

3. Ergebnisse

3.1. Die Einschleusung von HRV-14 in HeLa-Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose

Der Einschleusungsmechanismus von HRV-14 beschreibt den Weg von der Virusadsorption an die Zelloberfläche bis zur Auflösung des Viruskapsids mit Freisetzung der Virus-RNA (Uncoating) für die nachfolgende viralen RNA- und Proteinsynthese (s. 1.3). Der Vorgang der Adsorption wird durch die Wechselwirkung von HRV-14 und seinem zellulärem Virusrezeptor ICAM-1 bestimmt. Mit der Vorkenntnis, dass andere Picornaviren, wie Polioviren durch rezeptorvermittelte Endozytose in ihre Wirtszelle eingeschleust werden (Zeichhardt et al., 1985; Willingmann et al., 1989; Rueckert, 1996), wurde als Mechanismus für das Uncoating von HRV-14 ebenfalls ein pH-abhängiger Mechanismus der RNA-Freisetzung postuliert.

3.1.1. Viruseinschleusung und morphologische Veränderungen in HeLa-Zellen im Elektronenmikroskop nach Infektion mit HRV-14

Zur Untersuchung des Einschleusungsmechanismus wurden infizierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion elektronenmikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht (Abb. 6). Damit sollte der Weg einzelner Viruspartikel in die Zelle verfolgt werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit einer Infektionsdosis von 1000 p.f.u./Zelle bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 33°C erhöht, um die Penetration der Viren in die Zelle zu ermöglichen. Zum Nachweis der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche wurden die Zellen in einem Ansatz ohne Temperaturerhöhung bei 4°C nach 30 Minuten fixiert. In parallel durchgeführten Ansätzen erfolgte die Fixation der

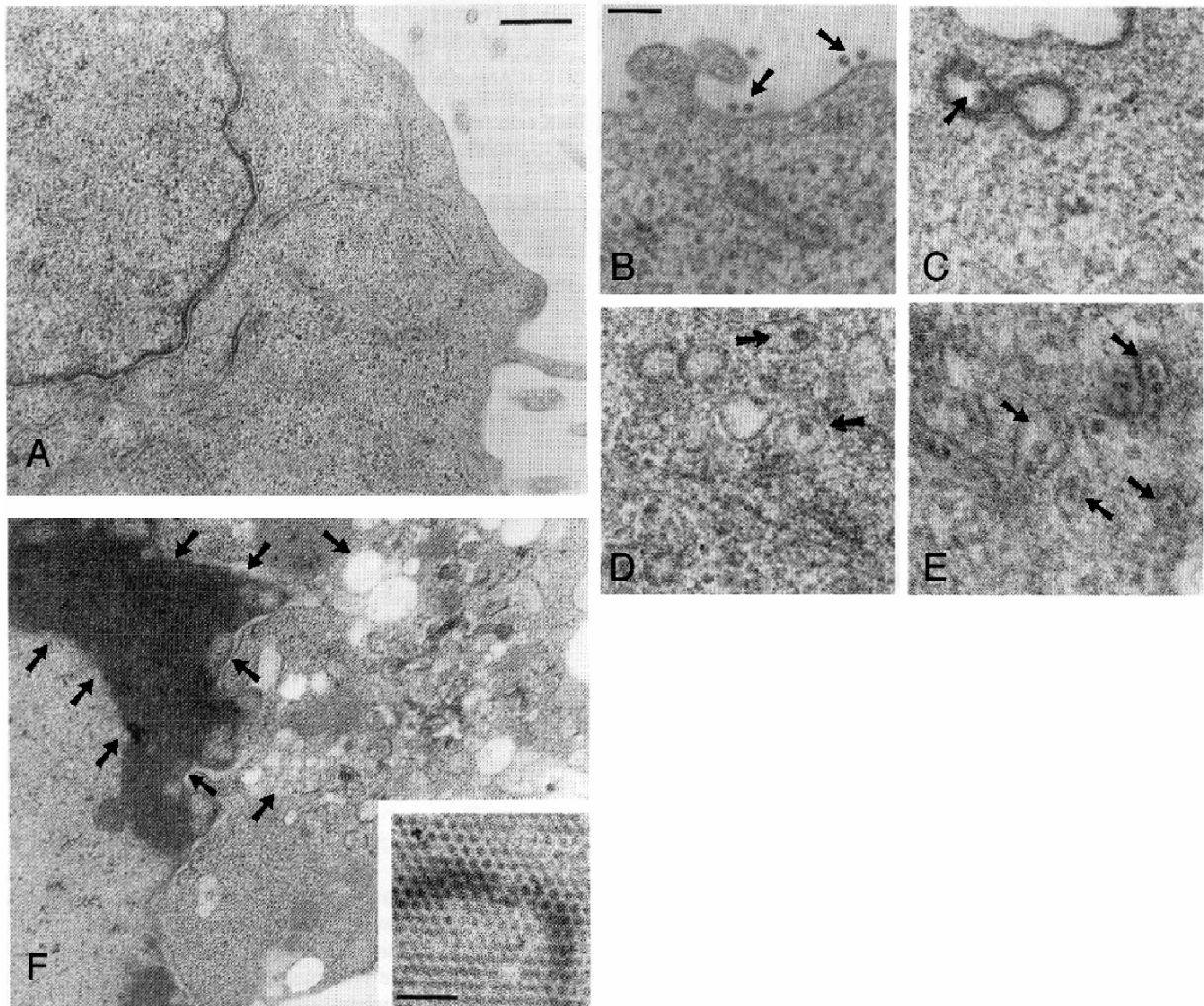


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HRV-14 während der Einschleusung in HeLa-Zellen (Grunert, H. P., Wolf, K. U., Langner, K. D., Sawitzky, D., Habermehl, K. O. und Zeichhardt, H., 1997)

Ultradünnschnitte von mock-infizierten Zellen (A) und HRV-14 infizierten HeLa-Zellen (B-F) wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet. Bei 4°C banden die Viruspartikel gleichmäßig verteilt an die Zelloberfläche (B). 5 Minuten nach der Temperaturerhöhung auf 33°C wurde die Mehrheit der Viren entweder an 'coated pits' oder in 'coated vesicles' im Inneren der Zelle nachgewiesen (C). Bei einer Minderheit der Viren sah man die Aufnahme in kleine clathrinfreie Vesikel (D). Nach 30 Minuten wurden die Viruspartikel entweder in 'coated vesicles' oder in großen clathrinfreien Vesikeln aus Endosomen lokalisiert (E). Im Vergleich zu den mock-infizierten Zellen (A) zeigten die HRV-14 infizierten HeLa-Zellen einen ausgeprägten zytopathischen Effekt. Der Zellkern war ungleichmäßig mit kondensiertem Chromatin gefüllt. Mehrere Vesikel waren clusterartig im Zellplasma angeordnet. Lange parakristalline Virusaggregate wurden im Zytoplasma gefunden (s. Teilbild in F). Balkenmarker zeigten die Länge von 0,1 µm an.

Zellen nach 5 Minuten, 30 Minuten und 12 Stunden nach der Temperaturerhöhung auf 33°C. Von allen Ansätzen wurden Ultradünnschnitte angefertigt (s. 2.10).

Bei 4°C waren die Rhinoviren nach 30 Minuten ohne Bevorzugung bestimmter Stellen gleichmäßig an der Zelloberfläche gebunden (Abb. 6B). Nach der Temperaturerhöhung auf 33°C kam es zur Ausbildung clathrintragender Zellmembranen (sog. 'coated pits'). Durch die Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran zu sog. 'coated vesicles' penetrierten die Viren in das Innere der Zellen (Abb. 6C). Eine Minderheit der Viren wurde in clathrinfreie Vesikel aufgenommen (Abb. 6D). Nach 30 Minuten waren diese Vorgänge abgeschlossen und die Viruspartikel entweder in clathrinumhüllten oder großen clathrinfreien Vesikeln (Endosomen) nachweisbar (Abb. 6E).

Derart infizierte Zellen waren nach 12 Stunden stark zytopathisch verändert. Im Vergleich zu den mock-infizierten Zellen (Abb. 6A) war der Zellkern mit unregelmäßig verteiltem, kondensiertem Chromatin angefüllt. Mehrere virushaltige Vesikel waren clusterartig im Zytoplasma verteilt (Abb. 6F). Makroskopische Veränderungen waren zur gleichen Zeit an den Zellen nachweisbar. Außerdem lagen neusynthetisierte Viren in großen parakristallinen Aggregaten im Zytoplasma der Zelle (Teilbild in Abb. 6F). Dieser zytopathische Effekt ähnelte stark den morphologischen Veränderungen, die durch die Infektion mit Poliovirus Typ 1 in HEp-2-Zellen verursacht wird (Stuart et al., 1961; Dales et al., 1965; Zeichhardt et al., 1982; Bienz et al., 1983).

Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass der Einschleusungsmechanismus von HRV-14 dem Weg der rezeptorvermittelten Endozytose von Polioviren vergleichbar ist.

3.1.2. Die Beteiligung von ICAM-1 an der Einschleusung in HeLa-Zellen

Die Interaktion von HRV-14 mit seinem zellulärem Virusrezeptor, dem Intercellular Adhesion Molecule ICAM-1, wurde durch Blockierung der Adsorption mit folgenden Methoden bei HeLa-Zellen untersucht:

- 1) Blockierung von ICAM-1 durch Antikörper gegen ICAM-1 (Anti-ICAM-1)
- 2) Blockierung von HRV-14 durch lösliches ICAM-1:Immunglobulin, das ein lösliches Rezeptoranalogen darstellt und um die Bindung an zelluläres ICAM-1 konkurriert

Bei beiden Varianten wurden die Auswirkungen auf die RNA-Neusynthese und die Bildung infektiöser Virusnachkommenschaft in HeLa-Zellen gemessen.

3.1.2.1. Die Blockierung der Adsorption von HRV-14 mit Anti-ICAM-1

Die Adsorption von HRV-14 an die Oberfläche von HeLa-Zellen wurde durch die Blockierung von ICAM-1 mit monoklonalen Antikörper gegen ICAM-1 (Anti-ICAM-1) verhindert. Dazu wurde der Einfluss der Rezeptorblockierung auf die Bildung der viralen RNA-Synthese (Abb. 7) und infektiöser Virusnachkommenschaft (Abb. 8) bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen gemessen.

Der Einfluss von Anti-ICAM-1 auf die virale RNA-Synthese in HeLa-Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Anti-ICAM-1 (0,1, 0,4, 1,1, 3,3 und 10 µg/ml) im RNA-Synthese-Inhibitions-Test (s. 2.7.1) durchgeführt (Abb. 7).

