

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die frühen Reproduktionschritte von humanem Rhinovirus Typ 14 untersucht. Außerdem wurde untersucht, inwieweit der Virusrezeptor allein die Infektion von Zellen determiniert. Dazu wurden BHK-Zellen eingesetzt, die durch den fehlenden Virusrezeptor ICAM-1 nicht in der Lage sind, mit HRV-14 infiziert zu werden. Als infizierbare Zellen dienten ICAM-1-tragende und für HRV-14 empfängliche HeLa-Zellen. Zur Klärung der Frage, ob der Virusrezeptor allein für eine Infektion einer Zelle verantwortlich ist, wurden nicht-infizierbare BHK-Zellen in Zusammenarbeit mit Dr. Langner (Behring-Werke) mit dem Virusrezeptor ICAM-1 transfiziert (sog. BHK-ICAM-1-Zellen). In allen drei Zelllinien (HeLa-, BHK-, BHK-ICAM-1-Zellen) wurde die Produktion viraler RNA und reifer Virusnachkommenschaft gemessen.

4.1. Verlauf der frühen Reproduktionsschritte von HRV-14 in HeLa-Zellen

HRV-14 wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in permissive HeLa-Zellen aufgenommen. Der entsprechende Virusrezeptor ist das Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1 (Greve et al., 1989; Staunton et al., 1989). Eine Blockierung dieses Rezeptors durch monoklonale Antikörper führte zu einer messbaren Reduktion viraler RNA-Synthese sowie der Synthese reifer Viren (s. 3.1.2.1). Ein gleicher Effekt konnte durch die Konkurrenz der Virusadsorption durch lösliches ICAM-1-Immunglobulin erzielt werden (s. 3.1.2.2). Versuche mit anderen Arten von löslichem ICAM-1 führten ebenfalls zu einer Reduktion der Infektiosität von HRV-14 (Greve et al., 1991; Casanovas et al., 1994).

Transmissionselektronenmikroskopisch konnte bei HeLa-Zellen die Bindung von HRV-14 an die Zelloberfläche nachgewiesen werden (s. 3.1.1, Abb. 6B). Anschließend erfolgte die Penetration in die Zelle durch Aufnahme in 'coated pits' und 'coated vesicles'. Nach der Fusion mit Endosomen (s. 3.1.1, Abb. 6E) kam es nach ca. 30 Minuten p.i. zu einem pH-abhängigen Uncoating des Virus. Dieser Uncoating-Mechanismus ist

durch carboxylische Ionophore wie Monensin, die den niedrigen pH von ca. 5 in den Endosomen erhöhen, hemmbar (s. 3.1.2.3).

Nach dem Freisetzen der RNA aus dem Viruskapsid (Uncoating) in das Zytoplasma der HeLa-Zelle wurde die Neusynthese der viralen RNA (s. 3.2.3.2.) nachgewiesen. Nach 7 Stunden p.i. war die maximale Einbaurrate von ³H-Uridin erreicht (Abb. 15). Nichtinfizierte HeLa-Zellen zeigten zum gleichen Zeitpunkt nur 10% der Einbaurrate.

Der elektronenmikroskopische Nachweis eines zytopathischen Effekts (s. 3.1.1, Abb. 6F) sowie der in der SDS-Gelelektrophorese beobachtete virusspezifische Shut-off und die Produktion virusspezifischer Proteine (Vorläuferproteine, Kapsidproteine) (s. 3.2.3.5) zeigten eindeutig eine produktive Infektion von HeLa-Zellen durch HRV-14. Die abschließende Freisetzung aus infizierten Zellen konnte indirekt durch die Bildung von Plaques bei der Neuproduktion reifer Viren (s. 3.2.3.3) nachgewiesen werden. Nach 8 Stunden p.i. war die maximale Virusreproduktion erreicht und lag um den Faktor 500 über dem p.f.u.-Wert zu Beginn der Infektion (Abb. 16).

Diese Art von Reproduktionszyklus ist auch bei anderen Picornaviren wie Polioviren bekannt (Madhus et al., 1984; Zeichhardt et al., 1985; Zeichhardt et al., 1987; Willingmann et al., 1989).

4.2. Einfluss von ICAM-1 als Virusrezeptor von HRV-14 auf die Adsorption und Penetration von HRV-14 in transfizierte BHK-ICAM-1-Zellen

Zur Virusaufnahme und zur weiteren produktiven Vermehrung von HRV-14 spielt der Virusrezeptor ICAM-1 eine entscheidene Rolle im Reproduktionszyklus von HRV-14. Daher wurde geprüft, ob die Transfektion von nichtpermissiven BHK-Zellen mit ICAM-1 zur Permissivität gegenüber HRV-14 führt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen solcher transfizierten BHK-ICAM-1-Zellen zeigten eine unerwartete Art der Virusaufnahme in Membrankanälen, in denen die Viren nach 5 Minuten p.i. wie Perlen aufgereiht lagen. Diese Membrankanäle ähnelten

morphologisch denen, die bei der Infektion eines anderen Picornavirus, dem DA Stamm von Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV), auftraten (Jelachich et al., 1996; Nedellec et al., 1998). In diesen Arbeiten wurden solche Membrankanäle jedoch spät in dem Reproduktionszyklus von TMEV beobachtet (8-12 h p.i.). Nicht-transfizierte BHK-Zellen zeigten dagegen weder eine Bindung von Virus noch eine Aufnahme in die Zelle.

Die Aufnahme von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen führte nicht zu einer produktiven Synthese von HRV-14. Weder eine Synthese von viraler RNA (s. 3.2.3.2) oder viraler Proteine (s. 3.2.3.5) noch von reifen Viren (s. 3.2.3.3) konnte beobachtet werden. Bei der Reproduktionskinetik viraler RNA lagen die Einbauraten von radioaktivem ³H-Uridin bei BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen in derselben Größenordnung wie bei nicht-infizierten HeLa-Zellen (Abb. 15). Eine Synthese viraler RNA fand in BHK-ICAM-1-Zellen nicht statt.

