

1. Einleitung

1.1. Die Familie der Picornaviridae

Die Familie der Picornaviridae, deren Name sich von 'klein' (pico) und dem Typ der Nukleinsäure (RNA) ableitet, wird in die Genera Enterovirus, Cardiovirus, Hepatovirus, Rhinovirus, Aphthovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus und Teschovirus unterteilt (Tab. 1) (Zeichhardt, 1991; Rueckert, 1996; King et al., 1999; Pringle, 1999; King et al., 2000; King et al., 2001).

Zu den wichtigen humanpathogenen Picornaviren gehören die Polioviren, Coxsackieviren der Gruppen A und B, ECHO-(enteritic cytopathogenic human orphan) Viren und die Enteroviren Typ 68-71 aus dem Genus Enterovirus, die humanen Rhinoviren aus dem Genus Rhinovirus und das Hepatitis A Virus aus dem Genus Hepatovirus.

Die besonders gut charakterisierten humanpathogenen Enteroviren sind im Gegensatz zu den Rhinoviren säurestabiler und führen zu einer zyklischen Infektion (Melnick, 1996).

Die Enteroviren werden fäkal-oral übertragen und vermehren sich nach der Aufnahme über virusspezifische Wirtszellrezeptoren primär im lymphatischen Gewebe des Rachenraums. Durch die Säurestabilität der Enteroviren kommt es nach Passage der Säurebarriere des Magens zur Infektion der Darmepithelien. Die Mehrzahl der Infektionen (90-95%) verläuft asymptomatisch unter der Ausbildung neutralisierender Antikörper (stille Feiung). Die Inkubationszeit beträgt ca. 1-2 Wochen, sie kann aber auch kürzer (2 Tage bei Enterovirus 70) oder länger (bis zu 35 Tagen) sein. Nach der Vermehrung im Intestinaltrakt kann das Virus durch die abführenden Lymphbahnen in den Blutkreislauf gelangen und zu einer zyklischen Infektion mit Virämie und Ausbreitung auf verschiedene Organsysteme in Abhängigkeit von der Art des Enteroviruses führen. So zeichnen sich z.B. Polioviren durch ihren ausgeprägten Neurotropismus aus, der bei manifester Infektion des Zentralnervensystems zum klinischen Bild einer

Tab. 1: Die Familie der Picornaviridae (Zeichhardt, 1991; Rueckert, 1996; King et al., 1999; Pringle, 1999; King et al., 2000; King et al., 2001)

Genus	Spezies	Mitglieder	Serotypen	Eigenschaften
Enterovirus	Poliovirus	Poliovirus 1-3	3	säurestabil, pH 2-10, Dichte in CsCl 1,33-1,34 g/ml
	Humanes Enterovirus A	Coxsackievirus A2-8, A10, A12, A14, A16	12	
		Enterovirus 71		
	Humanes Enterovirus B	Coxsackievirus B1-6, A9	36	
		ECHO-Virus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33		
		Humanes Enterovirus 69		
	Humanes Enterovirus C	Coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-22, A24	11	
	Humanes Enterovirus D	Enterovirus 68, 70	2	
	Bovines Enterovirus	Bovines Enterovirus 1, 2	2	
	Porzines Enterovirus A	Porzines Enterovirus 8	1	
	Porzines Enterovirus B	Porzines Enterovirus 9, 10	2	
	unklassifiziert	Affen Enterovirus 1-18, N125, N203	20	
Cardiovirus	Encephalomyocarditis Virus	Encephalomyocarditis Virus (EMCV) ¹⁾	1	
	Theilovirus	Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	3	
		Vilyuisk humanes Encephalomyelitis Virus (VHEV)		
		Ratten Encephalomyelitis Virus		
Hepatovirus	Hepatitis A Virus	Humanes Hepatitis A Virus	1	
	Aviäres Encephalomyelitis-artige Viren	Aviäres Encephalomyelitis Virus	1	
Rhinovirus	Humanes Rhinovirus A	Humanes Rhinovirus 1 ²⁾ , 2, 7, 8, 9-13, 15, 16, 18, 19, 21-25, 28-31, 33, 34, 36, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49-51, 53-56, 58-68, 71, 73-78, 85, 89	58	säurelabil, pH <6, Dichte in CsCl 1,38-1,42 g/ml
	Humanes Rhinovirus B	Humanes Rhinovirus 3-6, 14, 17, 26, 27, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 86	17	
	unklassifiziert	Humanes Rhinovirus 20, 32, 35, 40, 43, 46, 57, 80-84, 87, 88, 90-100, Bovines Rhinovirus 1-3	28	

¹⁾ auch Mengovirus, Maus Elberfeld (ME) Virus, Columbia SK Virus, MM

²⁾ Humanes Rhinovirus 1 wird in 2 antigene Subtypen HRV-1A und HRV-1B unterteilt

Fortsetzung Tab. 1

Genus	Spezies	Mitglieder	Sero- typen	Eigen- schaften
Aphthovirus	Maul- und Klauenseuche Virus	Maul- und Klauenseuche Virus O, A, C, Asia 1, SAT 1-3	7	säurelabil
	Equines Rhino- virus	Equines Rhinovirus A	1	
Parechovirus	Humanes Par- echovirus (HPeV)	Humanes Parechovirus 1, 2 ³⁾	2	
Erbovirus	Equines Rhinitis B Virus (ERBV)	Equines Rhinitis B Virus ⁴⁾	1	
Kobuvirus	Aichi Virus (AiV)	Aichi Virus	1	
Teschovirus	Porzines Te- schovirus (PTV)	Porzines Teschovirus 1-10 ⁵⁾	10	
	unklassifiziert	Säurestabiles Equines Picornaviren (EqPV) Aviäres Entero-artiges Virus 2-4 (AELV-1-3) Aviäres Nephritis Virus 2-3 (ANV-2-3) Barramundi Virus-1 (BaV) Cockatoo Entero-artiges Virus (CELV) Enten Hepatitis Virus 1, 3 (DHV-1,3) Equines Rhinovirus 3 (ERV-3) Guineafowl transmissible enteritis Virus (GTEV) Harbour seal picorna-like Virus (SPLV) Ljungan Virus (LV) ⁶⁾ Sea-bass virus-1 (SBV) Sikhote-Alyn Virus (SAV) Smelt virus-1, 2 (SmV-1,2) Syr-Daria Valley fever Virus (SDFV) Taura syndrome virus of marine penaeid shrimp (TSV) Turbot Virus-1 (TuV-1) Puten Entero-artiges Virus (TELV) Puten Hepatitis Virus (THV) Puten Pseudo Enterovirus 1-2 (TPEV-1-2)		

³⁾ auch ECHO-Virus 22, 23 (Ghazi et al., 1998; Stanway et al., 2000)
⁴⁾ auch Equines Rhinovirus 2
⁵⁾ auch Porzines Enterovirus 1-10
⁶⁾ Ljungan virus ist nahe verwandt zu den Parechoviren.

Poliomyelitis führen kann. ECHO-Viren besitzen einen breiteren Zelltropismus und können daher viele unterschiedliche Organsysteme infizieren. Eine Zusammenfassung der Krankheitsbilder bei Picornavirusinfektionen zeigt die Tabelle 2.

