

Viren als Parasiten und Überträger genetischer Elemente in die Wirtszelle: Zellbiologie von Viren¹

Urs F. Greber, Zürich

Zusammenfassung

Viren tauchen in unregelmässigen Intervallen, aber häufig in der Bevölkerung auf. Die erfolgreichen, sich stark ausbreitenden Viren haben Wege gefunden, zelluläre Mechanismen auszunützen. Sie können mit hoher Effizienz und Raffinesse in die Zellen des Wirts eindringen und der Neutralisierung durch den Wirt entgehen. Das Adenovirus des Typs C, ein menschliches Grippevirus, hat zum Ziel, sein DNS-Genom im Zellkern zu deponieren und sich in den Zielzellen der menschlichen Atemwege zu vermehren. Durch rezeptorvermittelte Endozytose gelangt das Virus mit hoher Effizienz in die Zellen, durchbricht die endosomale Membran und wird zum Zellkern transportiert. Es zerfällt an den Kernporenkomplexen der Kernmembran und entlässt seine DNS in das Kernplasma. Was sind die molekularen Mechanismen hinter diesem fein abgestimmten Programm des Zelleintritts und Viruszerfalls?

Viruses as parasites and gene transfer vehicles into cells

Viruses emerge randomly but frequently among the human population. Successful viruses are able to infect a large number of individuals. These viruses have learnt to exploit cellular mechanisms to enter their host cells and escape the host's immune surveillance. Type C adenovirus, a human cold virus, aims at delivering its DNA genome into the nucleus of epithelial cells in the respiratory tract. It enters target cells by receptor-mediated endocytosis, penetrates the endosomal membrane and is transported to the cell nucleus. It attaches to nuclear pore complexes and then disassembles and releases its genome into the nucleus. What are the molecular mechanisms which control this finely tuned entry and disassembly program?

1 EINLEITUNG

Rasante Fortschritte der Computerwissenschaften und der Biologie erlauben uns, immer feinere strukturelle Einzelheiten der Viren zu erkennen. Doch verstehen wir damit das Dasein der Viren? Leider nicht, denn ein Virus ist ohne die Zellen, aus denen es hervorgegangen ist, inert, inaktiv, nicht vermehrungsfähig. Obwohl Viren aus den gleichen Bausteinen wie die Zellen bestehen, können sie sich nicht selbst replizieren, sondern sind auf Leben in Form von Zellen angewiesen (Abb. 1).

Zellen sind die durch eine Zellmembran gegen die Umgebung abgegrenzten, grundlegenden Einheiten biologischer Organisation. Rudolf Virchow, einer der bedeutendsten Pathologen des 19. Jahrhunderts, hat diesen Sachverhalt wie folgt ausgedrückt: «Jedes Tier erscheint als die Summe von vitalen Einheiten, von denen jede einzelne alle Charakteristi-

ka des Lebens besitzt» und zudem festgehalten, dass jede Zelle von einer Zelle abstamme. Erwin Schrödinger, ein bedeutender Teilchenphysiker, hat vor etwa 50 Jahren Leben zum ersten Mal reduktionistisch als «die physikalische Natur der Vererbbarkeit mit einem den thermodynamischen Gesetzen unterstehenden Energiehaushalt» definiert (vgl. SCHRÖDINGER, 1987). Jede Zelle eines erwachsenen Organismus interagiert intensiv mit ihrer Umgebung (s. LODISH et al., 1995). Nahrung in Form von Protein, Fett oder Zucker wird von aussen in die Zelle aufgenommen, durch enzymatische Katalyse in ihre Komponenten abgebaut und in zelluläre Energieeinheiten umgesetzt. Diese chemische Energie ermöglicht den Aufbau von zelleigenen Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren sowie Zellkomponenten. Eine gesunde Zelle braucht dazu Instruktionen. Diese kommen entweder von innen oder von aussen und bewirken, dass bestimmte Teile

¹ Nach der Antrittsvorlesung vom 9. Dezember 1996 als Assistenzprofessor an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

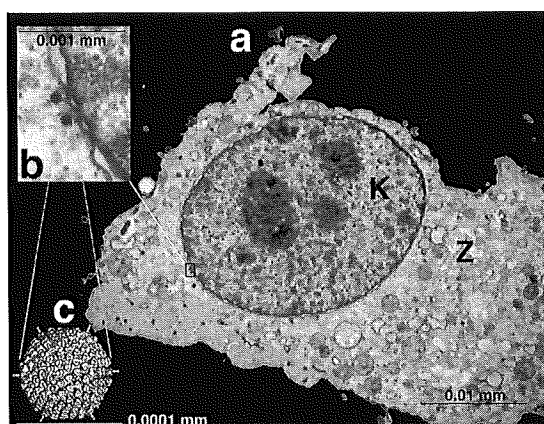


Abb. 1. Transmissionselektronenmikroskopische Abb. einer menschlichen HeLa-Zelle², eine Stunde nach der Infektion mit Adenoviren Typ 2. a) Gesamtansicht der Zelle mit Kern (K) und Zellplasma (Z). b) Im vergrösserten Ausschnitt sind zwei an Kernporenkomplexe gedockte Adenoviren sichtbar. c) Computerrekonstruktion des Adenovirus Typ 2 (aus STEWART et al., 1991).

Fig. 1. Transmission-electronmicrograph of a HeLa cell at 1 h post infection with adenovirus type 2. a) Overview with nucleus (K) and cytoplasm (Z). b) Enlargement of two adenoviruses docked at nuclear pore complexes. c) Computer-assisted reconstruction of adenovirus type 2 from cryoelectron micrographs (from STEWART et al., 1991).

der Erbinformation in der Desoxiribonucleinsäure (DNS oder DNA), in Boten-Ribonucleinsäure (Boten-RNS oder m-RNA) und diese wiederum in Proteine übersetzt werden, die ihrerseits zelluläre Strukturen wie Organellen, Zellskelett oder zytosolische Funktionen aufbauen und beeinflussen. Zellen können so sich selbst reproduzieren und der Umwelt anpassen. Eine Leberzelle ändert z. B. ihre Funktion während eines Essens. Eine nicht wachsende Zelle kann plötzlich sich zu teilen beginnen und im Falle einer onkogenen Veränderung zu einer Krebsgeschwulst ausarten. Bei der Embryonalentwicklung differenziert sich eine teilende Eizelle zu einer Vielfalt verschiedener Zelltypen unterschiedlicher Funktionen.

