertussis Toxin: ADP-Ribosylierung C-terminaler Peptide der α Untereinheiten von G-Proteinen durch Pertussis Toxin

Membranständige G-Proteine dienen einer Vielzahl eukaryotischer Zelloberflächenrezeptoren als molekulare Schalter bei der Signaltransduktion von Außenreizen über die Zellmembran in die Zelle zu den eigentlichen Effektoren. Der Nachweis von bereits über 100 verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren, die in direkter Wechselwirkung mit G-Proteinen stehen, demonstriert eindrucksvoll die zentrale Schlüsselstellung dieser Proteine für die Regulation von Zellreaktionen auf Außenreize (Simon *et al.* 1991).

Die S1 Untereinheit von Pertussis Toxin ist nach der erfolgten Einschleusung in seine Zielzellen und nachfolgender Aktivierung in der Lage die α Untereinheiten einiger dieser G-Proteine spezifisch zu erkennen und durch ADP-Ribosylierung zu modifizieren. Von Pertussis Toxin erkannt werden G-Protein Untergruppen mit den α Untereinheiten α -G_i, α -G_o und α -G_t. Die α Untereinheiten anderer G-Proteine, wie α -G_s oder α -G_z, werden hingegen von Pertussis Toxin (im Gegensatz zu Cholera Toxin) nicht als Substrate erkannt (Graf *et al.* 1992).

Die durch die S1 Untereinheit von Pertussis Toxin jeweils am Cystein an der Position -4 vorgenommene ADP-Ribosylierung der jeweiligen α Untereinheit führt beispielsweise beim α -G_i zur Inhibition der Regulation für die Adenylatcyklase. Daraufhin zeigt die Zelle eine Überreaktion auf Außenreize. Ganz allgemein kommt es durch die Modifikation zu einer Entkoppelung der G-Proteine von den ihnen zugeordneten Rezeptoren (vgl. Abb. 1.3) und zum Ausfall des jeweils damit zusammenhängenden Feinregulationssystems der Zelle (van Dop *et al.* 1985, Kurose *et al.* 1983).

Der Befund, daß Pertussis Toxin ein spezifisches Cystein an der Position -4, also in unmittelbarer Nähe des C-Terminus des Moleküls modifiziert, geht auf die Arbeiten von West *et al.* (1985) zurück. Anhand mehrerer, unabhängiger Experimente, bei denen durch Oligonukleotid vermittelte Mutagenese gezielte Sequenzmutationen im C-terminalen Bereich eingeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß auch die Positionen -1, -2 und -3 von Bedeutung für die Substraterkennung durch Pertussis Toxin sind (Neer *et al.* 1988, Tsuchiya *et al.* 1990, Avigan *et al.* 1992).

Entgegen der ursprünglichen Annahme, daß Pertussis Toxin nur das heterotrimere G-Protein als Substrat erkennt, konnten Graf *et al.* (1992) zeigen, daß auch freie 15mer und 20mer Peptide, die den C-Termini natürlicher α Untereinheiten der bekannten Pertussis Toxin-Substrate entsprechen, nicht nur erkannt, sondern darüber hinaus auch spezifisch modifiziert werden. Weiterführende Experimente sind bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht publiziert worden. Vermutlich ist dies u.a. deswegen nicht geschehen, weil keine geeignete Methode existierte, um große Mengen von in Länge und Sequenz frei definierbaren Peptiden unter identischen Bedingungen zu synthetisieren und zu präsentieren, um daran die Effekte von Längensvariationen und Sequenzmutationen zu studieren.

Die in dieser Arbeit bereits für die Anfertigung von Pepscans der Untereinheiten von Pertussis Toxin und die Bestimmung darauf befindlicher linearer antigener Epitope erfolgreich eingesetzte Spotsynthesetechnik erschien als vielversprechendes Verfahren, mit Hilfe von Peptid-Feldern die sich aus den vorherigen Arbeiten ergebenden, weiterführenden Fragestellungen experimentell zu untersuchen.

4.5.1 Einsatz C-terminal fixierter Peptide als Substrate für die ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin

Als Vorbedingung für die Weiterführung der von Graf *et al.* (1992) durchgeführten Untersuchungen mit freien Peptiden war zunächst der Nachweis zu führen, daß auch C-terminal fixierte Peptide von Pertussis Toxin erkannt und modifiziert werden. Dazu mußte geprüft werden, ob der Umstand, daß die Peptide C-terminal fixiert vorliegen, die Spezifität der Reaktion, nämlich die ADP-Ribosylierung am Cystein an der Position -4, verändert. Die Kristallstruktur von α -G₁₃ ist von Coleman *et al.* (1994) bestimmt worden, wobei jedoch die Struktur des C-terminalen Bereichs (AS 344-354) nicht aufgelöst werden konnte und der entsprechende Bereich in den Strukturdaten daher fehlt. Dies deutet auf eine hohe Flexibilität in der C-terminalen Region hin, die sich für den hier zu verwendenden experimentellen Ansatz mit C-terminaler Fixierung der Peptide als limitierender Faktor hätte auswirken können.

Die einleitenden Experimente, bei denen die Markierung zum Zwecke einer nachträglichen Quantifizierung der Ribosylierungseffizienz mit Hilfe von ³²P-NAD als ADP-Ribose-Donor durchgeführt wurde, zeigten, daß C-terminal fixierte Peptide von α -G₁₃ als Pertussis Toxin Substrate geeignet sind und sowohl spezifisch erkannt als auch modifiziert werden.

Erkannt wird offenbar eine spezifische Zielsequenz, jedoch nicht explizit ihre frei bewegliche Lokalisation am C-Terminus des Zielproteins. Wie erwartet, wurden die C-terminalen Peptide der untersuchten α Untereinheiten von G-Proteinen, die selbst keine Pertussis Toxin-Substrate sind, wie α -G₅ oder α -G₂, nicht von Pertussis Toxin modifiziert. Wird das Cystein an der Position -4 durch eine beliebige andere Aminosäure ausgetauscht, so findet ebenfalls keine ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin statt. Ebenso wurde gezeigt, daß ein Cystein an der Position -4 zwar der Zielsequenz notwendig, allein jedoch keinesfalls hinreichend ist, um eine Erkennung und Modifikation durch Pertussis Toxin zu induzieren.

Mit diesen Befunden wurden gleichzeitig frühere Resultate, die als ADP-Ribosylierungsstelle das Cystein an der Position -4 ermittelt hatten, in einem experimentell anderen Ansatz bestätigt (Hamm *et al.* 1988, Neer *et al.* 1988).

Um möglicherweise dennoch bestehende Einflüsse der C-terminalen Fixierung oder der Wechselwirkung zwischen Peptiden und Cellulosemembran zu untersuchen und gegebenenfalls zu minimieren, wurden die Effekte einer Vergrößerung des Abstands zwischen Cellulosemembran und Peptid untersucht. Bei Verwendung einer wachsenden Kette linearer Abstandshalter (Spacermoleküle), die sich aus β -Alanin-Oligomeren zusammensetzen, konnte keine Steigerung der ADP-Ribosylierungs-effizienz beobachtet

werden. Die Verwendung einer wachsenden α -Alaninkette als zusätzlichem Abstandshalter führte hingegen zum deutlichen Abfall der ADP-Ribosylierungs-effizienz (vgl. Abb. 3.36). Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der Tendenz von α -Alanin-Ketten, eigenständig α -Helices auszubilden (Arnott und Wonacott 1966, Arnott *et al.* 1967), was möglicherweise den C-Terminus der Zielsequenz in eine für die Modifikation durch Pertussis Toxin ungünstige Konformation zwingt.

Offenbar ist also der routinemäßig als Abstandshalter und Synthesestartpunkt eingebaute 2mer β -Alaninanker ausreichend, um die möglichen Effekte der Fixierung an die Membran auf die ADP-Ribosylierungsstelle zu minimieren.

4.5.2 Effekte der Längenvariationen von Peptidsubstraten auf Erkennung und ADP-Ribosylierungseffizienz

Um nähere Informationen über die minimalen Voraussetzungen und einflußreiche Abschnitte der von Pertussis Toxin als Ziele erkannten Peptidmotive zu gewinnen, wurden ausgehend von verschiedenen Substrat- und Nichtsubstratsequenzen entsprechende Sequenzen in unterschiedlicher Gesamtlänge (12-20mere) synthetisiert.

In diese Untersuchung eingeschlossen wurden Peptide aller bis dahin bekannten Pertussis Toxin-Substrate: α -G_{11/2}, α -G₁₃, α -G₁, α -G₀₁ und α -G_{02/0X1} sowie als Kontrollen die entsprechenden Peptide der Nichtsubstrate α -G_s und α -G_z (vgl. Tab. 3.11).

Die Sequenzen der von α -G_{02/0X1} und α -G₁₃ abgeleiteten Peptide erwiesen sich als die besten Pertussis Toxin Substrate innerhalb dieses experimentellen Ansatzes (Abb. 3.37 a).

Für beide Sequenzen wurde eine direkte Abhängigkeit der ADP-Ribosylierungseffizienz von der Länge des Peptids festgestellt.

Dabei war es jedoch nicht so, daß eine Steigerung der ADP-Ribosylierungseffizienz unmittelbar mit jeder zusätzlichen Aminosäure der Zielsequenz zu beobachten war, sondern beide Sequenzen zeigten vielmehr Längenoptima für die Substraterkennung durch Pertussis Toxin.

Dieses Optimum liegt für die von α -G_{02/0X1} abgeleitete Sequenz bei einer Länge von 17 Aminosäuren. Für die von α -G₁₃ abgeleitete Sequenz wurde ebenfalls ein Längenoptimum für das 16mer ausgemacht. Da für diese Sequenz bei länger werdenden Peptiden ein erneuter Anstieg der ADP-Ribosylierungseffizienz beobachtet werden konnte, wurden längere Peptide synthetisiert und daraufhin ein zweites, deutlich höher liegendes Maximum bei einer Peptidlänge von 21 Aminosäuren bestimmt (vgl. Abb. 3.37 b).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die „oberhalb“ der eigentlichen ADP-Ribosylierungsstelle gelegenen Bereiche einen deutlichen Einfluß auf die Substraterkennung ausüben. Die C-terminale Fixierung behindert diesen Effekt offenbar nicht, sondern erweist sich hier als geeignete Methode, um Peptiden eine flexible Anpassung ihrer Konformation in Abhängigkeit von Sequenz und Peptidlänge zu ermöglichen.

Das Beobachten von „Maxima“ für die ADP-Ribosylierungseffizienz erscheint zunächst ungewöhnlich. Es wird jedoch erklärlich, wenn man von einer sich mit wachsender

Peptidlänge aufgrund der neu hinzukommenden Reste veränderten Gesamtkonformation des Peptids ausgeht. Diese Konformationsänderung kann sowohl Einfluß auf die Präsentation der Modifikationsstelle, als auch auf dreidimensional erkannte Kontaktstrukturen im Zielmolekül ausüben.

Als Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen sollten daher in jegliche Betrachtung von „Enzym-Substrat“-Wechselwirkungen mit Hilfe C-terminal verankerter Peptide auf Basis der Spotsynthesemethode auch Längenvariationen der Zielsequenzen einfließen. Dadurch lassen sich die möglicherweise bestehenden konformellen Abhängigkeiten zwischen Substraterkennung und Peptidlänge detektieren und in der Auswertung zu berücksichtigen.

Die weiteren Untersuchungen an α -G₁₃ Peptiden mit einer Länge unterhalb von 12 Aminosäuren zeigten, daß die minimale Länge für ein innerhalb des hier gewählten experimentellen Ansatzes nachweisbar durch Pertussis Toxin-Einfluß ADP-ribosyliertes Peptid bei 11 Aminosäuren liegt (vgl. Abb. 3.37 c). Dies deutet darauf hin, daß in diesem Bereich neben den bereits von anderen Gruppen beschriebenen Einflüssen der Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung des Cys-4 möglicherweise weitere Positionen mit großem Einfluß für die grundsätzliche Erkennung als Zielsequenz liegen.

4.5.3 Detektion von α -G_n als hocheffizientes Pertussis Toxin-Substrat

Die BLASTP-Recherche nach homologen Sequenzen zum C-terminalen α -G₁₃ Peptid führte zur Detektion von α -G_n als neuem, zuvor nicht bekanntem Pertussis Toxin-Substrat (Sequenz im Anhang). Die dabei beobachtete ADP-Ribosylierungseffizienz lag für das C-terminale 16mer um etwa das dreifache höher als die Effizienz für die bis dahin beste von α -G_{02/1} abgeleitete Zielsequenz (vgl. Abb. 3.38).

Von Michel *et al.* (1986) war bereits vermutet worden, daß es sich bei α -G_n um ein regulatorisches G-Protein handelt. Der Befund, daß α -G_n Peptid tatsächlich ein Ziel für die ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin darstellt, liefert einen deutlichen Hinweis für das Zutreffen dieser Vermutung, so daß in Bezug auf G_n von einem typischen, Pertussis Toxin-modifizierbaren heterotrimeren G-Protein mit regulatorischer Funktion ausgegangen werden kann.

Anhand der α -G_n Sequenz läßt sich eindrucksvoll demonstrieren, daß die Zielsequenzen der anderen bekannten Peptidsubstrate nicht optimal für die Erkennung durch Pertussis Toxin sind (vgl. Abb. 3.38).

4.5.4 Effekte von Positionsaustauschen von Aminosäuren auf die ADP-Ribosylierungseffizienz

Um genaueres bezüglich der Positionseffekte einzelner Aminosäurereste innerhalb einer Substratsequenz zu ermitteln, wurden für vier Gruppen von Sequenzpositionen und

insgesamt 8 Positionen jeweils 19 Einzelpositionsaustausche innerhalb der C-terminalen α -G₁₃ Sequenz durchgeführt.

Anschließend wurden die Effekte der eingebauten Modifikationen bezüglich einer Veränderung der ADP-Ribosylierungseffizienz im Vergleich zur nativen Sequenz ermittelt (vgl. Tab. 3.12). Die α -G₁₃ Sequenz (als suboptimales Substrat) wurde gewählt, da sie erwarten ließ, daß sowohl positive als auch negative Effekte der Positionsaustausche innerhalb einer veränderten ADP-Ribosylierungseffizienz deutlich erkennbare Auswirkungen zeigen sollten.

Der Einbau eines zusätzlichen Cystein-Restes führte, abgesehen von der Position -15, in allen Fällen zum Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz. Dieser Befund unterstreicht die Abhängigkeit der Erkennung und Modifikation des Cysteins von seiner Position innerhalb des Zielpeptids.

Die Experimente mit den Sequenzmutationen an der Stelle -14, einer Position aus der Gruppe der innerhalb der Pertussis Toxin- und Nicht-Pertussis Toxin-Substrate konservierten Positionen, zeigten, daß das Vorhandensein von Aspartat an dieser Position ein wichtiges Kriterium für die Akzeptanz als Zielsequenz ist. Jeder Austausch mit einer anderen Aminosäure führt zu einem Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz. Besonders auffällig ist dabei, daß die Modifikation von Aspartat zu Glutamat, die mit keiner Ladungsveränderung, sondern lediglich einer Verlängerung des Restes um eine CH₂-Gruppe einhergeht, den stärksten Abfall in der ADP-Ribosylierungseffizienz bewirkt. Daraus läßt sich schließen, daß der Aspartatrest selbst in der Erkennung durch Pertussis Toxin eine wichtige Rolle spielt.