Tab. 2: Humanpathogene Picornaviren - klinische Syndrome (modifiziert nach Zeichhardt, 1992; Melnick, 1996; Stanway et al., 2000)

Genus	Spezies	Typ	Klinische Syndrome
Enterovirus	Poliovirus	1-3	Abortive Poliomyelitis (Minor Krankheit)
			Nichtparalytische Poliomyelitis
			Paralytische Poliomyelitis (Major Krankheit)
			Postpolio-Syndrom
	Coxsackievirus A	2, 3, 4, 5, 6, 8, 10	Herpangina (vesikuläre Pharyngitis)
			10
		2, 4, 7, 9, 10, 23	asept. Meningitis
		7, 9	Paralyse (selten)
		2, 4, 9, 16, 23	makuläres Exanthem
		4, 5, 6, 9, 10, 16	vesikuläres Exanthem
		5, 10, 16	Hand-, Fuß- und Mundkrankheit
		9, 16	Pneumonie bei Kindern
		21, 24, u.a.	'Common Cold', Sommergrippe
		4, 9	Hepatitis
		18. 20. 21. 22. 24	Diarrhöen
		24	akute hämorrhagische Konjunktivitis
		Coxsackievirus B	1, 2, 3, 4, 5
	1, 2, 3, 4, 5, 6		asept. Meningitis
	2, 3, 4, 5		Paralyse (selten)
	1, 2, 3, 4, 5		schwere system. Infektion b. Kindern, Meningoenzephalitis
	1, 2, 3, 4, 5		Bornholmsche Erkr. (epidem. Pleurodynie, akute endem. Myalgie)
	1, 2, 3, 4, 5		Perikarditis, Myokarditis
	4, 5		Infektionen des oberen Respirationstrakts
	1, 3, 5		makuläres Exanthem
	5		Hepatitis
	1, 2, 3, 4, 5, 6		unkl. fieberhafte Erkr.
1, 2, 4	Pankreatitis		
4	Diabetes mellitus		

Fortsetzung von Tab. 2

Genus	Spezies	Klinische Syndrome	Klinische Zeichen	
Enterovirus	ECHO-Virus	alle außer 12, 24, 26, 29, 32, 33, 34	aseptische Meningitis	
		2, 4, 6, 9, 11, 33, wahrscheinl. 1, 7, 13, 14, 16, 18, 31	Paralyse (selten)	
		2, 6, 9, 19, wahrscheinl. 3, 4, 7, 11, 14, 18, 22	Enzephalitis, Ataxie, Gullain-Barre-Syndrom	
		2, 4, 6, 9, 11, 16, 18, wahrscheinl. 1, 35, 7, 12, 14, 19, 20	Exantheme	
		4, 9, 11, 20, 25, wahrscheinl. 1-3, 6-8, 16, 19, 22	Infektionen des oberen Respirationstrakts	
		7, 11	Konjunktivitis	
		1, 6, 9	epidem. Myalgien	
		1, 6, 9, 19	Perikarditis, Myokarditis	
		4, 9	Hepatitis	
		Unterschiedl. Typen	Diarrhöen	
	Enterovirus 68-71	68	Bronchitis, Pneumonie	
		70	akute hämorrhagische Konjunktivitis	
		71	aseptische Meningitis	
		70, 71	Paralyse	
		70, 71	Meningoenzephalitis	
		71	Hand-, Fuß- und Mundkrankheit	
			vesikuläres Exanthem	
	Parechovirus	ECHO-Virus 22, 23	22, 23	Hepatitis, Durchfälle
			22, 23	Uncharakteristische fieberhafte Erkrankungen, Sommergrippe
22, 23			Myokarditis	
22, 23			Enzephalitis	
Hepatovirus	Hepatitis A-Virus		Hepatitis	
Rhinovirus	Rhinoviren	1A-100, 1B, "Hanks"	Rhinitis, Kopfschmerz, leichter Halsschmerz, Husten Kompl.: Sinusitis, Otitis media	

1.1.1. Das Humane Rhinovirus Typ 14 (HRV-14)

Zu dem Genus Rhinovirus zählen die humanen Rhinoviren mit 100 Serotypen (Tab. 1; Hamparian et al., 1987; Couch, 1996), die aufgrund ihrer Spezifität für ihren viralen Zellrezeptors in eine größere 'Major-Gruppe' mit 89 Serotypen und eine kleinere 'Minor-Gruppe' mit 10 Serotypen unterteilt werden. Andere humane Rhinoviren wie das Rhinovirus 87 sind noch keiner dieser Gruppen zugeordnet. Zum Genus Rhinovirus zählen außerdem die bovinen Rhinoviren mit 3 Serotypen.

Die Rhinoviren unterscheiden sich von den Enteroviren durch ihre leicht höhere Dichte (1,38-1,42 g/ml) und ihre Säurelabilität, weshalb die Magensäure eine natürliche Barriere für die Rhinoviren darstellt (Couch, 1996). Rhinoviren verursachen daher nur eine lokale Infektion des oberen Respirationstrakts, nämlich den Schnupfen ('Common Cold') (Tab. 2). Nach einer Inkubationszeit von 1-4 Tagen erkranken ca. zwei Drittel der Infizierten. Rhinitis mit verstopfter Nase oder Nasenlaufen, Niesen, Kopf- und Halsschmerzen, Husten und Schüttelfrost sind die häufigsten Symptome der Infektion. Darüber hinaus besteht eine Prädisposition zu weiteren sekundären Erkrankungen, die durch bakterielle Superinfektionen entstehen, wie Sinusitis, Otitis media und Infektionen des unteren Respirationstrakts.

Das humane Rhinovirus Typ 14 (HRV-14) zählt zu den am besten untersuchten Picornaviren und ist ein Mitglied der 'Major-Gruppe' der Humanen Rhinoviren.

1.1.2. Die Virusstruktur von HRV-14

Die Rhinoviren haben eine ikosaedrische Struktur mit einem Durchmesser von 30 nm und besitzen eine einzelsträngige (+)-Strang RNA (messenger RNA) mit 7212 Nukleotiden (Callahan et al., 1985; Lee et al., 1993) und einer Masse von $8,2 \times 10^6$ D (Stanway et al., 1984). Die RNA ist am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende kovalent mit einem 22 Aminosäuren langen Protein VPg (Virusprotein genome linked) verknüpft (Wimmer, 1982). Die Genomstruktur wird in Abschnitt 1.3 beschrieben. Die die

RNA umgebene 10-15 nm dicke Proteinhülle (Kapsid) besteht aus 60 symmetrisch angeordneten Untereinheiten (Abb. 1A; Rueckert, 1996), die als Protomere bezeichnet werden. An jeder der 12 fünffachen Symmetrieachsen des Kapsids befindet sich ein Pentamer aus 5 Protomeren. Jedes Protomer enthält die Kapsidproteine VP1 (289 Aminosäuren, 32,1 kD), VP2 (262 Aminosäuren, 28,5 kD), VP3 (236 Aminosäuren, 26,2 kD) und VP4 (69 Aminosäuren, 7,1 kD). Die 5 VP1-Proteine bilden den Mittelpunkt mit der fünffachen Symmetrieachse. Je 5 Proteine VP2 und VP3 liegen ringförmig alternierend um die VP1-Proteine. An den Ecken des Pentamers, wo je 3 VP2- bzw. 3 VP3-Proteine zusammenstoßen, wird die dreifache Symmetrieachse gebildet. Die zweifache Symmetrieachse liegt auf den Mittelpunkten der Seiten des Pentamers. Dort sind je 2 VP2-Proteine benachbart (Abb. 1 A). Die drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 liegen an der Kapsidoberfläche, während sich VP4 im Inneren des Kapsids befindet und wahrscheinlich Kontakt mit der RNA hat.