BHK-ICAM-1-Zellen zeigten in der Ein-Stufen-Wachstumskinetik für HRV-14-Viren nach 0 h p.i. eine Bindung von HRV-14 an die Zellmembran in der gleichen Größenordnung wie bei HeLa-Zellen (Abb. 16). Anschließend war ein Rückgang des nachzuweisenden Virus innerhalb des ersten Reproduktionszyklusses auf p.f.u.-Werte zu beobachten, die vergleichbar mit p.f.u.-Werte von nicht-transfizierten BHK-Zellen waren. Eine Neusynthese reifer HRV-14-Viren war innerhalb des ersten Reproduktionszyklusses bei BHK-ICAM-1-Zellen nicht zu detektieren. Elektronenmikroskopisch ließ sich zu späteren Zeitpunkten auch kein wie bei HeLa-Zellen zu beobachteter zytopathischer Effekt nachweisen (Abb. 14). Nach 18 Stunden p.i. waren keine virusspezifischen Veränderungen in den BHK-ICAM-1-Zellen zu beobachten. Die Zellen ähnelten morphologisch denen von mock-infizierten HeLa-Zellen bzw. BHK-Zellen. Da trotz nachgewiesener Virusaufnahme über Membrankanäle nach 18 h p.i. nur wenige Viruspartikel nachweisbar waren, muss ein inaktivierender Prozess in den BHK-ICAM-1-Zellen für HRV-14 angenommen werden.

Die Funktionalität des transfizierten Rezeptors ICAM-1 konnten durch folgende Ergebnisse bestätigt werden:

a) BHK-ICAM-1-Zellen exprimierten ICAM-1 in ähnlichem Ausmaß wie HeLa-Zellen (s. 3.2.1).

b) BHK-ICAM-1-Zellen banden HRV-14 mit der gleichen Kapazität wie HeLa-Zellen (s. 3.2.3.1). Der Nachweis zellgebundener Viren wurde im Plaquetest (s. 3.2.3.3) beim Nachweis der Reproduktion reifer HRV-14-Viren bestätigt, in dem bei BHK-ICAM-1-Zellen nach 0 min. p.i. eine Virusmenge in vergleichbarer Größe an der Zelloberfläche wie bei HeLa-Zellen gemessen werden konnte (Abb. 16). Bei BHK-Zellen war zum selben Zeitpunkt nur $\frac{1}{10}$ der Virusmenge nachweisbar. Eine unspezifische Bindung von HRV-14 an BHK-Zellen war daher eher unwahrscheinlich.

c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten die Fähigkeit von BHK-ICAM-1-Zellen, HRV-14 an ihrer Oberfläche zu binden (s. 3.2.2, Abb. 14 A).

d) Coxsackieviren A21, die ebenfalls den Rezeptor ICAM-1 zur Infektion benutzen, waren in der Lage, transfizierte BHK-ICAM-1-Zellen zu infizieren und Virus in ähnlicher Größenordnung wie in HeLa-Zellen zu reproduzieren (s. 3.2.3.4)

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse musste daher davon ausgegangen werden, dass die Blockade des Reproduktionszyklusses von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen während oder kurz nach dem Zeitpunkt des Uncoating stattfand, da zwar eine Aufnahme, aber keine Reproduktion des Virus nachgewiesen werden konnte.

4.3. Einfluss von virusbindenden Rezeptoren auf die Permissivität von transfizierten Zellen

Der Vergleich der bekannten Literatur mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte, dass die Permissivität einer Zelllinie für eine produktive Infektion von Viren sowohl von der benutzten Virusart als auch von der benutzten transfizierten Zelllinie abhängig ist.

So waren im Gegensatz zu den hier benutzten BHK-ICAM-1-Zellen African green monkey Zellen (COS-Zellen) nach der Transfektion mit ICAM-1 permissiv für HRV-14 (Staunton et al., 1992).

Humanes Rhinovirus 16 führte wie HRV-14 in HeLa-Zellen zu einer produktiven Infektion (Gern et al., 1996). In Makrophagen und Monozyten, die ebenfalls ICAM-1 an ihrer Oberfläche exprimieren, war keine Reproduktion von infektiöser Nachkommenschaft von HRV-16 nachweisbar. Eine Bindung von ³⁵S-HRV-16 war in den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe sowohl an HeLa-Zellen als auch an Makrophagen zu beobachten. Diese Bindung von HRV-16 an Makrophagen war nicht durch Anti-ICAM-1 inhibierbar. Eine Aufnahme von HRV-16 in Makrophagen und Monozyten konnte durch Nachweis viraler RNA nach 6 und 24 Stunden p.i. gezeigt werden. Wie in den eigenen vorgestellten Ergebnissen konnte auch die Bildung eines Shut-off (Abfall der totalen RNA-Synthese infizierter Zellen in Abwesenheit von Actinomycin D) und Produktion viraler RNA in HeLa-Zellen, aber kein Shut-off oder Produktion viraler RNA in Makrophagen nachgewiesen werden. Ebenfalls erfolgte keine Produktion reifer HRV-16-Viren in Makrophagen und Monozyten. Makrophagen und Monozyten verhielten sich in bezug auf die Reproduktion von HRV-16 wie die hier benutzten BHK-ICAM-1-Zellen.

Eine produktive Infektion für Coxsackievirus A21 konnte wie bei BHK-ICAM-1-Zellen auch bei Maus L Zellen nach Transfektion mit ICAM-1 nachgewiesen werden (Shafren et al., 1997a).

Maus L Zellen wurden nach Transfektion mit Poliovirusrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (PVR) ebenfalls empfänglich für alle drei Subtypen von Poliovirus (Mendelsohn et al., 1986; Mendelsohn et al., 1989). Transgene Mäuse, die den Poliovirusrezeptor PVR exprimierten, entwickelten nach intrazerebraler, intraperitonealer und intravenöser Gabe von Poliovirus eine paralytisches Krankheitsbild (Ren et al., 1990; Koike et al., 1991). Nach oraler Gabe bildeten sich dagegen keine Krankheitssymptome aus. Weiterhin sind bei Poliovirus zusätzliche Rezeptoren bekannt (Barnert et al., 1991; Barnert et al., 1992). CD44 auf lymphoiden Zellen sowie bestimmte glykosylierte Membranproteine auf HeLa-Zellen waren in der Lage, Poliovirus spezifisch zu binden. Diese Membranproteine wurden auch in L Zellen exprimiert, ohne dass eine produktive Infektion stattfand.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Umwandlung von nichtpermissiven in permissive Zellen nach der Transfektion mit einem Virusrezeptor nicht allein von der Expression des Virusrezeptors abhängen muss. Es ist zu vermuten, dass zusätzliche, anscheinend intrazellulär gelegene Faktoren über eine produktive Infektion transfizierter Zellen entscheiden.