Bei steigenden Anti-ICAM-1-Konzentrationen nahm die Menge an neusynthetisierter HRV-14-RNA ab. Bei 0,12 µg/ml Anti-ICAM-1 betrug sie zur 5. Stunde p.i. noch 91,2% der Syntheserate virusinfizierter HeLa-Zellen. Bei 0,37 µg/ml lag sie bei 31,8% und bei 1,1 µg/ml nur noch bei 4,4% im Vergleich zu virusinfizierten Zellen. Die Syntheseraten bei 3,3 µg/ml und 10 µg/ml Anti-ICAM-1 befanden sich auf dem Niveau von mock-infizierten HeLa-Zellen, die in Gegenwart von Actinomycin D die unspezifische Hintergrundaktivität angaben. Die Werte zur 6. Stunde p.i. ergaben ein ähnliches Bild.

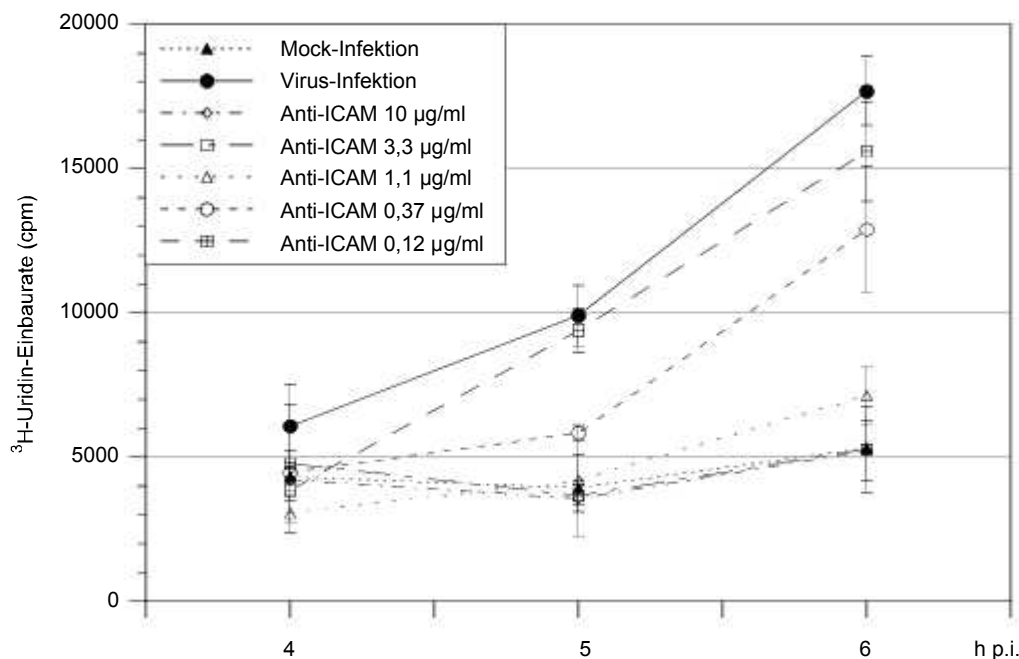


Abb. 7: Neusynthese von viraler HRV-14-RNA in HeLa-Zellen bei unterschiedlichen Anti-ICAM-1-Konzentrationen (Grunert, H. P., Wolf, K. U., Langner, K. D., Sawitzky, D., Habermehl, K. O. und Zeichhardt, H., 1997).

Die virale RNA-Neusynthese wurde bei unterschiedlichen Anti-ICAM-1-Konzentrationen in einem RNA-Synthese-Inhibitions-Test nach 4, 5 und 6 h p.i. gemessen.

Bei steigender Anti-ICAM-1-Konzentration nahm die Menge an neusynthetisierter HRV-14-RNA ab. Bei 0,12 µg/ml (◼) entsprach sie fast der unbehandelten infizierten Kontrolle (●, 91,2%). Bei 0,37 µg/ml (○) und bei 1,1 µg/ml (△) beträgt sie nur noch 31,8% bzw. 4,4% vom Ausgangswert der infizierten Kontrolle (gemessen zur 5. h p.i.). Über 3,3 µg/ml (◻) wurde kein Virus mehr synthetisiert, die Syntheserate entsprach derjenigen mock-infizierter HeLa-Zellen (▲). Unbehandelte infizierte HeLa-Zellen (●) zeigten die maximale Syntheserate an.

Der Einfluss von Anti-ICAM-1 auf die virale Reproduktion wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Anti-ICAM-1 (0,1, 0,4, 1,1, 3,3 und 10 µg/ml) im Plaque-Reduktions-Test (s. 2.8.1) gemessen (Abb. 8).

Die Infektiosität nahm im Vergleich zur Kontrolle ohne Anti-ICAM-1 mit steigender Anti-ICAM-1-Konzentration ab. Sie lag bei 0,1 µg/ml Anti-ICAM-1 bei 76%, bei 0,4 µg/ml bei 51%, bei 1,1 µg/ml bei 15%, bei 3,3 µg/ml bei 13% und bei 10 µg/ml bei 7% des Ausgangswertes von virusinfizierten Kontrollzellen ohne Anti-ICAM-1.

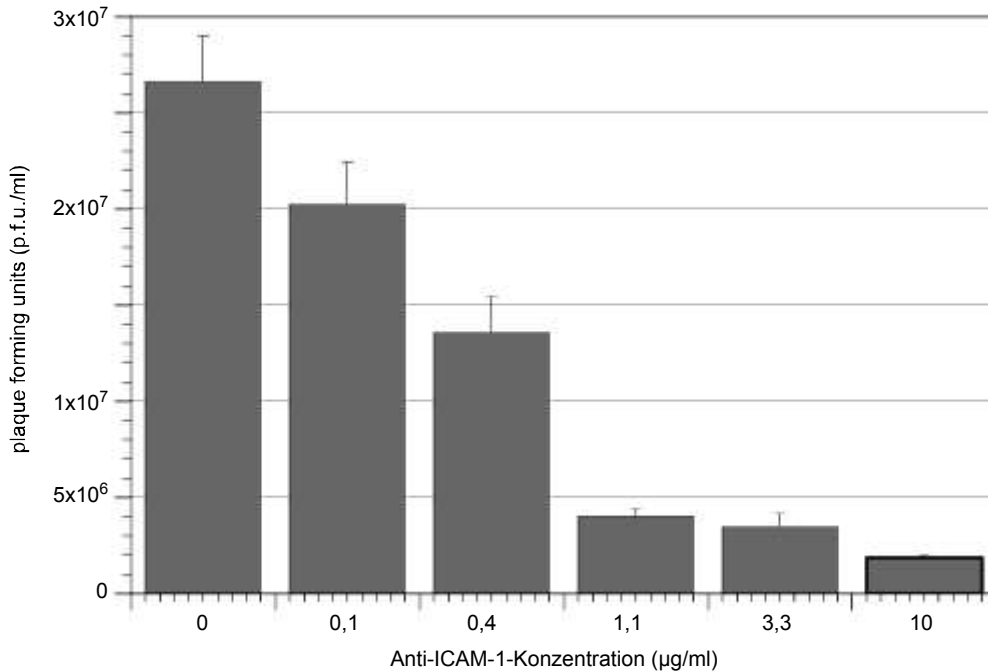


Abb. 8: Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft in HeLa-Zellen bei unterschiedlichen Anti-ICAM-1-Konzentrationen

Die Produktion von infektiösen Nachkommen von HRV-14 wurde bei unterschiedlichen Anti-ICAM-1-Konzentrationen im Plaque-Reduktions-Test gemessen. Als Kontrolle diente eine Infektion von unbehandelten HeLa-Zellen. Die Infektiosität im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nahm mit steigender Anti-ICAM-1 Konzentration ab. Sie betrug bei 10 µg/ml Anti-ICAM-1 nur noch 7% der Infektiosität unbehandelter Zellen.

Die Infektion von HeLa-Zellen durch HRV-14 lässt sich durch die Blockierung von ICAM-1 durch Anti-ICAM-1 inhibieren.

3.1.2.2. Die Konkurrenz der Adsorption von HRV-14 mit löslichem ICAM-1:Ig

Die Adsorption von HRV-14 an die zellständigen Virusrezeptoren wurde durch die Konkurrenz mit löslichem ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) blockiert. Dieses ICAM-1:Ig fungierte als löslicher, antikörperähnlicher Virusrezeptor und sollte mit

HRV-14 um die Bindung an zelluläres ICAM-1 konkurrieren. Die Affinität von ICAM-1:Ig zu HRV-14 wurde durch den Nachweis einer HRV-14~ICAM-1:Ig-Komplexbildung in einer Gradientenzentrifugation (s. 2.13) geprüft.

Die Konkurrenz der Bindung von HRV-14 an zellulärem ICAM-1 durch ICAM-1:Ig wurde anschließend durch die Messung der RNA-Synthese und Virusnachkommenschaft bei unterschiedlichen Konzentrationen von ICAM-1:Ig gemessen. Die eingesetzten Konzentrationen von ICAM-1:Ig variierten von 0,05 bis 14 µg/ml (Abb. 9).

20 µl gereinigtes, mit ³H radioaktiv markiertes HRV-14 wurde mit ICAM-1:Immunglobulin (Endkonzentration 14 µg/ml) inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 5-20%-igen Sucrose-Gradienten. Zum Nachweis des HRV-14~ICAM-1:Ig-Komplexes aus dem Gradienten erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit Protein A (0.1 µg/ml), das mit HRV-14~ICAM-1:Ig-Komplexen zur Vernetzung und Präzipitation am Röhrchenboden führen sollte. Als weitere Kontrollen diente die Auftrennung von ³H-HRV-14 allein sowie die Auftrennung eines Ansatzes aus ³H-HRV-14 und Protein A ohne ICAM-1:Immunglobulin.

Im Vergleich der Kurvengipfel von HRV-14 allein (Abb. 9B) und dem Gipfel vom Komplex aus ³H-HRV-14 und ICAM-1:Ig zeigte sich eine Verschiebung um einige Fraktionen (Abb. 9A), die durch die höhere Masse des gebildeten Immunkomplexes bedingt sein könnte. Die Inkubation mit zusätzlichem Protein A führte zu einer Vernetzung und Präzipitation der gebildeten HRV-14~ICAM-1:Ig-Komplexe am Boden des Gradienten. ³H-HRV-14 und der Ansatz aus ³H-HRV-14 und Protein A zeigten keine Bildung von Komplexen (Abb. 9B).

Die Ergebnisse zeigten, dass ICAM-1:Ig an HRV-14 bindet und Komplexe bildet.