Die Positionen -3 und -6 wurden als Beispiele für solche Positionen analysiert, die in allen bekannten Pertussis Toxin-Substratsequenzen konserviert sind.

Hier konnte gezeigt werden, daß an beiden Positionen im natürlichen α -G₁₃-Peptid mit Glycin bzw. Lysin fast optimale Reste vorliegen. Nur der Austausch gegen Arginin konnte in beiden Fällen die ADP-Ribosylierungseffizienz erhöhen.

In der Gruppe mit Positionen, die innerhalb der Sequenzen bekannter Substrate nicht konserviert sind, konnten sowohl Beispiele für positive, als auch für negative Beeinflussung der ADP-Ribosylierungseffizienz gefunden werden.

Austausche an der Position -9 führten innerhalb der α -G₁₃-Sequenz zu den insgesamt höchsten beobachteten Steigerungen in der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Im Gegensatz dazu resultierte jeder Austausch des Lysins an der Position -10 in einem deutlichen Abfall der beobachteten Modifikation. Auch in diesem Fall ist es sehr wahrscheinlich, daß das Lysin an der Position -10 direkt an der Substraterkennung durch Pertussis Toxin beteiligt ist.

Vergleicht man die Sequenzen der Pertussis Toxin-Substrate an den Positionen -9 und -10, so fällt auf, daß bei einem Substrat stets eine der beiden durch ein Lysin besetzt ist.

Innerhalb des α -G₁₃-Peptids führt der Einbau eines zweiten Lysins an der Position -9 zu einer Erhöhung der ADP-Ribosylierungseffizienz um das Siebenfache, der Einbau von Arginin an dieser Position sogar um das Zehnfache. Aus dieser Beobachtung läßt sich der Schluß ziehen, daß die frei zugängliche Präsentation positiv geladener Funktionen in diesem Bereich der Zielsequenz einen wichtigen Faktor für die ADP-Ribosylierungseffizienz darstellt.

Die letzte untersuchte Gruppe von Peptidpositionen enthält Mutationen an den Positionen -15 und -16, also am freien N-Terminus des Peptidsubstrats. Das Threonin an der Position -15 ist in allen bekannten α Untereinheiten, die von Pertussis Toxin als Substrat erkannt werden, konserviert. An der Position -16 enthält jede natürliche Zielsequenz mit Ausnahme von α -G_n ein Valin. Genauso wie an der Position -9 kann auch hier durch Austausch des Valins eine erhebliche Steigerung der ADP-Ribosylierungseffizienz bewirkt werden. Der Austausch gegen Leucin führt zu dem höchsten steigernden Effekt. In Übereinstimmung mit seiner besonders positiven Beeinflussung der Substrateigenschaften liegt genau dieser Leucin-Rest beim α -G_n Peptid an der Position -16 vor.

Bei der Betrachtung der Abhängigkeit der ADP-Ribosylierungseffizienz fällt weiterhin auf, daß das erste Maximum für α -G₁₃ bei einer Peptidlänge von 16 Aminosäuren erreicht wird. Auch daraus läßt sich schließen, daß dieser Bereich großen Einfluß auf die Sequenzerkennung und Modifikation durch Pertussis Toxin ausübt. An beiden Positionen (-15 und -16) zeigen Aminosäureaustausche mit nicht polaren Seitenketten, wie Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan positive Effekte auf die ADP-Ribosylierungseffizienz.

Die Begründung dafür kann in der Beeinflussung der Gesamtpeptidkonformation durch diese Austausche liegen, die im Resultat die Peptiderkennung durch Pertussis Toxin verbessern.

Die beobachteten positiven und negativen Effekte von Aminosäureaustauschen beruhen jeweils auf einem von zwei möglichen Faktoren:

- Positionen, an denen in Folge eines Austausches starke Effekte auf die ADP-Ribosylierungseffizienz beobachtet werden, charakterisieren vermutlich Stellen der direkten Interaktion zwischen Peptidsubstrat und Pertussis Toxin. Jede Veränderung an den Stellen einer direkten Interaktion sollte die allgemeine Substraterkennung, Substratbindung und Modifikation direkt beeinflussen.
- Eine weitere Ursache für die in Folge eines Einzelpositionsaustausches von Aminosäuren auftretenden Effekte kann in der Beeinflussung der dreidimensionalen Struktur des Peptids begründet liegen. Falls bei der Erkennung eines Substrats dreidimensionale Strukturen auf Molekülebene eine Rolle spielen, kann eine Veränderung dieser Struktur ebenfalls Einfluß auf Substraterkennung und Bindung ausüben.

4.5.5 Berechnungen und Strukturvorhersagen zu den Effekten der Positionsmutationen

Um weitere Informationen über die im Falle der α -G₁₃ Peptide tatsächlich Einfluß nehmenden Faktoren zu erhalten, wurde durch computergestützte Simulationsberechnungen versucht, das theoretische Potential der Positionsaustausche in Bezug auf strukturelle Veränderungen im Peptid zu bestimmen.

Basierend auf den Daten einer NOE-NMR-Spektroskopie wurde vermutet (Dratz *et al.* 1993), daß der C-terminale Bereich der α Untereinheiten eine β -Schleife (β -turn) ausbildet. Um die Effekte der Positionsaustausche auf diese postulierte Schleifenbildung zu bestimmen, wurden daher die Wahrscheinlichkeiten für Schleifenbildungen in den mutierten Sequenzen mit Hilfe der von Chou und Fasman (1978) entwickelten Berechnungsmodelle bestimmt (Wilmot und Thornton 1988). Dabei konnte jedoch keine Korrelation zwischen den Veränderungen in der ADP-Ribosylierungseffizienz und den berechneten Effekten der Aminosäureaustausche auf einen mögliche β -Schleife des C-Terminus gefunden werden.

Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Schritt dreidimensionale Strukturvorhersagen für energieminierte Molekülmodelle der nativen und einiger mutierter α -G₁₃ 16mer Peptide berechnet. Da die Konformation des C-Terminus nicht über Kristallstrukturdaten bekannt war, wurden die Modellstrukturen vollständig mit Hilfe der Molekularmodellierungssoftware MacSPARTAN erstellt. Ausgehend von einer vorgegebenen hypothetischen α -Helix-Struktur des jeweiligen Peptids, berechnete die Software die Konformation mit dem nächsten, stabilen Energieminimum in bis zu 6.000 Optimierungszyklen. Als mathematische Grundlage wurde dabei das SYBYL-Kraft-Feld verwendet, das die innerhalb des Moleküls wirkenden molekulardynamischen Kräfte beschreibt (Clark *et al.* 1989).

Die hier berechneten Strukturen weichen mit hoher Wahrscheinlichkeit von den tatsächlichen *in vivo* Strukturen in der nativen Untereinheit ab. Der Einfluß der Aminosäureaustausche auf die Konformation des C-Terminus sollte sich jedoch auch entsprechend in den berechneten Modellen auswirken.

Aufbauend auf den Strukturberechnungen wurden für insgesamt 8 Peptide graphische Darstellungen erzeugt, die die nach den Berechnungen vorhergesagte Struktur der Peptide wiedergeben (Abb. 3.39). Die Berechnungen wurden für ausgewählte Aminosäureaustausche an den Positionen -6, -10 und -14 durchgeführt, um sowohl Beispiele für Austausch mit steigendem als auch mit verringerndem Effekt auf die ADP-Ribosylierungseffizienz zu betrachten (vgl. Tabelle 3.12).

Abgesehen vom innerhalb des nativen α -G₁₃ Peptids an der Position -14 lokalisierten Aspartat führt jeder Austausch zu einer Hemmung der durch Pertussis Toxin bewirkten Modifikation. Der Vergleich der vorhergesagten Konformationen zweier Austausche an dieser Stelle zeigt in beiden Fällen strukturelle Veränderungen im Vergleich mit der nativen Sequenz (Abb. 3.39 a, e und f). Die beiden Simulationen der mutierten Sequenzen weisen im Vergleich zum nativen Peptid veränderte innere Winkel auf, und das Gesamtmolekül wirkt bereits im ersten Eindruck leicht „verdreht“.

Die stärkste beobachtete Reduktion in der ADP-Ribosylierungseffizienz tritt auf, wenn das Lysin an der Position -6 gegen Aspartat ersetzt wird. Die verbleibende ADP-Ribosylierungseffizienz liegt danach nur noch bei 2,5% des Ausgangswertes. Der extreme, konformelle Effekt auf das dazu berechnete Molekülmodell (vgl. Abb. 3.39 h) läßt vermuten, daß dieser Austausch die Substraterkennung durch Pertussis Toxin in extremer Weise beeinflußt.

Auch im simulierten Kalottenmodell (vgl. Abb. 3.40) wird der durch den Austausch eingefügte „Knick“ innerhalb des Moleküls in besonders deutlicher Weise ersichtlich. Im Gegensatz zu diesem konformellen Effekt, der mit einer fast völligen Blockade der Substraterkennung einhergeht, zeigt der einzige Austausch an der Position -6 mit förderlichem Einfluß auf die ADP-Ribosylierungseffizienz, nämlich der Austausch gegen Arginin, im berechneten Modell (vgl. Abb. 3.39 g) nur leichte konformelle Veränderungen.

Zusätzlich zu Energieminimierungs- und Strukturberechnungen für Austausche an den Positionen -14 und -6 wurden Berechnungen für Austausche an der Position -10 durchgeführt. Jeder Austausch an dieser Position führte zu einem Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz (vgl. Tab. 3.12). Der in Abb. 3.39 b dargestellte Austausch gegen Methionin führt im Modell zu leichten konformellen Modifikationen, bleibt jedoch deutlich hinter den an den Positionen -14 oder -6 berechneten Effekten zurück. Ebenfalls nur leichte, konformelle Veränderungen treten beim Austausch des Lysins gegen Aspartat auf. Tatsächlich führt dieser Austausch jedoch, ähnlich wie an der Position -6, zum starken Absinken der ADP-Ribosylierungseffizienz auf etwa 8,5%. In diesem Fall kann also nicht von einer strukturellen Ursache für die veränderte Substraterkennung gesprochen werden. Die ebenfalls berechneten, strukturellen Effekte eines Austausches des Lysins an Position -10 gegen Aspartat sind gleichfalls gering und stehen wiederum in Korrelation mit der nur mäßigen Verringerung der ADP-Ribosylierungseffizienz.

Eine mögliche Erklärung für die hier beobachteten Effekte ist das Vorliegen direkter Wechselwirkungen zwischen Pertussis Toxin und der Aminosäure an der Position -10, bei der die Ladung des Restes eine Bedeutung für die Substraterkennung und/oder die Modifikation hat.

Dieser Teil der Experimente hat gezeigt, daß C-terminal fixierte Peptide gut geeignet sind, um sie in direkten Versuchsansätzen als frei zu modifizierende Substrate für die Pertussis Toxin-Erkennung und Modifikation einzusetzen. Die Experimente zum Positionsaustausch haben weitere Erkenntnisse bezüglich der für die Substraterkennung wichtigen Positionen innerhalb der Zielpeptide ergeben und gezeigt, daß die natürlichen Substratsequenzen offenbar keinesfalls optimierte Sequenzen für eine ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin darstellen.

Es konnte weiterhin mit der α -G_n Sequenz ein zuvor nicht bekanntes Substrat von Pertussis Toxin identifiziert und dadurch auch gezeigt werden, daß die hier verwendete Technik zur Aufklärung weiterer (bisher unbekannter) Substratsequenzen geeignet ist.

Verallgemeinernd läßt sich sagen, daß fixierte Peptid-Felder generell von Nutzen bei der Aufklärung und Analyse von Zielsequenzen innerhalb von Proteinsubstraten sind. Die bei dieser Methode mögliche Einführung gezielter Mutationen kann bisherige Techniken, die ihre Ergebnisse z.B. über den Umweg einer Oligonukleotid vermittelten Mutagenese und der nachfolgenden gentechnischen Produktion modifizierter Substratmoleküle erhalten, in vielen Fällen vereinfachen und ersetzen.

Ebenso zeigen die durchgeführten Experimente zum Positionsaustausch, daß diese Methode ein Hilfsmittel für die Entwicklung optimierter Zielsequenzen sein kann. Im Falle von Pertussis Toxin kann dies als Option zur Entwicklung optimierter synthetischer Substrate eingesetzt werden. Diese synthetischen Substrate könnten eine Anwendung als kompetitive Inhibitoren der Interaktion von Pertussis Toxin mit G-Proteinen finden.

4.6 Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur und Funktion von Pertussis Toxin für weiterführende immunologische Arbeiten und praktische Perspektiven

Für die Erweiterung der Erkenntnisse bezüglich wichtiger Elemente der Struktur und Funktion von Pertussis Toxin für immunologische Zusammenhänge ist es mit dieser Arbeit gelungen, sämtliche immunodominanten, linearen Epitope innerhalb von Pertussis Toxin zu detektieren und auf der Kristallstruktur von Pertussis Toxin abzubilden.

Es zeigte sich, daß die humane Reaktion eines geimpften Patienten sich in der Epitoperkennung nur geringfügig von der Erkennung nach einer natürlichen Infektion unterscheidet. Auf jeder Untereinheit existiert mindestens ein immunodominant erkanntes lineares Epitop. Die die Aufnahme in die Zielzellen vermittelnden S2 und S3 Untereinheiten werden intensiv durch humane Antiseren erkannt. Von den immunodominanten Epitopen auf diesen Untereinheiten werden die lektinähnlichen Bindungsstellen für Sialinsäurereste der die Bindung an Zielzellen vermittelnden Glykoproteine abgedeckt, was vermutlich unmittelbar protektiv gegenüber Anheftung und Aufnahme wirkt.

Die Projektion der Epitope auf die Kristallstruktur von Pertussis Toxin hat gezeigt, daß auf den Untereinheiten ausgedehnte strukturelle, immunodominante Bereiche existieren, die von mehreren, immunodominanten Epitopen abgedeckt werden. *In vivo* werden diese Bereiche in der Regel durch polyklonale Antiseren kumulativ erkannt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß im Pepscan detektierte, scheinbar lineare Epitope tatsächlich aus mehreren Teilepitopen bestehen können, die in der dreidimensionalen Struktur deutlich voneinander abgesetzt an der Oberfläche des Moleküls präsentiert werden.

Vergleiche der von humanen Antiseren immunodominant erkannten Epitope mit den Sequenzen aller bekannten Proteine und Proteinfragmente haben gezeigt, daß, mit einer Ausnahme, alle detektierten Epitope spezifisch für Pertussis Toxin sind und daher zuverlässig einen zurückliegenden Kontakt des Immunsystems mit diesem Toxin detektieren.

Da außer *B.pertussis* kein weiterer Organismus der Gattung *Bordetella* das Toxin exprimiert, weist diese Reaktion eindeutig auf eine zurückliegende Infektion mit dem Pathogen oder eine Immunisierung hin.

Die gewonnenen Informationen können eine Grundlage für die Entwicklung hochspezifischer diagnostischer Tests bilden, die das Risiko einer falschpositiven Diagnose ausschließen. Weiterhin sind mit der Detektion der immunodominanten Epitope die Peptidsequenzen bekannt, die für eine Neuentwicklung epitopbasierter Kombinationsvakzinen in Betracht gezogen werden sollten.