Aus Röntgenstruktur-Untersuchungen ist bekannt, dass im Protomer zwischen VP1 und VP3 eine Grube von 2,5 nm Tiefe und 1,2 bis 3 nm Breite liegt (Abb. 1D). Diese Grube stellt die Bindungsstelle von HRV-14 für seinen viralen Zellrezeptor ICAM-1 dar und wird als 'Canyon' bezeichnet (Rossmann et al., 1985; Arnold et al., 1990; Bella et al., 1999).

Unterhalb der viralen Bindungsstelle, des sog. 'Canyons', liegt im Kapsidprotein VP1 eine hydrophobe Tasche (Abb. 1B), in die synthetische antivirale Substanzen (WIN-Compounds) hineindiffundieren. Dadurch können diese antivirale Substanzen sowohl die Virusadsorption an Zellen (Pevear et al., 1989) als auch die Freisetzung viraler RNA, das sog. 'Uncoating' (Smith et al., 1986; Zeichhardt et al., 1987), verhindern.

Der virusspezifische Zellrezeptor ICAM-1 mit seiner Größe von 2,5 x 2,5 nm ist im Gegensatz zu neutralisierenden Antikörpern klein genug, um in den 'Canyon' zu passen (Abb. 1E). Die 5 'Canyons' aus den 5 Protomeren bilden innerhalb eines Pentamers eine ringförmige Grube, die um die fünffache Symmetrieachse verläuft. Da ein Viruskapsid insgesamt 12 fünffache Symmetrieachsen besitzt, existieren 12 solcher ringförmigen Gruben in einem Viruskapsid. Um die Adsorption von HRV-14 an die Zelloberfläche zu ermöglichen, wird postuliert, dass 5 ICAM-1 Moleküle mit 5 'Can-

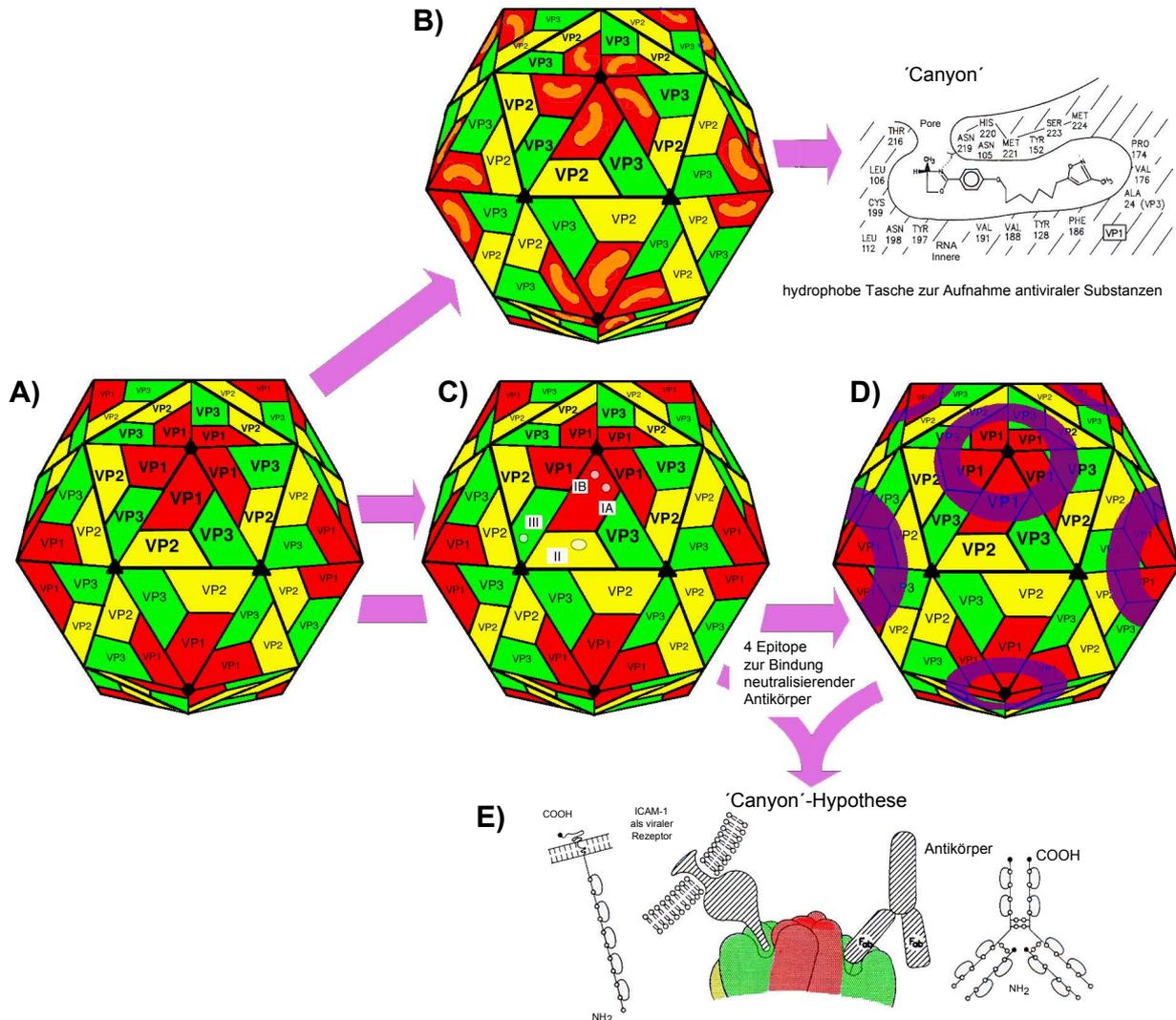


Abb. 1 Kapsidstruktur von Picornaviren (modifiziert nach Rossmann et al., 1987)

A) Das Viruskapsid von Picornaviren setzt sich aus 60 symmetrisch angeordneten Kapsidproteinen zusammen, die mit VP1, VP2, VP3 und VP4 bezeichnet werden. Um die 12 fünffachen Symmetrieachsen lagern sich 5 Protomere an. Diese Einheit aus 5 Protomeren wird Pentamer genannt. Ein Protomer (dicke Linien) ähnelt einem Dreieck und enthält als Untereinheit vier Kapsidproteinen. Nur VP1, VP2 und VP3 sind von außen sichtbar, VP4 liegt im Inneren des Kapsids verborgen und hat wahrscheinlich Kontakt mit der RNA.

B) Im Kapsidprotein VP1 liegt unterhalb der viralen Bindungsstelle, des sog. 'Canyons', eine hydrophobe Tasche (orange).

C) Die verschiedenen Kapsidproteine besitzen Epitope für neutralisierende Antikörper, die bei HRV-14 mit NIm-IA, NIm-IB, NIm-II und NIm-III bezeichnet werden.

D) Um die fünffache Symmetrieachse verläuft eine ringförmige Grube (violett), die sich aus 5 'Canyon'-Regionen zusammensetzt. Jede 'Canyon'-Region wird von Proteinanteilen aus VP1 und VP3 eines Protomers gebildet. Jeder 'Canyon' stellt die virale Rezeptorbindungsstelle dar (Rossmann, 1994; Bella et al., 1999).

E) Dieser 'Canyon' ist groß genug für die Bindung des zellulären Virusrezeptors, aber zu klein für die Bindung eines Antikörpers. Die Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper liegen daher nicht innerhalb des 'Canyons', sondern nur in räumlicher Nachbarschaft zum 'Canyon' (vgl. C).

yon'-Regionen einer ringförmigen Grube reagieren (Rossmann, 1994; Bella et al., 1999).