Die Zell- oder Plasmamembran besteht vorwiegend aus Lipiden und Proteinen; sie trennt das Zellinnere gegen aussen ab. Durch den hydrophoben Charakter der Lipide ist sie in der Lage, das wässrige Milieu der Zelle zusammenzuhalten, während die hydrophilen Proteine erlauben, einen spezifischen Stoffaustausch zu vermitteln und zu regeln. Ähnliche Cytomembranen, die wir uns als komplexe und sehr dynamische Strukturen vorstellen müssen, umhüllen in eukaryotischen Zellen auch die Organellen im Zellinnern und schaffen

so Kompartimente wie Golgivesikel, Lyso- und Endosomen, sekretorische Vesikel, Mitochondrien, glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie die doppelte Kernhülle. Zusammen mit einer Proteinschicht, der Lamina, verpackt diese Hülle die eukaryotische DNS.

Die Kompartimente bilden spezielle Räume des Zellplasmas, in denen bestimmte chemische Vorgänge geschützt und ungestört mit hoher Effizienz ablaufen. Endosomen z. B. entstehen aus Einstülpungen der Plasmamembran. Durch diese sog. Endozytose nehmen die Zellen extrazelluläre Nahrung und Signalmoleküle in sich auf. Die Endosomen können auch für die Aufnahme von Viren von hervorragender Bedeutung sein. Der Endozytosevorgang ist hoch effizient und kann innerhalb einer Stunde eine der ursprünglichen Zelloberfläche entsprechende Membranfläche internalisieren.

Um die verschiedenen Kompartimente effektiv zu nutzen, verwendet die Zelle proteinhaltige Kommunikationsmoleküle. Der Kernporenkomplex, illustriert in Abb. 2, kontrolliert den Stofftransport zwischen dem Zellkern und dem Zellplasma (s. DAVIS, 1995; PANTE & AEBI, 1996). Er hat einen Durchmesser von ungefähr $0,12 \mu\text{m}$. Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Tangentialschnitts durch die Kernhülle einer HeLa-Zelle² zeigt die ringförmige Struktur des Kernporenkomplexes (Abb. 2a). Ein Vertikalschnitt durch Kernporenkomplexe zeigt eine zentrale proteinhaltige Struktur, den sog. Transporter, der für den Durchtritt grosser Moleküle mit einem maximalen Durchmesser von 28 nm, z. B. Proteine oder Nucleinsäuren, durch die Kernhülle verantwortlich ist (Abb. 2b). In einer computergestützten Rekonstruktion erkennen wir die Ringstruktur, welche achtfach symmetrisch angelegt ist. Von dieser Ringstruktur zweigen gegen oben (ausen) zytoplasmatische Filamente und gegen unten (innen) nukleäre Filamente ab (Abb. 2c). Diese Filamente bilden Bindungsstellen für ein- und austretende Transportmoleküle. Der Kernporenkomplex ist in der äusseren und inneren Kernmembran durch die Ringstruktur verankert und steht somit in direktem Kontakt mit dem Innenraum der Kernlipidhülle.

Die Kernporenkomplexe bieten nicht die einzige Möglichkeit einer Zelle, ihre Gene dem Einfluss der Umgebung auszusetzen. Eine Zelle kann auf mindestens vier verschiedene Arten mit ihrer Umwelt interagieren: 1. Sie kann mit einer Nachbarzelle Stoffe austauschen. 2. Sie kann mit Nachbarzellen verschmelzen, unter Bildung eines sog. Synzytiums, in dem die einzelnen Zellkerne im gemeinsamen Zell-

² HeLa-Zellen sind menschliche Zellen, die 1951 aus Gebärmutterkrebsgewebe der Amerikanerin Henrietta Lacks entnommen wurden und bis heute als permanente Zelllinie in vielen Labors gehalten werden.

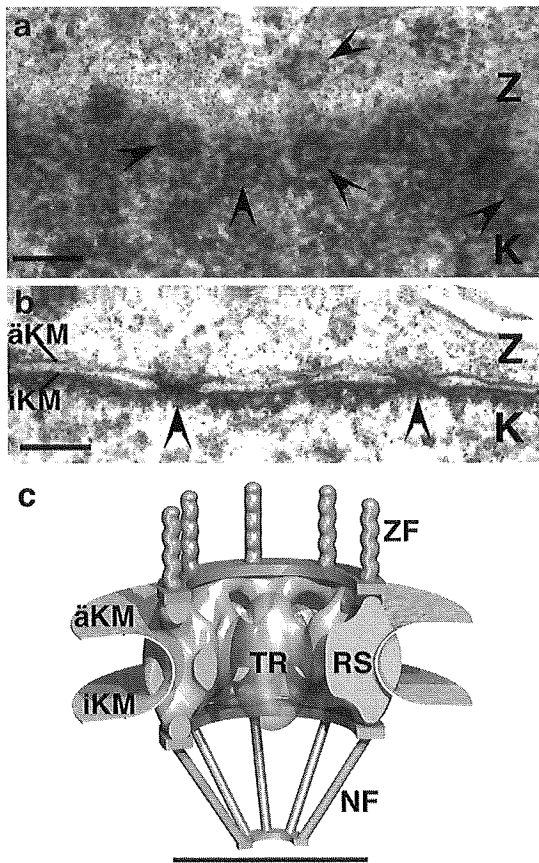


Abb. 2. Transmissionselektronenmikroskopische Abb. von Kernporenkomplexen einer menschlichen HeLa-Zelle. a) Schnitt tangential zur Kernhülle. Kernporenkomplexe sind mit Pfeilköpfen markiert. Balken entspricht 0,2 μm . b) Vertikalschnitt durch die Kernhülle mit äusserer Kernmembran (äKM), innerer Kernmembran (iKM), Zellplasma (Z), Kernplasma (K). Pfeilköpfe markieren die zentrale amorphe Struktur eines jeweiligen Kernporenkomplexes. Balken entspricht 0,2 μm . c) Computer-gestützte Rekonstruktion eines Kernporenkomplexes aus Krallenfroscheiern. Zytoplasmatische Filamente (ZF), nukleäre Filamente (NF) und periphere Ringsstruktur (RS) sind in der äusseren Kernmembran (äKM) und inneren Kernmembran (iKM) eingebettet. In der Mitte des Kernporenkomplexes liegt die Transporterstruktur (TR). Balken entspricht 0,1 μm (Modellaufnahme Ueli Aebi, Biozentrum der Universität Basel).

Fig. 2. Transmission-electronmicrographs of nuclear pore complexes of HeLa cells. a) Tangential section to the nuclear envelope. Bar 0.2 μm . b) Vertical section through the nuclear envelope with outer membrane (äKM), inner membrane (iKM), cytoplasm (Z), and nucleoplasm (K). Arrowheads point to the central amorphous structure of the pore complex. Bar 0.2 μm . c) Computer-based reconstruction of a *Xenopus* egg nuclear pore complex with cytoplasmic filaments (ZF), nuclear filaments (NF) and peripheral ring structure (RS). In the middle of the nuclear pore complex is the so called «transporter» (TR). Bar 0.1 μm (Model by courtesy of Ueli Aebi, Biocenter University Basel).

plasma eingebettet sind. 3. Die sexuelle Verschmelzung eines Spermiums mit einer Eizelle führt zur Vereinigung beider

Genome und zu einem neuen Individuum. 4. Genetisches Material kann von einer Zelle in eine andere Zelle der gleichen Art übertragen werden, wobei Viren als mobile genetische Träger eingesetzt werden.