4.4. Ablauf der frühen Reproduktionsschritte am Beispiel von Picornaviren, Semliki Forest Virus und Influenzaviren

4.4.1. Wechselwirkung des Virus mit dem Virusrezeptor und Aufnahme des Virus in die Zelle

Für Poliovirus als Prototyp der Picornaviren konnte gezeigt werden, dass dieses Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose und anschließendem pH-abhängiges Uncoating in Wirtszellen aufgenommen wird (Madshus et al., 1984; Zeichhardt et al., 1985; Zeichhardt et al., 1987; Willingmann et al., 1989). Die hier vorgestellten eigenen Ergebnisse deuten für HRV-14 ebenfalls auf diesen Mechanismus hin.

Die Aufnahme des Virus in eine Wirtszelle beginnt mit der Bindung des Virus an den oberflächenständigen Virusrezeptor durch langreichende, elektrostatische Kräfte (Leckband et al., 1992). Bei 37°C kommt es bei Picornaviren zu einer irreversiblen Veränderung des Virus-Virusrezeptor-Komplexes. Anschließend folgt der Verlust von VP4 und die Bildung eines A-Partikels (Eklipse). Die abgelaufene Konformationsänderung im A-Partikel führt bei Poliovirus zu einer Infektion in für Poliovirus nichtpermissive Maus L Zellen und CHO-Zellen (Curry et al., 1996).

Für den Rezeptor der Rhinoviren der 'Major-Gruppe', ICAM-1, sind zur Virusbindung die Domänen D1 und D2 und ein Membrananker (z.B. Glykosylphosphatidyl-Inositol)

wichtig. Die anderen immunglobulin-artigen Domänen D3-D5, der Transmembran und der zytoplasmatische Teil sind nicht nötig für eine HRV-Aufnahme (Staunton et al., 1992).

Die Aufgabe des Rezeptors liegt also in der Virusbindung und der Einleitung der Eklipse.

Die bei der Virusbindung auftretende Konformationsänderung des Virus-Rezeptor-Komplex ist auch durch lösliche Rezeptoren induzierbar (s. Abb. 19).

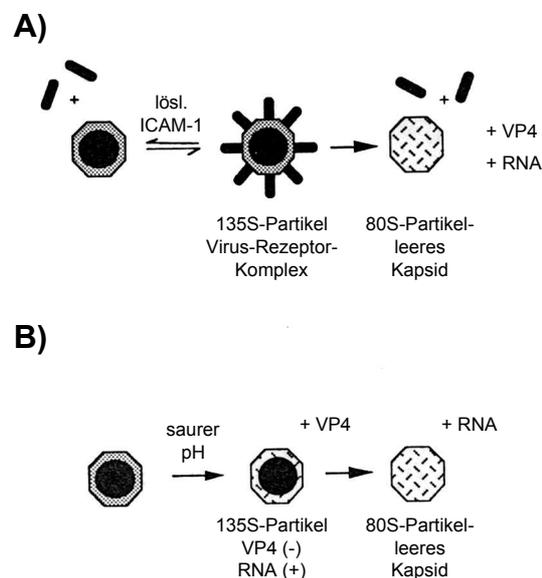


Abb. 19: In vitro-Konformationsänderung von Rhinoviren (Hoover-Litty et al., 1993; Casasnovas et al., 1994)

Lösliches ICAM-1 bildete einen Virus-Virusrezeptor-Komplex, der bei HRV-14 ein spontanes Uncoating durchführen konnte, was zu einem leeren 80S-Kapsid ohne RNA und VP4 führt. Bei HRV-16 konnte sich ein stabiler Virus-Virusrezeptor-Komplex ausbilden (A).

Eine Inkubation von HRV-14 bei pH 5.0 bewirkte eine Bildung eines 135 S-Partikel mit viraler RNA ohne VP4. HRV-16 bildete unter den gleichen Bedingungen ein leeres 80 S Kapsid ohne RNA und VP4 (B).

Lösliches ICAM-1 bindet HRV-14 unter der Bildung von A-Partikeln mit einem Sedimentationskoeffizienten von 135 S, anschließend folgt der weitere Zerfall in leere Kapside (80 S-Partikel) ohne VP4 und RNA (Greve et al., 1991; Hoover-Litty et al., 1993). Bei einem anderen Rhinovirus der 'Major-Gruppe', HRV-16, kommt es nach

der Bindung an lösliches ICAM-1 zu einem stabilen Virus-Virusrezeptor-Komplex. Ein saurer pH-Wert von 5.0 führt bei HRV-14 zur Bildung von RNA-haltigen 135 S-Partikeln ohne VP4 (Casasnovas et al., 1994). Dagegen wird bei HRV-16 der Verlust sowohl von VP4 als auch von RNA und die Bildung von 80 S-Partikeln nachgewiesen (Hoover-Litty et al., 1993). Unterschiedliche Serotypen der Rhinoviren besitzen daher eine unterschiedliche Empfindlichkeit für die Wirkung von Virusrezeptoren oder saurem pH-Milieu in den frühen Reproduktionsschritten.

Außerdem können Mutationen im Viruskapsids zur Erkennung zusätzlicher Rezeptorstrukturen führen. Dieser Effekt war bei einer Coxsackievirus B3-Variante, Coxsackievirus B3-RD zu beobachten, das zusätzlich an CD55 band und zur Infektion von HeLa-Zellen führte (Paglini et al., 1992; Mohanty et al., 1993). Die Konstruktion von chimären Polioviren mit Kapsidbestandteilen von Poliovirus Typ1 und Typ2 erzeugte einen Virustyp, der an Mauszellen adaptiert werden konnte (Martin et al., 1988; Murray et al., 1988). Bei einem Rhinovirus der 'Major-Gruppe', HRV-89, war das Auftreten einer Mutante nachweisbar, die HEp2-Zellen, die durch die Expression des LDL-Rezeptors für Rhinoviren der 'Minor-Gruppe' permissiv waren, ohne Ausbildung von produktiven Viren infizieren konnten (Reischl et al., 2001).

