

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Hahn
Abteilung Virologie
Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. H. Zeichhardt
Freie Universität Berlin
Fachbereich Humanmedizin
Universitätsklinikum Benjamin Franklin

Die Einschleusung von humanem Rhinovirus Typ 14 (HRV-14) in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Wolf, Kai-Uwe
aus: Berlin

Referent: Univ.-Prof. Dr. Heinz Zeichhardt

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. M. Pauschinger

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.12.2002

Danksagung

Die Arbeit wurde am Institut für Infektionsmedizin in der Abteilung für Virologie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Professor Zeichhardt (Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Regine Heilbronn, vormals Univ.-Prof. Dr. med. Karl-Otto Habermehl) durchgeführt. Für die großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit bin ich Herrn Professor Dr. Heinz Zeichhardt und dem vorherigen Institutsleiter zu tiefem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. H. Zeichhardt und Herrn Dr. P. Grunert danke ich für die Einführung in das Gebiet der Picornavirologie, alle Anregungen und ihre ständige und hilfreiche Diskussionsbereitschaft.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Kirschfeld und Frau Barz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Hennig danke ich für ihre Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Virologie danke ich für ihr freundliches Entgegenkommen und gute Zusammenarbeit.

Abstract

It is generally accepted that virus receptors are the main determinants for permissiveness as shown for poliovirus by Holland and McLaren nearly for forty years. The early steps of reproduction of human rhinovirus type 14 (HRV 14) were studied to what extent the virus receptor ICAM-1 alone determines the infection of cells. BHK cells that lack the virus receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) were not susceptible to HRV-14. As permissive cells HeLa cells were used. To study the influence of the virus receptor on the susceptibility of cells BHK cells were transfected with ICAM-1 (BHK-ICAM-1 cells).

I could show for HeLa cells that HRV-14 is internalized via coated pits and coated vesicles by receptor-mediated endocytosis. A pH-dependent entry mechanism could be demonstrated by exploiting the action of monensin as an ionophore which raises the pH in the acidic endosomes and lysosomes. The progeny of new rhinoviruses was detected by transmission electron microscopy and the measure of infectious virus by plaque titration.

Differently, the HRV-14 infection proceeded in BHK-ICAM 1-cells. In contrast to HeLa cells virus internalization into BHK-ICAM-1 cells was receptor mediated, too. But neither a synthesis of viral RNA nor a production of infectious rhinoviruses was detected. Long chains of virus particles were located in membrane tubes. Virus particles were lined up in these channels like pearls on a string, but did not induce a productive infection. ICAM-1 acts as a functional virus receptor on the transfected cells as shown in infection experiments with coxsackievirus A21. This virus, as HRV-14, utilizes ICAM-1 as its receptor. Coxsackievirus A21 replicated in BHK-ICAM-1 cells in titers similar to those of HeLa cells.

These results suggest that ICAM-1 was not sufficient to render transfected BHK cells permissive to HRV-14. The replication of HRV-14 in BHK-ICAM-1 cells was blocked directly during its uncoating or shortly after. It is not clear if the blockade is localizing at the step of the initiation of viral translation or the step of the initiation of viral transcription.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Familie der Picornaviridae.....	1
1.1.1.	Das Humane Rhinovirus Typ 14 (HRV-14).....	6
1.1.2.	Die Virusstruktur von HRV-14	6
1.2.	Virusrezeptoren.....	9
1.2.1.	ICAM-1 als Virusrezeptor für HRV-14	12
1.3.	Der Reproduktionsmechanismus von Picornaviren	16
1.4.	Zielsetzung	22
2.	Materialien und Methoden	23
2.1.	Abkürzungen	23
2.2.	Verwendete Medien	25
2.3.	Verwendete Lösungen, Puffer und Seren	27
2.4.	Zellen.....	31
2.4.1.	HeLa-Zellen.....	31
2.4.2.	BHK-Zellen	31
2.4.3.	BHK-ICAM-1-Zellen	32
2.4.3.1.	Transfektion von BHK-Zellen mit ICAM-1	32
2.5.	Propagierung von HRV-14 und Coxsackievirus A21	33
2.6.	Hochreinigung von HRV-14.....	34