2 WAS SIND VIREN?

Im Gegensatz zu den Zellen sind Viren unbelebte Natur. Sie reagieren nur passiv auf veränderte Umweltbedingungen. Wie die Zellen bestehen auch Viren aus Nukleinsäure (als genetische Information), Protein, Zucker und oft Lipid. Im Gegensatz zu den Zellen enthalten Viruspartikel jedoch nur entweder DNA oder RNA, nie beides (FIELDS et al., 1996). Entsprechend der vorhandenen genetischen Information können daher DNA- und RNA-Viren unterschieden werden, wobei die DNA bzw. RNA in verschiedenen Virustypen zudem entweder in Einzelstrangform (Einzelhelix) bzw. Doppelstrangform (Doppelhelix) vorliegt. Bei der doppelsträngigen DNA winden sich zwei rechtshändige helikale Ketten phosphodiesterverknüpfter Desoxyribosemoleküle um eine zentrale Achse. Die beiden Ketten sind durch zwei Typen von Purinbasen (Abk. A, G) und zwei Typen von Pyrimidinbasen (T, C) zusammengehalten. Ein Purin oder Pyrimidin der einen Kette paart sich stets mit einem bestimmten Pyrimidin bzw. Purin der andern Kette (A mit T, G mit C). Die Sequenz der einen Kette bestimmt so zwangsläufig die Sequenz der andern Kette. Darauf gründet der universelle Kopiermechanismus des genetischen Materials. Bei der RNA ist die Desoxyribose durch Ribose und T durch U ersetzt. Im Vergleich zu den Zellen ist der Wassergehalt von Viren viel geringer. Dafür ist ihr Protein- und Nukleinsäureanteil höher. Ein typisches Virus ist etwa 1000 mal leichter als eine bakterielle Zelle und etwa eine Million mal leichter als eine eukaryotische Plasmazelle, die etwa 400 Picogramm wiegt ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$).

Viren sind für ihre Vermehrung auf lebende Zellen angewiesen, aber nicht für ihre nackte Existenz als Viruspartikel oder Virion. Sie sind naturgemäss Parasiten, weil sie Energie und andere Faktoren von ihrem Wirt beziehen und dessen Stoffwechselapparat benutzen müssen. Im Gegensatz zu zellulären Parasiten wie z. B. gewissen Bakterien verlieren Viren nach dem Eintritt in die Wirtszelle ihre Individualität – sie verschwinden und erscheinen erst nach einer Replikationsphase wieder als individuelles Partikel. Während dieses Prozesses kann die Wirtszelle zerstört werden.

Wie bei allen Parasiten kommt es im Verlaufe der Koevolution mit dem Wirt zu gegenseitiger Anpassung, so dass der Wirt möglichst geringen Schaden davonträgt. Die erfolg-

reichsten Viren schädigen ihren Wirt nicht offensichtlich; sie vermehren sich mehr oder weniger unbemerkt. Extreme pathologische Situationen kommen oft zustande, wenn ein Virus seinen Wirt wechselt und sich im neuen, nicht adaptierten Wirt behaupten muss (MORSE, 1993). Das Ebola Virus, das für den Menschen wohl gefährlichste Virus, vermehrt sich in einem natürlichen Wirt des afrikanischen Dschungels – vielleicht Fledermäusen oder bestimmten Affen –, ohne diesen Tieren offensichtlichen Schaden zuzufügen (FELDANN et al., 1996; LE GUENNO et al., 1995). Gelangt das Virus jedoch in einen nicht angepassten Wirt wie den Menschen, führt dies in 80% der Fälle zum unmittelbaren Tod. Zu den am besten an den Wirt angepassten Viren gehören beim Menschen die Retroviren³, die Herpesviren³ und die Adenoviren³, von denen die letzteren uns im folgenden besonders beschäftigt werden.

3 VIREN SIND ERFOLGREICHE GENTRANSFERSYSTEME

Viren sind erfolgreich, weil sie ihre Gene mit hoher Effizienz von einer Zelle in die andere übertragen können; sie sind die trojanischen Pferde der Biologie. Durch «List» gelangen sie praktisch unbemerkt hinter die Schutzmauern der Zelle und können dort ihre oft subtilen Waffen ungehindert zur Wirkung bringen. Wenn es gelingt, ein fremdes Gen in das Genom eines Virus einzubauen, besteht eine gute Chance, dieses Gen mit dem Virus in eine Zelle zu transferieren und in deren Genom zu integrieren.

Ein erfolgreiches Gentransfer-System muss mindestens sieben Kriterien erfüllen. Die zu übertragende DNA muss kondensiert und kompakt sein; sie darf nicht offen vorliegen, sonst würde sie sich in den Zellstrukturen verfangen. Das System muss an die Zielzelle binden – im Falle des Adenovirus an Epithelzellen der Lunge – und ins Zellplasma eindringen können. Das Genom muss durch das Zellplasma zum Kern transportiert werden und dort durch den Kernporenkomplex in den Zellkern eindringen. Das transferierte Erbgut

sollte stabil wie die zelleigenen Gene deponiert werden und während der gesamten Lebensdauer der Zelle das gewünschte Protein produzieren.

Stellt man nun genetisch inaktivierte Viren her, deren Äusseres sich nicht von normalen Wildtypviren unterscheidet, so besitzt man effiziente Werkzeuge, um ins Innerste der Zelle vorzustossen. Inaktivierte Adenoviren werden in der molekularen Medizin bereits als Überträger gesunder genetischer Elemente in kranke Wirtszellen eingesetzt (HARRIS & LEMOINE, 1996). Das Paradebeispiel für den Einsatz rekombinanter Adenoviren ist die Mukoviszidose oder cystische Fibrose, eine monogenetisch vererbte Erkrankung vornehmlich der Atemwege (CRYSTAL, 1996; SHEPPARD et al., 1993; WELSH & SMITH, 1993). Da konventionelle Therapien wenig Erfolg haben, sterben Patienten mit dieser Krankheit sehr jung an den Folgen von Sekundärinfektionen ihrer stark verschleimten Atemwege. Mittels Gentherapie erhoffen sich die behandelnden Ärzte eine grundlegende Heilung dieser tödlichen Krankheit.