4.4.2. Uncoating und Freisetzung der viralen RNA

Nach der Bindung des Virus an den Virusrezeptor ist der nächste essentielle Schritt im Reproduktionszyklus eines Virus die Virusaufnahme in die Zelle und die Freisetzung des viralen Genoms (Abb. 3, Schritt 1). Es kommt bei Polio- und HRV-14-Viren zur Aufnahme des Virus in 'coated pits', zu einem pH-abhängigen Uncoating in Endosomen und Lysosomen und dadurch zur Freisetzung der RNA in das Zytoplasma. Die Möglichkeit eines solchen intrazellulären niedrig-pH-Schrittes im Reproduktionszyklus eines Virus kann durch die Inhibition durch schwache Basen, carboxylische Ionophore wie Monensin und spezifische Inhibitoren der vakuolären Protonenpumpen wie Bafilomycin A geprüft werden.

Die 'coated pits' interagieren mit Zellrezeptoren in der Zellmembran und ermöglichen so eine rezeptorvermittelte Endozytose (Watts et al., 1992). Clathrin und andere Proteine, sog. Adaptine, bilden einen Mantel um die 'coated pits' (Robinson et al., 1992). Die Wechselwirkung mit zytoplasmatischen Resten von Rezeptoren steuern den Transport in die 'coated pits'. Dieses endozytotische Transportsignal ist zum Beispiel eine Proteinsequenz eines Rezeptorproteins von 4-6 Aminosäuren mit großen, aromatischen oder hydrophoben Resten (Trowbridge et al., 1993). Plasmamembranproteine ohne zytoplasmatischen Rest wie z.B. CD4 werden durch alternative Signale (4-6 Aminosäure langes Protein mit einem Leucin-Paar; Dietrich et al., 1994) zu den 'coated pits' geleitet (Pelchen-Matthews et al., 1993).

Daher sind auch Membranproteine ohne endozytotisches Signal nicht vom Transport in 'coated pits' ausgeschlossen (Pelchen-Matthews et al., 1991). So konnte auch bei ICAM-1 ohne zytoplasmatischen Teil eine produktive Infektion durch Rhinoviren nachgewiesen werden (Staunton et al., 1992).

Bei säurestabilen Enteroviren wie Poliovirus ist auch ein alternativer Weg der Einschleusung beschrieben worden. Bei diesem alternativen Weg konnte eine pH-unabhängige Infektion nachgewiesen werden (Gromeier et al., 1990; Kronenberger et al., 1992; Perez et al., 1993). Bei säurelabilen Enteroviren wie Rhinoviren (z.B. HRV-2 und HRV-14) und FMDV beobachtet man ein Uncoating in Endosomen (Carrillo et al., 1984; Mason et al., 1993; Schober et al., 1998; Bayer et al., 1999). Alternativ ist auch bei HRV-14 die Freisetzung der RNA durch irreversible Modifikation des Kapsid durch lösliches ICAM-1 möglich (Greve et al., 1991; Hoover-Litty et al., 1993; Martin et al., 1993).

Somit gibt es unterschiedliche Strategien zur RNA-Freisetzung aus dem Picornavirus-Kapsid: rezeptorvermittelt, endosomal/lysosomaler niedrig-pH-Schritt oder beides (Hoover-Litty et al., 1993).

Während des Uncoatings konnte bei Poliovirus die Ausstülpung des normalerweise im Inneren des Viruskapsids liegende N-Terminus von VP1 an die Kapsidoberfläche nachgewiesen werden. Neu exponierte Aminosäuren des N-Terminus von VP1 können eine amphipathische α -Helix bilden und interagieren mit hydrophoben Regionen

der Plasmamembran (Flore et al., 1990). Ebenfalls wurde eine hydrophobe Interaktion von Rhinoviren mit einer Endosomenmembran während des Uncoating beobachtet. Subvirale Partikel von Rhinoviren zeigten bei niedrigem pH eine Wechselwirkung mit Liposomen (Korant et al., 1972; Lonberg-Holm et al., 1976; Flore et al., 1990). Ein Vergleich mit Poliovirus wies eine homologe Sequenz bei Rhinoviren mit der Fähigkeit zur Ausbildung einer amphipathischen α -Helix auf. Untersuchungen zum Uncoating-Mechanismus von HRV-2 legen ebenfalls die Bildung einer amphipathischen α -Helix aus dem N-Terminus von VP1 nahe (Prchla et al., 1995). Die Bildung einer solchen amphipathischen Helix stützt die Hypothese einer Ausbildung eines Kanals oder einer Pore durch die Membran des Endosoms. Durch diese Kanalstruktur könnte dann die virale RNA in das Zytoplasma freigesetzt werden (s. Abb. 20, Fricks et al., 1990). Das an der Innenseite des Kapsids liegende Virusprotein VP4, das Kontakt mit der RNA hat, müsste vor der Freisetzung der RNA von der Öffnung des Kanals verdrängt werden, um der virale RNA den Durchtritt durch den Kanal zu ermöglichen. Dieser Vorgang wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei sog. Provirionen, bei denen der Reifungsschnitt von VP0 zu VP4 und VP2 nicht erfolgt ist (s. Abb. 3), keine produktive Infektion durch solche Provirionen nachweisbar ist (Lee et al., 1993; Moscufo et al., 1993).