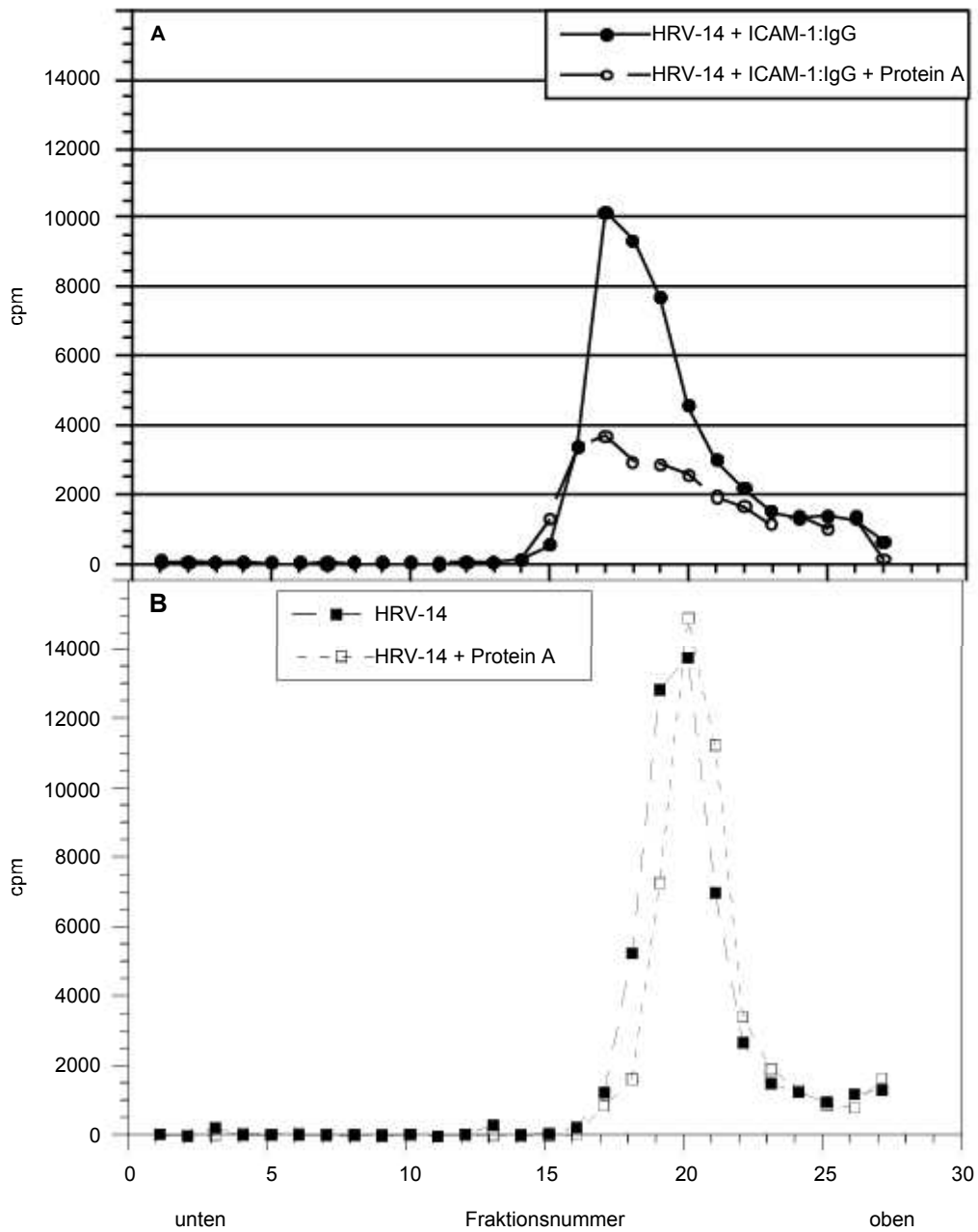


Abb. 9: Gradientenzentrifugation von HRV-14 im Komplex mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig)

20 μ l 3 H-markiertes HRV-14 wurde mit ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig) (14 μ g/ml) für 1 h bei 33°C inkubiert. Die Auftrennung der gebildeten HRV-14~ICAM-1:Ig-Komplexe zwischen 3 H-HRV-14 und ICAM-1:Ig erfolgte in einem 5-20%-igen Sucrose-Gradienten. Der Vergleich der Kurvengipfel von 3 H-HRV-14 (■) und dem Ansatz aus 3 H-HRV-14 und ICAM-1:Ig (●) zeigte eine Verschiebung um einige Fraktionen. Bei Zusatz von Protein A (○) bildete sich ein Präzipitat, das am Boden sedimentiert. Die Kontrolle mit 3 H-HRV-14 allein (■) und HRV-14 mit Protein A (□) zeigte keine Komplexbildung.

Anschließend wurde der kompetitive Einfluss von ICAM-1:Ig auf die Bindung von HRV-14 an zellulärem ICAM-1 untersucht. Dabei wurde die virale RNA-Synthese im RNA-Synthese-Inhibitions-Test (s. 2.8.1) gemessen (Abb. 10). HRV-14-Lösung wurde für 1 Stunde mit steigenden Konzentrationen von ICAM-1:Ig (0,05, 0,47, 4,67 und 14 µg/ml) bei 33°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Infektion von konfluenten HeLa-Zellen mit diesen Ansätzen.

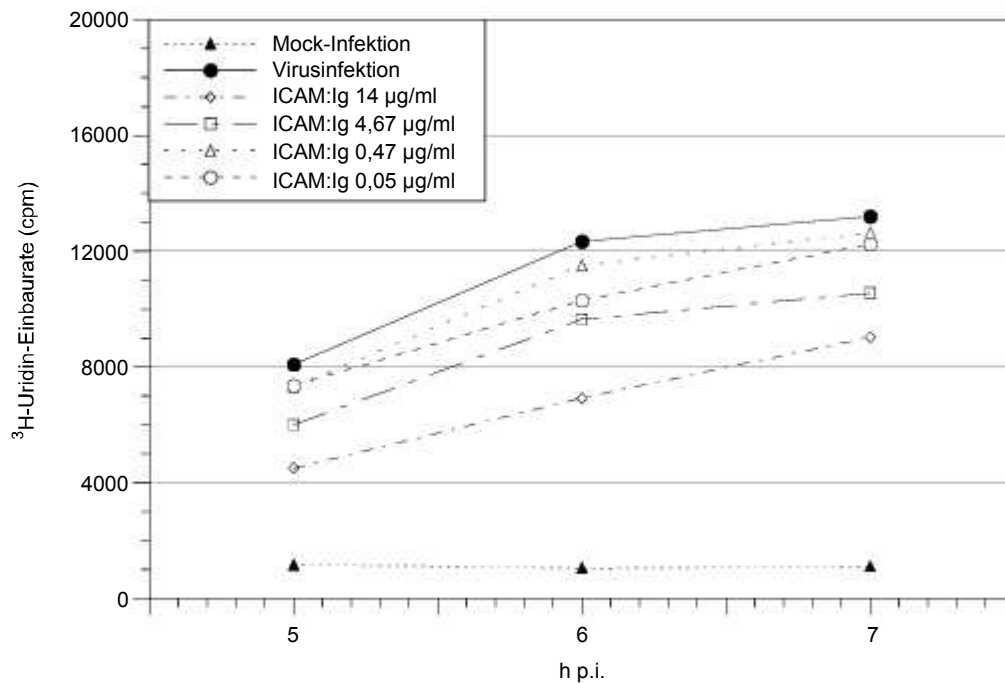


Abb. 10: Neusynthese von viraler HRV-14-RNA in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig)

Die virale RNA-Neusynthese wurde bei unterschiedlichen ICAM-1:Ig-Konzentrationen in einem RNA-Synthese-Inhibitions-Test nach 5, 6 und 7 h p.i. gemessen. Bei steigender ICAM-1:Ig Konzentration nahm die Menge an neusynthetisierter HRV-14-RNA ab. Bei 0,05 (○) und 0,47 µg/ml (△) entsprach sie nahezu der unbehandelten infizierten Kontrolle (ca. 82%, gemessen zur 6. h p.i.). Ab 4,67 µg/ml (□, ◇) nahm die RNA-Synthese auf Werte von 76,1% bzw. 51,9% ab. Unbehandelte infizierte HeLa-Zellen (●) zeigten die maximale Syntheserate an (100%). Mock-infizierten HeLa-Zellen (▲) gaben in Gegenwart von Actinomycin D die Hintergrundaktivität an.

Die Menge neusynthetisierter viraler RNA nahm bei zunehmender ICAM-1:Ig-Konzentration ab. Bei niedrigen Konzentrationen von ICAM-1:Ig (0,05 und 0,47 µg/ml) lag die Einbaurrate bei ca. 80% im Vergleich zur ungehemmten Infektion mit HRV-14 (gemessen zur 6. Stunde). Bei 4,67 µg/ml ICAM-1:Ig erreichte die Neusynthese Werte von ca. 76%, die bei 14 µg/ml auf ca. 52% im Vergleich zu virusinfizierten Kontrollzellen (100%) abfallen.

Der Einfluss von ICAM-1:Ig auf die Produktion reifer Rhinoviren wurde im Plaque-Reduktions-Test (s. 2.8.1) untersucht (Abb. 11). Wie beim RNA-Synthese-Inhibitions-Test wurde HRV-14 mit steigenden Konzentrationen an ICAM-1:Ig (1,4, 4,67 und 14 µg/ml) vorinkubiert und mit diesen Ansätzen anschließend konfluente HeLa-Zellen in-

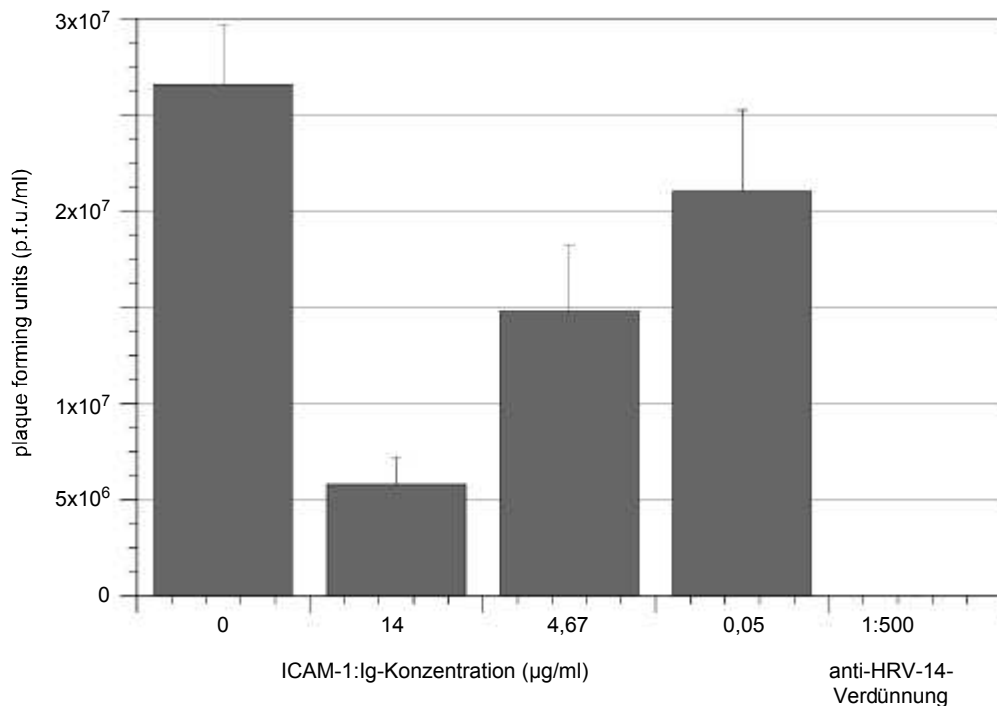


Abb. 11: Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft in HeLa-Zellen in Abhängigkeit von ICAM-1:Immunglobulin (ICAM-1:Ig)

Die Produktion von infektiösen Nachkommen von HRV-14 bei steigenden Konzentrationen von ICAM-1:Ig wurde im Plaque-Reduktions-Test gemessen. Bei steigender ICAM-1:Ig-Konzentration nahm die Infektiosität von HRV-14 ab. Bei 1,4 µg/ml ICAM-1:Ig betrug sie 78,9%, bei 4,67 µg/ml 55,6% und bei 14 µg/ml nur noch 21,8% vom Ausgangswert un behandelter Viren. Eine anti-HRV-14-Verdünnung von 1:500 führte zur völligen Neutralisation von HRV-14.

fiziert. Analog wurde eine Kontrolle mit einer Anti-HRV-14-Lösung in einer Verdünnung von 1:500 anstelle von ICAM-1:Ig durchgeführt.