4 ZELLBIOLOGIE EINES VIRUS

4.1 Bau und Vermehrungszyklus des Adenovirus

Adenoviren enthalten einen «Kern» (Core) aus doppelsträngiger DNA und Proteinen, welcher von einem ikosaedrischen Proteinmantel (20flächiges Capsid aus meist sechseckigen Capsomeren oder Hexonen) von 70–90 nm Durchmesser umgeben ist, wobei jeweils 5 Hexone die 12 Seckigen Pentonbasen auf den 12 Ikosaederecken umgeben. In jeder Pentonbase ist ein antennenartiger Fortsatz (Spike) verankert, bestehend aus einer langen Faser (*fiber*) mit Endköpfchen (s. Abb. 3, und SHENK, 1996). Hierarchisch angelegte Interaktionen zwischen den Proteinmolekülen bewirken, dass das Capsid eine äusserst kompakte Hülle darstellt, die ausserhalb der Wirtszelle vielen chemischen und mechanischen Kräften widersteht und das darin verpackte Genom schützt. Core und Capsid bilden zusammen die infektiöse Einheit, das Viruspartikel oder Virion.

³ *Retroviren* (Fam. Retroviridae) sind Viren mit einsträngiger RNS als genetischem Material und dem Enzym *reverse Transkriptase*, mit dessen Hilfe die Virus-RNS in der Wirtszelle in DNS übersetzt und dann in das Wirtsgenom eingebaut wird. Zu ihnen gehören verschiedene Tumoviren und die langsame Virusinfektionen erzeugenden Lentiviren, zu denen auch die HIV gerechnet werden.

Herpesviren (Fam. Herpesviridae) sind Viren mit einem «Kern» (Core) aus doppelsträngiger DNS, umgeben von einem Proteinmantel (Capsid mit Tegument) und einer Lipoproteinhülle (Ø 120–200 nm); sie beschränken sich auf ektodermale Gewebe. Bekannte Beispiele sind die Viren, die Fieberbläschen und Windpocken erzeugen.

Adenoviren (Fam. Adenoviridae) sind Viren, deren «Kern» ebenfalls doppelsträngige DNS enthält; ihr Bau wird weiter unten im Text beschrieben. Es handelt sich um eine Art Grippeviren, die grippale (d. h. grippeähnliche) Infekte der Luftwege, seltener auch des Magen-Darm-Trakts u. a. Organe bewirken. Sie sind nicht mit den eigentlichen Grippe- oder Influenzaviren (Fam. Orthomyxoviridae) verwandt, deren «Kern» aus mehreren Einzelstrang-RNS-Segmenten besteht, die von einer helikalen Proteinhülle und einer sphärischen Lipoproteinhülle umgeben sind.

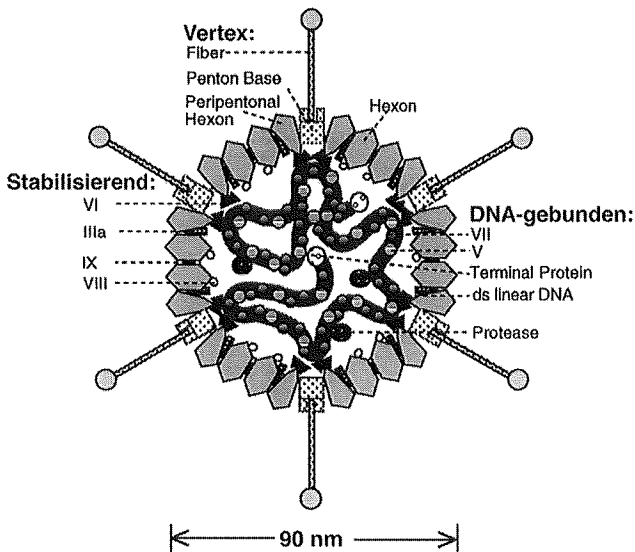


Abb. 3. Schematische Darstellung eines Adenovirus Typ 2. Das Virus hat einen Durchmesser von 90 nm und besteht aus mindestens 11 verschiedenen Proteinen. An den 12 Ecken des Icosaeders befinden sich fünfeckige Pentonbasen, umgeben von je fünf sechseckigen Hexonen aus Hexonprotein. In jeder Pentonbase ist ein Fortsatz verankert, der aus einem langen Filament (*fiber*) und dem terminalen Köpfchen besteht. Hexon ist das häufigste Protein der Virushülle (Capsid); es wird stabilisiert durch die Proteine IIIa, VI, VIII und IX. Assoziiert mit dem viralen Genom sind die Proteine V und VII, das terminale Protein sowie eine Protease.

Fig. 3. Schematic view of adenovirus type 2. The capsid has a diameter of 90 nm and consists of at least 11 different proteins. The 12 corners of the icosahedron bear 12 vertices, each comprising a fiber with terminal globule, anchored in a penton base. The latter is surrounded by the peripentonal hexons. The main capsid protein hexon is stabilized by proteins IIIa, VI, VIII and IX. Proteins VII and V, terminal protein and protease are associated with the viral genome.

Zur Replikation muss das Virus in eine geeignete Zelle eintreten und sein Genom in den Zellkern bringen. Um die Gene zu aktivieren, muss zuvor die Virushülle zerstört werden. Dann muss das Virusgenom die Wirtszelle so programmieren, dass sie Viruskomponenten produziert. Dazu wird einerseits die Virus-DNS repliziert und andererseits in komplementäre Boten-RNS übersetzt, die ihrerseits zur Synthese von Virusproteinen führt. Unter günstigen Bedingungen können sie, zusammen mit viralen Genomen, neue Viruspartikel formen. Solche werden aus der Zelle ausgeschieden und infizieren weitere Zellen (Abb. 4).

4.2 Das Aufbau-Zerfall-Paradoxon

Es stellt sich somit die Frage, wie es denn möglich sei, dass ein Virus in einer infizierten Zelle als stabiles Virion mit

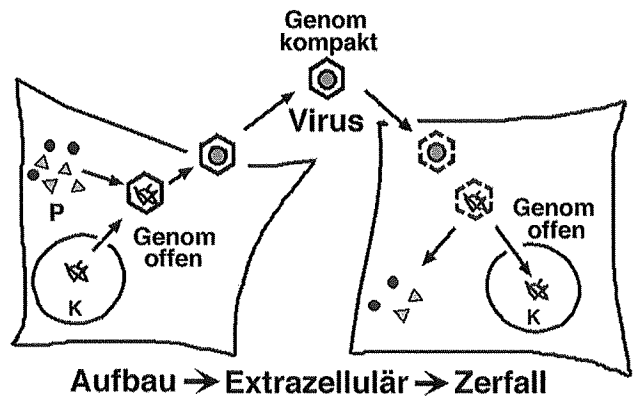


Abb. 4. Das Aufbau-Zerfall-Paradoxon. Wie kann ein Virus in einer infizierten Zelle zu einem stabilen Partikel zusammengebaut werden (links) und Momente später nach der Passage durch extrazelluläres Medium in einer neu infizierten Zelle zerfallen (rechts)?