Die Untersuchungen an Zielsequenzen von Pertussis Toxin haben gezeigt, daß Pertussis Toxin bereits Peptide mit einer Länge von 11 AS spezifisch erkennt und modifiziert. Die erhebliche Steigerung der Zielsequenzerkennung bei der Verwendung wachsender Peptidsubstrate hat gezeigt, daß auch strukturelle Faktoren „oberhalb“ der ADP-Ribosylierungsstelle deutlichen Einfluß auf Erkennung und Modifikation ausüben. Mit der α -G_n Sequenz wurde aufgrund von Datenbankrecherchen ein neues Substrat von Pertussis Toxin detektiert, das im Vergleich mit allen bisher bekannten Zielsequenzen erheblich effizienter durch Pertussis Toxin erkannt und modifiziert wird.

Durch Positionsaustausche wurde gezeigt, daß „natürliche“ Zielsequenzen nicht optimal durch Pertussis Toxin erkannt werden und Einzelpositionsaustausche einen negativen, jedoch gleichfalls an einigen speziellen Positionen in der Zielsequenz einen erheblich steigernden Einfluß auf die ADP-Ribosylierungseffizienz haben können.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die systematische Suche nach einem Pertussis Toxin-Hyperpeptidsubstrat aufgenommen werden kann. Wenn es gelingt, ein Substrat zu finden, das zwar optimal erkannt und von Pertussis Toxin gebunden wird, jedoch durch Austausch des Cysteins an der Position -4 nicht umgesetzt werden kann, stünde damit möglicherweise ein Pertussis Toxin-Inhibitor mit therapeutischer Relevanz zur Verfügung.

4.7 Das Potential der Spotsynthesemethode als Verfahren bei der Bearbeitung unterschiedlicher Fragestellungen

Die Untersuchungen, die zur Detektion linearer und konformeller Epitope auf den fünf Untereinheiten von Pertussis Toxin geführt haben, waren in dieser Form nur unter Einsatz von Pepscans, die mit der halbautomatischen Spotsynthesemethode angefertigt wurden, umzusetzen. Die Arbeiten von Raupach (1993) mußten sich aufgrund der fehlenden Technik und der Zahl parallel zu synthetisierender Peptide noch auf die Untersuchung der Epitope innerhalb der S1 Untereinheit beschränken. Hier konnten nun erstmals Serien von identischen Pepscans sämtlicher Pertussis Toxin Untereinheiten auf einem Cellulosefilter angefertigt werden, die mehrfach wiederverwendbar waren und das detaillierte Studium der Epitoperkennung durch Seren aus verschiedenen Kollektiven erlaubten.

Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Spotsynthese hervorragend zur Untersuchung von Enzym-Substrat Wechselwirkungen geeignet ist (von Olleschik *et al.* 1997, von Olleschik *et*

al. eingereicht). Die Synthese, Präsentation und Analyse der Erkennung von Längenvariationen und Positionsmutationen der Zielsequenzen von Pertussis Toxin innerhalb der C-terminalen Bereiche von G-Protein α Untereinheiten wären mit freien Peptiden nicht ohne einen enormen Aufwand möglich gewesen.

Im Rahmen der Kooperationen mit der Tiermedizinischen Hochschule in Hannover (Strutzberg *et al.* 1996) und dem Institute Pasteur Mérieux (Renauld-Mongenie *et al.* 1997) konnten mit dieser Methode ebenfalls Beiträge zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen geleistet werden.

Für das Transferrin bindende Protein von *A.pleuropneumonie* war zuvor der bindende Bereich mit Hilfe von Fusionsproteinen nur grob als im N-terminalen Teil des Proteins befindlich bestimmt worden. Ohne den Einsatz des Pepskans wäre die weitere Eingrenzung nur mit Hilfe langwieriger Klonierungsstudien mit vielfältigen Fehlerquellen möglich gewesen. Dieser Weg war bereits vor Beginn der Kooperation beschritten worden, hatte jedoch innerhalb eines Jahres noch zu keinem Ergebnis geführt.

Der Pepscan des gesamten, für eine Bindung in Frage kommenden Bereiches bot dagegen einen sehr direkten Weg, der unmittelbar zum Erfolg führte (Strutzberg *et al.* 1996).

Hierbei offenbarte sich auch ein wichtiger Unterschied im Vergleich zur Detektion immunogener Epitope. Ebenso wie bei der Identifikation der immunodominanten Epitope auf den Untereinheiten von Pertussis Toxin schienen auch hier jeweils mehrere, benachbarte 16mer Peptide im Bindungsexperiment den Kernbereich der Bindung zu überspannen (vgl. Abb. 3.41). Nachfolgende Experimente, die die Länge der Peptide reduzierten, zeigten jedoch, daß sich beim Einsatz von 15mer Peptiden keine eindeutige Bindung feststellen ließ.

Daraus läßt sich schließen, daß für eine stabile Ausbildung einer Protein-Protein-Wechselwirkung in diesem Fall mindestens die 16mere erforderlich sind. Die gegenüber einer Antikörper-Epitop-Erkennung wesentlich geringeren Bindungskonstanten sind somit bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ein wichtiger Faktor bei der Auswahl der zu betrachtenden Sequenzlängen.

Möglicherweise sind auch hier, wie bei einigen Epitopen auf Pertussis Toxin festgestellt, in der linearen Abfolge getrennte Bereiche in der Tertiärstruktur nahe beieinander lokalisiert und gemeinsam an der Bindung beteiligt. Diese Einzelinteraktionen wären dann jedoch zu schwach, um selbständig eine stabile Bindung zu bewirken.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden für die Untersuchungen an den Transferrin-bindenden Proteinen des humanpathogenen *N.meningitidis* direkt größere Peptide (18mere) gewählt, um möglichst viele der wechselwirkenden Bereiche zu erfassen. Auch hier konnte für einige distinkte Bereiche des Proteins die Bindung von humanem Transferrin nachgewiesen werden (vgl. Abb 3.42 und 3.43).

Bei der Auswertung fiel auf, daß die Intensität der Bindung deutlich abgestuft ist. Parallel durchgeführte Experimente mit Fusionsproteinen für das TpbB zeigten, daß die im Pepscan detektierten Epitope mit schwacher Transferrinbindung im Fusionsprotein nicht als bindende

Bereiche auftreten (Renauld-Mongenie *et al.* 1997). Die Epitope mit starker Bindung lagen hingegen sämtlich innerhalb von Fusionsproteinen, die bindende Bereiche enthielten. Das bedeutet hier wurden die Bereiche tatsächlicher Wechselwirkung eindeutig detektiert.

Es ist nicht ganz auszuschließen, daß die Bereiche mit schwacher Transferrinbindung *in vivo* dennoch eine Rolle spielen. Dies ist möglicherweise erst dann zu abschließend klären, wenn die Kristallstruktur der Transferrin bindenden Proteine frei verfügbar sind und ähnlich wie für das Pertussis Toxin dreidimensionale Projektionen der bindenden Epitope auf die Struktur möglich werden.

C-terminal fixierte Peptide wurden auch im Rahmen einer sich aus den hier beschriebenen Arbeiten aufbauenden Diplomarbeit innerhalb des Arbeitskreises verwendet. In diesem Fall dienten die Pepscans als Werkzeug zur Identifizierung linearer Zielepitope von monoklonalen Antikörpern gegen Transferrin bindende Proteine verschiedener Stämme von *N.meningitidis* (Grün 1997). Hierbei gelang es, zwischen Antikörpern, die ausschließlich konformelle Epitope erkennen, und solchen, die lineare Epitope erkennen, zu differenzieren. Weiterhin konnten genaue Sequenzen der erkannten Epitope bestimmt werden. Ihre Länge lag in dem hier untersuchten System üblicherweise zwischen 3 und 8 Aminosäuren.

Als eher ungewöhnliche Anwendung konnte zusätzlich in Kooperation mit der Tiermedizinischen Hochschule in Hannover (Strutzberg 1996) gezeigt werden, daß C-terminal an Cellulose fixierte Peptide erfolgreich für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden können. Insbesondere die subcutane Applikation von ausgeschnittenen Spots mit fixierten Peptiden führte zur effektiven Induktion von Antikörpern.

Es werden sicher in rascher Folge weitere Anwendungsmöglichkeiten für den Einsatz der Spotsynthese für die Untersuchung molekularer Grundlagen von Virulenzfaktoren aufgezeigt werden. Einer Vielzahl immunologischer Fragestellungen kann durch den Einsatz der halbautomatischen Spotsynthese viel konsequenter und direkter als bisher möglich nachgegangen werden. Nicht genannt wurde zum Beispiel das Anwendungsgebiet der Spotsynthese für den Aufbau kombinatorischer Peptidbanken zur Entschlüsselung biologischer Erkennungsstrukturen (Kramer *et al.* 1994).

Die hier dargestellte Vielfalt zeigt jedoch bereits eindrucksvoll das breite Potential dieser relativ jungen Technik, deren Anwendung der Spotsynthese sicherlich nicht auf den reinen universitären Forschungsbereich beschränkt bleiben wird.

5 Anhang

5.1 Ergänzende Daten zu den innerhalb dieser Arbeit gesammelten und eingesetzten Humanseren

Für diese Arbeit wurde eine Kollektion von humanen Antiseren von nicht gegen Pertussis immunisierten Kindern und Seren aus zwei verschiedenen Impfstudien mit azellulären Pertussis Vakzinen gesammelt und katalogisiert. Aus diesen Kollektionen wurden nach Vortests die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Seren ausgewählt.

Für viele Seren existieren neben den selbst ermittelten Daten weitere bezüglich serologischer Tests, ärztlicher Diagnose, Alter und Geschlecht.

Da seit 1995 auch in Deutschland Säuglinge wieder mit azellulären Vakzinen gegen Pertussis immunisiert werden, ist die weitere Kollektion von Serumproben nicht-immunisierter oder natürlich infizierter Patienten zukünftig voraussichtlich nur noch selten möglich.

Die Seren wurden jeweils aliquotiert und in Aliquots zu 100 µl bei -20°C gelagert. Die innerhalb dieser Arbeit nicht verwendeten Aliquots stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

5.1.1 Humanseren von nicht gegen Pertussis geimpften Kindern

Für die Untersuchungen an Humanseren wurden von einer Reihe von Kinderärzten Humanseren nicht-immunisierter Kinder mit Keuchhustenverdacht oder von Personen aus dem unmittelbaren Kontaktbereich von Patienten in der paroxysmalen Phase zur Verfügung gestellt.

Serum	Alter	Geschlecht	Diagnose	Titer (im ELISA des Arztes)			Quelle
				IgG	IgA	IgM	
S1	n.b.	n.b.	positiv	n.B	n.B.	n.B.	B (ä)
S2	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	N
S3	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S4	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S5	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S6	n.b.	n.b.	positiv	n.b.	n.b.	n.b.	N
S7	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S8	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S9	1	m.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	N
S10	4 Mon.	w.	positiv	positiv	n.b.	n.b.	R
S11	1	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	N
S12	n.b.	n.b.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	H
S13	3 Mon.	m.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	G

Serum	Alter	Geschlecht	Diagnose	Titer (im ELISA des Arzies)			Quelle
				IgG	IgA	IgM	
S14	6	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	G
S15	9	m.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	B
S16	6	m.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	M
S17	4	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	M
S18	6	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	M
S19	1	m.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	M
S20	5	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	W
S21	3	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	R
S22	5	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	G
S23	2	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	Gu
S24	3	w.	Verdacht	n.b.	n.b.	n.b.	Gu
25/1833	n.b.	n.b.	positiv	1:64	n.b.	1:128	E
26/1731	n.b.	n.b.	positiv	1:64	n.b.	1:128	E
27/1323	n.b.	n.b.	positiv	1:128	n.b.	1:64	E
28/3243	4	n.b.	positiv	1:64	n.b.	1:128	E
29/3373	5	n.b.	positiv	1:32	n.b.	1:128	E
30/1763	5	n.b.	positiv	1:128	n.b.	1:128	E
31/3319	5	n.b.	positiv	1:128	n.b.	1:128	E
32/3426	4	n.b.	geimpft!	1:32	n.b.	1:32	E
33/3444	10	n.b.	Kontakt	1:32	n.b.	1:32	E
34/3312	24	n.b.	Verdacht	1:64	n.b.	1:32	E
35/506041	10	n.b.	positiv	1:1024	n.b.	1:512	E
36/410353	12	n.b.	positiv	1:4096	n.b.	1:2048	E
37/410617	7	n.b.	positiv	1:4096	n.b.	1:2048	E
38/409849	27	n.b.	positiv	1:1024	n.b.	1:1024	E
39/41079	42	n.b.	positiv	1:4096	n.b.	1:2048	E
40/410806	9	n.b.	positiv	1:4096	n.b.	1:512	E
41/505727	10	n.b.	positiv	1:256	n.b.	1:512	E
42/410016	6	n.b.	positiv	1:8192	n.b.	1:512	E
43/410152	11	n.b.	positiv	1:2048	n.b.	1:512	E
44/409649	15	n.b.	positiv	1:512	n.b.	1:1024	E
45/1	5	n.b.	Bronchitis	1:2048	n.b.	1:64	E
46/2	6	n.b.	Husten	1:4096	n.b.	1:128	E
47/3	5	n.b.	Husten	1:4096	n.b.	1:512	E
48/4	1M	n.b.	Verdacht	1:4096	n.b.	1:512	E
49/5	4	n.b.	Verdacht	1:4096	n.b.	1:512	E
50/6	4	n.b.	Verdacht	1:4096	n.b.	1:512	E
51/7	5	n.b.	Verdacht	1:2048	n.b.	1:512	E
52/8	2	n.b.	Husten	1:2048	n.b.	1:2048	E
53/9	1	n.b.	positiv	1:4096	n.b.	1:256	E
54/10	6	n.b.	Bronchitis	1:2048	n.b.	1:2048	E
55/11	4	n.b.	Bronchitis	1:1024	n.b.	1:1024	E
56/12	5	n.b.	Husten	1:2048	n.b.	1:1024	E
57/14	5	n.b.	Verdacht	1:1024	n.b.	1:1024	E
58/13	4	n.b.	Verdacht	1:1024	n.b.	1:1024	E
59/15	6	n.b.	Husten	1:8192	n.b.	1:4096	E

Serum	Alter	Geschlecht	Diagnose	Titer (im ELISA des Arztes)			Quelle
				IgG	IgA	IgM	
60/515130	1	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
61/401840	3	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
62/401860	6	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
63/401991	6	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
64/515284	4	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
65/515030	3	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
66/401900	3	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
67/401961	3	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
68/402102	1	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
69/402008	2	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E
70/402005	2	n.b.	n.b.	< 1:16	n.b.	< 1:64	E

Tab. 5.1: Humansenen nichtimmunisierter Patienten mit und ohne Keuchhustenverdacht.

Herkunft der Seren: K = Krankenhaus Krefeld, E=Dr. Enders, H=Dr. Holtmann, R=Dr. Rosenfeld, G=Dr. Göhler, M=Dr. Middendorf, B=Dr. Backasch, W=Wieners, Gu=Dr. Gussone.