Bei steigender ICAM-1:Ig-Konzentration kam es zur einer Abnahme der Infektiosität von HRV-14. Im Vergleich zu der nur mit HRV-14 infizierten Kontrolle (0 µg/ml ICAM-1:Ig-Konzentration) lag die Neusynthese reifer HRV-14-Viren bei Anwesenheit von 1,4 µg/ml ICAM-1:Ig bei ca. 79%, bei 4,67 µg/ml bei ca. 56% und bei 14 µg/ml bei nur noch ca. 22%. Die Konzentration von 14 µg/ml ICAM-1:Ig zeigte sich also eine Neutralisation von 78%.

Bei der 1:500-Verdünnung von Antikörper gegen HRV-14 waren keine Plaques mehr nachweisbar. Diese Anti-HRV-14-Verdünnung führte zur vollständigen Neutralisation von HRV-14 und fehlender Neusynthese von Rhinoviren.

Die Infektion von HeLa-Zellen durch HRV-14 lässt sich durch die Bindung von ICAM-1:Ig an HRV-14 inhibieren.

3.1.2.3. Das pH-abhängige Uncoating von HRV-14

Nach der Inhibition der Adsorption von HRV-14 an seinen zellulären Rezeptor durch Anti-ICAM-1 und lösliches ICAM-1-Immunglobulin wurde der Vorgang des Uncoatings untersucht (s. 1.3). Dabei sollte geklärt werden, ob das Uncoating von HRV-14, d.h. die Freisetzung der viralen RNA aus dem Kapsid, wie bei anderen Picornaviren, z.B. Poliovirus ein pH-abhängiger Prozess ist (Zeichhardt et al., 1985).

Dazu wurde als erster Schritt nach dem Uncoating die Neusynthese viraler RNA in einem RNA-Synthese-Inhibitions-Test unter dem Einfluss von Monensin gemessen (Abb. 12). Monensin ist ein karboxylisches Ionophor, das den pH-Wert in den sauren Endosomen und Lysosomen auf neutrale Werte erhöht (Tartakoff, 1983). Unter diesen Bedingungen findet bei Polioviren keine Freisetzung der viralen RNA mehr statt (Zeichhardt et al., 1985).

Konfluente HeLa-Zellen wurden wie im RNA-Synthese-Test beschrieben (s. 2.7) mit HRV-14 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 min p.i.), d.h. während und nach der Viruseinschleusung, erfolgte die Zugabe von 0,5 μ M Monensin zu den Zellen. Nach 6 h p.i. wurde die neusynthetisierte Virus-RNA durch Einbau von 3 H-Uridin gemessen. Als Kontrolle diente eine Infektion von HeLa-Zellen ohne Monensin.

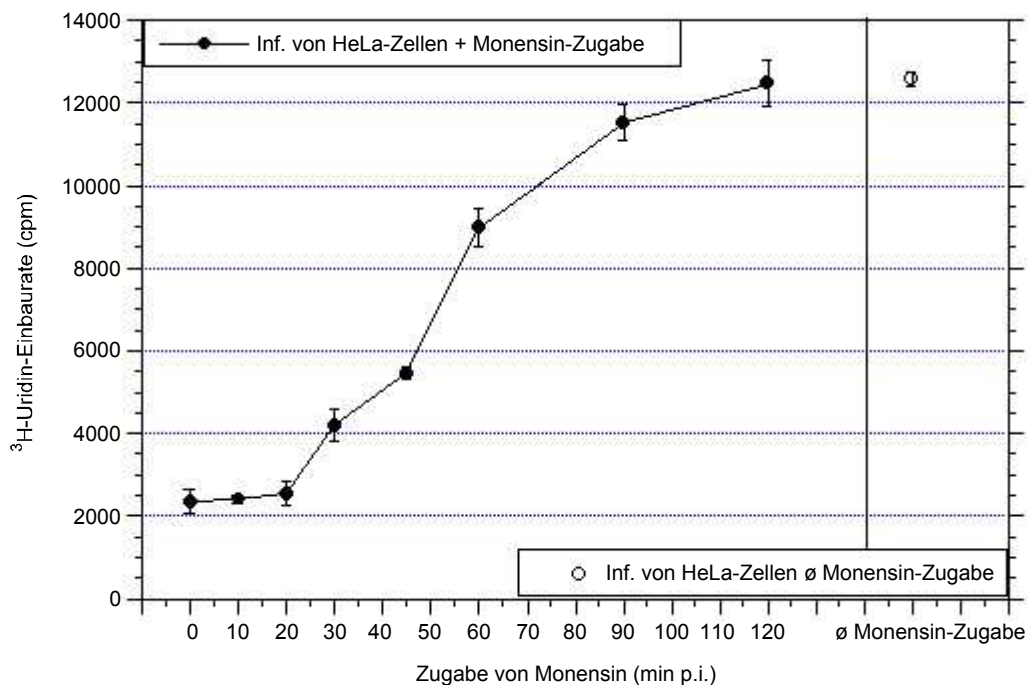


Abb. 12: Neusynthese von viraler HRV-14-RNA in HeLa-Zellen unter dem Einfluss von Monensin (Grunert, H. P., Wolf, K. U., Langner, K. D., Sawitzky, D., Habermehl, K. O. und Zeichhardt, H., 1997)

Die virale RNA-Neusynthese wurde nach Zugabe von Monensin zu unterschiedlichen Zeiten in einem RNA-Synthese-Inhibitions-Test zur 6 h p.i. gemessen.

Die Zugabe von 0,5 μ M Monensin bis zur 20 min p.i. führte nach einer Infektion von HeLa-Zellen mit HRV-14 zu einer deutlichen Reduktion der Syntheserate viraler RNA um 80% (●). Die Werte lagen mit 2380 cpm auf dem Niveau von Mock-infizierten HeLa-Zellen mit Actinomycin D. Ab der 30 min p.i. nahm die virale RNA-Synthese bis auf Werte der unbehandelten Kontrolle zu. Die Gabe ab 120 min p.i. hatte keinen Einfluss auf die Syntheserate mehr. Als Kontrolle diente eine Infektion von Zellen ohne Monensin (○).

Die Freisetzung viraler RNA konnte bis 20 Minuten nach Infektion durch die Zugabe von Monensin verhindert werden. Die gemessene Einbaurrate von ^3H -Uridin lag mit 2380 cpm auf dem Niveau von Mock-infizierten HeLa-Zellen mit Actinomycin. Ab 30 Minuten p.i. nahm die Inhibition des Uncoating durch Monensin ab und war nach einer Zugabe zur 120. Minute p.i. nicht mehr nachweisbar. Die Neusynthese viraler RNA nahm in Abhängigkeit der Zugabezeit von Monensin zu und die Einbaurrate zur 120. Minute p.i. lag mit 12500 cpm genauso hoch wie die von den unbehandelten Kontrollzellen.

Nach 30 Minuten p.i. ist die Freisetzung von viraler RNA aus den aufgenommenen HRV-14-Viren abgeschlossen und daher in den sauren Kompartimenten nicht mehr durch Monensin inhibierbar. Die pH-Abhängigkeit und der Zeitverlauf des Uncoatings bei HRV-14 gleicht somit stark der von Polioviren.

3.2. Die Einschleusung von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen

Zur Untersuchung der Frage, ob der Virusrezeptor von HRV-14 allein eine Infektion von Zellen determiniert, wurden BHK-Zellen, die durch den fehlenden Virusrezeptor normalerweise nicht durch HRV-14 infizierbar sind, mit dem Rezeptor ICAM-1 transfiziert (nachfolgend als BHK-ICAM-1-Zellen bezeichnet).

Es sollte geprüft werden, ob es bei BHK-ICAM-1-Zellen durch diese Transfektion mit ICAM-1 zu einer Infektion durch HRV-14 kommt.

Zuerst wurde die erfolgreiche Expression von ICAM-1 an der Zelloberfläche von BHK-ICAM-1-Zellen und die Bindung von HRV-14 an diesen Rezeptor durch ELISA-Techniken überprüft. Anschließend wurden die Zellen elektronenmikroskopisch nach einer Infektion auf morphologische Veränderungen untersucht und die Produktion von viraler RNA und infektiöser Virusnachkommenschaft bestimmt. Zum Vergleich wurde die Reproduktion von Coxsackievirus A21 in HeLa- und BHK-ICAM-1-Zellen gemessen.

Abschließend erfolgte die Bestimmung der Neusynthese von Virusproteinen in HeLa- und BHK-ICAM-1-Zellen.

3.2.1. Der Nachweis von ICAM-1 auf BHK-ICAM-1-Zellen

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Expression von ICAM-1 in den nichtpermissiven BHK-Zellen wurde in einem selbstentwickelten ELISA-System (ICAM-1-ELISA) zellständiges ICAM-1 durch einen monoklonalen ICAM-1-Antikörper detektiert (s. 2.11).