1.2. Virusrezeptoren

Zu Beginn einer Virusinfektion steht bei den meisten Viren die Bindung des Virus an die Zelle durch spezifische Erkennungsmoleküle, sog. Rezeptoren. Die physiologische Funktion dieser Rezeptoren liegt in der Reaktion auf extrazelluläre Signale wie Mediatoren (z.B. Histamin), Hormone (z.B. Insulin) oder Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin) durch die Zelle. Dadurch werden Entwicklung und Organisation in Geweben reguliert, Wachstum und Teilung kontrolliert und andere Aktivitäten koordiniert. Außer den physiologischen Liganden können auch andere biologisch aktive Moleküle mit Rezeptoren in Wechselwirkung treten. So beruht die Wirkung von einigen Pharmaka auf ihrer den natürlichen Liganden verwandten Struktur (z.B. Succinylcholin für den Acetylcholin-Rezeptor).

Für mehrere Picornaviren sind diese virusspezifischen Rezeptoren identifiziert (Tab.3).

Es sind für die verschiedenen Serotypen der einzelnen Spezies unterschiedliche, teilweise auch mehrere Rezeptoren identifiziert worden. Allerdings kann ein einzelnes Rezeptormolekül auch verschiedene Virusspezies erkennen. So wurden für Polioviren mehrere Virusrezeptoren identifiziert. Der Poliovirusrezeptor (PVR) stammt aus der Immunglobulin-Superfamilie und stellt ein 67 kD großes Glykoprotein dar (Mendelsohn et al., 1989). Daneben wurden als weitere polioviruspezifische Rezeptoren das 100 kD große CD44 (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. Coxsackieviren der Gruppe A benutzen Integrine wie den Vibronectin-Rezeptor (Mbida et al., 1992; Roivainen et al., 1994) oder das 'Intercellular Adhesion Molecule 1' ICAM-1 (Colonno et al., 1986; Tomassini et al., 1986; Roivainen et al., 1996) als Rezeptoren. Bei den Mitgliedern der Coxsackieviren der Grup-

Tab. 3: Virusrezeptoren für die unterschiedlichen Picornaviren (modifiziert nach Zeichhardt et al., 1999)

Spezies	Serotyp	Rezeptor	Familie
Poliovirus	1-3	Poliovirusrezeptor (PVR) (Mendelsohn et al., 1989; Koike et al., 1990)	Immunglobulin-Superfamilie
		CD44 (Shepley et al., 1988; Shepley et al., 1994)	
		zusätzliches Bindungsprotein: 50- und 23-/25-kD HeLa-Zellmembranproteine (Barnert et al., 1992)	
Coxsackievirus A	A9	Vibronectin-Rezeptor ($\alpha_v\beta_3$) (Mbida et al., 1992; Roivainen et al., 1994)	Integrin
	A13, A18, A21	'Intercellular Adhesion Molecule 1' ICAM-1 (Colonno et al., 1986; Tomassini et al., 1986; Roivainen et al., 1996)	Integrin
	A21	zusätzliches Bindungsprotein: Decay accelerating factor (DAF; CD55) (Shafren et al., 1997b)	
Coxsackievirus B	B1-6	Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997)	Immunglobulin-Superfamilie
	B1, B3, B5	Decay accelerating factor (DAF; CD55) Mohanty et al., 1993; Shafren et al., 1995)	
ECHO-Virus	1, 8	very late antigen-2 VLA-2 (α -Kette) (Bergelson et al., 1992; Bergelson et al., 1994)	Integrin
	3, 6, 7, 11, 12, 20, 21, 29, 33	Decay accelerating factor (DAF; CD55) (Bergelson et al., 1994)	
	22	$\alpha_v\beta_1$ (Pulli et al., 1997)	Integrin

Fortsetzung von Tab. 3

Spezies	Serotyp	Rezeptor	Familie
Enterovirus	70	Decay accelerating factor (DAF; CD55) (Karnauchow et al., 1996)	
Humanes Rhinovirus	Major-Gruppe (alle außer Minor-Gruppe und 87)	Intercellular adhesion molecule ICAM-1 (Tomassini et al., 1986; Greve et al., 1989; Staunton et al., 1989)	Integrin
	Minor-Gruppe (1A, 1B, 2, 29, 30, 31, 44, 47, 49, 62)	low density lipoprotein-Rezeptor (Mischak et al., 1988; Hofer et al., 1994)	
	87	Sialoprotein (Uncapher et al., 1991)	
Hepatitis A-Virus		α_2 -Makroglobulin (Zajac et al., 1991)	
Encephalomyocarditis (EMC) Virus		vascular cell adhesion molecule VCAM-1 (Huber, 1994)	Integrin
Theiler's murine encephalomyelitis (TMEV)		Sialyloligosaccharid (Fotiadis et al., 1991; Zhou et al., 1997)	

pe B existiert ein gemeinsamer Rezeptor für Coxsackie- und Adenoviren (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997) und als zusätzlicher Rezeptor der Decay accelerating factor (DAF, Mohanty et al., 1993; Shafren et al., 1995).

Rhinoviren der 'Major-Gruppe' wie z.B. HRV-9, HRV-14 oder HRV-16 werden wie einige Serotypen von Coxsackieviren der Gruppe A von ICAM-1 erkannt (Greve et al., 1989, s. 1.4.). Für die 'Minor-Gruppe' der Rhinoviren wie HRV-1A, HRV-1B oder HRV-2 wurde als Rezeptor ein Mitglied der Familie der 'low density lipoprotein'-Rezeptoren identifiziert (Mischak et al., 1988; Hofer et al., 1994).

1.2.1. ICAM-1 als Virusrezeptor für HRV-14

Ein gut charakterisiertes Virus-Virusrezeptor-System ist das System mit Humanem Rhinovirus Typ 14 (HRV-14) und seinem Rezeptor 'Intercellular Adhesion Molecule 1' (ICAM-1).

Das 'Intercellular Adhesion Molecule 1' (ICAM-1) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und stellt den wichtigsten physiologischen Liganden für das 'Lymphocyte Function Associated Antigen 1' (LFA-1) dar (Marlin et al., 1987; Huang et al., 1995; Bella et al., 1999). Weitere mögliche Liganden sind das Makrophagen-Antigen 1 (Mac-1) auf Leukozyten (Lo et al., 1989; Diamond et al., 1993), das Sialophorin CD 43 (Rosenstein et al., 1991; Manjunath et al., 1995), lösliches Fibrinogen (Altieri et al., 1995), der Matrixfaktor Hyaluronan und mit dem Malariaerreger Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten (Berendt et al., 1992; Tacchini-Cottier et al., 1995). Andere Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind das 'Intercellular Adhesion Molecule 2' (ICAM-2), Vascular Adhesion Molecule 1' (VCAM-1) und Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule 1' (MadCAM-1) (Wang et al., 1998).

ICAM-1 findet man auf Zellen mit immunologischen Funktionen wie Lymphozyten, Monozyten (Dustin et al., 1986), Makrophagen (Most et al., 1992), Thymuszellen, dendritische Zellen der Tonsillen (Bjorck et al., 1992), Peyer'sche Plaques (Westermann et al., 1994; Ruedl et al., 1996), Astrozyten (Aloisi et al., 1992), Keratinozyten (Barker et al., 1989; Morelli et al., 1994), Darmmukosazellen (Kvale et al., 1992; Norton et al., 1992; Ruedl et al., 1996), Fibroblasten (Piela-Smith et al., 1991) und anderen Zellen wie Epithel- oder Endothelzellen (Dustin et al., 1986; Pober et al., 1986). LFA-1 kommt auf Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen (Makgoba et al., 1988; Tohma et al., 1992; Hviid et al., 1993), Thymozyten (Yong et al., 1990) und natural killer-Zellen (Heicappell et al., 1994; Vigano et al., 1994) vor.