5.1.2 Humansenen aus einer italienischen Impfstudie mit rekombinantem PT

In diese Studie wurden als Säugling mit einer kombinierten Ganzzellvakzine (wcDTP) oder der rekombinanten italienischen Vakzine (DTaP) gegen Pertussis grundimmunisierte Patienten eingeschlossen. Sie wurden mit einer gentechnisch veränderten azellulären Pertussis Toxin PT-9K/129G (Podda *et al.* 1994, Rappuoli *et al.* 1992) in Kombination mit filamentösem Hämagglutinin, Pertactin sowie in der Kombination mit Diphtherie und Tetanus Toxoiden geboostert (vgl. Tab. 1.1). Alle Patienten waren zuvor im Alter von zwei, vier und sechs Monaten, mit einer DT-Ganzzell-Pertussis-Vakzine (wcDTP) oder der italienischen DT-azellulären-Pertussis-Vakzine (DTaP) mit rekombinantem Pertussis Toxin (Di Martino, pers. Mittlg.) immunisiert worden (vgl. Tab. 5.2).

Serumproben, die den Immunstatus vor (pre) und nach (post) der Boosterimmunisierung repräsentieren, wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Rino Rappuoli, Instituto Ricerche Immunobiologiche Siena (IRIS), Siena.

Bezeichnung	geboren	Geschl.	vorimmuni- siert mit	Auffrischungs- immunisierung	IgG	CHO
It125 pre/post	24.05.1991	w.	wcDTP	06.10.1992	180	160
It126 pre/post	25.05.1991	m.	DTaP	07.10.1992	275	320
It128 pre/post	23.05.1991	m.	wcDTP	06.10.1992	291	320
It130 pre/post	18.05.1991	w.	wcDTP	10.11.1992	252	320
It133 pre/post	22.05.1991	m.	wcDTP	24.10.1992	158	160
It135 pre/post	03.06.1991	m.	DTaP	29.10.1992	143	1280
It136 pre/post	03.06.1991	m.	wcDTP	03.11.1992	141	320
It142 pre/post	18.01.1991	m.	wcDTP	28.09.1992	1900	1280
It156 pre/post	01.04.1991	w.	DTaP	21.09.1992	207	640
It159 pre/post	n.b.	m.	wcDTP	09.09.1992	211	20
It160 pre/post	04.04.1991	m.	wcDTP	28.09.1992	221	320

Bezeichnung	geboren	Geschl.	vorimmuni- siert mit	Auffrischungsim- munisierung	IgG	CHO
It176 pre/post	20.04.1991	w.	wcDTP	12.10.1992	212	40
It252 pre/post	21.12.1990	m.	DTaP	18.06.1992	270	320
It258 pre/post	15.12.1990	m.	DTaP	24.07.1992	311	320
It278 pre/post	19.02.1991	m.	wcDTP	03.07.1992	224	320
It281 pre/post	16.03.1991	m.	DTaP	02.11.1992	166	640
It283 pre/post	08.03.1991	m.	wcDTP	19.10.1992	498	640
It292 pre/post	20.06.1991	m.	DTaP	08.02.1993	219	640
It293 pre/post	11.06.1991	m.	wcDTP	18.12.1992	224	10
It307 pre/post	08.12.1990	m.	wcDTP	26.06.1992	660	80
It316 pre/post	18.12.1990	m.	wcDTP	26.06.1992	381	640
It322 pre/post	02.12.1990	w.	DTaP	26.06.1992	413	640
It347 pre/post	08.02.1991	w.	wcDTP	26.06.1992	119	20
It402 pre/post	22.01.1991	m.	DTaP	24.06.1992	606	640
It409 pre/post	04.03.1991	m.	wcDTP	22..06.1992	688	10
It412 pre/post	16.03.1991	w.	DTaP	02..07.1992	226	320
It414 pre/post	04.03.1991	m.	wcDTP	05.08.1992	298	80
It415 pre/post	12.03.1991	m.	wcDTP	02.07.1992	209	20
It416 pre/post	16.04.1991	m.	DTaP	19.08.1992	623	640
It419 pre/post	29.04.1991	m.	wcDTP	08,08.1992	129	40

Tab. 5.2: Pre- und Postboosterseren aus der italienischen Impfstudie mit einer rekombinanten Pertussis Vakzine.

Die Entnahme der Preboosterseren erfolgte am Tag der Auffrischungsimmunisierung (Booster), die Entnahme der Postboosterseren erfolgte einen Monat nach der Boosterimmunisierung. Die Auffrischungsimmunisierung gegen Pertussis erfolgte mit jeweils 5 µg rekombinatem PT, 25 µg FHA und 2,5 µg Pertactin. CHO-Neutralisierungstest (CHO) und IgG-ELISA (IgG) nach Podda *et al.* (1994). Die Bezeichnungen der Seren entsprechen den innerhalb dieser Arbeit verwendeten Serenbezeichnungen.

5.1.3 Humanseren aus einer deutschen Impfstudie

Diese Sammlung enthält Humanseren aus einer deutschen Impfstudie für die Untersuchungen der Immunantwort gegen lineare Epitope. Innerhalb dieser Studie wurden die Patienten mit einer azellulären Pertussis Vakzine (Arbeitsbezeichnung: APV 50) von SmithKline, Beecham immunisiert. Sie enthält als Pertussis spezifische antigene Komponenten pro Dosis jeweils 25 µg Pertussis Toxin und FHA sowie 8 µg Pertactin. Immunisiert wurde insgesamt 4 mal im Alter von 3, 4, 5 sowie abschließend im Alter von 15 bis 19 Monaten. Die Serumproben, die vor der zweiten (ES) und der dritten Immunisierung (ZS) genommen wurden, wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wirsing von König, Städtische Krankenanstalten Krefeld.

ES	ZS	PT-G1	PT-G2	PT-A1	PT-A2
4388	5350	178	57	11	4
4390	5059	7	216	4	59
4381	5263	98	122	86	7
4367	4925	6	160	1	13
4407	4997	232	95	6	1
4408	4995	1	37	1	1
4409	4998	13	42	2	3
4410	4991	19	210	2	5
4412	4989	30	99	10	11
4395	5335	1	124	1	13
4398	5108	8	29	3	2
4402	4927	1	21	1	1
4492	5011	2	28	1	1
4418	5308	5	157	1	4
4419	5307	3	93	1	4
4422	5306	1	277	1	8
4467	5320	1	149	1	2
4587	5047	1	768	1	19
4497	5343	13	72	7	5
4498	5342	1	3	1	1
4499	5340	7	34	3	7
4507	5155	57	40	8	3

Tab. 5.3: Humanseren der deutschen Impfstudie APV 50 mit einer azellulären Pertussis Vakzine.

Zur Immunisierung gegen Pertussis wurden jeweils 25 µg PT und FHA sowie 8 µg Pertactin verwendet. Negativ bzw. nicht nachweisbar diagnostiziert sind die Erstseren, deren Wert für PT-G1 eins beträgt. Die im ELISA ermittelten Werte stammen aus einer speziellen Testmethode, entsprechen nicht den FDA-Einheiten und sind daher qualitativ zu betrachten (von König, pers. Mittlg.).

(ES = Erstserum, ZS = Zweitserum, PT-G1= IgG anti-PT-Titer im Erstserum, PT-G2 = IgG anti-PT-Titer im Zweitserum, PT-A1 = IgA anti-PT-Titer im Erstserum). Die Bezeichnungen der Seren entsprechen den innerhalb dieser Arbeit verwendeten Serenbezeichnungen.

5.1.4 Humanseren aus der Sammlung des Instituts für Infektiologie

Diese Gruppe enthält die Sammlung von Humanseren von Bärbel Raupach (1993), die im Rahmen Ihrer Promotionsarbeit verwendet wurden. Die Seren wurden ursprünglich freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wirsing von König, Städtische Krankenanstalten Krefeld. Die Seren stammen von nicht-geimpften Kindern mit positiver oder negativer Pertussis Diagnose.

Bezeichnung	Alter	Geschlecht	Diagnose	Titer (Im ELISA des Arztes)		
				IgG	IgA	IgM
S6187	5	m.	positiv	1250	50	250
S6188	18	w.	positiv	1250	50	1250
S6197	4	w.	positiv	1250	50	250
S6265	6	m.	positiv	1250	1250	1250
S6270	7	m.	positiv	1250	1250	50
S6277	5	m.	positiv	1250	50	250
S6293	5	m.	positiv	1250	1250	1250
S6391	5	w.	positiv	1250	50	250
S6420	5	w.	positiv	1250	50	250
S6512	2	m.	positiv	1250	250	250
S6698	8	w.	positiv	1250	50	250
S6700	n.b.	m.	positiv	250	50	50
S6701	13	w.	positiv	1250	250	1250
S6705	5	w.	positiv	1250	250	250
S6709	7	m.	positiv	1250	1250	50
S6719	2	?	positiv	250	50	250
S6728	9	m.	positiv	1250	50	250
S6746	5	w.	negativ	0	0	0
S6751	8	m.	positiv	1250	50	250
S6758	2	m.	negativ	0	0	0
S6763	1	w.	negativ	0	0	0
S6768	2	m.	negativ	0	0	0
S6777	2	m.	positiv	1250	50	50
S6778	n.b.	m.	negativ	0	0	0
S6780	2	m.	positiv	1250	10	250
S6781	?	w.	positiv	1250	50	50
S6782	5	m.	positiv	1250	250	50
S6784	4	m.	negativ	0	0	0

Tab. 5.4: Humanseren von nicht-geimpften Kindern mit positiver oder negativer

Pertussis Diagnose.

Sammlung und Angaben von Raupach (1993) übernommen. Die Bezeichnungen der Seren entsprechen den innerhalb dieser Arbeit verwendeten Serenbezeichnungen.

5.2 Datenbanksequenzen

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Reihe von Proteinprimärstruktur- und Kristallstrukturdaten verwendet. Mit Hilfe dieser Sequenzen wurden die beschriebenen Pepsans und Datenbankrecherchen angefertigt.

Diese Sequenzen wurden aus den auch über das Internet frei verfügbaren Datenbanken SWISSPROT, SWISSPIR und Brookhaven entnommen. Bei jeder dargestellten Sequenz ist der jeweilige Zugriffscode für den vollständigen Datensatz innerhalb der Datenbank angegeben, mit der diese Sequenz direkt identifiziert werden kann.

Im folgenden sind Auszüge aus den jeweiligen Datensätzen wiedergegeben, soweit sie für die in dieser Arbeit betrachteten Fragen relevant sind.

Auf den Ausdruck der für die hier beschriebenen Arbeiten aus den Kristallstrukturdaten von Stein *et al.* (1994) ermittelten Atomkoordinaten der Pertussis Toxin Untereinheiten wird

aufgrund des dafür erforderlichen Umfangs und der Tatsache, daß eine nichtelektronische Interpretation dieser Daten unmöglich ist, verzichtet.

Die für die Erstellung der dreidimensionalen Strukturen der einzelnen Untereinheiten von Pertussis Toxin extrahierten Daten sind über das ZMBE - Institut für Infektiologie in Münster in elektronischer Form verfügbar.

5.2.1 Sequenzen für die Pepscans von Pertussis Toxin

S1 Untereinheit - SWISSPROT: TOX1_BORPE, Zugriffscode: P04977

```

FT SIGNAL          1      34
FT CHAIN           35     269      TOXIN SUBUNIT 1.
SQ SEQUENCE        269 AA;  29974 MW;  15CFC6CD CRC32;
MRCTRAIRQT ARTGWLTLWA ILAVTAPVTS PAWADDPPAT VYRYDSRPPE DVFQNGFTAW
GNNDNVLDHL TGRSCQVGSS NSAFVSTSSS RRYTEVYLEH RMQEAVEAER AGRGTGHFIG
YIYEV RADNM FYGAASSYFE YVDTYGDNAG RILAGALATY QSEYLAHRI PPENIRRVTR
VYHNGITGET TTTEYSNARY VSQQTRANPN PYTSRRSVAS IVGTLVRMAP VIGACMARQA
ESSEMAAAS ERAGEAMVLV YYESIAYSF

```

S2 Untereinheit - SWISSPROT:TOX2_BORPE, Zugriffscode: P04978

```

FT SIGNAL          1      27
FT CHAIN           28     226      TOXIN SUBUNIT 2.
FT DISULFID        50     114
FT DISULFID       147     161
FT DISULFID       219     226
SQ SEQUENCE        226 AA;  24829 MW;  129C9F2E CRC32;
MPIDRKTLC LLSVLPLALL GSHVARASTP GIVIPPQEQI TQHGPSYGR ANKTRALTV
ELRSGDLQE YLRHVTRGWS IFALYDGYL GGEYGGVIKD GTPGGAFDLK TTFCIMTRN
TGQPATDHY SNVTATRLS STNSRLCAVF VRSGQPVIGA CTSPYDGKYW SMYSRLRML
YLIYVAGISV RVHVSKEEQY YDYEDATFET YALTGISICN PGSSLC

```

S3 Untereinheit - SWISSPROT:TOX3_BORPE, Zugriffscode: P04979

```

FT SIGNAL          1      28
FT CHAIN           29     227      TOXIN SUBUNIT 3.
FT DISULFID        51     115
FT DISULFID       148     162
FT DISULFID       220     227
SQ SEQUENCE        227 AA;  24988 MW;  FD162408 CRC32;
MLINNKKLLH HILPILVLAL LGMRTAQAVA PGIVIPPKAL FTQQGGAYGR CPNGTRALTV
AELRGNAELQ TYLRQITPGW SIYGLYDGYL LGQAYGGIIG DAPPGAGFIY RETFCITTIY
KTGQPAADHY YSKVTATRL ASTNSRLCAV FVRDQSVIG ACASPYEGRY RDMYDALRRL
LYMIYMSGLA VRVHVSKEEQ YDYEDATFQ TYALTGISLC NPAASIC

```

//

S4 Untereinheit - SWISSPROT:TOX4_BORPE, Zugriffscode: P04980

```

FT SIGNAL 1 42
FT CHAIN 43 152 TOXIN SUBUNIT 4.
FT DISULFID 73 93
FT DISULFID 145 151
SQ SEQUENCE 152 AA; 16544 MW; 7BD1134F CRC32;
MLRRFPTRTT APGQGGARRS RVRALAWLLA SGAMTHLSPA LADVPPYVLVK TNMVVTSVAM
KPYEVTPTRM LVCGIAAKLG AAASSPDAHV PFCFGKDLKR PGSSPMEVML RAVFMQQRPL
RMFLGPKQLT FEGKPALELI RMVECSGKQD CP
//

```

S5 Untereinheit - SWISSPROT:TOX5_BORPE, Zugriffscode: P04981

```

FT SIGNAL 1 34
FT CHAIN 35 133 TOXIN SUBUNIT 5.
FT DISULFID 61 75
FT DISULFID 126 132
SQ SEQUENCE 133 AA; 14500 MW; 86BEE9BF CRC32;
MQRQAGLPLK ANPMHTIASI LLSVLGIYSP ADVAGLPHTL YKNFTVQELA LKLKGNQEF
CLTAFMSGRS LVRACLSDAG HEHDTWFDTM LGFAISAYAL KSRIALTVED SPYPGTPGDL
LELQICPLNG YCE
//