Fig. 4. The assembly-disassembly paradox. How can a virus be built together in an infected cell (left side) and moments later after passage through the extracellular medium fall apart in a newly infected cell (right side)?

kondensiertem Genom zusammengesetzt und ins extrazelluläre Medium ausgeschieden wird, um kurze Zeit später, wenn es in eine nichtinfizierte Zielzelle gelangt, zu desintegrieren und sein Genom zur Replikation und Transkription zu decondensieren (Abb. 4). Drei prinzipielle Antworten sind möglich: (1) Das aus der infizierten Zelle freigesetzte Virus ist anders aufgebaut als das in die Zielzelle eintretende Virus. (2) Die infizierte Zelle besitzt andere Komponenten als die Zielzelle. (3) Das austretende Virus kommt mit andern zellulären Molekülen in Kontakt als das eintretende Virus.

4.3 Zelleintritt des Adenovirus

Um diese paradoxe Situation zu begreifen, untersuchen wir die Mechanismen, die es dem Adenovirus erlauben, in eine Zielzelle einzutreten, zu zerfallen und sein Genom in den Zellkern zu importieren. Ein Adenovirus ist, verglichen mit einer Zelle, sehr klein, etwa so gross wie ein Fussball im Vergleich zum Spielfeld. Doch damit der Fussball ins Tor gelangt, braucht es die Unterstützung durch die Spieler. Genau so verhält es sich mit dem Adenovirus. Es ist auf die aktive Hilfe zellulärer Mechanismen angewiesen, um den Weg in den Zellkern (Abb. 1) zu finden.

Der erste Kontakt des Adenovirus mit der Zielzelle erfolgt zufällig, durch die Vertices auf der Virusoberfläche (Abb. 5). Dieser Kontakt allein genügt jedoch nicht, um dem Virus eine Zellpforte zu öffnen. Ein zweites Capsidprotein, die Pentonbase, macht einen weiteren Kontakt mit Integrinmolekülen

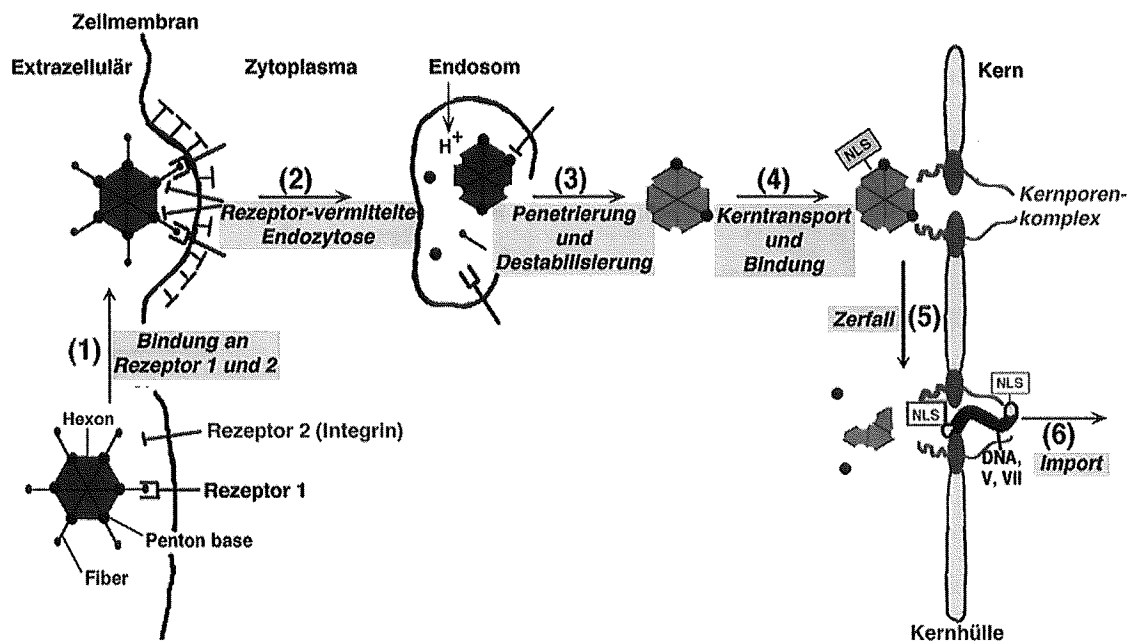


Abb. 5. Schematische Darstellung des Adenovirus-Eintritts in eine Epithelzelle. 1) Virus bindet mit hoher Affinität an einen noch unbekanntem Rezeptor 1 sowie an den Rezeptor 2, ein Integrin des Typs $\alpha_v\beta_5$. 2) Integrin-vermittelte Endozytose internalisiert Virus. 3) Leicht saurer pH (um pH 6) ermöglicht Virus Durchbruch ins Zellplasma. 4) Mikrotubuli- und Kernlokalisationssequenz (NLS) abhängiger Virus-Transport zum Zellkern mit Virus-Bindung an zytosolische Filamente des Kernporenkomplexes. 5) Viruszerfall und 6) Import des viralen Erbguts sowie Protein VII und eines geringen Teils von Hexon in den Kern.

Fig. 5. Schematics of adenovirus entry into an epithelial cell. 1) Virus attaches with high affinity to an unknown fiber receptor and to $\alpha_v\beta_5$ integrin (Receptor 2). 2) Virus is internalized by integrin-mediated endocytosis. 3) Slightly acidic endosomal pH (approximately pH 6) facilitates virus penetration through the endosomal membrane into the cytoplasm. 4) Microtubule- and nuclear localization sequence (NLS) dependent transport of virus attaches the particle to the cytoplasmic filaments of nuclear pore complexes. 5) Virus disassembles and 6) viral DNA, protein VII and a small fraction of hexon are imported into the nucleus.

auf der Zelloberfläche (WICKHAM et al., 1993). Dieser Kontakt signalisiert der Zelle, den Virus-Integrin-Komplex aufzunehmen.

Wir finden Viruspartikel alsbald in rauhen endozytotischen⁴ Vesikeln und in endosomalen Vesikeln, erkennbar in elektronenmikroskopischen Aufnahmen menschlicher Epithelzellen (GREBER et al., 1993). Die Virusendozytose erfolgt innerhalb einiger Minuten mit einer Effizienz von mindestens 80%, wie wir in biochemischen Tests gemessen haben. Als nächstes muss das Virus aus den Endosomen ins Zellplasma ausbrechen. Dieser Schritt wird durch das leicht saure Milieu der frühen Endosomen stimuliert und läuft, wie die Endozytose, fast quantitativ ab. Jedes Endosom, das während der ersten 15 min der Virusaufnahme von der Zellmembran gebildet wird, wird unter bestimmten Bedingungen von einem Adenovirus durchlöchert.