2.7.	RNA-Synthese-Test	35
2.7.1.	RNA-Synthese-Inhibitions-Test	37
2.8.	Plaque-Test	38
2.8.1.	Plaque-Reduktions-Test	39
2.9.	Endpunktstiteration	40
2.10.	Elektronenmikroskopie.....	41
2.11.	ELISA zum Nachweis von membranständigem ICAM-1 (ICAM-1-ELISA)	42
2.12.	ELISA zum Nachweis von zellgebundenem HRV-14 (HRV-14-ELISA)	43
2.13.	Gradientenzentrifugation	45
2.14.	Die Markierung viraler Proteine mit ³⁵ S-Methionin.....	46
2.15.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.	Ergebnisse	49
3.1.	Die Einschleusung von HRV-14 in HeLa-Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose	49
3.1.1.	Viruseinschleusung und morphologische Veränderungen in HeLa-Zellen im Elektronenmikroskop nach Infektion mit HRV-14	49
3.1.2.	Die Beteiligung von ICAM-1 an der Einschleusung in HeLa-Zellen	51
3.1.2.1.	Die Blockierung der Adsorption von HRV-14 mit Anti-ICAM-1	52
3.1.2.2.	Die Konkurrenz der Adsorption von HRV-14 mit löslichem ICAM-1:Ig	54

3.1.2.3.	Das pH-abhängige Uncoating von HRV-14	59
3.2.	Die Einschleusung von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen.....	61
3.2.1.	Der Nachweis von ICAM-1 auf BHK-ICAM-1-Zellen.....	62
3.2.2.	Viruseinschleusung und morphologische Veränderungen in BHK- ICAM-1-Zellen im Elektronenmikroskop im Vergleich zu BHK-Zellen nach Infektion mit HRV-14.....	63
3.2.3.	Die Beteiligung von ICAM-1 an der Einschleusung von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen	66
3.2.3.1.	Der Nachweis der Bindung von HRV-14 an BHK-ICAM-1-Zellen	66
3.2.3.2.	Die Bestimmung der RNA-Synthese von HRV-14 in BHK-ICAM-1- Zellen.....	68
3.2.3.3.	Die Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen	69
3.2.3.4.	Die Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 im Vergleich zu Coxsackievirus A21 in BHK-ICAM-1-Zellen.....	71
3.2.3.5.	Die Bestimmung von HRV-14-Proteinen in BHK-ICAM-1-Zellen im Vergleich zu HeLa- und BHK-Zellen	74
4.	Diskussion	78
4.1.	Verlauf der frühen Reproduktionsschritte von HRV-14 in HeLa- Zellen.....	78
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	79

4.3.	Einfluss von virusbindenden Rezeptoren auf die Permissivität von transfizierten Zellen.....	81
4.4.	Ablauf der frühen Reproduktionsschritte am Beispiel von Picornaviren, Semliki Forest Virus und Influenzaviren	83
4.4.1.	Wechselwirkung des Virus mit dem Virusrezeptor und Aufnahme des Virus in die Zelle.....	83
4.4.2.	Uncoating und Freisetzung der viralen RNA.....	85
4.4.3.	Initiation der Translation zu Beginn des ersten Replikationszyklusses.....	88
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	93
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literatur	97
7.	Lebenslauf	117

7. Lebenslauf

Name: Wolf
Vorname: Kai-Uwe
Geburtsdatum: 5.1.1964
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

Juli 1970 bis 23.6.1976	Grundschule AltLankwitz Berlin
23.6.1976 bis 16.12.1982	Gesamtschule Bröndby-Oberschule Berlin
16.12.1982	Erlangung der Hochschulreife

Berufsausbildung:

1.4.1983 bis 17.5.1984	Hochschulstudium an der Technischen Universität Berlin Fachrichtung Chemie
15.5.1984 bis 2.10.1991	Hochschulstudium an der Freien Universität Berlin Fachrichtung Biochemie
13.8.1986	Vordiplom Biochemie
2.10.1991	Diplom Biochemie
15.10.1987 bis 18.5.1995	Hochschulstudium an der Freien Universität Berlin Fachrichtung Humanmedizin
21.8.1990	Ärztliche Vorprüfung
26.3.1992	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.3.1994	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
18.5.1995	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1.10.1995 bis 1.4.1997	Arzt im Praktikum am Max-Bürger-Zentrum im Fach Innere Medizin
1.6.1997 bis 1.3.1998	Arzt in Weiterbildung an der Freien Universität Berlin im Fach Medizinische Mikrobiologie
1.4.1998 bis 1.4.2001	Assistenz-Arzt am Max-Bürger-Zentrum im Fach Innere Medizin
1.7.2001 bis 1.7.2002	Assistenz-Arzt am Klinikum Frankfurt/Oder im Fach Innere Medizin
seit 1.7.2002	Assistenz-Arzt am DRK-Krankenhaus Luckenwalde im Fach Allgemeinmedizin