```

5.2.2 Sequenzen für die Pepscans von Transferrin-bindendem Protein**TBP2 aus *N.meningitidis* Stamm B16B6 - SWISSPROT: TB22_NEIME, Zugriffscode Q06988**

```

FT SIGNAL 1 20
FT CHAIN 21 599 TRANSFERRIN-BINDING PROTEIN 2.
FT LIPID 21 21 N-ACYL DIGLYCERIDE (PROBABLE).
SQ SEQUENCE 599 AA; 65468 MW; CAD9FE77 CRC32;
MNNPLVNQAA MVLPVFLLSA CLGGGGSFDL DSVETVQDMH SKPKYEDEKS QPESQQDVSE
NSGAAYGFAV KLPRRNAHFN PKYKEKHKPL GSMDWKKLQR GEPNSFSERD ELEKKGSSSE
LIESKWEDGQ SRVVGTYNFT YVRSYVYLN KNNIDIKNNI VLFPGPDGYLY YKGKEPSKEL
PSEKITYKGT WDYVTDAMEK QRFEGLGSAA GGDKSGALSA LEEGVLRNQA EASSGHTDFG
MTSEFEVDFS DKTIKGTLYR NNRITQNNSE NKQIKTTRYT IQATLHGNRF KGKALAADKG
ATNGSHPPFIS DSDSLEGGFY GPKGEELAGK FLSNDNKVAA VFGAKQKDKK DGENAAGPAT
ETVIDAYRIT GEEFKKEQID SFGDVKKLLV DGVELSLLPS EGNKAAFQHE IEQNGVKATV
CCSNLDYMSF GKLSKENKDD MFLQGVRTVP SDVAARTEAN AKYRGTWYGY IANGTWSWGE
ASNQEGGNRA EFDVDFSTKK ISGTLTAKDR TSPAFTITAM IKDNGFSGVA KTGENGFALD
PQNTGNSHYT HIEATVSGGF YGKNAIEMGG SFSFPGNAPE GKQEKASVVF GAKRQQLVQ
//

```

TBP2 aus *N.meningitidis* Stamm M982 - SWISSPROT: TB21_NEIME, Zugriffscode Q09057

```

FT SIGNAL 1 20
FT CHAIN 21 599 TRANSFERRIN-BINDING PROTEIN 2.
FT LIPID 21 21 N-ACYL DIGLYCERIDE (PROBABLE).
SQ SEQUENCE 711 AA; 76928 MW; FA128E58 CRC32;
MNNPLVNQAA MVLPVFLLSA CLGGGGSFDL DSVDTTEAPRP APKYQDVSSE KPQAQKDQGG
YGFAMRLKRR NWYPGAESE VKLNESDWEA TGLPTKPKEL PKRQKSVIEK VETDGDSDIY
SSPYLTSPNH QNGSAGNGVN QPKNQATGHE NFQYVYSGWF YKHAASEKDF SNKKIKSGDD

```

```

GYIFYHGEKP SRQLPASGKV IYKGVWHFVT DTKKGQDFRE IIQPSKKQGD RYSGFSGDGS
EEYSNKNEST LKDDHEGYGF TSNLEVDVFN KKLTKGLIRN NASLNNNTMN DKHTTQYYSL
DAQITGNRFN GTATATDKKE NETKLHPFVS DSSSLSGGFF GPQGEELGFR FLSDDQKVAV
VGS AKTKDKL ENGAAASGST GAAASGGAAG TSSSENSKLT VLD AVELTLN DKKIKNLDNF
SNAAQLVVDG IMIPLLPKDS ESGNTQADKG KNGGTEFTRK FEHTPESDKK DAQAGTQTNG
AQTASNTAGD TNGKTKTYEV EVCCSNLNYL KYGMLTRKNS KSAMQAGGNS SQADAKTEQV
EQSMFLQGER TDEKEIPTDQ NVVYRGSWYG HIANGTSWSG NASDKEGGR AEFVNFADK
KITGKLTAEN RQAQFTTIEG MIQNGFEGT AKTAESGF DL DQKNTTRTPK AYITDAKVKG
GFYGPKA EEL GWFAYPGDK QTEKATATSS DGNSASSATV VFGAKRQQPV Q

```

//

TfbA Protein von *Helicobacter pylori*. Sequenz zur Verfügung gestellt von Katrin Strutzberg, Tiermedizinische Hochschule Hannover (Strutzberg, K. 1996)

```

MHFKLNPYAL AFTSLFLVAC SGGKGSFDLE DVRPNKTTGV SKEEYKDVET AKKEKEQLGE 60
LMEPALGYVV KVPVSSFENK KVDISDIEVI TNGNLDDVPY KANSSKYNYP DIKTKDSSLQ 120
YVRSYVIDG EHS GSNEKGY VYYKGNPAK ELPVNQLLTY TGSWDFTSNA NLNNEEGRPN 180
YLNDYYTKF IGKRVGLVSG DAKPAKHKYT SQFEVDFATK KMTGKLS DKE KTIYTVNADI 240
RGNRFTGAAT ASDKNKGKGE SYNFFSADSQ SLEGGFYGPK AEEMAGKFVA NDKSLFAVFS 300
AKHNGSNVNT VRIIDASKID LTNFSISELN NFGDASVLII DGKKIKLAGS GFTNKHTIEI 360
NGKTMVAVAC CSNLEYMKFG QLWQQAEGGK PENNSLFLQG ERTATDKNPK GGNKYIGTW 420
DAQVSKENNW VATADDDRKA GYRTEFDVDF GNKNLSGKLF DKNGVNPVFT VDAKIDGNGF 480
TGKAKTSDEG FALDSGSSRY ENVKFNDVAV SGGFYGPTAA ELGGQFHHKS ENGSVGAVFG 540
AKQVKK 547

```

5.2.3 BLASTP-Suche nach Sequenzen mit Homologie zum C-terminalen α -G₁₃ Peptid

Innerhalb dieser Arbeit wurden BLASTP-Homologiesuchen (Altschul *et al.* 1990) mit den C-terminalen 12 und 16meren von α -G₁₃ durchgeführt, um weitere, potentielle Pertussis Toxin-Substrate zu finden. Dabei wurde als zuvor nicht bekannte Zielsequenz der C-Terminus der α Untereinheit von G_n, einem G-Protein aus Schafen, ermittelt. Sein C-terminales 16mer zeigte im Experiment eine sehr hohe ADP-Ribosylierungseffizienz.

Sequenz von α -G_n - SWISSPIR Eintrag und Zugriffscode: B25888

```

probable GTP-binding regulatory protein Gh alpha chain - bovine
(fragment)
C;Species: Bos primigenius taurus (cattle)
C;Date: 16-Aug-1988 #sequence_revision 16-Aug-1988 #text_change 12-Apr-
1995
C;Accession: B25888
R;Michel, T.; Winslow, J.W.; Smith, J.A.; Seidman, J.G.; Neer, E.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7663-7667, 1986
A;Title: Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the GTP-
binding protein alpha-i and identification of a related protein, alpha-h.
A;Reference number: A94131; MUID:87017009
A;Accession: B25888
A;Status: not compared with conceptual translation
A;Molecule type: mRNA
A;Residues: 1-104
C;Superfamily: GTP-binding regulatory protein Gs alpha chain
>B25888
VPANDSAAYY LNDLERIAQS DYIPTQQDVL GTRVKTGTGIV KTHFTFKDLH
FKMFDVGGHG SERKKWIHCF EGVTAIIFCV ALSAYDLVLT DVIKNNLRN
CGLF

```

5.3 BLASTP-Recherchen nach Sequenzhomologien zu den auf den Pertussis Toxin Untereinheiten S1 bis S5 gefundenen immunodominanten, linearen Epitopen

In dieser Arbeit wurden innerhalb der 5 Untereinheiten von Pertussis Toxin mit Hilfe von Pepscans insgesamt 18 lineare Epitope identifiziert, die eine charakteristische Erkennung durch Seren von geimpften und rekonvaleszenten Patienten zeigen.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob diese Reaktionen ggf. auch auf Kreuzreaktionen mit Epitopen anderer, bereits bekannter Virulenzfaktoren bzw. Peptidsequenzen beruhen könnten, wurde für jedes dieser Epitope eine BLASTP-Recherche gegen die SWISSPROT- und SWISSPIR-Datenbank durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Recherchen sind hier wiedergegeben.

Eine Vielzahl homologer Sequenzen außerhalb der Gattung *Bordetella* wurde nur für das Epitop S1/1 gefunden. Alle anderen Epitope zeigten ausschließlich Homologien innerhalb der Gattung *Bordetella*, so daß sich hier kein Hinweis auf potentiell kreuzreagierende Proteinsequenzen ergibt.

Das Ergebnis für die BLASTP-Recherche ist nur für das Epitop S1/1 angegeben, da für die anderen Epitope ausschließlich Sequenzen innerhalb der Gattung *Bordetella* gefunden wurden. Die verwendeten Parameter waren mit Ausnahme der zu vergleichenden Epitopsequenzen identisch.

BLASTP-Suche gegen das Epitop S1/1

BLASTP 1.4.11 [24-Nov-97] [Build 24-Nov-97]

Reference: Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-10.

Query= Peptidsequenz aus PTX S1 Pos 7-18 (codierender Bereich)
(14 letters)

Database: Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPupdate+PIR
292,459 sequences; 87,789,635 total letters.

Searching.....done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
pdb 1PRT A	Bordetella pertussis >pdb 1PRT G Bor...	78	0.0019	1
pir WEBR11	pertussis toxin chain S1 precursor (...)	78	0.0019	1
pdb 1PTO A	Bordetella pertussis >pdb 1PTO G Bor...	78	0.0019	1
pir A25973	pertussis toxin chain S1 precursor -...	78	0.0019	1
pir B25973	pertussis toxin chain S1 precursor -...	78	0.0019	1
gi 39770	(X16347) toxin S1 subunit (AA 1-269)...	78	0.0019	1
sp P04977 TOX1_BORPE	PERTUSSIS TOXIN SUBUNIT 1 (S1) PRECU...	78	0.0019	1
pdb 1BCP A	Bordetella pertussis >pdb 1BCP G Bor...	78	0.0019	1
pir JE0062	core protein VP3 - bluetongue virus ...	50	1.000000	1
pdb 1XTC A	Vibrio cholerae	49	1.000000	1
prf 1001196A	toxin, cholera [Vibrio cholerae]	49	1.000000	1
gnl PID di006852	(D30052) cholera toxin [Vibrio chole...	49	1.000000	1
sp P01555 CHTA_VIBCH	CHOLERA ENTEROTOXIN, A CHAIN PRECURS...	49	1.000000	1
gi 48348	(X00171) ctx A [Vibrio cholerae]	49	1.000000	1
gi 155160	(K02679) enterotoxin prepeptide [Vib...	49	1.000000	1
pir S73790	hypothetical protein A19_orf591 - My...	48	1.000000	1
sp P33474 VP3_EHDVA	VP3 CORE PROTEIN >pir A43969 core p...	47	1.000000	1
sp P27281 VP3_EHDV1	VP3 CORE PROTEIN >pir P3XREH core p...	47	1.000000	1
pdb 1HTL A	Escherichia coli	47	1.000000	1
pdb 1LTB A	Escherichia coli >pdb 1LTS A Escheri...	47	1.000000	1
pir QLECA	heat-labile enterotoxin chain A prec...	47	1.000000	1
sp P43530 ELAH_ECOLI	HEAT-LABILE ENTEROTOXIN A CHAIN PREC...	47	1.000000	1
sp P06717 ELAP_ECOLI	HEAT-LABILE ENTEROTOXIN A CHAIN PREC...	47	1.000000	1
pir I55231	heat-labile enterotoxin A precursor ...	47	1.000000	1
bbs 131494	(S60731) heat-labile enterotoxin A s...	47	1.000000	1
pdb 1LTA A	Escherichia coli	47	1.000000	1
pdb 1LT4 A	Escherichia coli	47	1.000000	1
pdb 1LTI A	Escherichia coli	47	1.000000	1
gi 147191	(M61015) heat-labile enterotoxin [Es...	47	1.000000	1
pdb 1LT3 A	Escherichia coli	47	1.000000	1
gi 148532	(M57244) heat-labile enterotoxin sub...	47	1.000000	1
pir S27514	mosquitocidal toxin 21 - Bacillus sp...	46	1.000000	1
gi 2407262	(AF017281) inner core protein VP3 [B...	45	1.000000	1
gi 2407260	(AF017280) inner core protein VP3 [B...	45	1.000000	1
bbs 168194	(S78452) VP3 core protein [bluetongu...	45	1.000000	1
gi 438516	(L19969) inner capsid protein [Bluet...	45	1.000000	1
gi 438514	(L19968) inner capsid protein [Bluet...	45	1.000000	1
gi 438512	(L19967) inner capsid protein [Bluet...	45	1.000000	1
sp P03539 VP3_BT17	VP3 CORE PROTEIN >pir P3XR17 core p...	45	1.000000	1
sp P12435 VP3_BT10	VP3 CORE PROTEIN >pir S07419 core p...	45	1.000000	1

>pdb|1PRT|A Bordetella pertussis >pdb|1PRT|G Bordetella pertussis
Length = 234

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 6 VYRYDSRPPEDVFQ 19

>pir||WEBR11 pertussis toxin chain S1 precursor (version 1) - Bordetella
pertussis
Length = 268

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 41 VYRYDSRPPEDVFQ 54

>pdb|1PTO|A Bordetella pertussis >pdb|1PTO|G Bordetella pertussis
Length = 244

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 16 VYRYDSRPPEDVFQ 29

>pir||A25973 pertussis toxin chain S1 precursor - Bordetella bronchiseptica
Length = 269

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 41 VYRYDSRPPEDVFQ 54

>pir||B25973 pertussis toxin chain S1 precursor - Bordetella parapertussis
Length = 269

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 41 VYRYDSRPPEDVFQ 54

>gi|39770 (X16347) toxin S1 subunit (AA 1-269) [Bordetella pertussis]
Length = 269

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 41 VYRYDSRPPEDVFQ 54

>sp|P04977|TOX1_BORPE PERTUSSIS TOXIN SUBUNIT 1 (S1) PRECURSOR
(ISLET-ACTIVATING PROTEIN) (IAP) (NAD-DEPENDENT
ADP-RIBOSYLTRANSFERASE >pir||WEBR1P pertussis toxin chain S1
precursor (version 2) - Bordetella pertussis >gi|144062 (M13223)
pertussis toxin S1 subunit precursor [Bordetella pertussis]

>gi|144071 (M14378) pertussis toxin subunit 1 [Bordetella
pertussis]
Length = 269

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 41 VYRYDSRPPEDVFQ 54

>pdb|1BCP|A Bordetella pertussis >pdb|1BCP|G Bordetella pertussis
Length = 235

Score = 78 (36.2 bits), Expect = 0.0019, P = 0.0019
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
VYRYDSRPPEDVFQ
Sbjct: 7 VYRYDSRPPEDVFQ 20

>pir||JE0062 core protein VP3 - bluetongue virus (serotype 1, isolate
Australia)
Length = 901

Score = 50 (23.2 bits), Expect = 16., P = 1.0
Identities = 8/11 (72%), Positives = 10/11 (90%)

Query: 4 YDSRPPEDVFQ 14
YD+RPP+DV Q
Sbjct: 786 YDARPPDDVLQ 796

>pdb|1XTC|A Vibrio cholerae
Length = 194

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
+YR DSRPP+++ Q
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEIKQ 18

>prf||1001196A toxin, cholera [Vibrio cholerae]
Length = 382

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
+YR DSRPP+++ Q
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEIKQ 36

>gnl|PID|d1006852 (D30052) cholera toxin [Vibrio cholerae]
Length = 258

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
+YR DSRPP+++ Q
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEIKQ 36

```

>sp|P01555|CHTA_VIBCH CHOLERA ENTEROTOXIN, A CHAIN PRECURSOR
(NAD(+)--DIPHTHAMIDE ADP-RIBOSYLTRANSFERASE) >pir||XVCA cholera
enterotoxin chain A precursor - Vibrio cholerae >gi|48421 (X58786)
cholera toxin A protein (CTA) [Vibrio cholerae] >gi|48889 (X58785)
cholera toxin A protein (CTA) [Vibrio cholerae] >gnl|PID|d1006854
(D30053) cholera toxin [Vibrio cholerae]
Length = 258

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query:      1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
            +YR DSRPP+++ Q
Sbjct:     23 LYRADSRRPPDEIKQ 36

>gi|48348 (X00171) ctx A [Vibrio cholerae]
Length = 258

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query:      1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
            +YR DSRPP+++ Q
Sbjct:     23 LYRADSRRPPDEIKQ 36

>gi|155160 (K02679) enterotoxin prepeptide [Vibrio cholerae]
Length = 212

Score = 49 (22.7 bits), Expect = 21., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 12/14 (85%)

Query:      1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
            +YR DSRPP+++ Q
Sbjct:     23 LYRADSRRPPDEIKQ 36

>pir||S73790 hypothetical protein A19_orf591 - Mycoplasma pneumoniae (SGC3)
(ATCC 29342) >gi|1674154 (AE000046) Mycoplasma pneumoniae,
A19_orf591 Protein [Mycoplasma pneumoniae]
Length = 591

Score = 48 (22.3 bits), Expect = 30., P = 1.0
Identities = 8/14 (57%), Positives = 11/14 (78%)

Query:      1 VYRYDSRPPEDVFQ 14
            VYR D R PE++F+
Sbjct:      8 VYRVDLRSPEEIFE 21

>sp|P33474|VP3_EHDVA VP3 CORE PROTEIN >pir||A43969 core protein VP3 - epizootic
hemorrhagic disease virus (type 2, strain Australia) >bbs|68012
(S68010) VP3=inner capsid protein [epizootic haemorrhagic disease
of deer virus EHDV, Australian serotype 2, Peptide, 899 aa]
[Epizootic hemorrhagic disease of deer virus]
Length = 899

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/11 (63%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +DSRPPE++ Q
Sbjct:     784 FDSRPPEEILQ 794

```

>sp|P27281|VP3_EHDV1 VP3 CORE PROTEIN >pir||P3XREH core protein VP3 - epizootic hemorrhagic disease virus (type 1) >gi|323736 (M76616) VP3 protein [Epizootic hemorrhagic disease virus type 1]
Length = 899

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/11 (63%), Positives = 10/11 (90%)

Query: 4 YDSRPPEDVFQ 14
+DSRPPE++ Q
Sbjct: 784 FDSRPPEEILQ 794

>pdb|1HTL|A Escherichia coli
Length = 191

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRRPDEI 16

>pdb|1LTB|A Escherichia coli >pdb|1LTS|A Escherichia coli >pdb|1LTT|A Escherichia coli
Length = 185

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 2 LYRADSRRPDEI 13

>pir||QLECA heat-labile enterotoxin chain A precursor - Escherichia coli >gi|41340 (V00275) enterotoxin subunit A [Escherichia coli]
Length = 254

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRRPDEI 34

>sp|P43530|ELAH_ECOLI HEAT-LABILE ENTEROTOXIN A CHAIN PRECURSOR (LT-A, HUMAN) (LTH-A)
Length = 258

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRRPDEI 34

>sp|P06717|ELAP_ECOLI HEAT-LABILE ENTEROTOXIN A CHAIN PRECURSOR (LT-A, PORCINE) (LTP-A) >gi|148334 (M15361) Heat labile toxin subunit A precursor [Plasmid ENT] >gi|148338 (M15362) Heat-labile toxin subunit A precursor [Plasmid ENT] >gi|150459 (M35581) heat-labile enterotoxin subunit A [Plasmid P307]
Length = 258

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEI 34

>pir||I55231 heat-labile enterotoxin A precursor - Escherichia coli >gi|148028
(K01995) heat-labile enterotoxin A prepeptide [Escherichia coli]
Length = 258

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEI 34

>bbs|131494 (S60731) heat-labile enterotoxin A subunit, LTc A subunit
[Escherichia coli, 21d, Peptide, 258 aa] [Escherichia coli]
Length = 258

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEI 34

>pdb|1LTA|A Escherichia coli
Length = 188

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEI 16

>pdb|1LT4|A Escherichia coli
Length = 247

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEI 16

>pdb|1LTI|A Escherichia coli
Length = 192

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEI 16

>gi|147191 (M61015) heat-labile enterotoxin [Escherichia coli]
Length = 40

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 23 LYRADSRPPDEI 34

>pdb|1LT3|A Escherichia coli
Length = 240

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEI 16

>gi|148532 (M57244) heat-labile enterotoxin subunit A [Plasmid EWD 299]
Length = 240

Score = 47 (21.8 bits), Expect = 41., P = 1.0
Identities = 7/12 (58%), Positives = 11/12 (91%)

Query: 1 VYRYDSRPPEDV 12
+YR DSRPP+++
Sbjct: 5 LYRADSRPPDEI 16

>pir||S27514 mosquitocidal toxin 21 - Bacillus sphaericus >gi|143205 (M60446)
mosquitocidal toxin [Bacillus sphaericus]
Length = 870

Score = 46 (21.3 bits), Expect = 56., P = 1.0
Identities = 7/11 (63%), Positives = 9/11 (81%)

Query: 3 RYDSRPPEDVDF 13
R+D RPP D+F
Sbjct: 97 RWDRRPPNDIF 107

>gi|2407262 (AF017281) inner core protein VP3 [Bluetongue virus]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query: 4 YDSRPPEDVDFQ 14
+D+RPP+D+ Q
Sbjct: 786 FDARPPDDILQ 796

>gi|2407260 (AF017280) inner core protein VP3 [Bluetongue virus]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query: 4 YDSRPPEDVDFQ 14
+D+RPP+D+ Q
Sbjct: 786 FDARPPDDILQ 796

>bbs|168194 (S78452) VP3 core protein [bluetongue virus BTV 2, Ona-A, serotype
2, Peptide, 901 aa] [Bluetongue virus 2]

```
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796

>gi|438516 (L19969) inner capsid protein [Bluetongue virus 13]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796

>gi|438514 (L19968) inner capsid protein [Bluetongue virus 11]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796

>gi|438512 (L19967) inner capsid protein [Bluetongue virus 2]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796

>sp|P03539|VP3_BTV17 VP3 CORE PROTEIN >pir||P3XR17 core protein VP3 -
bluetongue virus >gi|210861 (K02369) P3 protein [Bluetongue virus]
>gi|323171 (M32722) major core protein P3 [Bluetongue virus]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796

>sp|P12435|VP3_BTV10 VP3 CORE PROTEIN >pir||S07419 core protein P3 - bluetongue
virus (serotype 10) >gi|210863 (M22096) VP3 protein [Bluetongue
virus]
Length = 901

Score = 45 (20.9 bits), Expect = 77., P = 1.0
Identities = 6/11 (54%), Positives = 10/11 (90%)

Query:      4 YDSRPPEDVFQ 14
            +D+RPP+D+ Q
Sbjct:     786 FDARPPDDILQ 796
```

Parameters:

V=100
B=100
H=0
E=100

Lambda	K	H
0.321	0.145	0.456

Cutoff to enter 2nd pass: ≥ 33 (0.0 bits)

E	S	T1	T2	X1	X2	W	Gap		
100.0		47	11	11	-16		-22	40	50

Database: Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPupdate+PIR
Posted date: Mar 1, 1998 5:48 AM
of letters in database: 87,789,635
of sequences in database: 292,459

Number of Hits to DB: 1st pass: 3069160, 2nd pass: 11111
Number of Sequences: 1st pass: 292459, 2nd pass: 322
Number of extensions: 1st pass: 17966, 2nd pass: 6812
Number of successful extensions: 1st pass: 322, 2nd pass: 1059
Number of sequences better than 100: 40

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur- und Funktionsanalyse von Pertussis Toxin (PT), einem der Hauptvirulenzfaktoren des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*. Als neues methodisches Verfahren wurden für die Untersuchungen C-terminal an Cellulose fixierte Peptide eingesetzt.

Um die Grundlage für die Durchführung dieser Arbeit zu schaffen, mußte zunächst die Spotsynthese von Peptiden auf Cellulosefiltern etabliert und optimiert werden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde eine Methode zur einfachen, (semi-)quantitativen Auswertung von Farbreaktionen auf festen Oberflächen entwickelt. Mit diesen Techniken wurden die hier beschriebenen Untersuchungen an PT durchgeführt und darüber hinaus im Rahmen von Kooperationen und weiterführenden Arbeiten zusätzliche Anwendungsbereiche für die Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen aufgezeigt.

Es gelang in dieser Arbeit mit Hilfe von Pepscans von PT und humanen Antiseren ein Vielzahl immunodominanter, linearer, humaner Epitope innerhalb der fünf Untereinheiten von PT zu detektieren sowie die Lage dieser Determinanten innerhalb der dreidimensionalen Kristallstruktur von Pertussis Toxin zu bestimmen und abzubilden.

Dabei wurde festgestellt, daß die humane Reaktion eines geimpften Patienten sich in der Epitoperkennung nur geringfügig von der Erkennung nach einer natürlichen Infektion unterscheidet.

Auf jeder Untereinheit von PT existiert mindestens ein immunodominant erkanntes, lineares humanes Epitop. Neben der enzymatisch aktiven S1 Untereinheit werden insbesondere die eine Aufnahme in Zielzellen vermittelnden S2 und S3 Untereinheiten durch humane Antiseren erkannt. Von den immunodominanten Epitopen auf diesen Untereinheiten werden die lektinähnlichen Bindungsstellen für Sialinsäurereste der die Bindung an Zielzellen vermittelnden Glycoproteine abgedeckt.

Die Projektion der Epitope auf die Kristallstruktur von PT hat gezeigt, daß auf den Untereinheiten zum Teil auch strukturelle, immunodominante Bereiche existieren, die von polyklonalen Antiseren kumulativ erkannt werden.

Ebenso konnte durch diese Projektion gezeigt werden, daß im Pepscan detektierte, scheinbar lineare Epitope tatsächlich aus mehreren Teilepitopen bestehen können, die in der dreidimensionalen Struktur deutlich voneinander abgesetzt an der Oberfläche des Moleküls präsentiert werden.

In Vergleichen der von humanen Antiseren erkannten Epitope mit Sequenzen aller bekannten Proteine und Proteinfragmente wurde gezeigt, daß - mit einer Ausnahme - alle detektierten Epitope spezifisch für PT sind und daher zuverlässig einen zurückliegenden Kontakt des Immunsystems mit diesem Toxin detektieren. Da außer *B.pertussis* kein weiterer bekannter Organismus das PT exprimiert, weist diese Reaktion eindeutig entweder auf eine zurückliegende Infektion mit diesem Pathogen oder auf vorhergehende Immunisierung hin.

Die hier gewonnenen Informationen bilden somit eine wichtige Grundlage für die Entwicklung hochspezifischer serologischer Tests, die das Risiko falschpositiver Diagnosen weitgehend ausschließen können.

Weiterhin sind mit der Detektion der linearen humanen Epitope nunmehr die Peptidsequenzen bekannt, die als Basis für die Entwicklung epitopbasierter Kombinationsvakzinen in Betracht gezogen werden können.

Neben der Detektion von Antikörperreaktion mit C-terminal verankerten Peptiden wurde dieses Verfahren hier erstmals zur Untersuchung von Enzym-Substrat Reaktionen eingesetzt. Die Darstellung von Cellulose fixierten Peptid-Feldern (Peptid-Arrays) bzw. Peptid-Bibliotheken zur Analyse der Einflüsse von Sequenzaustauschen in Substraten wurde erstmals am Beispiel der ADP-Ribosylierung von Peptiden durch PT angewendet.

In Untersuchungen an den von nativen α Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine abgeleiteten C-terminalen Zielsequenzen von PT wurde gezeigt, daß PT bereits Peptide mit einer Länge von 11 Aminosäuren spezifisch erkennt und modifiziert.

Die erhebliche Steigerung der Zielsequenzerkennung bei der Verwendung größerer Peptidsubstrate macht deutlich, daß auch strukturelle Faktoren „oberhalb“ der ADP-Ribosylierungsstelle deutlichen Einfluß auf Erkennung und Modifikation ausüben.

Mit der α -G_n Sequenz wurde ein neues Substrat von PT detektiert, das im Vergleich mit allen bisher bekannten Zielsequenzen erheblich effizienter erkannt und modifiziert wird.

Durch gezielte Austausche von Aminosäurepositionen in Zielsequenzen für die ADP-Ribosylierung wurde gezeigt, daß „natürliche“ Zielsequenzen nicht optimal von PT erkannt werden und Einzelpositionsaustausche einen negativen und gleichfalls an einigen speziellen Positionen einen erheblich steigernden Einfluß auf die ADP-Ribosylierungseffizienz haben können.

Daraus ergibt sich, daß die systematische Suche nach einem PT Hypersubstrat aufgenommen werden kann. Wenn es gelingt ein Substrat zu finden, daß zwar optimal erkannt und von PT gebunden wird, jedoch durch Austausch des Cysteins an der Position -4 nicht umgesetzt werden kann, steht damit möglicherweise ein PT Inhibitor mit therapeutischer Relevanz zur Verfügung.

7 Veröffentlichungen und wissenschaftliche Beiträge

Im folgenden sind die im Zusammenhang mit den hier beschriebenen eigenen Arbeiten und Kooperationen entstandenen Veröffentlichungen und wissenschaftlichen Beiträge aufgeführt.