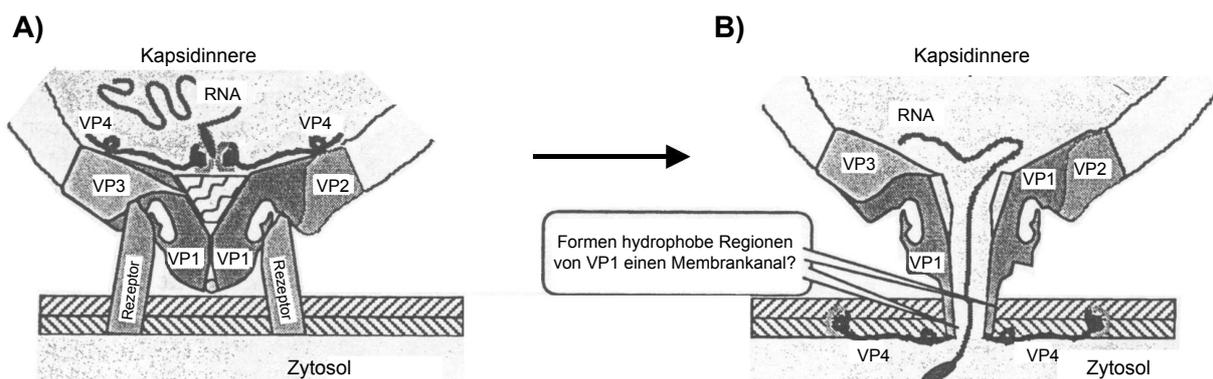


Abb. 20: Rezeptorvermittelte Infektion durch Bindung an die Zellmembran (modifiziert nach Rueckert, 1996)

Mehrere Rezeptoren binden das Viruspartikel über die viruspezifischen Bindungsstellen an die Endosomenmembran (A). Die hypothetische Struktur eines infektiösen Virions zeigt die Ausbildung von hydrophoben Kapsidelementen von VP1, die einen Kanal oder Pore formen (Fricks et al., 1990). Die virale RNA tritt durch die Membran und gelang in das Zytoplasma (B).

Die Freisetzung des viralen Genoms erfolgt bei Picornaviren nach der Aufnahme des Kapsids in Endosomen. Nach der rezeptorvermittelten Bindung an die Endosomenmembran kommt es zu Konformationsänderungen im Kapsid. Dabei wird die Ausbildung eines hydrophoben Kanals aus viralen Kapsidproteinen postuliert, durch den die virale RNA geschleust wird und in das Zytoplasma gelangt.

Bei membranhaltigen Viren wie Semliki Forest Virus oder Influenzaviren läuft die Virusaufnahme und Freisetzung des viralen Genoms anders ab. Bei diesen Viren umgibt das Viruskapsid noch eine Membranhülle. Hier erfolgt erst nach der Fusion der Membran des Virus mit der Zellmembran die Aufnahme des Viruskapsids in Lysosomen der Zelle. Anschließend kommt es wie bei unbehüllten Viren zum Uncoating des Viruskapsids. Bei einigen Viren wie Semliki Forest Virus ist hier eine pH-Abhängigkeit beschrieben worden (Marsh et al., 1989; Grewe et al., 1990). Bei Semliki Forest Virus geschieht während des pH-abhängigen Uncoatings bei niedrigem pH-Milieu die Fusion von Virionen mit der Lipidmembran (Helenius et al., 1980). Semliki Forest Virus kann durch eine Fusion mit der Zellmembran BHK-Zellen produktiv infizieren, jedoch nicht CHO-Zellen (Marsh et al., 1992). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Vesicular Stomatitis Virus (VSV) beschrieben. Bei Influenzavirus A führt ein saurer pH-Wert zu Konformationsänderungen im Virushüllprotein Hämagglutinin, der Ausbildung eines hydrophoben Fusionsproteins am Aminoterminal von HA2 und zur Fusion des viralen Envelopes mit der Liposomenmembran (Marsh et al., 1992). Nach der Membranfusion öffnet sich ein Protonenkanal in dem viralen Membranprotein M2, der die Ansäuerung des Virusinneren erlaubt und zum Uncoating des Ribonukleoproteinkomplexes führt (Pinto et al., 1992; Sakaguchi et al., 1997).

4.4.3. Initiation der Translation zu Beginn des ersten Replikationszyklusses

Nach der Freisetzung der viralen RNA folgt als nächster Schritt im Replikationszyklus der Picornaviren die Translation der RNA in Virusproteine. Die virale RNA wird als

(+)-Strang RNA wie eine messenger-RNA benutzt und in ein 220 kD großes Polyprotein translatiert (Abb. 3, Schritt 2).

Die Translation wird in einem ca. 750 Nukleotiden langen, nichttranslatierten Bereich am 5'-Ende der viralen RNA (5' non translated region, 5' NTR) begonnen. Als Aufsprungstelle für die zellulären Ribosomen dient eine sog. IRES (internal ribosomal entry site) (Jackson et al., 1990; Jang et al., 1990; Sonenberg et al., 1990). Diese IRES-Region liegt bei HRV-14 in einer pyrimidinreichen Region zwischen dem Nukleotid 10 und 538-591 am 5'-Ende (Borman et al., 1992; Rojas-Eisenring et al., 1995).

Die Effizienz der Translation ist von der Präsenz viraler Proteine, z.B. Protease 2A bei Rhinoviren (Ziegler et al., 1995; Borman et al., 1997) und der Mitwirkung zellulärer Translationsproteine, z.B. pyrimidine tract binding protein PTB und p97 (Jang et al., 1990; Rojas-Eisenring et al., 1995; Belsham et al., 1996) abhängig. Diese zusätzlichen Faktoren werden als ITAFs (IRES transacting factors) bezeichnet (Pestova et al., 2001). Daher existieren auch unterschiedliche in vitro-Translationsaktivitäten bei den verschiedenen Picornaviren. Die am besten translatierenden IRES-Regionen besitzen Cardio- und Aphthoviren, dann folgen die IRES-Regionen von Enteroviren und die IRES-Region von Encephalomyocarditis Virus (EMCV) (Borman et al., 1995).