ICAM-1 interagiert mit LFA-1 und spielt als kostimulierendes Molekül auf antigen-präsentierenden Zellen bei der Aktivierung von MHC-II tragenden T-Zellen, auf anderen Zellen in Zusammenarbeit mit MHC-I bei der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen eine Rolle (Moingeon et al., 1991; Roncarolo et al., 1994). Es reguliert so die Lyse

allogener (Bagnasco et al., 1990; Bumgardner et al., 1998), xenogener (Moses et al., 1992; Horimoto et al., 1997), virusinfizierter (Rochford et al., 1993; Dennis et al., 1995; Makino et al., 1995; Guerette et al., 1997; Barbeau et al., 1998) und haptensmodifizierter Zellen (Murayama et al., 1997; Nakano, 1998). ICAM-1 steuert natural killer-Zellfunktionen (Vyth-Dreese et al., 1993; Bendall et al., 1995), CD4-abhängige Reaktionen wie T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung (Bjorck et al., 1992; Greicius et al., 1998) und die Phagozytose antikörperbeladener Partikel (Regezi et al., 1993; Mizoi et al., 1995). Auf Endothelzellen sind ICAM-1 und LFA-1 bei der Migration aktivierter Leukozyten zu entzündeten Bereichen beteiligt (Male et al., 1992; Greenwood et al., 1995; Issekutz et al., 1999).

Störungen in der ICAM-1-Expression können durch Beeinflussung der normalen Immunfunktion zur klinischen Manifestation vieler Krankheiten führen. Diese Erkrankungen können Malignome (insbesondere Melanome und Lymphome, Heicappell et al., 1994; Banner et al., 1995; Jiang et al., 1998), Atherosklerose (Suzuki et al., 1997), Ischämien (Kukielka et al., 1993; Seekamp et al., 1993; Williams et al., 1997) oder einige neurologische Erkrankungen sein (Akiyama et al., 1993; Cannella et al., 1995). Weiter sind solche Einflüsse bei vielen entzündlichen Erkrankungen (Jutila, 1992; Bacher et al., 1993; Dalakas, 1995; Tews et al., 1995; Vainer et al., 1997), Infektionen (Dohlsten et al., 1991; Xu et al., 1994; Matsushita et al., 1996), allergischen Erkrankungen (Stanciu et al., 1998), und Transplantatreaktionen (Kanagawa et al., 1991; Gorczynski et al., 1994; Heemann et al., 1994; Arai et al., 1995) bekannt.

ICAM-1 ist ein 90 kD großes, an der Zelloberfläche liegendes Glykoprotein und wird aus einer induzierbaren 3,3 kb m-RNA synthetisiert. Seine Bildung kann durch Zytokine wie Interleukin-1, IFN- γ , Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) induziert werden (Galy et al., 1991; Chong et al., 1992; Saban et al., 1997). Die Regulation von ICAM-1 erfolgt hauptsächlich über die Transkription. Der ICAM-1 Promoter enthält mehrere Enhancer Elemente. Dazwischen liegt ein NF kappa B-Element (Muller et al., 1995; Gern et al., 1996; Tozawa, 1996), das dem Einfluss von 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (Barton et al., 1989; Hansen et al., 1994; Muller et al., 1995), Interleukin-1, Lipopolysacchariden (Grigg et al., 1994; Hmama et al., 1999), TNF- α und Glucokortikoiden (Tessier et al., 1993) unterliegt. Die Regulation der Expression ist zellspezifisch

und abhängig von der Verfügbarkeit von Zytokin- oder Hormonrezeptoren, Signal-Transduktionswegen, Transkriptionsfaktoren und posttranskriptionaler Modifikation (Stratowa et al., 1995).

ICAM-1 enthält 505 Aminosäuren mit einer extrazellulären Domäne von 453 Aminosäuren, die fünf Immunglobulin-ähnliche Strukturen aufweist (Abb. 2; Tomassini et al., 1989; Staunton et al., 1990). Die Transmembranregion besteht aus 24 Aminosäuren und der intrazelluläre Anteil enthält 28 Aminosäuren. Weiterhin weist es einen hohen Glykosilierungsgrad auf und enthält 7-8 N-verknüpfte Oligosaccharide.

Starke Sequenzhomologien wurden mit dem 'Neural Cell Adhesion Molecule' (NCAM) und 'Myelin Associated Glycoprotein' (MAG) gefunden, die ebenfalls fünf Immunglobulin-ähnliche Strukturen als extrazelluläre Domänen enthalten (Simmons et al., 1988). NCAM und MAG sind Adhäsionsmoleküle im Nervensystem, sind aber im Gegensatz zu ICAM-1 homophil, d.h. sie reagieren mit gleichen Molekülen auf anderen Zellen. NCAM und MAG gehören wie ICAM-1 zur Immunglobulin-Superfamilie. Die Wechselwirkung zwischen ICAM-1 und LFA-1 ist die erste beobachtete Reaktion zwischen Mitgliedern der Immunglobulin- und Integrin-Superfamilien (Dustin et al., 1986; Staunton et al., 1988).

ICAM-1 ist der zelluläre Virusrezeptor für humane Rhinoviren der 'Major-Gruppe' wie HRV-14 (Greve et al., 1989; Staunton et al., 1989; Tomassini et al., 1989). Auch einige Coxsackieviren der A-Gruppe (A13, A18, A21) benutzen diesen Rezeptor zur Infektion von Zellen (Colonno et al., 1986; Tomassini et al., 1986; Roivainen et al., 1996). Bei HRV-14 erfolgt die Bindung an ICAM-1 an die beiden äußersten Domänen D1 und D2 (Abb. 2, Marlin et al., 1987; Staunton et al., 1988). Dabei wurde ein intensiver Kontakt zwischen der 'Canyon'-Region von HRV-14 und BC-, CD-, DE-, und FG-Schleifen der Domänen D1 nachgewiesen (McClelland et al., 1991; Rossmann, 1994; Bella et al., 1999). Für lösliche Formen von vollständigem ICAM-1 (sICAM-1) und Formen mit den ersten beiden Domänen konnte weiterhin eine durch die Bindung von HRV-14 auftretende Neutralisation des Virus gezeigt werden (Greve et al., 1991; Staunton et al., 1992; Martin et al., 1993; Casasnovas et al., 1994; Ohlin et al., 1994; Huguenel et al., 1997).