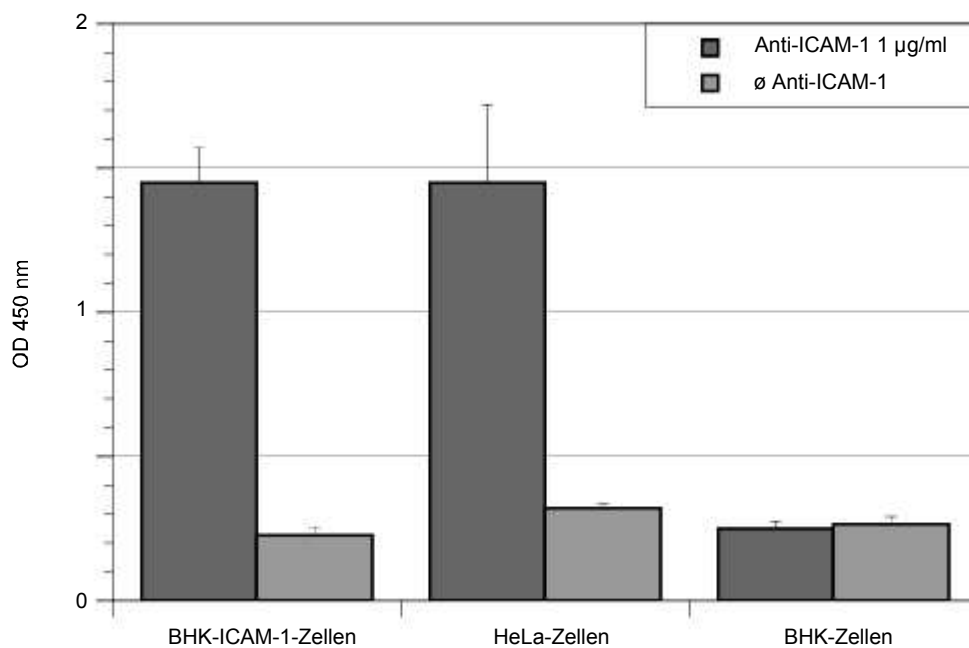


Abb. 13: Nachweis von ICAM-1 auf der Zelloberfläche von HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen

Der Nachweis von zellständigem ICAM-1 auf fixierten BHK-ICAM-1-, HeLa-, BHK-Zellen erfolgte durch Anti-F_c-spezifische AP-markierte Antikörper in einem ICAM-1-ELISA.

Der Gehalt an ICAM-1 (■) bei BHK-ICAM-1-Zellen war im Vergleich zu HeLa-Zellen nahezu gleich. BHK-Zellen zeigten im Vergleich keinen signifikanten Nachweis von zellständigem ICAM-1. Als Kontrolle (□) wurden entsprechende Ansätze mit BHK-ICAM-1-, HeLa- bzw. BHK-Zellen ohne Anti-ICAM-1 inkubiert.

Zellsuspensionen von BHK-ICAM-1-, BHK- und HeLa-Zellen wurden fixiert und unspezifische Bindungsstellen, wie in 2.11 beschrieben, blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit Antikörper gegen ICAM-1 aus der Maus. Mit dem gegen Maus-Antikörper gerichteten und mit alkalischer Phosphatase (AP) markierten Helferantikörper erfolgte durch photometrische Messung der Nachweis von umgesetztem para-Nitrophenylphosphat bei 405 nm (Abb. 13). Zur Kontrolle wurden parallele Ansätze ohne Anti-ICAM-1 durchgeführt. Alle Versuche erfolgten als Dreifachbestimmungen.

BHK-ICAM-1-Zellen wiesen in der photometrischen Messung eine deutliche Differenz (ca. Faktor 5) zwischen dem Ansatz mit und ohne ICAM-1-Antikörper auf. Eine ähnliche Differenz war auch bei den HeLa-Zellen nachweisbar.

Transfizierte BHK-ICAM-1-Zellen exprimieren somit ICAM-1 in vergleichbarer Menge an ihrer Zelloberfläche wie HeLa-Zellen, was sich durch gleichstarke Reaktivität gegen Anti-ICAM-1 zeigte. In der Kontrolle zeigten die untransfizierten BHK-Zellen mit Anti-ICAM-1 keinen Anstieg der Extinktion bei 405 nm im Vergleich zum Ansatz ohne Anti-ICAM-1. Zellständiges ICAM-1 ließ sich auf diesen Zellen daher nicht nachweisen.

3.2.2. Viruseinschleusung und morphologische Veränderungen in BHK-ICAM-1-Zellen im Elektronenmikroskop im Vergleich zu BHK-Zellen nach Infektion mit HRV-14

Nach dem Nachweis der Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche von BHK-ICAM-1-Zellen wurde der Einschleusungsmechanismus von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen untersucht.

Zuerst wurde geprüft, ob HRV-14-Viren in der Lage sind, durch ICAM-1 an die Oberfläche von BHK-ICAM-1-Zellen zu binden. Anschließend erfolgte die elektronenmikroskopische, morphologische Untersuchung von infizierten BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit HRV-14 (Abb. 14).

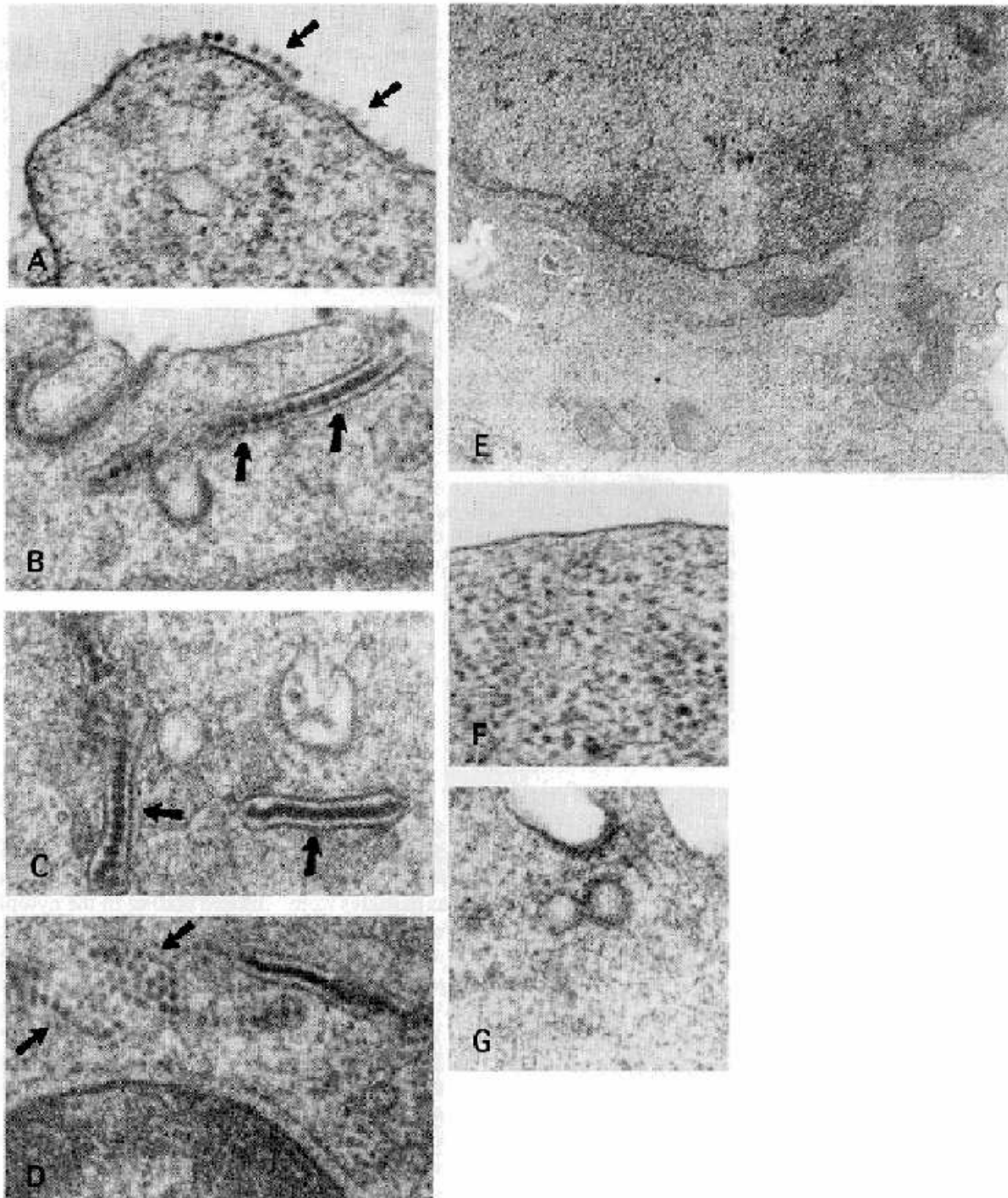


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HRV-14 nach der Aufnahme in BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen (Grunert et al., 1997)

Ultradünnschnitte von HRV-14 infizierten BHK-ICAM-1-Zellen wurden im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

Bei 4°C banden die Viruspartikel wie aufgereichte Perlen an bevorzugte Stellen an die Zelloberfläche (A). 5 Minuten nach der Temperaturerhöhung auf 33°C wurden lange Ketten von Viren in Membranschläuchen im Zellinneren nachgewiesen (B, C). Nach 30 Minuten wurden größere Virusaggregate im Zytoplasma lokalisiert (D). Nach 18 Stunden waren die Viren weiterhin aggregiert, ein zytopathischer Effekt trat nicht auf (E). Bei den BHK-Zellen waren weder Virusadsorption noch -aufnahme nachweisbar (F, G).

Dazu wurden BHK-ICAM-1-Zellen mit einer Infektionsdosis von 1000 p.f.u./Zelle bei 4°C inkubiert. Zum Nachweis der Adsorption des Virus an die Zelloberfläche wurde die Temperatur nicht erhöht und die Zellen sofort fixiert. Anschließend wurde die Temperatur wie bei dem analogen Versuch mit HeLa-Zellen (s. 3.1.1) auf 33°C erhöht, um eine mögliche Penetration der Viren in die Zelle zu erlauben. Nach 5 Minuten, 30 Minuten und 12 Stunden nach der Infektion wurde die weitere Virusvermehrung durch Fixation der Zellen gestoppt und Ultradünnschnitte von den Zellen angefertigt (s. 2.10). Als Kontrolle wurden die Adsorption von HRV-14 an BHK-Zellen und die Infektion nach 5 Minuten in BHK-Zellen gemessen.

