

**Untersuchungen zur Rolle von Dynamin
beim Eintritt von HIV-1 in humane Zellen**

Zusammenfassung der
Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jessica Daecke
aus Hamburg

- Hamburg 2002 -

Zusammenfassung

Der Viruseintritt (Entry) in die Zielzelle und der Transport zum geeigneten Zellkompartiment stellen kritische Schritte im Replikationszyklus dar und werden auf unterschiedlichen Wegen erreicht. Während einige Viren wie Paramyxoviren direkt an der Plasmamembran mit der Zelle fusionieren, nutzen andere Viren zelluläre Transportmechanismen, um weiter ins Zellinnere vorzudringen. So werden z.B. Influenza Viren und das vesikuläre Stomatitis verursachende Virus in Clathrin-umhüllten Vesikeln internalisiert und fusionieren erst nach pH-induzierter Konformationsänderung der Fusionsproteine mit der Endosomemembran. Simian Virus 40 wiederum wird durch Caveolae – spezielle Vesikel aus Cholesterolreichen Membraninvaginationen - in die Zelle aufgenommen.

Der Eintritt von HIV-1 erfolgt Rezeptor-vermittelt und pH-unabhängig und es wurde bisher angenommen, daß die Fusion ausschließlich an der Plasmamembran vollzogen wird. Allerdings wird der Großteil der Partikel unspezifisch über Endosomen in die Zelle aufgenommen. Dies wurde bisher als unproduktive Internalisierung eingeschätzt, die in der Degradation der Partikel in Lysosomen resultiert. Gegen diese Annahme spricht, daß bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen neben Partikeln, die mit der Plasmamembran fusionierten auch solche entdeckt wurden, die den Kapsidkern aus endosomalen Vesikeln ins Zytoplasma entließen. Zudem wurde für den Eintritt von HIV-1_{SF2} eine pH-Abhängigkeit aufgezeigt, sowie eine Erhöhung der Infektiosität bei experimentell verstärkter vesikulärer Internalisierung.

Um die Rolle von endozytotischen Prozessen und Transportmechanismen der Zelle beim HIV-1 Eintritt näher zu untersuchen, wurden HeLa-Zelllinien benutzt, die stabil und Tetrazyklin-regulierbar transdominant-negative Mutanten der zellulären GTPase Dynamin exprimieren. Dynamin ist essentiell für die Ablösung von Clathrin-umhüllten endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran und vermittelt dies vermutlich auch bei Caveolae-Vesikeln. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Bildung von „actin tails“, die für die Motilität von zellulären Vesikeln und manchen eingedrungenen Pathogenen wichtig sind. Durch die Transduktion mit dem CD4-Rezeptorgen wurden Zellen, die transdominant-negatives, Temperatur-sensitives Dynamin- (Dyn-ts-) exprimieren für HIV-1 infizierbar gemacht. Bei dieser Dynamin-Mutante wird die GTP-Hydrolyse bei der nicht-permissiven Temperatur inhibiert und die Clathrin-abhängige Endozytose gehemmt. Es wurden klonale Zelllinien isoliert, die CD4 stabil über mehrere

Wochen exprimierten und die endozytotische Aufnahme von Transferrin bei der nicht-permissiven Temperatur in bis zu 85% der Zellpopulation inhibierten.

Es wurde ein Versuchsaufbau etabliert, bei dem die Infektionseffizienz in Zellen, die während des Virus Entry keine Dynamin-vermittelte Endozytose durchführten mit derjenigen in nicht-Dyn-ts-exprimierenden Zellen verglichen wurde. Hier ergab sich im Falle von HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} reproduzierbar eine Reduktion an Virusprotein-exprimierenden Zellen von 50 bis 60% und eine 84%ige Reduktion für das Virusisolat HIV-1_{MVP8161} (Gruppe O). Dies ließ darauf schließen, daß ein Teil der eindringenden Viren bei den frühen Replikationsschritten von Dynamin-vermittelten, zellulären Prozessen abhängig ist. Die Verhinderung der Endosomenansäuerung mit Ammoniumchlorid erhöhte den Virustiter bei HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{SF2} und bestätigte somit vorherige Veröffentlichungen über die pH-Unabhängigkeit von HIV-1_{NL4-3}, stand jedoch im Kontrast zu einer Studie über den HIV-1_{SF2}-Zelleintritt und ließ einen grundsätzlich ähnlichen Entry-Mechanismus für HIV-1_{SF2} wie für HIV-1_{NL4-3} vermuten. Zur präziseren Untersuchung des Dyn-ts-induzierten Blocks wurden die frühen Replikationsphasen mittels quantitativer Real Time PCR-Analyse von reversen Transkriptionsprodukten (RT-Produkte) untersucht. Es wurden RT-Produkte, die nach Eintritt des Virus ins Zytoplasma gebildet wurden zwischen Dyn-ts-exprimierenden und -nicht-exprimierenden Zellen quantitativ verglichen. In bisher drei unabhängigen Experimenten wurden jedoch noch keine konsistenten Ergebnisse erzielt. Weitere Experimente müssen aufklären, ob eine Dyn-ts-induzierte Reduktion dieser RT-Produkte besteht. In diesem Fall ließe dies einen zusätzlich zur Plasmamembranfusion vorhandenen endozytotischen Entry-Mechanismus bei HIV-1 vermuten, der entweder Clathrin-umhüllte Vesikel oder Caveolae betrifft und durch spezifischere Inhibitoren aufgeklärt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Beteiligung des Aktin Zytoskeletts an der reversen Transkription, die zuvor vorgeschlagen wurde und an der Dynamin beteiligt sein könnte. Eine andere Auswirkung der Störung der Interaktion zwischen Dynamin und dem Aktin Zytoskelett könnte erst nach dem Eintritt eingreifen und den Kerntransport betreffen. Dieser Fall würde zu keiner Reduktion der zytoplasmatischen RT-Produkte durch Dyn-ts führen und könnte durch die quantitative Analyse kernspezifischer, viraler DNA-Produkte belegt werden.