Viruspenetration ins Zellplasma genügt aber noch nicht, um die Zelle zu infizieren. Das Virus muss den Weg zum Zellkern finden. Dort bindet es mit grosser Genauigkeit, das heisst mit einer Effizienz von mehr als 80%, an die Kernporenkomplexe (GREBER et al., 1996). Der Transport eines Partikels von der Grösse eines Adenovirus (\varnothing etwa 90 nm) durch das Zellplasma kann aus sterischen Gründen nicht durch reine Diffusion erfolgen, sondern benötigt wahrscheinlich einen energieabhängigen gerichteten Mechanismus. Studien aus andern Laboratorien haben gezeigt, dass Kügelchen von mehr als 50 nm \varnothing , z. B. synthetische Ficollpartikel, nach mechanischer Injektion ins Zellplasma keine Mobilität besitzen und am Ort der Injektion bleiben (s. LUBY-PHELPS, 1994). Hingegen können kleinere Ficollkügelchen in einer min eine Fläche von beispielsweise 18 x 18 μm belegen, wären also innerhalb weniger min über die ganze Zelle

⁴ Bei der Endozytose werden extrazelluläre Stoffe und Partikel von der Plasmamembran umhüllt und als Vesikeln in das Zytoplasma abgesondert (endosomale Vesikeln). Anfänglich zeichnen sie sich durch eine wabige Oberflächenstruktur aus dem Strukturprotein Clathrin aus; sie werden dann rauhe Endosomen (coated vesicles) genannt.

verteilt. Aus diesen Resultaten folgt, dass das Adenovirus ohne Hilfe hoffnungslos im Zellplasma steckenbliebe. Wie sieht nun aber diese zelluläre Hilfe aus?

4.4 Intrazellulärer Transport

Grosse zelluläre Partikel wie Vesikeln, Mitochondrien oder gar Zellkerne, können prinzipiell durch drei Mechanismen im Zellplasma verschoben werden (LODISH et al., 1995). Alle drei Mechanismen benötigen das Zytoskelett. Das erste System, die Mikrotubuli, transportiert Vesikeln oder auch bestimmte Viren in beide Richtungen, zum Kern oder vom Kern weg zur Zellperipherie. Mikrotubuli-abhängige Bewegung ist langsam, in der Grössenordnung von $\mu\text{m}/\text{min}$ und wird von bestimmten Motorproteinen erzeugt (VALLEE & SHEETZ, 1996). Das zweite System, das Aktinzytoskelett, kann durch gerichtete Polymerisierung am Plus-Ende die Bewegung etwa von Vacciniaviren im Zellplasma bewirken (CUDMORE et al., 1995). Das dritte System, bestehend aus intermediären Filamenten, hat weder Polarität noch Eigendynamik, kann jedoch langsam an den Mikrotubuli entlanggleiten. Dieses System könnte für die Eigenmotilität bestimmter einfacher Zellen von Bedeutung sein (BRAY, 1992).

Wird die intrazelluläre Lokalisierung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Adenoviren im Zellplasma lebender Zellen mittels einer hochempfindlichen Videokamera im Fluoreszenzmikroskop verfolgt, kann festgestellt werden, dass sich die Viren mit einer Geschwindigkeit von rund $0,8 \mu\text{m}/\text{min}$ kernwärts bewegen (R. STIDWILL & U. GREBER, in Vorbereitung).

Es wäre also möglich, dass sich die Adenoviren entlang der Mikrotubuli bewegen. Falls diese Hypothese zuträfe, müssten wir Viren in der Nähe der Mikrotubuli beobachten können. Dies trifft in der Tat zu (Abb. 6). Wir haben lebende HeLa-Zellen mit fluoreszierendem Virus infiziert, dann nach 30 min Zellen und Viren chemisch fixiert und die Mikrotubuli durch einen spezifischen, anders fluoreszierenden Antikörper markiert. Fluoreszenzpunkte (Adenoviren) dunkel dargestellt in HeLa-Zellen oder PtK₂-Zellen⁵ liegen in der Nähe von grau erscheinenden Mikrotubuli (Pfeile). Dieses Resultat können wir mit Hilfe des hochauflösenden Elektronenmikroskops bestätigen (K. BOUCKE & U. GREBER, in Vorbereitung).

Doch sind intakte Mikrotubuli für den Transport des Virus zum Zellkern notwendig? Diese Frage können wir mit Hilfe von spezifischen Inhibitorsubstanzen angehen. So bewirkt

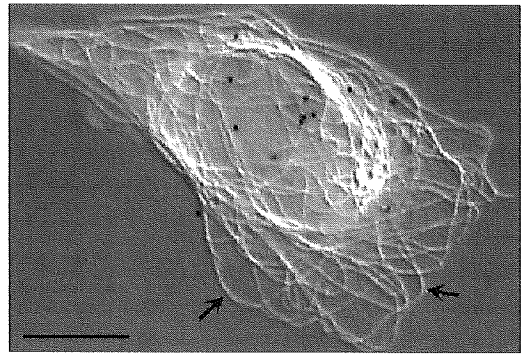


Abb. 6. Schattenverstärkte Immunfluoreszenzaufnahme von Mikrotubuli einer PtK₂-Zelle (Pfeile) mit fluoreszierend markierten Adenoviren (als dunkle Punkte sichtbar) 30 min nach der Virusinfektion. Balken $10 \mu\text{m}$ (Bild R. Stidwill; Antikörper Prof. T. Kreis, Genf).

Fig. 6. Shadow-enhanced immunofluorescence micrograph of microtubules in a PtK₂ cell (arrows) containing fluorescently labeled adenovirus (dark dots) 30 min post infection. Bar $10 \mu\text{m}$ (Picture R. Stidwill; Antibodies from Prof. T. Kreis, Geneva).

z. B. Nocodazol die sofortige Depolymerisierung der Mikrotubuli und legt dieses Transportsystem komplett lahm (WILSON & JORDAN, 1994). Wir verwenden wiederum mit Fluoreszenzstoff markiertes Adenovirus und beobachten, wann sich das Virus an der Kernhülle einfindet (U. GREBER & M. SUOMALAINEN, in Vorbereitung). Rund 60 min nach dem Viruseintritt ohne Nocodazol sind die meisten Viren an der Kernmembran, und die Mikrotubuli sind intakt. Werden die Mikrotubuli zerstört, ist das Virus nach 60 min immer noch im Zellplasma und nicht an der Kernmembran. Ähnliche Beobachtungen werden nach 30 und 120 min gemacht. Dass Nocodazol nicht einfach die Zelle abtötet, zeigt sich darin, dass nach Entfernung der Droge die Mikrotubuli wieder erscheinen und das Virus nun an die Kernmembran vorrücken kann.