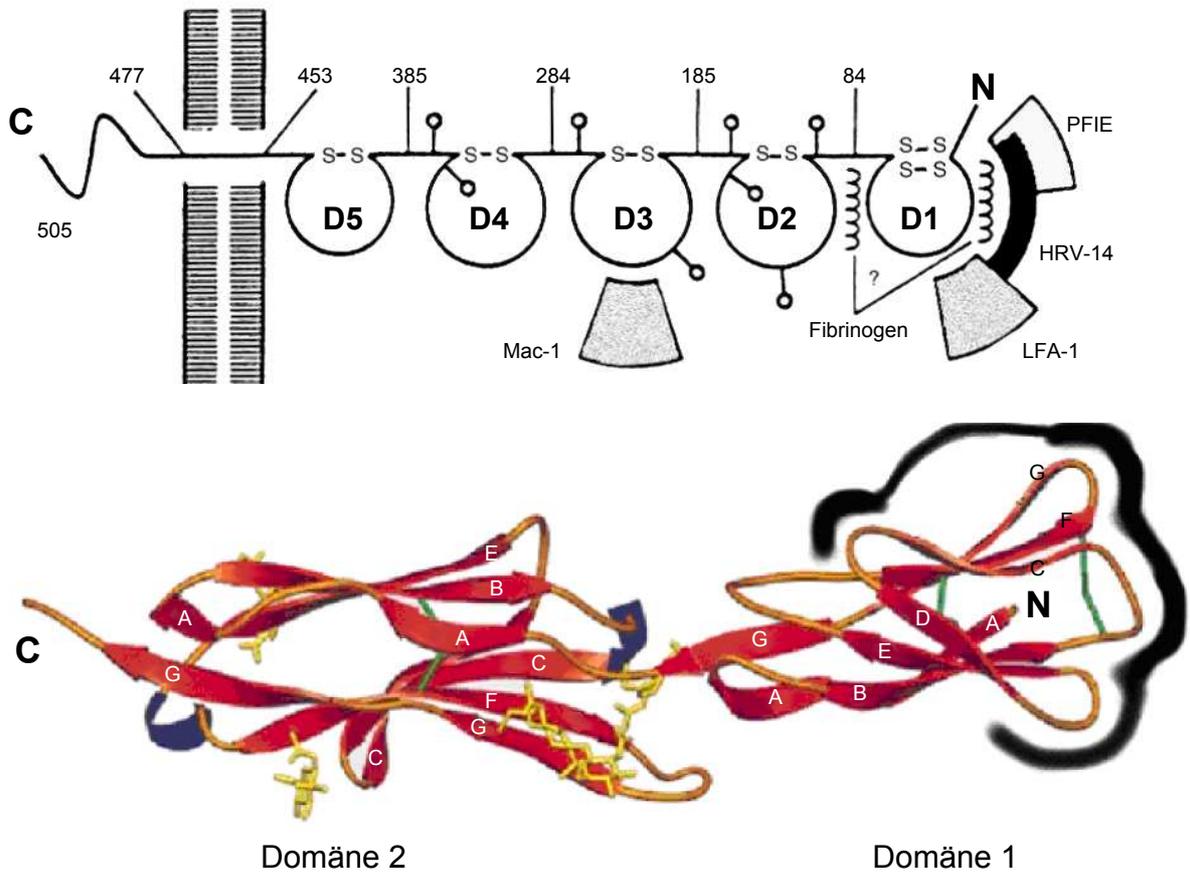


Abb. 2 Aufbau von ICAM-1 (Intercellular Adhesion molecule 1) (modifiziert nach Carson, 1987; Bella et al., 1999)

Die Proteinkette von ICAM-1 besteht aus einem intrazellulärem Teil mit einem C-Terminus, einer Transmembranregion und einem extrazellulärem Teil mit dem N-Terminus. Der extrazelluläre Teil mit 453 Aminosäuren besitzt 5 immunglobulinartige Domänen (D1-D5). Die Glykosylierungsstellen sind 'lollipop'-artig dargestellt. Die Bindungsstellen von HRV-14, LFA-1 und Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten (PFIE) befinden sich auf der Domäne D1, während Mac-1 mit der Domäne D3 interagiert.

Der Ausschnitt mit den Domänen D1 und D2 zeigt die Faltung der Peptidkette. Die β -Faltblattstrukturen sind rot dargestellt und mit den Buchstaben A-G bezeichnet. Die α -Helices werden in blau und die Disulfidbindungen in grün abgebildet. Die N-verknüpften Oligosaccharide sind gelb gezeichnet. Die Kontakte zwischen der 'Canyon'-Region und der Domäne D1 sind schwarz wiedergegeben.

1.3. Der Reproduktionsmechanismus von Picornaviren

Der Reproduktionszyklus von Picornaviren ist am besten für Poliovirus beschrieben und stellt sich wie folgt dar (Rueckert, 1996):

1. Adsorption und Penetration des Virus an bzw. in die Zelle

Die Adsorption des Virus geschieht durch spezifische Bindung des Viruskapsids an Zellrezeptoren. Die spezifische Wechselwirkung zwischen dem Virus und dem Rezeptor entscheidet, ob eine Zelle von einem bestimmten Virus infiziert werden kann. Anfänglich besteht eine reversible Bindung an nur einige Rezeptormoleküle, die anschließend durch Rekrutierung weiterer membrangebundener Virusrezeptoren verstärkt wird (Abb. 3, Schritt 1). Unter Ausbildung eines Clathrin-Mantels an der Zelloberflächenmembran erfolgt die Einstülpung des Virus-Virusrezeptor-Komplexes im 'coated pit' und die Abschnürung in das Zellinnere als 'coated vesicle'. Dieser Weg der Penetration von Picornaviren in die Zellen wird als rezeptorvermittelte Endozytose bezeichnet (Zeichhardt et al., 1985; Willingmann et al., 1989). Im 'coated vesicle' kommt es zu irreversiblen Konformationsänderungen im Viruskapsid, die zum Verlust eines Kapsidproteins (VP4) führen. Diesen Prozess bezeichnet man als 'Eklipse'. Durch den Verlust von VP4 entstehen sog. A-Partikel, die als nichtinfektiöse Partikel wieder eluiert werden können (Joklik et al., 1961; Lonberg-Holm et al., 1974; Willingmann et al., 1989).

2. 'Uncoating'

Die 'coated vesicles' mit dem Virus fusionieren mit Endosomen, die in der Folge mit Lysosomen verschmelzen. In diesen Kompartimenten liegt ein niedriger pH-Wert ($\text{pH} < 5$) vor. Durch die Interaktion von Membran und Virus bilden sich Ionenkanäle in den Membranen (Tosteson et al., 1997). Es wird postuliert, dass im sauren Milieu das membrangebundene Kapsid durch Konformationsänderungen schwillt und so die virale Nukleinsäure freigesetzt wird (Zeichhardt et al., 1985). Dieser Prozess wird als pH-abhängiges 'Uncoating' bezeichnet (Abb. 3, Schritt 1). Die freigesetzte Nukleinsäure

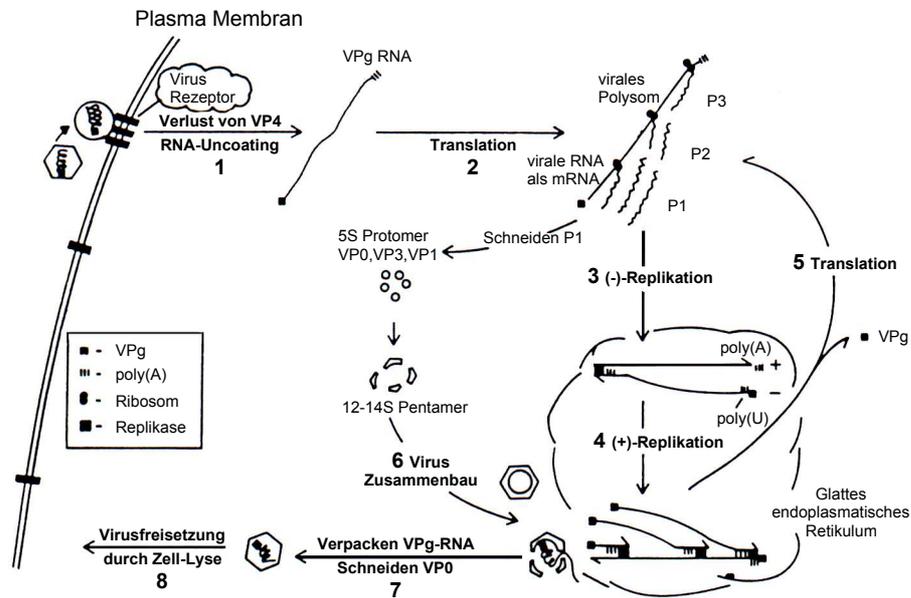


Abb. 3: Übersicht über den Reproduktionszyklus von Picornaviren (modifiziert nach Rueckert, 1996)