Bei 4°C waren die HRV-14-Viren unter Bevorzugung bestimmter Stellen an der BHK-ICAM-1-Zelloberfläche gebunden und lagen wie Perlen aufgereiht an der Zelloberfläche (Abb. 14A). Nach der Temperaturerhöhung kam es zur Einstülpung der Zellmembran und der Ausbildung langer Zellmembranschläuchen mit einer Öffnung zum Zelläußeren und einem geschlossenem Ende im Zellinneren (Abb. 14B, C). Teilweise konnte eine vollständige Abschnürung von Membranschläuchen ohne Kontakt zum Zelläußeren nachgewiesen werden. Nur eine Minderheit der Viren wurde in clathrinhaltige 'coated pits' und 'coated vesicles' aufgenommen. Diese Viruspartikel waren hier einzeln oder in kleinen Aggregaten, jedoch nie in langen Ketten wie in den Membranschläuchen zu beobachten. Nach 30 Minuten konnten die meisten Viruspartikel in größeren Aggregaten im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 14D). Teilweise lag auch noch eine Membranhüllung vor. In BHK-ICAM-1-Zellen konnte selbst nach 18 Stunden p.i. keine zytopathischen Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 14E). Eine Vermehrung von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen war nicht nachweisbar. Die Viren lagen weiterhin in größeren Aggregaten im Zytoplasma.

Dieses Ergebnis steht im deutlichen Gegensatz zu den starken zytopathischen Veränderungen in infizierten HeLa-Zellen (s. Abb. 6F).

Die Infektion der BHK-Zellen führte zu keinem elektronenmikroskopischen Nachweis einer Virusadsorption oder -aufnahme (Abb. 14F, G).

3.2.3. Die Beteiligung von ICAM-1 an der Einschleusung von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen

Trotz ähnlich starker Expression von membrangebundenem ICAM-1 auf BHK-ICAM-1-Zellen wie auf HeLa-Zellen (s. Abb. 13) kam es nach der Infektion mit HRV-14 bei BHK-ICAM-1-Zellen im Gegensatz zu HeLa-Zellen zu anderen morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen und zum Ausbleiben eines zytopathischen Effekts bei BHK-ICAM-1 nach Infektion. Zur Untersuchung dieser Differenzen wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

- 1) Nachweis der Bindung von HRV-14 an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen
- 2) Bestimmung der RNA-Neusynthese von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen
- 3) Bestimmung von infektiöser Nachkommenschaft von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen
- 4) Bestimmung von infektiöser Nachkommenschaft von HRV-14 und Coxsackievirus A21 in BHK-ICAM-1-Zellen (Coxsackievirus A21 benutzt wie HRV-14 als Virusrezeptor ICAM-1)
- 5) Bestimmung der Virusproteine von HRV-14 infizierten BHK-ICAM-1-Zellen im Vergleich zu BHK- und HeLa-Zellen

3.2.3.1. Der Nachweis der Bindung von HRV-14 an BHK-ICAM-1-Zellen

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von exprimiertem ICAM-1 an HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen wurde in einem HRV-14-ELISA der Gehalt von adsorbiertem HRV-14 auf HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen bestimmt.

Bei jeweils konfluent gewachsenen und fixierten HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen wurden unspezifische Bindungsstellen mit Kaninchen-Serum blo-

ckiert. Dann wurde die Inkubation mit HRV-14 durchgeführt (s. 2.12). Anschließend erfolgte die Zugabe des aus dem Meerschweinchen stammenden Anti-HRV-14. Mit dem gegen Meerschweinchen-Antikörper gerichteten, mit alkalischer Phosphatase markierten Helfer-Antikörper erfolgte der Nachweis von umgesetztem para-Nitrophenylphosphat bei 405 nm. Die weitere Durchführung dieses Sandwich-ELISAs erfolgte wie im ICAM-1-ELISA.

Als Kontrolle wurden parallele Ansätze ohne HRV-14 durchgeführt, um die unspezifische Bindung des Anti-HRV-14-Antikörpers an die eingesetzten Zellen nachzuweisen. Alle Versuche erfolgten als Dreifachbestimmungen. Die virusfreien Kontrollansätze zeigten starke Schwankungen in den Extinktionswerten (bis 13%) bei den Ansätzen ohne HRV-14. Deshalb wurde die Differenz aus den Extinktionswerten des virushaltigen und virusfreien Ansatzes bei HeLa-Zellen als 100% definiert. Der Nachweis der Bindung von HRV-14 an die verschiedenen Zelllinien wurde tabellarisch (bezogen auf die Werte ohne Virus) dargestellt (s. Tab. 4).

Zellen	Bindung von HRV-14 (Extinktion bei 450 nm)	Kontrolle ohne HRV-14 (Extinktion bei 450 nm)	Differenz (Extinktion bei 450 nm)	Differenz bezogen auf HeLa-Zellen (%)
HeLa-Zellen	0,508	0,265	0,243	100± 3,1%
BHK-ICAM-1-Zellen	0,459	0,2	0,259	105,6±13,6 %
BHK-Zellen	0,248	0,232	0,016	6,8± 0,2 %

Tab. 4: Nachweis von HRV-14 auf der Zelloberfläche von HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen

Fixierte BHK-ICAM-1-, HeLa- und BHK-Zellen wurden mit HRV-14 inkubiert. Der Nachweis von oberflächengebundenem HRV-14 erfolgte über Anti-HRV-14-Antikörper in einem HRV-14-ELISA. Die Adsorptionswerte wurden relativ zur Adsorption von HRV-14 an HeLa-Zellen (=100%) angegeben.

BHK-ICAM-1-Zellen konnten HRV-14 mit der gleichen Kapazität wie HeLa-Zellen adsorbieren. BHK-Zellen zeigten im Vergleich keine spezifische Adsorption von HRV-14.

Bei HeLa-Zellen war eine deutliche Differenz zwischen der Bindung von HRV-14 und dem Kontrollwert ohne Virus nachweisbar (Tab. 4, definiert als 100%). Mit etwa der-

selben Kapazität konnte HRV-14 an BHK-ICAM-1-Zellen binden (105% Bindung im Vergleich zu HeLa-Zellen). BHK-Zellen zeigten dagegen keine signifikante Bindung von HRV-14 (6,84% Bindung im Vergleich zur Virusbindung an HeLa-Zellen). BHK-Zellen waren daher ohne ICAM-1 nicht in der Lage, HRV-14 spezifisch an der Zelloberfläche zu binden.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das von den BHK-ICAM-1-Zellen exprimierte ICAM-1 genauso wie das ICAM-1 von HeLa-Zellen in der Lage war, HRV-14 zu binden.

3.2.3.2. Die Bestimmung der RNA-Synthese von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen

Wie bei HeLa-Zellen (s. 3.1.2) wurde die Produktion von viraler RNA in BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen als ein Maß der Einschleusung von HRV-14 in die Zellen untersucht. Da elektronenmikroskopisch in BHK-ICAM-1-Zellen kein virusspezifischer zytopathischer Effekt erkennbar war, wurde gefragt, ob noch eine virale RNA-Synthese in BHK-ICAM-1-Zellen stattfand.

Jeweils konfluente BHK-ICAM-1-Zellen, HeLa- und BHK-Zellen wurden mit HRV-14 in einer Infektionsdosis von 10 p.f.u./Zelle infiziert. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die virale RNA nach 4, 5, 6, 7, 8 und 10 h. p.i mit ³H-Uridin radioaktiv markiert, präzipitiert und die Radioaktivität gemessen. Alle Messungen wurden in doppelten Ansätzen durchgeführt (Abb. 15).

Nach der Infektion der BHK-ICAM-1-Zellen mit HRV-14 war weder in BHK-ICAM-1-Zellen noch in BHK-Zellen eine Neusynthese von HRV-14-RNA nachweisbar. Die Einbauraten lagen im gesamten Meßzeitraum auf dem Niveau mock-infizierter HeLa-Zellen. Infizierte HeLa-Zellen zeigten dagegen bei der viralen RNA-Synthese eine glockenförmige Reproduktionskinetik, die der von Polioviren ähnelt und ein Maximum zur 7. Stunde mit Werten bis 46000 cpm aufweist. Die scheinbare Abnahme nach der 7. Stunde war auf das Ablösen zytopathisch veränderter Zellen von den Glasplättchen zurückzuführen, auf denen die Zellen als Monolayer gewachsen waren.

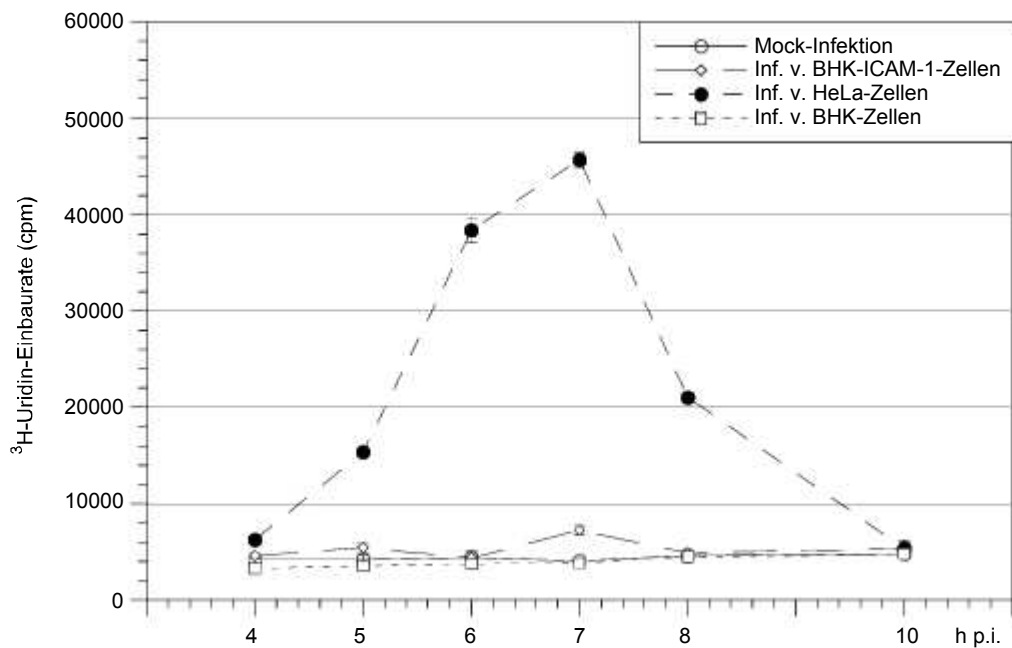


Abb. 15: Neusynthese von viraler HRV-14-RNA in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen

Die virale RNA-Neusynthese in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen wurde in einem RNA-Synthese-Test nach 4, 5, 6, 7, 8 und 10 h p.i. gemessen. Die Synthese viraler RNA ist weder bei BHK- (□) noch bei BHK-ICAM-1-Zellen (◇) nachweisbar, die Einbausraten entsprechen denen der Mock-Kontrolle (○). HeLa-Zellen (●) zeigten einen Reproduktionsverlauf, wie er auch bei der Infektion mit Polioviren beobachtet wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Infektion von BHK-ICAM-1-Zellen zu keiner messbaren viralen RNA-Synthese führte.

3.2.3.3. Die Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen

Nach der Messung der RNA-Synthese wurde die infektiöse Nachkommenschaft von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen als eine Ein-Stufen-Wachstumskinetik untersucht. Dazu wurde die Virusproduktion in infizierten Zellen durch Lyse nach verschiedenen Zei-

ten gestoppt und die Virusnachkommenschaft im Plaque-Test (s. 2.8) gemessen (Abb. 16).

Konfluent gewachsene BHK-ICAM-1-Zellen (8×10^5 Zellen/Vertiefung) wurden mit HRV-14 in einer Infektionsdosis von 10 p.f.u./Zelle infiziert. Nach Entfernung des Inokulums wurde die Virusadsorption bei 0 min. und 4°C gemessen. Die Zellen wurden

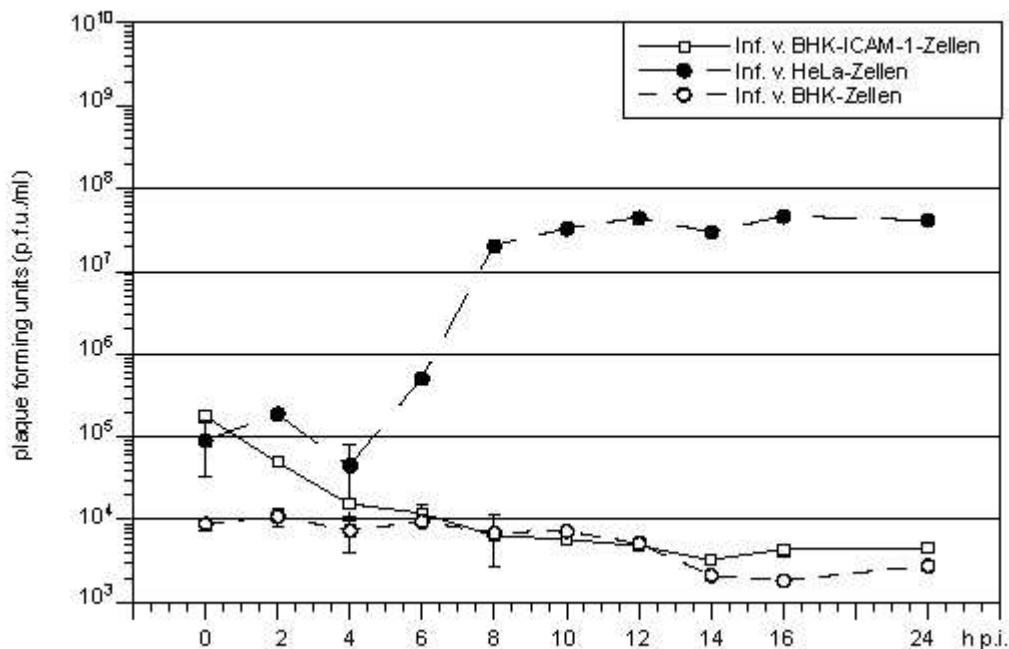


Abb. 16: Ein-Stufen-Wachstumsexperiment zur Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen (Grunert et al., 1997)

Die Produktion von infektiösen Nachkommen von HRV-14 in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen wurde nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 24 h p.i. im Plaque-Test gemessen. Zu den angegebenen Zeiten wurden die infizierten HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen lysiert. Die Virusnachkommenschaften aus den Lysaten wurde auf HeLa-Zellen durch Plaquetitration bestimmt.

Die Synthese infektiöser Viren war bei BHK-Zellen (○) nicht nachweisbar. Die Plaquetiter waren nahezu konstant. Bei BHK-ICAM-1-Zellen (□) lag zur 0. h p.i. eine Bindung oder Aufnahme von HRV-14 an bzw. in die Zellen vor, entsprechend zur gleichen Zeit bei den HeLa-Zellen (●). Im weiteren Verlauf erfolgte anstelle einer Neusynthese ein Abbau von HRV-14 mit der Abnahme der Titerwerte auf vergleichbare Werte wie bei BHK-Zellen. Infizierte HeLa-Zellen zeigten eine sigmoide Reproduktionskinetik mit einem Anstieg ab der 4. Stunde bis auf das konstante Maximum von ca. 5×10^7 p.f.u./ml.

nach 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 24 h.p.i bei 33°C geerntet und lysiert. In diesem Ein-Stufen-Wachstumsexperiment wurde die Infektiosität der Lysate, wie im Plaque-Test (s. 2.8) beschrieben, auf HeLa-Zellen durch Plaquetitration gemessen. Als Kontrolle wurde eine analoge Infektion von BHK-Zellen und HeLa-Zellen durchgeführt. Alle Bestimmungen wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt.

Die Infektion der BHK-ICAM-1-Zellen mit HRV-14 führte weder in BHK-ICAM-1-Zellen noch in BHK-Zellen zu einer Neusynthese von infektiösen HRV-14-Viren (Abb. 16). Im Vergleich zu BHK-Zellen (ca. 10^4 p.f.u./ml adsorbiertes Virus) zeigte sich bei BHK-ICAM-1-Zellen zur 0. Stunde ein Virusnachweis von ca. 10^5 p.f.u./ml, der dem Wert bei HeLa-Zellen zu diesem Zeitpunkt vergleichbar war und die Adsorption von elterlichem Virus an die Zelloberfläche widerspiegelte. Im weiteren zeitlichen Verlauf kam es dann bei den BHK-ICAM-1-Zellen zu einer Elution des nachweisbaren Virus. Ab der 6. Stunde lagen die Virustiter bei BHK-ICAM-1-Zellen auf der Stufe von denen der BHK-Kontrollzellen. Infizierte HeLa-Zellen zeigten eine sigmoide Reproduktionskinetik mit einem Anstieg ab der 4. Stunde bis auf das konstante Maximum von ca. 5×10^7 p.f.u./ml.

Die Infektion von BHK-ICAM-1-Zellen führte somit zu keiner messbaren Synthese reifer HRV-14-Virusnachkommen.

3.2.3.4. Die Bestimmung von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 im Vergleich zu Coxsackievirus A21 in BHK-ICAM-1-Zellen

Aufgrund der fehlenden Infizierbarkeit der BHK-ICAM-1-Zellen durch HRV-14 wurde die Funktionalität des transfizierten ICAM-1-Rezeptors in BHK-ICAM-1-Zellen überprüft. Dazu wurde die Virusproduktion von Coxsackievirus A21 in HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen im Vergleich zu HRV-14 gemessen. Coxsackievirus A21 ist wie HRV-14 ein Mitglied der Picornavirusfamilie (Tab. 2) und benutzt ebenfalls ICAM-1 als Virusrezeptor (Colonno et al., 1986).

Die Infektiosität von Coxsackievirus A21 wurde im Vergleich zu HRV-14 in HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen im Plaque-Test untersucht.

Jeweils konfluent gewachsene HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen wurden mit Coxsackievirus A21 oder HRV-14 in einer Infektionsdosis von 10 p.f.u./Zelle infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das Inokulum entfernt. Nach 2 Tagen wurde die Anzahl der gebildeten Plaques bestimmt und die Infektiosität berechnet.

Coxsackievirus A21 reproduzierte sich sowohl in HeLa-Zellen wie auch in BHK-ICAM-1-Zellen mit einer Infektiosität von 7×10^7 p.f.u./ml (Abb. 17). In BHK-Zellen konnten keine Plaques induziert werden. BHK-Zellen waren daher für Coxsackievirus A21 wie für HRV-14 nicht empfänglich. Im Gegensatz zu Coxsackievirus A21 bildete HRV-14 nur in HeLa-Zellen, jedoch nicht in BHK-ICAM-1- oder BHK-Zellen Plaques. Eine Vermehrung von HRV-14 war nur in HeLa-Zellen nachweisbar. In BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen war keine Virusnachkommenschaft von HRV-14 messbar. Auf BHK-Zellen waren weder Plaques durch HRV-14 noch durch Coxsackievirus A21 nachweisbar.

Da Coxsackievirus A21 an ICAM-1 bindet und sich in BHK-ICAM-1-Zellen vermehrt, muss ICAM-1 ein funktionell aktiver Rezeptor auf BHK-ICAM-1-Zellen sein. Auch sind transfizierte BHK-ICAM-1-Zellen in der Lage, Coxsackievirus A21 im Gegensatz zu HeLa-Zellen in hohen Titern zu reproduzieren. BHK-ICAM-1-Zellen waren also durch die Transfektion mit ICAM-1 in der Lage, bestimmte Picornaviren wie Coxsackievirus A21 erfolgreich zu reproduzieren.

Zusätzlich zur Messung der Virusreproduktion im Plaque-Test wurde die halbmaximale Infektionsdosis (ID_{50}) von Coxsackievirus A21 und HRV-14 in HeLa-, BHK-ICAM-1- und BHK-Zellen durch Endpunktstirration bestimmt. Bei diesem Test ist die Infektionsdosis wesentlich höher als im Plaque-Test. Dadurch sollte der Nachweis einer Infektion möglich sein.

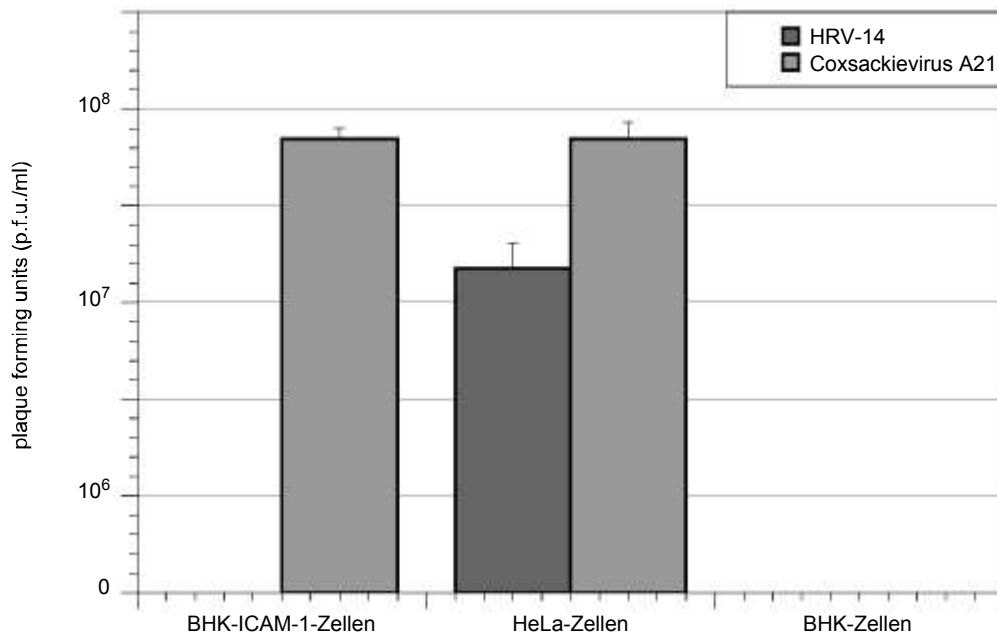


Abb. 17: Bestimmung von infektiöser HRV-14- und Coxsackievirus A21-Nachkommenschaft in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen

Die Produktion von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 und Coxsackievirus A21 wurde auf BHK-ICAM-1-, HeLa- und BHK-Zellen durch Plaque-titration gemessen.