7.1 Veröffentlichungen

- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1995) Identification of binding proteins for Pertussis toxin on pancreatic β cell-derived insulin-secreting cells. *Microb. Pathogen.* **18**: 173-185
- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robenek, H. und Schmidt, M.A. (1997) Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur. J. Cell Biol.* **73**: 40-48
- el Bayâ, A., Linnemann, R. von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt M.A. (1997) Pertussis toxin: entry into cells and enzymatic activity. In: Haag, F. und Koch-Nolte, F. (Hrsg.) ADP-ribosylation in animal tissues: structure, function, and biology of mono (ADP-ribosyl) transferases and related enzymes. *Adv. Exp. Med. and Biol.* **419**: 83-86
- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1997) Binding of pertussis toxin (PT) to eucaryotic target cells and evidences for retrograde transport of PT. In: Frandsen et al. Bacterial Protein Toxins. *Zbl. Bakt. Suppl.* **28**: 97-98
- Renaud-Mongenie, G., Poncet, D., von Olleschik-Elbheim, L. Cournez, T. Mignon, M. Schmidt, M.A. und Quentin-Millet, M.J. (1997) Identification of human transferrin-binding sites within meningococcal transferrin-binding protein B. *J. Bacteriol.* **179**: 6400-6407
- Strutzberg, K., von Olleschik, L., Franz, B., Pyne, C., Schmidt, M.A. und Gerlach, G.-F. (1995) Mapping of functional regions on the transferrin-binding protein (TfB) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**: 3846-38
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1996) Quantification of immunological membrane reactions employing a digital desk top scanner and standard graphics software. *J. Immun. Methods* **197**: 181-186
- von Olleschik-Elbheim, L. el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1996) Membrane anchored synthetic peptides for the structure-function analysis of pertussis toxin: Recognition of G-protein domains and mapping of human B-cell epitopes. In: Frandsen *et al.* Bacterial Protein Toxins, *Zbl. Bakt. Suppl.* **28**: 365-366
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1997) Membrane anchored synthetic peptides as a tool for structure-function analysis of pertussis toxin and its target proteins. In: Haag, F. und Koch-Nolte, F. (Hrsg.) ADP-Ribosylation in Animal Tissues: structure, function, and biology of mono (ADP-ribosyl) transferases and related enzymes. *Adv. Exp. Med. and Biol.* **419**: 87-91
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M. A. (1998) Eine Methode zur einfachen Quantifizierung trägergebundener Signale. *Biospektrum* **5**: 37-39
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1998) Membrane anchored synthetic peptide arrays for the dissection of α -Gi-Protein acceptor sites for ADP-ribosylation by pertussis toxin, eingereicht

7.2 Vorträge und Poster

- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1994) Pertussis Toxin-Rezeptoren auf Inselzellen des Pankreas. 1. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ der Fachgruppen für Mikrobielle Pathogenität der DGHM und VAAM, Burg Rothenfels, 11. - 13.11.1994 (Vortrag)

- el Bayâ, A. Linnemann, R. von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1995) Retrograde transport of pertussis toxin into eucaryotic target cells. 47. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Würzburg, 3. - 7. 10. 1995 (Vortrag)
- el Bayâ, A. Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1995) Bindung des Pertussis Toxins an Zielzellen und Aufnahme der enzymatisch aktiven Untereinheit S1. Workshop der Fachgruppen „Mikrobielle Pathogenität“ der DGHM und VAAM „Endotoxine und Exotoxine als bakterielle Pathogenitätsfaktoren“, Borstel, 27. - 29.4.1995 (Poster)
- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1995) Pertussis toxin binding proteins on islet cells and translocation in target cells. Seventh european workshop conference on bacterial protein toxins. Hindsgavl, Dänemark, 2. - 7. 7. 1995 (Poster)
- el Bayâ, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1995) Identification of receptor proteins for pertussis toxin on pancreatic β cell-derived insulin secreting cells. 95th general meeting of the ASM, Washington D.C., USA, April 1995 (Poster)
- el Bayâ, A. Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L. und M. Alexander Schmidt (1996) Pertussis toxin: entry into cells and enzymatic activity. International workshop: „Biological significance of mono-ADP-ribosylation in animal tissues.“ Hamburg-Blankenese, 19. - 23. 5. 1996 (Kurzvortrag, Poster)
- Frey, A., Externest, D., von Olleschik-Elbheim, L. und Schmidt, M.A. (1997) Comparison of the B cell epitope recognition after mucosal and systemic immunization of BALB/C mice with soluble ovalbumin. 9th international congress of mucosal immunology, Sydney, Australien (Poster)
- Strutzberg, K., L. von Olleschik B. Franz, C. Pyne, Ma. Schmidt und G-F. Gerlach (1995) Kartierung des funktionellen Bereiches eines Transferin bindenden Proteins von *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 47. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Würzburg, 3. - 7.10.1995 (Vortrag, Poster)
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1994) Charakterisierung linearer humaner B-Zell Epitope in der Aminosäuresequenz der Pertussis Toxin Untereinheiten S1 - S5. 1. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ der Fachgruppen für Mikrobielle Pathogenität der DGHM und VAAM, Burg Rothenfels, 11. - 13.11.1994 (Poster)
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1995) Characterization of linear human B-cell epitopes in the aminoacid sequence of pertussis toxin subunits S1 - S5. Seventh european workshop conference on bacterial protein toxins. Hindsgavl, Dänemark, 2. - 7. 7.1995 (Poster)
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1995) Charakterisierung linearer humaner B-Zell Epitope in der Aminosäuresequenz der Pertussis Toxin Untereinheiten S1 - S5. Workshop der Fachgruppen „Mikrobielle Pathogenität“ der DGHM und VAAM „Endotoxine und Exotoxine als bakterielle Pathogenitätsfaktoren“, Borstel, 27. - 29.4.1995 (Poster)
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A., und Schmidt, M.A. (1995) Synthetische, matrixfixierte Peptide inhibitorischer G-Proteine als Akzeptoren für die ADP-Ribosylierung durch Pertussis Toxin. 47. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Würzburg, 3. - 7. 10. 1995 (Vortrag)
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1996) Membrane-anchored synthetic peptides as a tool for structure-function analysis of pertussis toxin and its target proteins. International Workshop: „Biological significance of mono-ADP-ribosylation in animal tissues.“ Hamburg-Blankenese, 19. - 23. 5. 1996 (Kurzvortrag, Poster)

8 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- Arnon, R., and M.H.V. van Regenmortel. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* **6**: 3265-3274
- Arnott, S. and A.J. Wonacott. 1966. Atomic coordinates for an alpha-helix: refinement of the crystal structure of alpha-poly-L-alanine. *J. Mol. Biol.* **21**: 371-383
- Arnott, S., S.D. Dover, and A. Elliott. 1967. Structure of beta-poly-L-alanine: refined atomic co-ordinates for an anti-parallel beta-pleated sheet. *J. Mol. Biol.* **30**: 201-208
- Askelöf, P., K., Rodmalm, G. Wrangsell, U. Larsson, Svenson, S.B., Cowell, J.L., Undén, A., Bertfai, T.(1990) Protektive immunogenicity of two synthetic peptides selected from the amino acid sequence of Bordetella pertussis toxin subunit S1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 1347-1351
- Avigan, J., J.J. Murtagh, Jr., L.A. Stevens, C.W. Angus, J. Moss, and M. Vaughan. 1992. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G(o) alpha with mutations at the carboxyl terminus. *Biochemistry* **31**: 7736-7740
- Barbieri, J.T. und Cortina, G. (1988) ADP-ribosyltransferase mutations in the catalytic S-1 subunit of pertussis toxin. *Infect. Immun.* **56**: 1934-1941
- Barbieri, J.T., Armellini, D., Molkentin, J., und Rappuoli, R. (1992) Construction of a Diphteria Toxin A Fragment-C180 Peptide Fusion Protein Wich Elicits a Neutralizing Antibody Response against Diphteria Toxin and Pertussis Toxin. *Infect. Immun.* **60**: 5071-5077
- Bergquist, S.O., Bernander, S. Dahnsjo, H. und Sundelof B. (1987) Erythromycin in the treatment of pertussis: A study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**: 458-461
- Bolag, U. und Matter, L. (1992) Pertussis in der Praxis - Kritische Betrachtung von Diagnose und Epidemiologie. *Schweiz. med. Wschr.* **12**: 1530-1535
- Bordet, J.O. Gengou, O. (1908) Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur Paris* **20**: 731-741
- Boucher, P., Sato, H. Sato, Y und Locht, C. (1994) Neutralizing antibodies and immunoprecipitation against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect. Immun.* **62**: 449-456
- Cherry, J.D., Baraff, L.J. und Hewlett, E. (1989) The past, present and future of pertussis - the role of adults in epidemiology and future control. *West. J. Med.* **150**: 319-328
- Chou, P. Y. und G.D. Fasman, G.D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 251-276
- Clapham, D. E., und Neer, E.J. (1993) New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406
- Clark, M., Cramer III, R.D. und van Opdenbosch, N. (1989) Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *J. Comp. Chem.* **10**: 982-1012
- Codina, J., A. Yatani, D. Grenet, A.M. Brown, und L. Birnbaumer. (1987) The α subunit of the GTP binding protein Gk opens atrial potassium channels. *Science* **236**: 442-445
- Coleman, D. E., Berghuis, A.M., Lee, E. Linder, M.E. Gilman, A.G. und Sprang, S.R. (1994) Structures of active conformations of $G_i\alpha_1$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**: 1405-1412
- Cone, T.C. Jr. (1970) Whooping cough is first described as a disease *sui generis* by Baillou in 1640. *Pediatrics* **46**: 522

- Conklin, B. R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D. und H.R. Bourne. (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of $G_q\alpha$ to that of $G_i\alpha$. *Nature* **363**: 274-276
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M und Orcutt, B.C. (1976) A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M.O. (Hrsg.) Atlas of Protein Sequence and Structure. Natl. Biomed. Res. Found, Washington, 345-352
- de Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A. und Campbell, K.P. (1997) Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* **385**: 446-450
- Denker, B.M., Neer, E.J. und Schmidt, C.J. (1992) Mutagenesis of the amino terminus of the α subunit of the G protein G_O . *J. Biol. Chem.* **267**: 6272-6277
- Donavan, R.S., Robinson, C.W. und Glick, B.R. (1994) Detection enhancement of computer images of bands from western blots using a grayscale scanner. *BioTechniques* **17**: 660-661
- Dratz, E. A., Furstenau, J.E., Lambert, C.G., Thireault, D.L., Rarick, H.Schepers, T., Pakhlevaniants, S. und Hamm, H.E. 1993. NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide. *Nature* **363**: 276-281
- Durbin, W.A. (1992) *Bordetella*. In: Gorbach, S.L., Bartlett, J.G. und Blacklow, N.R. (Hrsg.) Infectious diseases, Saunder Company, Philadelphia, 1538-1543
- Edwards, K. M., Decker, M.D., Graham, B.S., Mezzatesta, J., Scott, J. und Hackell, J. (1993) Adult immunization with azellular pertussis vaccine. *JAMA* **269**: 53-56
- el Bayâ, Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robeneck, H. und Schmidt, M.A. (1997) Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur. J. Cell. Biol.* **73**: 40-48
- Finger, H. und von König, W. (1992) Azelluläre Pertussisvakzinen. *Immun. Infekt.* **20**: 188-191
- Finger, H. und von König, W. (1996) Der Keuchhusten - eine Toxikose? *DMW* **111**: 950-954
- Frank, D.W. und Parker, C.D. (1984) Isolation and characterisation of monoclonal antibodies to *B. pertussis*. *J. Biol. Stand.* **12**: 353-365
- Frank, R. (1992) Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**: 9217-9232
- Frank R. und Overwin, H. (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods. Mol. Biol.* **66**: 149-169
- Freismuth, M., Casey, P.J. und Gilman, A.G. (1989) G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB* **3**: 2125-2131
- Freissmuth, M., und Gilman, A.G. (1989) Mutations of $G_s\alpha$ designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins. Substitutions at ARG187 result in loss of GTPase activity. *J. Biol. Chem.* **264**: 21907-21914
- Friedman, R.L, Nordensson, K., Wilson, L. Akporiaye, E.T. und Yocim, D.E. (1992) Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **60**: 4578-4585
- Gierschick, P. (1992) ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **175**: 69-96
- Goodnow, R.A. (1980) Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* **44**: 722-738

- Graf, R., J. Codina, and L. Birnbaumer. 1992. Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins. *Mol. Pharmacol.* **42**: 760-764
- Griffiths, R. (1988) Efficacy of whole-cell pertussis vaccine. In: Wardlaw, A.C. und Parton, R. (Hrsg.): Pathogenesis and immunity in pertussis. Wiley & Sons, Chichester, 223-238
- Grün, M. (1997) Identifikation und Charakterisierung funktioneller Domänen Transferrin-bindender Proteine (Tbps) von *Neisseria meningitidis*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- Halperin, S.A., Bortolussi, R., Kasina, A. und Wort, A.J. (1990) Use of a chinese hamster ovary cell cytotoxicity assay for the rapid diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microb.* **28**: 32-38
- Hamm, H. E., Deretic, D., Arendt, A., Hargrave, P.A. Koenig, B. und Hoffmann, K.P. (1988) Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the a subunit. *Science* **241**: 832-835
- Hazes, B., Boodhoo, A., Cockle, S.A., Read, R.J. (1996) Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor. *J. Mol. Biol.* **258**: 661-671
- Hewlett, E.L., Sauer, K.T., Myers, G.A., Cowell, J.L. und Guerrant, R.L. (1983) Induction of a new morphological response in chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect. Immun.* **40**: 1198-1203
- Howson, C.P., Howe, C. J., und Fineberg, H.V. (Hrsg.) (1991) Adverse effects of pertussis and rubella vaccines. National academy press, Washington D.C., 9-3 und 320-326
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuko, M und Satoh, T. (1991) Structure and function of signal transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev. Biochem.* **60**: 349-400
- Jackwood, M.W., McCarter, S.M. und Brown, T.P. (1995) *Bordetella avium*: an opportunistic pathogen in leghorn chickens. *Avian-Dis.* **39**: 360-367
- Kolb, J.P., Genot, E., Petit-Koskas, E. Paul-Eugene, N. und Dugas, B. (1990) Effect of bacterial toxins on human B cell activation. I. Mitogenic activity of pertussis toxin. *Eur. J. Immunol.* **20**: 969-976
- Kong, A.S. und Morse, S.I. (1977) The *in vitro* effects of *Bordetella pertussis* lymphocytosis-promoting factor on murine lymphocytes I. Proliferative response. *J. Exp. Med.* **145**: 151-162
- Kramer, A., Schuster, A. Reinecke, U., Malin, R., Volkmer-Engert, R. Landgraf, C. und Schneider Mergener, J. (1994) Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: Screening tools for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *Comp. Meth. Enzymol.* **6**: 388-395
- Krueger, K.M. und Barbieri, J.T. (1995) The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microb. Rev.* **8**: 34-47
- Kurose, H., Katada, T., Amano, T. und Ui, M. (1983) Specific uncoupling by islet activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via α -adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* **258**: 4870-4875
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. and Sigler, H.E. (1994) Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**: 621-628
- Lind-Brandberg, L., Welinder-Olsson, C., Lagergard, T., Taranger, J., Trollfors, B. und Zackrisson, G. (1998) Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *Clin. Microbiol.* **36**: 679-683