Viren lagern sich an membranständige Rezeptoren an. Nach der Penetration durch die Zellmembran wird während des Uncoatings die virale (+)-Strang-RNA freigesetzt (Schritt 1) und in ein Polyprotein translatiert (Schritt 2), aus dem mehrere Vorläuferproteine entstehen. Außerdem wird aus der viralen RNA eine (-)-Strang-RNA repliziert (Schritt 3). Daraus entstehen erneut (+)-Strang-RNAs zur Translation der viralen Proteine und (-)-Strang-RNA (Schritt 4 und 5). Der Viruszusammenbau erfolgt aus 12-14S-Pentameren, die aus unreifen 5S Untereinheiten aus dem Vorläuferprotein P1 entstehen (Schritt 6). Die Reifung des Virus erfolgt durch die Kondensation der Pentameren um die virale (+)-Strang-RNA und einen Reifungsschnitt der Virusproteine in die viralen Proteine VP4, VP2, VP3 und VP1 (Schritt 7). Komplette Viruspartikel werden durch die Lyse der infizierten Zelle freigesetzt (Schritt 8).

trägt kovalent gebunden das virusgebundene Protein VPg. Alternativ konnte in-vitro auch eine pH-unabhängige Freisetzung der viralen RNA beobachtet werden (Gromeier et al., 1990).

3. Synthese von Virusproteinen und -nukleinsäure

Die Genom von Picornaviren enthält eine einzelsträngige (+)-Strang RNA (messenger RNA) aus 7200 bis 8500 Nukleotiden. Es besteht aus einer nichttranslatierten 5'-Region mit dem kovalent gebundenen Protein VPg, dem kodierenden Teil und der nichttranslatierten polyadenylierten 3'-Region, die für die RNA-Synthese wichtig ist (Abb. 4).

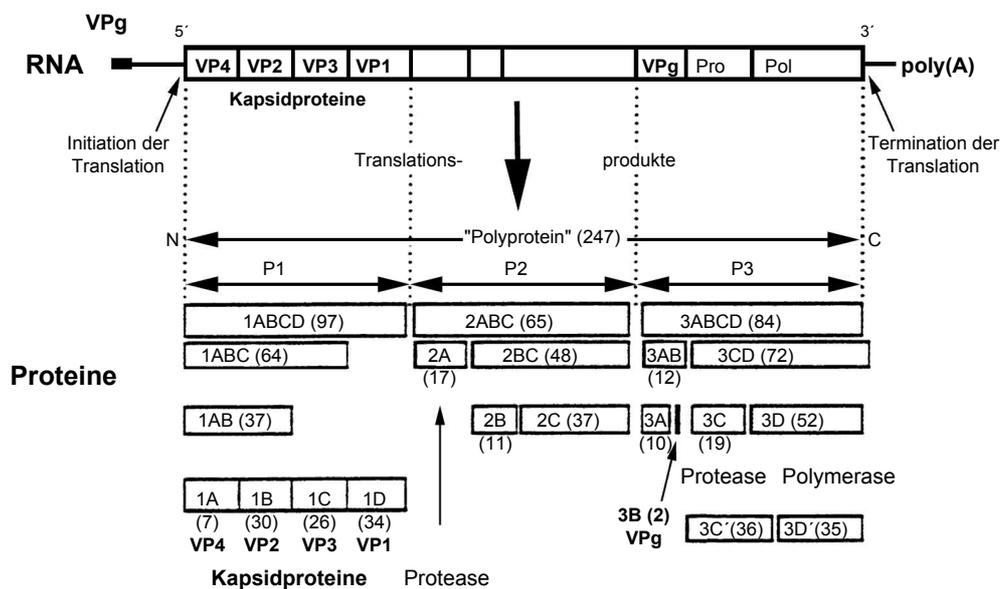


Abb. 4: Organisation des Poliovirus-Genoms und proteolytische Spaltung des Polyproteins

Die virale RNA wird als (+)-Strang-RNA in ein 220 kD großes Polyprotein translatiert. Virale Proteasen zerschneiden das Polyprotein in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3. Aus P3 werden durch weitere proteolytische Schnitte die Polymerase, die Protease und das Virusprotein VPg, das mit der RNA kovalent verknüpft wird, abgespalten. Eine zweite Protease wird aus P2 geschnitten. P1 liefert die Kapsidproteine durch Abspalten von VP1, VP3 und VP0, welches bei der Virusreifung in VP 2 und VP 4 zerlegt wird (aus Willingmann, 1987, modifiziert nach Pallansch et al., 1984).

Der 5'-nichttranslatierte Bereich (5' non translated region, 5' NTR) enthält bei den unterschiedlichen Picornaviren zwischen 624 (HRV-14) und 1200 Basen (Aphthovirus)

(Abb. 5). Er weist eine kleeblattförmige Struktur auf und stellt durch die Bindung eukaryotischer Ribosomen die Initiationsstelle (IRES, internal ribosomal entry site) für die Synthese von viraler RNA und Proteinen dar (Le et al., 1990; Wimmer et al., 1993). Die IRES von Rhino- und Enteroviren ähnelt der von Poliovirus und wird als RE-Typ bezeichnet. Die IRES von Aphtho-, Cardio- und Hepatoviren weisen eine andere Faltung auf und werden als ACH-Typ bezeichnet (Rueckert, 1996; Palmenberg et al., 1997).

Die virale RNA wird als (+)-Strang RNA wie eine messenger-RNA benutzt und in ein 220 kD großes Polyprotein translatiert (Abb. 3, Schritt 2). Dieses Polyprotein wird durch virale Proteasen proteolytisch in mehrere Vorläuferproteine gespalten ('Processing'). Aus dem Polypeptid wird ein Kapsidvorläuferprotein P1, ein mittleres (P2) und ein endständig gelegenes Vorläuferprotein (P3) geschnitten (Abb. 4; Pallansch et al., 1984).

Weitere autokatalytische Schnitte liefern aus P3 3 kleinere Proteine. Die Produkte sind eine Protease (3C), die die viralen Proteine spaltet, ein Protein (3AB), von dem VPg abgespalten wird, das für die Initiation der viralen RNA Synthese notwendig ist und eine RNA Polymerase (3D), die den viralen (+)-Strang in den komplementären (-)-Strang mit Poly(U) am 5'-Ende repliziert (Abb. 3, Schritt 3).

Der (-)-Strang wird unter der Bildung eines multisträngigen replikativen Zwischenproduktes (replikative intermediate, RI), das im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, zur gleichzeitigen Replikation mehrerer (+)-Strang RNA Moleküle benutzt (Abb. 3, Schritt 4). Die (+)-Strang RNAs werden ihrerseits zur Translation der Virusproteine (Abb. 3, Schritt 5) und zur Replikation weiterer (-)-Stränge benutzt.

4. Reifung und Freisetzung der neugebildeten Viren

Der Zusammenbau der Virusproteine zum Kapsid geschieht in der Zelle nicht spontan, sondern in enger Assoziation mit zytoplasmatischen Membranen. Die Morphogenese ist eng an die Virus-RNA-Synthese geknüpft. In einem ersten Schritt des Kapsidzusammenbaus wird aus dem Vorläuferprotein P1 durch die viruskodierte Protease

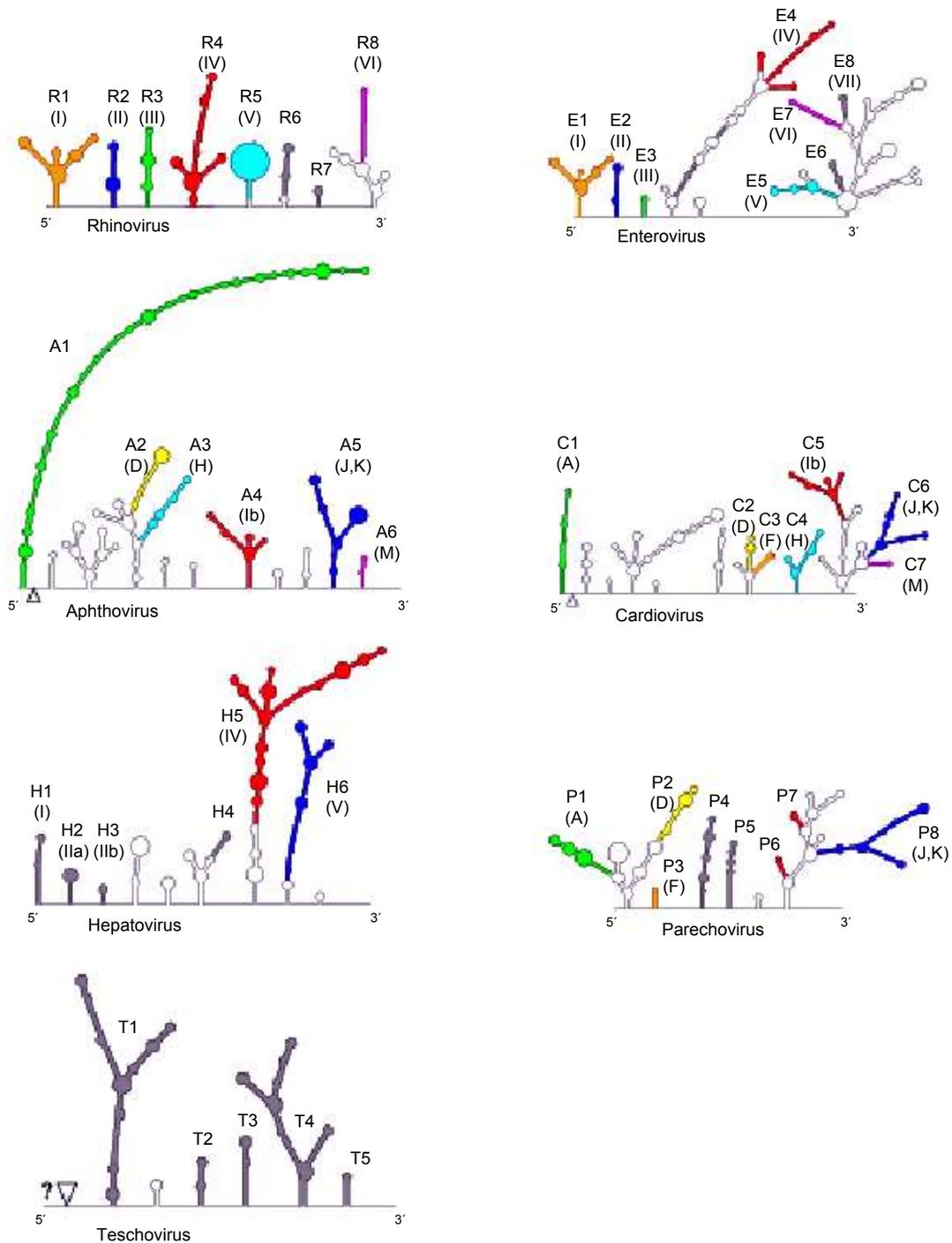


Abb. 5: Schematische 5'-nichttranslatierte Regionen von Picornaviren (modifiziert nach Rueckert, 1996; Witwer et al., 2001)

Die 5'-nichttranslatierten Regionen (5' NTR) von Picornaviren sind als RNA-Sekundärstrukturen dargestellt. Die farbigen Regionen bezeichnen die konservierten Regionen. Die Bezeichnungen in Klammern entsprechen der Nomenklatur im IRES-Modell nach Rueckert (Rueckert, 1996). Dreiecke bedeuten eine poly-C-Sequenz, das ? weist auf fehlende Daten der 5'-NTR von Teschovirus-Sequenzen hin.

eine 5S Untereinheit gebildet (Abb. 3, Schritt 6). Diese unreifen 5S-Protomere werden zu 12-14S-Pentameren zusammengesetzt.

Die (+)-Strang RNA scheint zu einem kompakten Kern zu kondensieren, um den sich jeweils 12 Pentamere anlagern und die Viruskapsidhülle bilden (Abb. 3, Schritt 7). Die Pentamere bestehen aus den Virusproteinen VP0, VP3 und VP1. Infektiöse 150-160S-Virionen werden danach durch einen „Reifungsschnitt“, bei dem VP0 zu VP4 und VP2 gespalten wird, gebildet.

Die fertigen Nukleokapside können sich zu kristallartigen Strukturen anordnen, die elektronenmikroskopisch im Zytoplasma sichtbar sind. Die Art der Virusfreisetzung ist noch unbekannt. Es wird eine Kumulation der neugebildeten Viren in der Zelle bis zu deren Lyse angenommen (Abb. 3, Schritt 8). Alternativ wird auch eine Exozytose als aktive Leistung der Zelle als mögliche Form der Virusfreisetzung diskutiert. Nach ca. 8 Stunden ist der Reproduktionszyklus bei den meisten Picornaviren beendet.

1.4. Zielsetzung

Die ersten Schritte im Infektionszyklus von Viren sind die Adsorption an die Zelloberfläche und das Eindringen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Bei Polioviren handelt es sich dabei um eine rezeptorvermittelte Endozytose (Zeichhardt et al., 1985; Willingmann et al., 1989).

Für Rhinoviren war der genaue Weg der Viruspenetration zum Zeitpunkt der vorliegenden eigenen Arbeit noch unklar. Im Unterschied zu Polioviren wurde bei Rhinoviren der 'Major-Gruppe' als Virusrezeptor nur ein Rezeptor, ICAM-1, identifiziert. Er kommt im Gegensatz zu den Poliovirusrezeptoren *in vitro* auch in löslicher Form vor und führt bei Rhinoviren zu ähnlichen Änderungen in der Virusstruktur wie die Bindung an sein zellständiges Pendant (Hoover-Litty et al., 1993; Casasnovas et al., 1994). Der gleiche Effekt bei Rhinoviren wurde bei der Benutzung von chimären ICAM-1:Immunglobulin Molekülen beobachtet (Martin et al., 1993).

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die frühen Schritte im Reproduktionszyklus eines Rhinovirus der 'Major-Gruppe', in diesem Fall HRV-14, zu untersuchen und zu klären, ob HRV-14 auf dem Weg der rezeptorvermittelten Endozytose seine Wirtszellen infiziert.

Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit der Virusrezeptor allein die Infektion von Zellen determiniert. Dazu wurden BHK-Zellen, die durch den fehlenden Virusrezeptor ICAM-1 nicht in der Lage sind, mit HRV-14 infiziert zu werden, eingesetzt. 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.