Innerhalb der 5' NTR der Entero- und Rhinoviren bestehen teilweise deutliche Unterschiede in der Sequenz und der Sekundärstruktur. Durch den Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der 5'-NTR mehrerer Picornaviren wurden strukturelle Homologien und phylogenetische Verwandtschaften erstellt (Abb. 21, Zell et al., 1997). Aufgrund ihrer Homologien können Enteroviren in 4 Untergruppen (Cluster) und Rhinoviren in 2 Cluster unterteilt werden. Diese 5'-NTR enthalten bis zu 7 Sekundärstrukturen (Domänen I-VII). Domäne I ist in die Initiation der Replikation involviert. Die Domänen II, IV, V und VI bilden die interne ribosomale Aufsprungstelle (IRES) und sind für die Initiation der cap-unabhängigen Translation verantwortlich (Zell et al., 1997; Bella et al., 1999). Die 5'-NTR der humanen Enteroviren besitzen einen 21 Nukleotide langen Strang, der eine zusätzliche 7. Sekundärstruktur (Domäne VII) ausbildet. Die 5'-NTR der Rhinoviren zeigen eine verlängerte Domäne VI mit einer an-

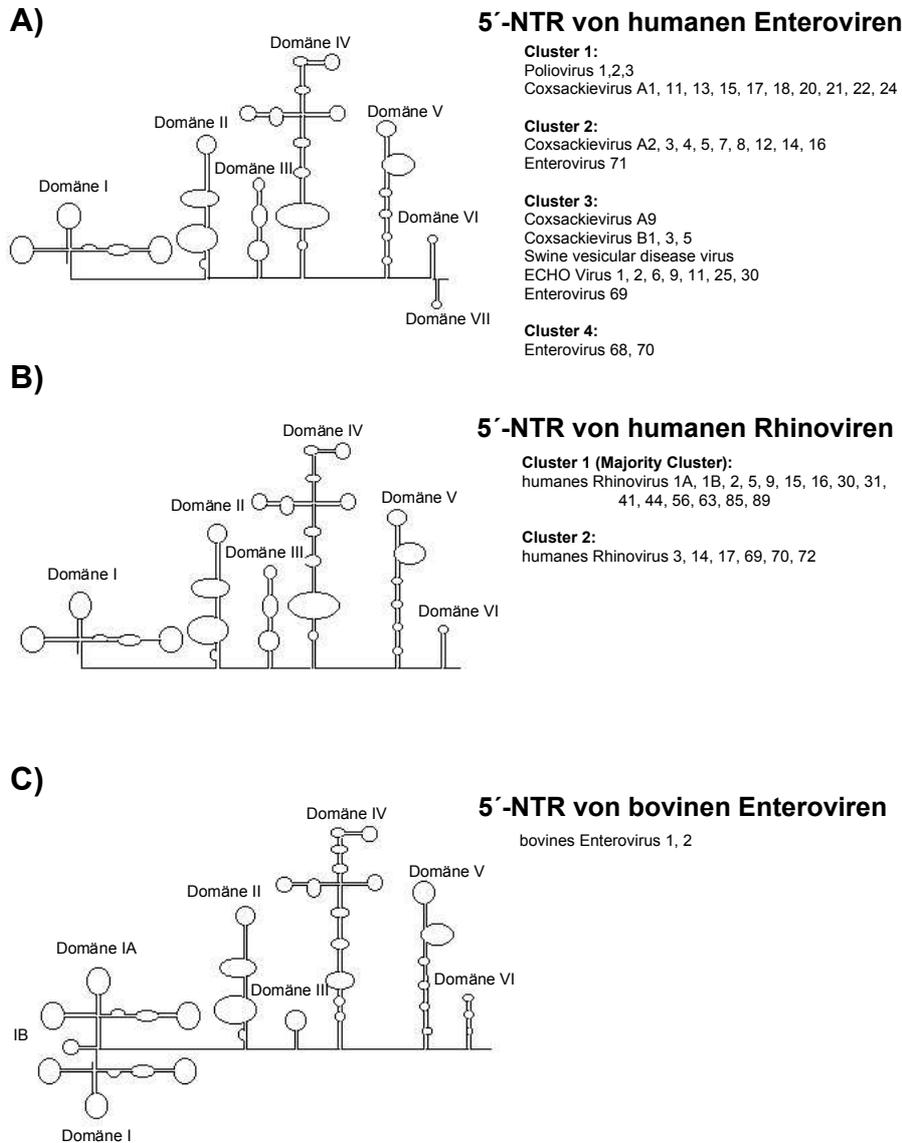


Abb. 21: Phylogenetische Analyse der 5'-nichttranslatierten Regionen (5' NTR) von humanen und bovinen Enteroviren und humanen Rhinoviren (Zell et al., 1997)

Durch den Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der 5'-NTR mehrerer Picornaviren wurden strukturelle Homologien und phylogenetische Verwandtschaften erstellt. Diese 5'-NTR enthielten bis zu 7 Sekundärstrukturen (Domänen I-VII). Domäne I ist in die Initiation der Replikation involviert. Die Domänen II, IV, V und VI bildeten die interne ribosomale Aufspaltungstelle (IRES) und waren für die Initiation der Translation verantwortlich.

Aufgrund ihrer Homologien können Enteroviren in 4 Untergruppen (Cluster) (A) und Rhinoviren in 2 Cluster (B) unterteilt werden. Die 5'-NTR der humanen Enteroviren besitzt einen 21 Nukleotide langen Strang, der eine 7. Sekundärstruktur (Domäne VII) ausbildet (A). Die 5'-NTR der Rhinoviren zeigt eine verlängerte Domäne VI mit einer anderen Position des Initiationscodons AUG als bei Enteroviren (B). Die 5'-NTR bei bovinen Enteroviren weist eine zusätzliche Insertion von 100 Nukleotide auf, die die zusätzlichen Domänen IA und IB bildeten, und besitzt eine veränderte Sekundärstruktur der Domäne III (C).

deren Position des Initiationscodons AUG für die virale RNA- und Proteinsynthese als bei Enteroviren. Die 5'-NTR bei bovinen Enteroviren weisen eine zusätzliche Insertion von 100 Nukleotide auf, die die zusätzlichen Domänen IA und IB bildeten, und besitzen eine veränderte Sekundärstruktur der Domäne III.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IRES-Regionen von verschiedenen Picornaviren in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Translationsraten aufwiesen (Abb. 22, Borman et al., 1997). Hierzu wurden rekombinante Vaccinia-Viren mit den IRES-Regionen von Poliovirus Typ1, ECHO-Virus Typ 25, HRV-2, HAV, EMCV, FMDV bzw. HCV hergestellt. Anschließend erfolgte die Infektion von FRhK4-, HepG2, Neuro-2A- bzw. BHK-Zellen mit diesen Rekombinanten. Vergleicht man die Effizienz der Translation von Virusproteinen der Vaccinia-Virus-Rekombinante mit der HRV-2-IRES-Region in den unterschiedlichen Zelllinien, zeigten infizierte HeLa-Zellen die stärkste Aktivität. In BHK-Zellen konnte dagegen keine Translation von Vaccinia-Virusproteinen nachgewiesen werden.

Außerdem scheint eine hohe Spezifität der IRES-Regionen für ein bestimmtes Virus zu bestehen. Eine Kompensation von IRES-Deletionsmutanten von Encephalomyocarditis Virus (EMCV) ist nur durch die vollständige IRES-Region von EMCV, aber nicht durch die IRES-Region von TMEV oder FMDV möglich (Roberts et al., 1997). Außerdem konnte ein Einfluss der 5'-nichttranslatierten Regionen auf die Pathogenität von Polioviren nachgewiesen werden. Der Austausch der IRES von Poliovirus gegen die IRES von HRV-2 ergab einen Verlust der Neuropathogenität bei dem entstandenen chimären Virushybrid (Gromeier et al., 1999). Eine Punktmutation in der IRES-Region (Pos. 472, Mutation von Uridin nach Cytosin) von Poliovirus Sabin Typ 3 führte zu einer Änderung der Sekundärstruktur und zur Verwandlung des Impfstamms zu einem neurovirulenten Stamm (Evans et al., 1985).

Die vorhandenen IRES-Regionen der verschiedenen Picornaviren scheinen also sowohl spezifisch für die einzelnen Picornaviren als auch für die entsprechenden Wirtszelllinien zu sein. Außerdem scheint ein Einfluss der Strukturen der verschiedenen IRES (verschiedene Sekundärstrukturen bei Rhino- und Enteroviren in Abb. 21) auf die Pathogenität des betreffenden Virus möglich zu sein.

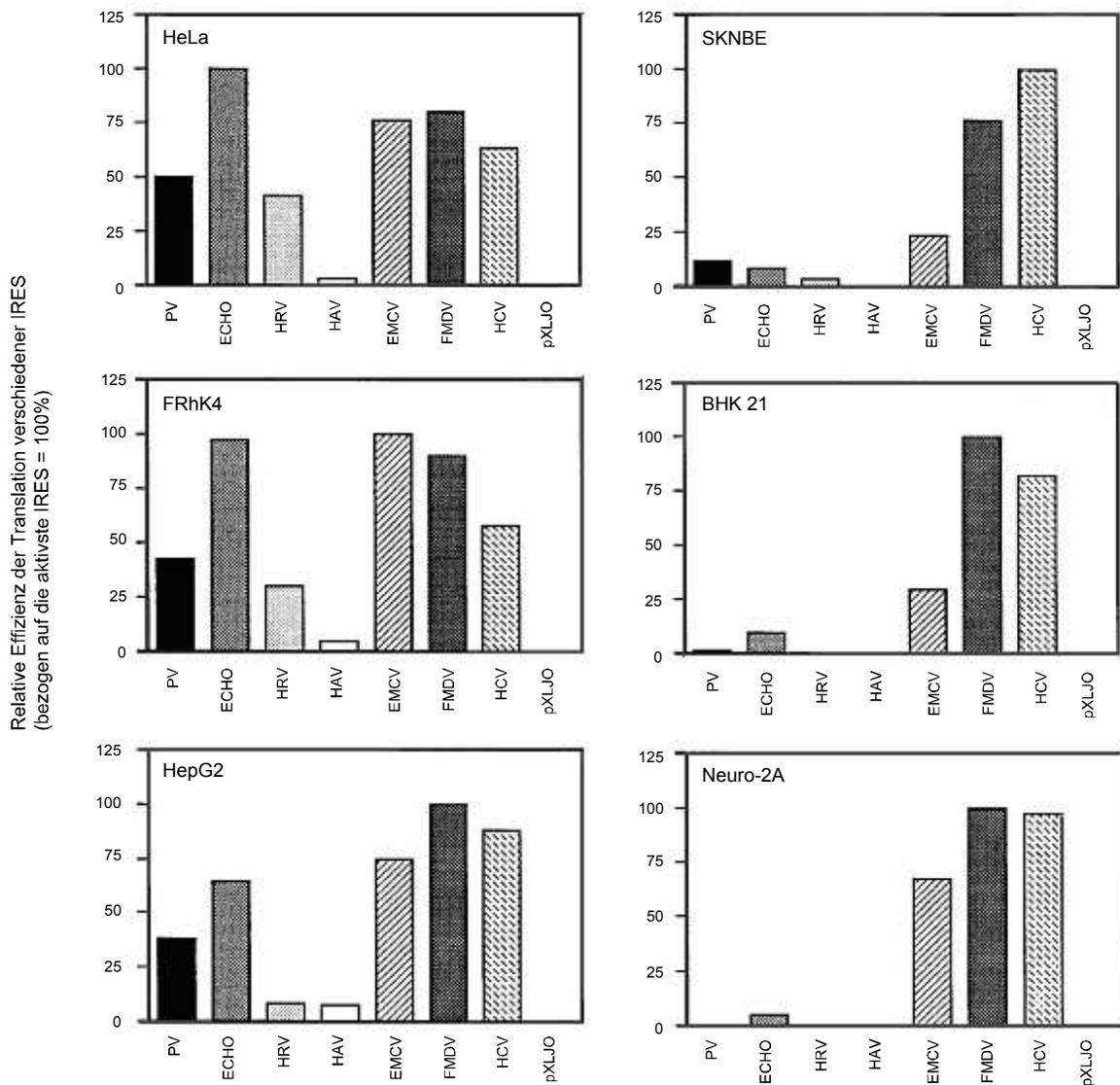


Abb. 22: Vergleich der Wirksamkeit verschiedener IRES-Regionen auf die Translation von verschiedenen Zelllinien (modifiziert nach Borman et al., 1997)

Vaccinia-Virus wurde mit Hilfe eines Plasmid pXLJO mit den IRES-Regionen verschiedener Picornaviren (Poliovirus Typ1, ECHO-Virus Typ 25, HRV-2, HAV, EMCV, FMDV, HCV) rekombiniert. Mit diesen Rekombinanten erfolgte die Infektion von FRhK4-, HepG2, Neuro-2A- und BHK-Zellen. Als Kontrolle diente das Vaccinia-Virus mit dem unrekombinierten Plasmid pXLJO.

Der Nachweis neusynthetisierter Proteine erfolgte durch Markierung mit ^{35}S -Methionin und Detektion mittels Autoradiographie. Die IRES mit der größten Effizienz in einer Zelllinie wird als 100% definiert und dient als Vergleich für die anderen IRES-Regionen.

4.5. Mögliche Ursachen des Effekts von zellgebundenem ICAM-1 auf die Aufnahme von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen im Unterschied zu HeLa-Zellen

Die hier präsentierten Ergebnisse zu den frühen Reproduktionsschritten von humanem Rhinovirus Typ 14 in HeLa- und BHK-ICAM-1-Zellen zeigen, dass HRV-14 in HeLa-Zellen nach rezeptorvermittelter Virusaufnahme und einem pH-abhängigen Uncoating reproduziert werden kann. In BHK-ICAM-1-Zellen kommt es dagegen zu einer rezeptorvermittelter Aufnahme des Virus ohne eine weitere Reproduktion. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse musste daher davon ausgegangen werden, dass die Blockade des Reproduktionszyklusses von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen

- a) bei oder kurz nach dem 'Uncoating' mit fehlender Freisetzung der viralen RNA aus dem Viruskapsid oder
- b) während der Initiation der Translation der viralen RNA (s. Abb. 3) stattfand.

Im Folgenden soll versucht werden, unter Berücksichtigung der Reproduktionsabläufe bei anderen Viren (s. 4.3 und 4.4) Ursachen für diese Blockade aufzuzeigen.

I. Mehrere zellulärer Virusrezeptoren für einzelne Picornaviren

Für Polioviren wurden mehrere Virusrezeptoren identifiziert. Der Poliovirusrezeptor (PVR) stellt ein 67 kD großes Glykoprotein dar (Mendelsohn et al., 1989). Daneben wurden als weitere polioviruspezifische Rezeptoren ein 100 kD großes Protein (Shepley et al., 1988; Shepley et al., 1994) sowie ein 50 kD großes und ein 23-25 kD großes Glykoprotein als zusätzliches Bindungsprotein (Barnert et al., 1992) nachgewiesen. Bei einem Rhinovirus der 'Minor-Gruppe', HRV-2, ist eine Bindung an ein weiteres Rezeptorprotein, alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (α_2 MR/LRP) nachgewiesen worden (Hofer et al., 1994). Dieses Protein unterliegt über Konformationsänderungen einer Kontrolle seiner Aktivität durch ein Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP) (möglicherweise ein weiteres Bindungsprotein für HRV-2). Die Infektionsrate von HRV-2 ist in LDLR-defizienten Zellen umgekehrt proportional zur exprimierten RAP-Menge (Williams et al., 1992). Bei humanem Rhinovi-

rus Typ 2 existieren also mehr als 1 Virusrezeptor. Die Aufnahme von HRV-16 in Makrophagen ohne eine produktive Infektion ähnelte dem Reproduktionszyklus in BHK-ICAM-1-Zellen. Da eine solche Aufnahme nicht durch Anti-ICAM-1 hemmbar ist, lässt sich die Existenz zusätzlicher, bislang unbekannter Virusrezeptoren für HRV-14 nicht ausschließen (Gern et al., 1996).

II. Vorhandensein zellulärer Ko-Faktoren

Weiterhin kann das Vorhandensein von Ko-Faktoren (ITAFs, IRES transacting factors) wie zelluläre Translationsproteine (PTB, p97) und die virale Proteinase 2A (Borman et al., 1995; Ziegler et al., 1995; Borman et al., 1997; Hunt et al., 1999; Pestova et al., 2001) für die Effizienz der Translation viraler RNA von Bedeutung sein. Die Ko-Expression der entero- und rhinoviraler Proteinase 2A modulieren durch die Inhibition des zellulären Translationsinhibitionsfaktors eIF4G die IRES-gesteuerte Translation (Hunt et al., 1999). Eine Mutation der viralen Proteinase 2A führt daher zu einer Veränderung der Aktivität der Translation (Macadam et al., 1994). Bei BHK-ICAM-1-Zellen könnte es möglicherweise zu einer Störung dieser modulierenden Funktion der viralen Proteinase 2A kommen. Eine erfolgreiche Initiation der Translation von HRV-14 wäre dann nur noch erschwert möglich.

III. Sekundärstrukturen der 5'-NTR

Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von HeLa- und BHK-ICAM-1-Zellen liegt vielleicht auch in den unterschiedlichen Sekundärstrukturen der 5'-nichttranslatierten Regionen zwischen Coxsackievirus A21 und Humanem Rhinovirus 14 (Zell et al., 1997). Die 5'-NTR der Rhinoviren unterscheiden sich von den 5'-NTR der Enteroviren hauptsächlich durch eine erweiterte Domäne VI und das Fehlen der Domäne VII. Diese Unterschiede könnten die virale Translation von HRV-14 in transfizierte BHK-ICAM-1-Zellen erschweren. Das könnte eine Mitursache für das Phänomen sein, dass eine Transfektion von unterschiedlichen Zellen mit Virusrezeptoren bei unterschiedlichen Viren auch unterschiedliche Ausbildung der Permissivität dieser Zellen bedeutet (s. 4.3).

Zusammenfassend lässt sich über die unterschiedlichen Reproduktionszyklen von HRV-14 in HeLa- und BHK-ICAM-1-Zellen Folgendes sagen:

Die Blockade des Reproduktionszyklusses von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen sollte bei oder kurz nach dem Zeitpunkt des Uncoating stattfinden. Die Ursache dieser Blockade liegt am wahrscheinlichsten auf der Ebene der Initiation der Translation der viralen RNA. Eine genaue Ermittlung dieser Ursache bedarf weiterer Forschung.