4.5 Zerfall und Kernimport des Virus

Das Vorrücken des Virus an die Kernmembran genügt nicht für den Eintritt des Virus in den Kern selbst. Das Virus muss zerfallen, um sein Genom in den Kern einzuschleusen, denn das Virion selbst ist zu gross, um direkt durch die Kernpore in den Kern zu gelangen (GREBER & KASAMATSU, 1996). Der Inhalt des Virus, die DNS zusammen mit assoziierten Proteinen wie z. B. Protein VII, muss sich von der Virushülle aus Hexonprotein trennen. Genau diese Beobachtung können wir in lebenden Zellen machen (Abb. 7). Etwa 150 min nach dem

⁵ PtK₂-Zellen stammen aus Nierengewebe des Ratten-Känguruhs.

Viruseintritt in die Zelle befindet sich Protein VII im Kern, während das Hexonprotein fast quantitativ im Zellplasma vorliegt.

Wenn der Viruszerfall im Zellplasma verhindert wird, sei es durch chemische Modifizierung des Virus oder durch Inhibitoren des Kernporenkomplexes, werden Kernimport und Infektion vermindert (GREBER et al., 1996). Protein VII von chemisch inaktivierten Viren ist nicht im Kern erkennbar, da die Virionen noch intakt sind, im Gegensatz zum natürlichen Virus, dessen Protein VII sich im Kerninnern befindet. Wenn nun Kalzium, eine der Hauptkomponenten des Innern der Kernhülle, aus dieser entfernt wird, werden die Kernporenkomplexe inaktiviert und der Import von Proteinen in den Kern gehemmt (GREBER & GERACE, 1995). Der Gruppe von David Clapham in den USA gelang es in der Zwischenzeit zu zeigen, dass sich in der Abwesenheit von Kalzium in der Kernhülle, zum Beispiel in mit Inositol-3-Phosphat behandelten Kernhüllen von Krallenfroscheiern, die Kernporenkomplexe in der Mitte verdichten und undurchlässig werden (PEREZ-TERZIC et al., 1996).

Wird 30 min nach der Infektion einer HeLa-Zelle mit Adenoviren das Kalzium durch den Ionophor Ionomycin aus der Kernhülle entfernt, so gelangt das Protein VII nicht in den Kern, ganz im Gegensatz zu den Kontrollen, die unter normalen Kalziumbedingungen gehalten werden (GREBER et al., zur Publ. eingereicht). Dies bedeutet, dass, obwohl die Virus-hüllen nach 30 min zerfallen und virale Genome freigesetzt

werden (wie die Kontrollen zeigen), diese Genome ohne Kalzium nicht in den Kern transportiert werden können.

Werden nun spezifische Inhibitoren des Kernimports wie Weizenkeim-Agglutinin (WGA) oder Antikörper RL1 in lebende Zellen mikro-injiziert und diese Zellen mit Adenoviren infiziert, finden wir – im Gegensatz zum Kalziumexperiment –, dass das Virion nicht zerfällt. Die injizierten Zellen zeigen nur eine geringe Hexon-Fluoreszenz, während nicht injizierte Kontrollzellen eine starke Hexonfluoreszenz aufweisen (GREBER et al., zur Publ. eingereicht). Injektion eines Kontrollantikörpers erlaubt ungehinderten Viruszerfall. In ähnlichen Experimenten hemmen WGA und RL1 den Kernimport von Protein VII. Diese Resultate unterstreichen die zentrale Rolle des Kernporenkomplexes beim Import des DNS-assoziierten Proteins VII.

5 REKAPITULATION

Ein in die Zelle eintretendes Adenovirus erhält von der Zelle verschiedene Signale. Diese Signale ermöglichen es dem Virus, zelluläre Barrieren zu überwinden und sein Zerfallsprogramm einzuleiten (Abb. 8). Integrine der Zelloberfläche signalisieren durch ihre RGD-Sequenzen die Entfernung der Fiberproteine sowie die Endozytose und aktivieren, zusammen mit reduzierendem Milieu im Zellplasma, eine im Virus enthaltene Protease. Die Aktivität dieser Protease verdaut ein internes Virusprotein, Protein VI, und bereitet das Virus für den späteren Zerfall an der Kernhülle vor. Wird die Protease durch Behandlung des Virus mit Dithiothreitol (DTT) und N-Ethylmaleimide (NEM) gehemmt, so kann das Virus nicht zerfallen. Das Virus durchbricht die endosomale Membran mit Hilfe des sauren pH-Wertes, der zum Beispiel durch den Ionophor Monensin neutralisierbar ist. Das Virus gelangt mit Hilfe der Mikrotubuli zur Kernhülle. Der Kernporenkomplex bindet das andockende Virus und bewirkt wahrscheinlich den Viruszerfall. Kalzium (Ca) in den Kernhüllenmembranen, zusammen mit anderen noch nicht charakterisierten Faktoren, sorgt dann dafür, dass die virale DNS in den Kern eintritt und die Replikation des Virus beginnen kann. Durch die Identifizierung von Signalen, die das eintretende Adenovirus von der Zelle erhält, können wir die in Abb. 3 geschilderte paradoxe Situation des Virus-Aufbaus und -Zerfalls erklären. Ein Virus kann in einer infizierten Zelle nur als stabiles Virion vorliegen und in das extrazelluläre Medium ausgeschieden werden, wenn es keine zellulären Signale für seinen Zerfall erhält.

Die Identifizierung weiterer zellulärer Faktoren und deren Zusammenspiel mit eintretenden Viren verspricht uns auch

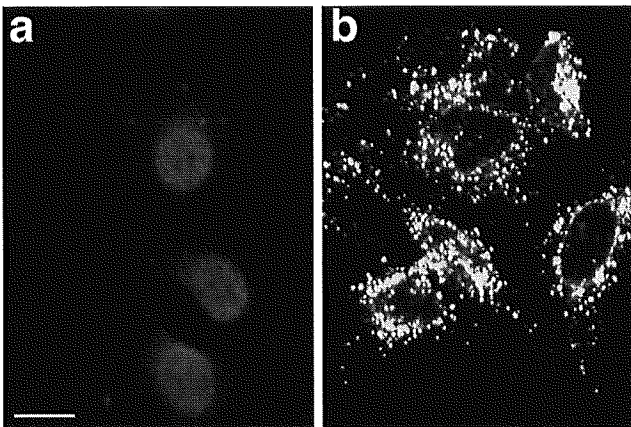


Abb. 7. Indirekte Immunofluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen 150 min nach der Infektion mit Adenoviren. a) Markierung von eintretenden Viren mit Anti-Protein VII Antikörpern und b) Markierung mit Anti-Hexon Antikörpern. Balken 10 μm (Experimentelle Details s. GREBER et al., 1996).