Coxsackievirus A 21 (☉) war sowohl in HeLa- (7×10^7 p.f.u./ml) als auch in BHK-ICAM-1-Zellen (7×10^7 p.f.u./ml) vermehrungsfähig, HRV-14-Vermehrung (⊗) war nur bei HeLa-Zellen ($1,5 \times 10^7$ p.f.u./ml) nachweisbar. Bei BHK-Zellen erfolgte für beide Viren keine Reproduktion.

Konfluent gewachsene HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen wurden mit Coxsackievirus A21- oder HRV-14 aus einer Verdünnungsreihe von 10^0 bis 10^{-6} infiziert (s. 2.9). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das Inokulum entfernt. Nach 24 Stunden wurde der zytopathische Effekt makroskopisch durch Auszählung der Plaques halbquantitativ bestimmt und daraus die Infektionsdosis berechnet, bei der die Hälfte der Zellen zytopathisch verändert waren (halbmaximale Infektionsdosis ID_{50}).

Coxsackievirus A21 zeigte in HeLa-Zellen und BHK-ICAM-1-Zellen eine Reproduktion mit einer ID_{50} von $10^{5,8}/\text{ml}$ bzw. $10^{5,3}/\text{ml}$ (Tab. 5). In BHK-Zellen war Coxsackievirus A21 nicht nachzuweisen. HRV-14 war nur in HeLa-Zellen mit einer ID_{50} von $10^6/\text{ml}$

nachweisbar. In BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen konnte HRV-14 nicht nachgewiesen werden.

Virus	BHK-ICAM-1-Zellen	HeLa-Zellen	BHK-Zellen
Coxsackievirus A21 (ID ₅₀ /ml)	10 ^{5,3}	10 ^{5,8}	n.d.
HRV-14 (ID ₅₀ /ml)	n.d.	10 ^{6,0}	n.d.

Tab. 5: Reproduktion von HRV-14 und Coxsackievirus A21 in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen, nachgewiesen durch Endpunktstirration (Grunert et al., 1997)

Die Produktion von infektiöser Virusnachkommenschaft von HRV-14 und Coxsackievirus A21 wurde auf BHK-ICAM-1-, HeLa- und BHK-Zellen durch Endpunktstirration gemessen.

Coxsackievirus A21 war sowohl in HeLa- als auch in BHK-ICAM-1-Zellen vermehrungsfähig, HRV-14-Vermehrung war nur bei HeLa-Zellen nachweisbar. Bei BHK-Zellen erfolgte für beide Viren keine Reproduktion (n.d. = nicht nachweisbar).

Die Funktionalität von ICAM-1 in BHK-ICAM-1-Zellen konnte somit nachgewiesen werden. Durch die Transfektion von BHK-Zellen mit ICAM-1 war eine Infektion der Zellen mit Coxsackievirus A21 möglich. Eine Infektion dieser Zellen mit HRV-14 gelang jedoch nicht. HeLa-Zellen mit zellulärem ICAM-1 waren dagegen sowohl mit Coxsackievirus A21 als auch mit HRV-14 infizierbar.

3.2.3.5. Die Bestimmung von HRV-14-Proteinen in BHK-ICAM-1-Zellen im Vergleich zu HeLa- und BHK-Zellen

Die Funktionalität von BHK-ICAM-1-Zellen zeigte sich bei Coxsackievirus A21 in einer erfolgreichen Infektion der Zellen mit dem Nachweis reifer Viren (s. 3.2.3.4). Bei HRV-14 ließ sich dagegen in BHK-ICAM-1-Zellen trotz elektronenmikroskopisch

nachgewiesener Aufnahme in die Zelle (s. 3.2.2) keine erfolgreiche Infektion beobachten (s. 3.2.3.3). In den zellbiologischen Infektionsversuchen konnte weder eine RNA- noch eine Virusneusynthese nachgewiesen werden (s. 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

Der blockierte Schritt im Reproduktionszyklus von HRV-14 musste in BHK-ICAM-1-Zellen also nach der Adsorption und Penetration des Virus in die Zelle und vor der Replikation der viralen RNA liegen (s. Abb. 3). Es war zu prüfen, ob bei einer funktionierenden Freisetzung der viralen RNA aus dem Viruskapsid ('Uncoating') trotz der gestörten Replikation eine ungestörte Translation mit einer Synthese von viralen Proteinen nachweisbar war.

Daher wurde untersucht, ob in BHK-ICAM-1-Zellen HRV-14-Proteine aus freigesetzter viraler RNA translatiert werden konnten.

Dazu wurden HeLa-Zellen, BHK-ICAM-1-Zellen und BHK-Zellen mit HRV-14 mit einer Infektionsdosis von 10 p.f.u./Zelle für 30 Minuten bei 33°C in Gegenwart von Actinomycin D als Inhibitor zellulärer RNA-Polymerase infiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Medium mock-infiziert. Die radioaktive Markierung der Proteine erfolgte mit 10 µl ³⁵S-Methionin für 1 Stunde bei 33°C (Yin et al., 1983). Die Zellen wurden präzipitiert und lysiert. Die Auftrennung der Virusproteine erfolgte in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli wie in 2.13 beschrieben. Aufgetrennte Proteine wurden durch Fluorographie detektiert. ¹⁴C-markierte Proteine wurden als Molekulargewichtsmarker eingesetzt.

HeLa-Zellen zeigten nach der Infektion eine durch HRV-14 induzierte Abnahme der zellulären Proteinsynthese (Abb. 18, Spur 3), die durch die zusätzliche Inhibition der zellulären RNA-Polymerase durch Actinomycin D (Spur 4) noch verstärkt wird. Die Bildung virusspezifischer Proteine wie P1, 3CD, VP0, VP1 und VP3 mit den entsprechenden Molekulargewichten ist bei HeLa-Zellen zu beobachten (Spur 3, 4). Das Proteinmuster infizierter BHK-ICAM-1-Zellen (Spur 9, 10) ähnelte dem von mock-infizierten HeLa-Zellen (Spur 2) und unterschied sich nicht von dem mock-infizierter BHK-ICAM-1-Zellen (Spur 8) oder ICAM-1 freier BHK-Zellen (Spur 5-7). BHK-ICAM-1-Zellen zeigten im Vergleich zu HeLa-Zellen keine Bildung von virusspezifischen Proteinen (Spur 10 im Vergleich zu Spur 4). Auch eine virusbedingte Abschaltung der

zellulären Proteinsynthese, des sog. 'Shut-off', war in BHK-ICAM-1-Zellen nicht zu beobachten (Spur 9 im Vergleich zu Spur 3).

Bei BHK-ICAM-1-Zellen kam es im Gegensatz zu HeLa-Zellen nach einer Infektion mit

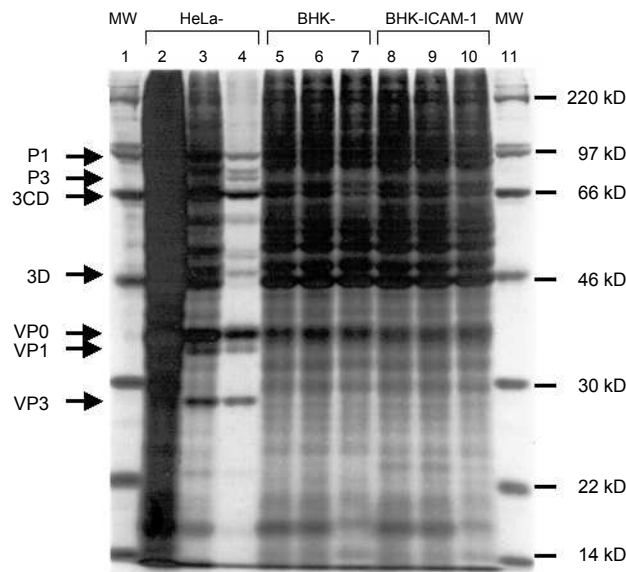


Abb. 18: Proteinsynthese von HRV-14 in HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen (Grunert et al., 1997)

HeLa-, BHK- und BHK-ICAM-1-Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Actinomycin D mit HRV-14 infiziert. Neusynthetisierte Zell- und Virusproteine wurden durch radioaktive Markierung mit ^{35}S -Methionin und anschließender Auftrennung in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli nachgewiesen. HeLa-Zellen: Mock-Infektion (Spur 2), HRV-14 Infektion (Spur 3), HRV-14 Infektion in Gegenwart von Actinomycin D (Spur 4). BHK-Zellen: Mock-Infektion (Spur 5), HRV-14 Infektion (Spur 6), HRV-14 Infektion in Gegenwart von Actinomycin D (Spur 7). BHK-ICAM-1-Zellen: Mock-Infektion (Spur 8), HRV-14 Infektion (Spur 9), HRV-14 Infektion in Gegenwart von Actinomycin D (Spur 10). Molekulargewichtsmarker (MW) (Spur 1,11)

BHK-ICAM-1-Zellen zeigten weder eine virusbedingte Abschaltung zellulärer Proteinsynthese, sog. 'Shut-off' (Spur 9) noch die Bildung spezifischer Virusproteine (Spur 10) im Vergleich zu den entsprechenden Spuren bei HeLa-Zellen (Spur 3,4). Sie glichen in ihrem Proteinmuster den nicht infizierbaren BHK-Zellen (Spur 5-7). Im Gegensatz war bei HeLa-Zellen sowohl eine virusbedingte Abschaltung der zellulären Proteinsynthese (Spur 3 im Vergleich mit Spur 2) als auch spezifische Virusproteine P1, 3CD, VP0, VP1 und VP3 zu beobachten (Spur 3,4)

HRV-14 nicht zu einer RNA-abhängigen Synthese virusspezifischer Proteine. Auch andere virusspezifische Prozesse wie die Abnahme zellulärer Proteinsynthese waren in BHK-ICAM-1-Zellen nicht nachweisbar.

Es ist daher zu folgern, dass in BHK-ICAM-1-Zellen nach den hier vorliegenden Untersuchungen zwar die Aufnahme von HRV-14 in die Zelle funktioniert, aber als Ursache für die fehlende Reproduktion von HRV-14 eine fehlende Synthese viraler RNA und Proteine verantwortlich ist.

Als gestörter Vorgang im Reproduktionszyklus von HRV-14 in BHK-ICAM-1-Zellen ist daher entweder eine gestörte Freisetzung der viralen RNA aus dem Viruskapsid ('Uncoating') oder der Initiation der Translation der viralen RNA anzusehen (s. Abb. 3).