- Locht, C. und Keith, J.M. (1986) Pertussis toxin gene: Nucleotid sequence and genetic organization. *Science* **232**: 1258-1264
- Loosmore, S.M., Zealey, G.R., Boux, H.A. Cockle, S.A., Radika, K., Fahim, R.E., Zobrist, G.J., Yacoob, R.K., Chong, P.C., Yao F.L., *et al.* (1990) Engineering of genetically detoxified pertussis toxin analogs for development of a recombinant whooping cough vaccine. *Infect. Immun.* **58**: 3653-3662
- Magistris, T.M. de, Romano, M., Nuti, S., Rappuoli, R. und Tagliabue, A. (1988) Dissecting human T cell responses against *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **60**: 4578-4585
- Marsili, I., Pizza, M., Giovannoni, F., Volpini, G., Bartalini, M., Olivieri, R. Rappuoli, R. und Nencioni, L. (1992) Cellular pertussis vaccine containing a *Bordetella pertussis* strain that produces a nontoxic pertussis toxin molecule. *Infect. Immun.* **60**: 1150-1155
- Martin, E. L., S. Rens-Domiano, P.J. Schatz, and H.E. Hamm. 1996. Potent peptide analogous of a G protein receptor-binding region obtained with a combinatorial library. *J. Biol. Chem.* **271**: 361-366
- Meade, B.D., Kind, P.D., Ewell, J.B., McGrath, P.P. und Manclark, C.R. (1984) *In vitro* inhibition of murine macrophage migration by *Bordetella pertussis* lymphocytosis promoting factor. *Infect. Immun.* **45**: 718-725
- Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Soc.* **85**: 2149-2152
- Michel, T., Winslow, J.W., Smith, J.A., Seidman, J.G. und Neer, E.J. (1986) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the GTP-binding protein α_i and identification of a related protein, α_h . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7663-7667.
- Morse, S.I. und Morse, J.H. (1976) Isolation and properties of the leukocytosis and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* **143**: 1483-1502
- Müller, F.M., Hoppe, J.E. und von König, W.C.H. (1997) Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2435-2443
- Munoz, J. J. (1985) Biological activities of pertussigen (pertussis toxin). In: Pertussis Toxin. Sekura, R.D., Moss, J. und Vaughan, M. (Hrsg.) Academic Press, London, 1-18.
- Nakamura, T. und Ui, M. (1985) Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid releases, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. A possible involvement of the toxin-specific substrate in the Ca²⁺-mobilizing receptor-mediated biosignaling system. *J. Biol. Chem.* **260**: 3584-3593
- Neer, E. J., Pulsifer, L. und Wolf, L.G. (1988) The amino terminus of G protein α subunits is required for interaction with $\beta\gamma$. *J. Biol. Chem.* **263**: 8996-9000
- Nencioni, L., Pizza, M., Bugnoli, M., de Magistris, T., di Tommaso, A., Giovannoni, F., Manetti, R., Marsili, I., Matteucci, G., Nucci, D., *et al.* (1990) Characterisation of genetically inactivated pertussis toxin mutants: Candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect. Immun.* **58**: 1308-1315
- Nencioni, L., Pizza, M., Volpini, G., de Magistris, M.T., Giovanoni, F. und Rappuoli, R. (1991) Properties of the B-oligomer of pertussis toxin. *Infect. Immun.* **59**: 4732-4734
- Nicosia, A., Perugini, M., Franzini, C., Casagli, M.C., Borri, M.G., Antoni, G., Almoni, M., Neri, P., Ratti, G. und Rappuoli, R. (1986) Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: Operon structure and gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 4631-4635
- Noel, J.P., Hamm, H.E. und Sigler, P.B. (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**: 654-663
- Nogimori, K., Tamura, M., Yajima, M., Ito, K., Nakamura, T., und Kajikawa, N. (1984) Dual mechanisms involved in development of diverse biological activities of islet-activating

- protein, pertussis toxin, as revealed by chemical modifications of lysine residues in the toxin molecule. *Biochim. Biophys. Acta.* **801**: 232-239
- Olcen, P., Bäckmann, A., Johansson, B., Esbjörner, E., Törnquist, E., Bygraves, J. und McPheat, W.L. (1992) Amplification of DNA by the polymerase chain reaction for the efficient diagnosis of pertussis. *Scand. J. Infect. Dis.* **24**: 339-345
- Olson, L.C (1975) Pertussis. *Medicine* **54**: 427-469
- Onorato, I.M. und Wassilak, S.G.F. (1987) Laboratory diagnosis of pertussis: The state of the art. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**: 145-151
- Osawa, S., N. Dhanasekaran, C.W. Woon, und Johnson, G.L. (1990) $G\alpha_i$ - $G\alpha_s$ chimeras define the function of a chain domains in control of G protein activation and $\beta\gamma$ subunit complex interactions. *Cell* **63**: 697-706
- Parker, C.D. und Payne, B.J. (1985) *Bordetella*. In: Lenette, E.H. (Hrsg.) Manual of Clinical Microbiology., 4. Aufl., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 394-399
- Pizza, M., Bartoloni, A., Prugnola, A., Silvestri, S. und Rappuoli, R. (1988) Subunit S1 of pertussis toxin: mapping of the regions essential for ADP-ribosyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7521-7525
- Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., de Magistris, M.T., Villa, L., Nucci, D., Maneti, R., Barbieri, J.T., Sato, H. und Rappuoli, R. (1989) Mutants of pertussis toxin subunits suitable for vaccine development. *Science* **246**: 497-500
- Plotkin, S.A. (1993) Vaccination in the 21st Century. *J. Inf. Dis.* **168**: 29-37
- Podda, A., Carapella de Luca, E., Contu, B., Furlan, R., Maida, A., Moiraghi, A., Stramare, D., Titone, L., Uxa, F., di Pisa, F., Peppoloni, S., Nencioni, L. und Rappuoli, R. (1994) Comparative study of a whole-cell pertussis vaccine and a recombinant avellular vaccine. *Jour. Pediatr.* **124**: 921-926
- Price, S. R., A. Barber, and J. Moss. (1990). Structure-function relationships of guanine nucleotide-binding proteins. In: ADP-ribosylating toxins and G-proteins: Insights into signal transduction. Moss, J., und Vaughan, M. (Hrsg.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., 397-424
- Qiushui, H., Mertssola, J. Soini, H., Skurnik, M. Ruuskanen, O. und Viljanen, M.K. (1993) Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microb.* **31**: 642-645
- Rapp, I. und Enders, G. (1988) Diagnostische Verfahren zum Nachweis einer Pertussis-Infektion. *Ärztl. Lab.* **34**: 181-189
- Rappuoli, R., Pizza, M., de Magistris, M.T., Podda, A., Bugnoli, M., Manetti, R. und Nencioni, L. (1992) Development and clinical testing of an acellular pertussis vaccine containing genetically detoxified pertussis toxin. *Immunobiology* **184**: 230-239
- Rarick, H. M., Artemyev, N.O. und Hamm, H.E. (1992) A site on rod G protein a subunit that mediates effector activation. *Science* **256**: 1031-1033
- Rasband, W.S. und Bright, D.S. (1995). NIH Image: A public domain image processing program for the macintosh. *Microbeam Anal. Soc. J.* **4**, 137-149
- Raupach, B. (1993) Das Pertussis Toxin A-Protomer: Identifizierung immunodominanter Epitope der S1 Untereinheit von serologischer Relevanz. Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
- Renauld-Mongenie, G., Poncet, D.M., von Olleschik-Elbheim, L., Cournez, T., Mignon, M., Schmidt, M.A. und Quentin-Millet, M.J. (1997) Identification of human transferrin-binding sites within *meningococcal* transferrin-binding protein B. *J. Bac.* **179**: 6400-6407

- Robertson, P.W., Goldberg, H., Jarvie, B.H. Smith, D.D. und Whybin, L.R. (1987) *Bordetella pertussis* infection: A cause of persistent cough in adults. *Med. J. Aus.* **147**: 522-525
- Robinson, A. und Funnell, S.G.P. (1992) Potency testing of acellular pertussis vaccines. *Vaccine* **10**: 139-141
- Rothbard, J. B., Fernandez, R., Wang, L., Teng, N.H.H. und Schoolnik, G.K. (1985) Antibodies to peptides corresponding to a conserved sequence of *gonococcal* pilins block bacterial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 915-919
- Sayle, R.A. und Milner-White, E.L. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 374
- Schmidt, M.A. (1989) Development and application of synthetic peptides as vaccines. *Biotech. Adv.* **7**: 187-213
- Schmidt, M.A. und Schmidt, W. (1989) Inhibition of pertussis toxin binding to modell receptors by antipeptide antibodies directed at an antigenic domain of the S2 subunit. *Infect. Immun.* **57**: 3828-3833
- Schröder, J.P. und Kuhlmann, W.D. (1991) Tetanusimmunität bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. *Immun. Infekt.* **19**: 14-17
- Schröder, J.P., Geßler, M., Kuhlmann, W.D. und Trendelenburg, C. (1992) Vermeidung hyperallergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissensbasierten Systems bei Fragen der Impfnotwendigkeit. *Klin. Lab.* **38**: 229-233
- Shahin, R.D., Arnsbaugh, D.F., Endoh, M. und Manclark, C.R. (1990) Analysis of protective immunity to respiratory *Bordetella pertussis* infection. In: Manclark, C.R. (Hrsg.) Proceedings of the sixth international symposium on pertussis. Department of health and human services., US public health service, Bethesda, Maryland, 196-201
- Simon, M. I., Strathmann, M.P. und Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-808
- Sondek, J., Lambright, D.G. Noel, J.P., Hamm, H.E. und Sigler, P. B. (1994) GTPase mechanism of G proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α -GDP-AIF-4. *Nature* **372**: 276-279
- Söndergard-Andersen, J, Lauritzen, E. Lind, K. und Holm, A. (1990) Covalently linked peptides for enzyme linked peptides for enzyme linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* **131**: 99-104
- Sotomayor, J., Weiner, L.B. und McMillan, J.A. (1985) Inaccurate diagnosis in infant with pertussis: An 8 year experience. *Am. J. Dis. Child.* **139**: 724-727
- Staros, V.V., Wright, R.W. und Swingle, D.M. (1989) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.* **156**: 220-222
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H. und Read, R.J. (1994) The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**: 45-57
- Strutzberg, K. (1996) Kartierung des funktionellen Bereiches eines Transferrin bindenden Proteins von *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dissertation, Tiermedizinische Hochschule, Hannover
- Strutzberg, K., von Olleschik, L., Franz, B., Pyne, C. Schmidt, M.A. und G.F.Gerlach (1995) Mapping of functional regions on the transferrin-binding protein (TfbA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**: 3846-3850
- Stryer, L. (1990) Eine G-Protein Familie überträgt viele Hormonsignale und Sinesreize. In: Stryer, L. Biochemie Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 1019-1021

- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T. Ui, M. und Ishii, S. (1992) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**: 5516-5522
- Thomas, M., Redhead, K. und Lambert, H.P. (1989) Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J. Infect. Dis.* **159**: 211-218
- Thomas, M.G., Askelöf, P. und Granström, M. (1988) Specific immunoglobulin A to *Bordetella pertussis* antigens in mucosal secretion for rapid diagnosis of whooping cough. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 869-874
- Trollfors, B. und Rabo, E. (1981) Whooping cough in adults. *Brit. Med. J.* **283**: 696-697
- Tsuchiya, M., Bliziotis, M. M., Serventi, I. M., Price, S. R., Avigan, J., Murtagh, Jr., J. J., Stevens, L. A., Angus, C. W., Walker, M. W., Newman, K. B., Halpern, J. L., Tsai, S. C., Moss, J., und Vaughan, M. (1990) Pertussis toxin substrates: characterization of multiple forms of G_α mRNA and the requirements for toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G_α and G_{βγ}. In: Manclark, C. R. (Hrsg.) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis*. Dep. of Health and Human Services, US Public Health Service, Bethesda, MD. DHHS Pub. No. (FDA) 90-1164, 57-65
- Tuomanen, E. und Weiss, A. (1985) Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **152**: 118-125
- Ui, M. (1984) Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* **5**: 277-279
- Ui, M. (1990) Pertussis toxin as a valuable probe for G-protein involvement in signal transduction. In: Moss, J. und Vaughan, M. (Hrsg.) *ADP-Ribosylating Toxins and G Proteins: Insights into Signal Transduction, ORT!!!* 45-77
- van Dop, C., Yamanaka, G., Steinberg, F., Sekura, R.D., Manclark, C.R., Stryer, L. und H.R. Bourne, H.R. (1984) ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **259**: 23-26
- van't Wout, J. Burnette, W.N., Mar, V.L., Rozdzinski, E., Wright, S.D., Tuomanen, E. (1992) The role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect. Immun.* **60**: 3303-3308
- Vellmann, S.G. (1995) Quantifying immunoblots with a digital scanner. *Biotechniques* **18**: 1056-1058
- Viramed (1994) *Bordetella pertussis* Elisa IgA, IgG, IgM, Viramed Produktinformation, Plannegg
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1996) Quantification of immunological membrane reactions employing a digital desk top scanner and standard graphics software. *J. Immun. Meth.* **197**: 181-186.
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1997) Membrane anchored synthetic peptides as a tool for structure-function analysis of pertussis-toxin and its target proteins. In: Haag, F. und Koch-Nolte, F. (Hrsg.) *ADP-Ribosylation in animal tissues: structure, function and biology of mono (ADP-ribosyl) transferases and related enzymes*. *Adv. Exp. Med. and Biol.* **419**: 87-91
- von Olleschik-Elbheim, L., el Bayâ, A. und Schmidt, M.A. (1997) Membrane anchored synthetic peptides of α -Gi-Proteins as substrates for ADP-ribosylation by pertussis toxin and as tools for the dissection of acceptor sites, eingereicht
- Weiss, A. 1997. Mucosal immune defenses and the response of *Bordetella pertussis*. *ASM News* **63**: 22-28
- Weiss, A.A. und Hewlett, E.L. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 661-687

- West, R. E. Jr., Moss, J., Vaughan, M., Liu, T. und Liu, T.-Y. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* **260**: 14428-14430.
- WHO (1996) The World Health Report 1996 Fighting disease, Fostering Development, World Health Organization, Geneva
- Wilmot, C. M., and J.M. Thornton. (1988) Analysis and prediction of the different types of β -turn in proteins. *J. Mol. Biol.* **203**: 221-232
- Wilson, I.A., Haft, D.H, Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Lerner, R.A. und Brenner, S. (1985) Identical short peptide sequences in unrelated proteins can have different conformations: A testing ground for the theories of immune recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5255-5259
- Wirsing von König, C.W.W. und Finger, H. (1995) Wirksamkeit azellulärer Pertussisimpfstoffe. *Immun. Infekt.* **23**: 125-129
- Xu, Y. und Barbieri, J.T. (1995) Pertussis toxin-mediated ADP-ribosylation of target proteins in Chinese hamster ovary cells involves a vesicle trafficking mechanism. *Infect. Immun.* **63**: 825-832

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lars Peter Hans von Olleschik-Elbheim
geboren am: 25. April 1965 in Glendale, Arizona, USA
Familienstand: verheiratet
Name des Vaters: Dieter von Olleschik-Elbheim
Name der Mutter: Monika von Olleschik-Elbheim, geb. Funnekötter

Schulbildung:

1970 - 1972 Grundschule, Idar-Oberstein
1972 - 1975 Overlundscole, Viborg, Dänemark
1975-1984 St. Antoniusgymnasium, Lüdinghausen
Mai 1984 Abitur am 15. Mai 1984 in Lüdinghausen

Wehrdienst:

Juli 1984 - September 1995 Grundwehrdienst in Hamburg, Oldenburg und Damme

Studium:

1985 - Studium der Biologie

Prüfungen:

Januar 1993 Diplom im Fach Biologie am 5. Januar 1993 an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.
Thema der Diplomarbeit: „Molekulare Analyse des Genoms von *Gibberella pulicaris*“

Tätigkeiten:

Oktober 1992 - Dezember 1992 studentische Hilfskraft am Institut für allgemeine Botanik und Mikrobiologie in Münster

Januar 1993 - März 1993 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für allgemeine Botanik und Mikrobiologie in Münster

April 1993 - wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Infektiologie im Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) in Münster

Beginn der Dissertation:

April 1993 am Institut für Infektiologie im Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung in Münster, betreut durch Prof. Dr. rer. nat. M. Alexander Schmidt
Thema: „Struktur- und Funktionsanalyse von Pertussis Toxin unter Einsatz C-terminal an Cellulose fixierter Peptide“

Wir benötigen unser ganzes Leben, um zu werden, was wir sind. Es gibt keinen Weg zurück und keine Wiederholungen. Jede Begegnung und jede Äußerung kann die Letzte sein. Das sollten wir niemals aus unserem Bewußtsein verdrängen. Wir sind immer mitten in und gleichzeitig stets am Ende unserer persönlichen Entwicklung.