Fig. 7. Indirect immunofluorescence microscopy of HeLa cells infected with adenovirus for 150 min. a) Anti-protein VII labeling and b) anti-hexon labeling. Bar 10 μm (For experimental details see GREBER et al., 1996).

Fiber Verlust Abbau von VI Durchbruch Zerfall

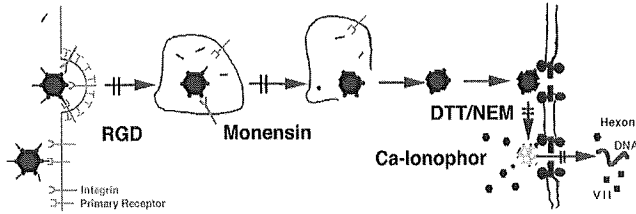


Abb. 8. Inhibitoren des Adenovirus-Eintritts in Epithelzellen. RGD Peptide (Aminosäuresequenz Arginin-Glyzin-Aspartat) hemmen Virus-Endozytose. Monensin hemmt die Ansäuerung der Endosomen und vermindert den Virusdurchbruch ins Zellplasma. Hemmung der Virus-Protease durch Behandlung des Virus mit Dithiothreitol (DTT) und N-Ethylmaleimide (NEM) verhindert den Viruszerfall. Reduktion des Kalziumgehalts in der Kernhülle, zum Beispiel durch den Ionophoren Ionomycin, schliesst die Kernporen und verhindert den Eintritt des viralen Genoms und des Proteins VII sowie des Hexons in den Kern.

Fig. 8. *Inhibitors of adenovirus entry into epithelial cells. RGD peptides (amino acid sequence arginine-glycine-aspartate) block virus endocytosis. The carboxylic ionophore monensin prevents endosomal acidification and reduces virus penetration into the cytoplasm. Inhibitors of virus-associated protease, such as dithiothreitol (DTT) and N-ethylmaleimide (NEM), block virus disassembly. Calcium depletion of the nuclear envelope, e.g. by treating cells with the calcium ionophore ionomycin, closes nuclear pore complexes and inhibits nuclear import of the viral genome, protein VII, and hexon protein.*

in Zukunft neue Erkenntnisse über grundlegende Mechanismen zellulärer Funktionen. Detaillierte Kenntnis der Zellbiologie von Viren ist nicht nur für die Gentransfertechnologie unerlässlich, sondern auch grundlegend zur Bekämpfung stets neu auftretender und bereits bestehender infektiöser Krankheiten.

6 DANK

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Robert Stidwill und Grazia Barenco für Fluoreszenz- und Videomikroskopie, bei Dr. Maarit Suomalainen und Stephan Keller für Reagentien und Karin Boucke für Elektronenmikroskopie sowie Robert Stidwill für Kommentare zu diesem Manuskript. Dank geht auch an Prof. Roger Burnett für Abb. 1c und Prof. Ueli Aebi für Abb. 2c. Das Projekt wird vom Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 31-43 412.95) und vom Kanton Zürich unterstützt.

7 LITERATUR

BRAY, D. 1992. Cell movements. – Garland Publ. Co., New York, 406 pp.

CRYSTAL, R.G. 1996. Hot papers – gene therapy – administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. – *Scientist* 10, 13.

CUDMORE, S., COSSART, P., GRIFFITHS, G. & WAY, M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. – *Nature* 378, 636–638.

DAVIS, L.I. 1995. The nuclear pore complex. – *Annu. Rev. Biochem.* 64, 865–896.

FELDMANN, H., SLENCZKA, W. & KLENK, H.D. 1996. Emerging and reemerging of filoviruses. – *Arch. Virol. Suppl.* 11, 77–100.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M. 1996. *Fundamental Virology*. – Lippincott-Raven, New York, 1340 pp.

GREBER, U.F. & GERACE, L. 1995. Depletion of calcium from the lumen of the endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. – *J. Cell Biol.* 128, 5–14.

GREBER, U.F. & KASAMATSU, H. 1996. Nuclear targeting of adenovirus and simian virus SV40. – *Trends Cell Biol.* 6, 189–195.

GREBER, U.F., WEBSTER, P., WEBER, J. & HELENIUS, A. 1996. The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. – *EMBO J.* 15, 1766–1777.

GREBER, U.F., WILLETTS, M., WEBSTER, P. & HELENIUS, A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. – *Cell* 75, 477–486.

HARRIS, J.D. & LEMOINE, N.R. 1996. Strategies for targeted gene therapy. – *Trends in Genetics* 12, 400–405.

LE GUENNO, B., FORMENTRY, P., WYERS, M., GOUNON, P., WALKER, F. & BOESCH, C. 1995. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. – *Lancet* 345, 1271–1274.

LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P. & DARNELL, J. 1995. *Molecular cell biology*. – W.H. Freeman & Co., New York, 1344 pp.

LUBY-PHELPS, K. 1994. Physical properties of the cytoplasm. – *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 3–9.

MORSE, S.S. 1993. *Emerging viruses*. – Oxford University Press, New York, 317 pp.

PANTÉ, N. & AEBI, U. 1996. Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. – *Cell Biol.* 8, 397–406.

PEREZ-TERZIC, C., PYLE, J., JACONI, M., STEHNO-BITTEL, L. & CLAPHAM, D.E. 1996. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear calcium stores. – *Science* 273, 1875–1877.

SCHRÖDINGER, E. 1987. *Was ist Leben?* – Piper Verlag, München, 154 pp.

SHENK, T. 1996. Adenoviridae. In «*Fundamental Virology*», B.N. Fields, D.M. Knipe & P.M. Howley (eds.), pp. 979–1016. – Lippincott-Raven, New York, Vol. 3, 1340 pp.

SHEPPARD, D.N., RICH, D.P., OSTEDGAARD, L.S., GREGORY, R.J., SMITH, A.E. & WELSH, M.J. 1993. Mutations in CFTR associated

with mild-disease-form Cl channels with altered pore properties. - *Nature* 362, 160-164.

STEWART, P., BURNETT, R.M., CYRKLAF, M. & FULLER, S.D. 1991. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. - *Cell* 67, 145-154.

VALLEE, R.B. & SHEETZ, M.P. 1996. Targeting of motor proteins. - *Science* 271, 1539-1544.

WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. - *Nature* 171, 737.

WELSH, M.J. & SMITH, A.E. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. - *Cell* 73, 1251-1254.

WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A. & NEMEROW, G.R. 1993. Integrin-alpha-v-beta-3 and integrin-alpha-v-beta-5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. - *Cell* 73, 309-319.

WILSON, L. & JORDAN, M.A. 1994. Pharmacological probes of microtubule function. In: «Microtubules», J.S. HYAMS & C.W. LLOYD (eds.), pp. 59-83. - Wiley-Liss Inc., New York, 439 pp.

Prof. Dr. Urs F. Greber, Zoologisches Institut der Universität, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich