

Dezember 2000
Nr. 58

Der Verein «Forschung für Leben» informiert:

Biomedizinische Forschung

Drei Zürcher Forscher geben einen Einblick in ihre Arbeit

Eine Schaufensteraktion der Zürcher Kantonalbank

PD Dr. med. vet. Max Gassmann, FVH
Prof. Dr. Urs F. Greber
Prof. Dr. Ueli Grossniklaus

Geschäftsstelle: Goldauerstrasse 47, Postfach, 8033 Zürich
Telefon: 01 365 30 93, Telefax: 01 365 30 80, E-Mail: contact@forschung-leben.ch
Bankverbindung: ZKB Wiedikon, Kto. 1115-1277.952

PD Dr. med. vet. Max Gassmann, FVH

Sauerstoffmangel bewirkt Blut- und Gefässneubildung

Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Bluthochdruck, Herzinfarkt, Hirnschlag, Wundverschluss und Tumorwachstum

Seite 3

Dr. Urs F. Greber

Viren, blinde Passagiere der Zellen

Beobachtung des Viruseintritts in Zellen

Seite 9

Impressum

Der Verein «Forschung für Leben», gegründet 1990, bezweckt die Information der Bevölkerung über die Ziele und die Bedeutung der biologisch-medizinischen Forschung. Er bringt den Nutzen, aber auch die Gefahren, die sich aus der Forschung ergeben, einfach und klar zur Sprache und baut durch Aufklärung Ängste und Misstrauen ab.

«Forschung für Leben» besteht aus gegen 200 Mitgliedern und Gönnermitgliedern. Die Einzelmitgliedschaft beträgt jährlich Fr. 50.–, die Gönnermitgliedschaft Fr. 500.–.

Bei Interesse oder für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte die Geschäftsstelle:
Verein «Forschung für Leben»
Postfach, 8033 Zürich
Geschäftsführerin: Dr. Regula Pfister
Tel. 01 365 30 93, Fax 01 365 30 80
E-Mail: contact@forschung-leben.ch
Internet: <http://www.forschung-leben.ch>

Prof. Dr. Ueli Grossniklaus

Sex, Plants and Rock'n Roll:

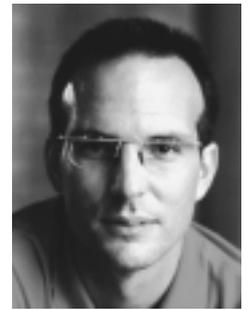
Die genetischen Grundlagen der Fortpflanzungsbiologie bei Pflanzen

Seite 18

Sauerstoffmangel bewirkt Blut- und Gefässneubildung

Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Bluthochdruck, Herzinfarkt, Hirnschlag, Wundverschluss und Tumorwachstum

PD Dr. med. vet. Max Gassmann, FVH *)



___ Forschungsgebiet

Sauerstoffmangel führt zur Neubildung von roten Blutkörperchen

Ohne Sauerstoff können wir nicht leben. Der in der eingeatmeten Luft vorhandene Sauerstoff (20%) ist eine Grundvoraussetzung für die Bereitstellung von Energie in allen Zellen unseres Körpers. Tritt ein Sauerstoffmangelzustand ein, beispielsweise durch das Einatmen sauerstoffarmer Luft im Hochgebirge oder durch unfallbedingten Blutverlust, so ist unser Körper gewappnet: die Nieren produzieren grosse Mengen des blutbildenden Hormons Erythropoietin – besser bekannt als EPO – das ins Blut abgegeben wird. Via Blutbahn gelangt EPO ins Knochenmark, die Produktionsstätte von roten Blutkörperchen, und kurbelt dort die Reifung der roten Blutkörperchen an (*Abbildung 1*). Diese wiederum sind mit rotem Blutfarbstoff (Hämoglobin) gefüllt. Die Funktion des Hämoglobins besteht darin, die eingeatmeten Sauerstoffmoleküle zu binden und via Blutstrom im Körper zu verteilen. Auf diese Weise werden die Zellen im Körper letztlich mit Sauerstoff versorgt.

Dank diesem EPO-gesteuertem Mechanismus wird die Anzahl roter Blutkörperchen im Gesamtblut

*) PD Dr. Max Gassmann
Physiologisches Institut
Universität Zürich-Irchel
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich

Tel. 01 635 50 51
Fax 01 635 68 14
e-mail maxg@physiol.unizh.ch
URL www.unizh.ch/physiol

Nachdruck mit Quellenangabe gestattet.

prozentuell erhöht. In der medizinischen Fachsprache wird dies als Erhöhung des Hämatokrits bezeichnet. Ein gesunder Mensch hat einen Hämatokritwert von ungefähr 45%, ein Ausdauerathlet einen von knapp 50%. Im Höhentraining kann ein Sportler somit kurz vor dem Wettkampf seinen Hämatokritwert (legalerweise!) erhöhen, was zu einer höheren Sauerstofftransportkapazität führt. Leider wird aber häufig zur EPO-Spritze gegriffen, mit der Folge, dass EPO in die negativen Schlagzeilen geraten ist (v.a. Doping im Radsport). In der Klinik aber hat EPO, eines der ersten gentechnologisch hergestellten Medikamente, seinen festen Standplatz eingenommen. Das Hormon wird häufig eingesetzt bei Patienten mit Blutverlust (z.B. Wöchnerinnen nach schwerer Geburt) oder bei Patienten die an schweren Nierenerkrankungen leiden (eigene EPO-Produktion stark vermindert).

Eisentransport, Blutdruck und Gefässneubildung

Weniger bekannt ist die Tatsache, dass EPO nur ein Beispiel aus einer grossen Familie von Faktoren darstellt, die der Körper als Antwort auf Sauerstoffmangelzustände einsetzen kann. Erwähnt sei beispielsweise das Transferrin, ein Eiweiss, das Eisen transportiert. Eisen ist ein wichtiger Bestandteil des roten Blutfarbstoffes und muss daher bei der Produktion von neuen roten Blutkörperchen zur Verfügung gestellt werden. Es macht also Sinn, dass bei Sauerstoffmangel die Eisentransportkapazität, sprich die Transferrinmenge, ebenfalls erhöht ist (*Abbildung 2*).

Ein weiteres Beispiel aus der Familie von Faktoren, die durch den Sauerstoffmangel erhöht werden, ist das sog. Endothelin-1. Dieser Faktor reguliert den Blutdruck indem es die Kontraktion von Blutgefässen bewirkt. So führt ein erhöhter Gehalt an Endo-

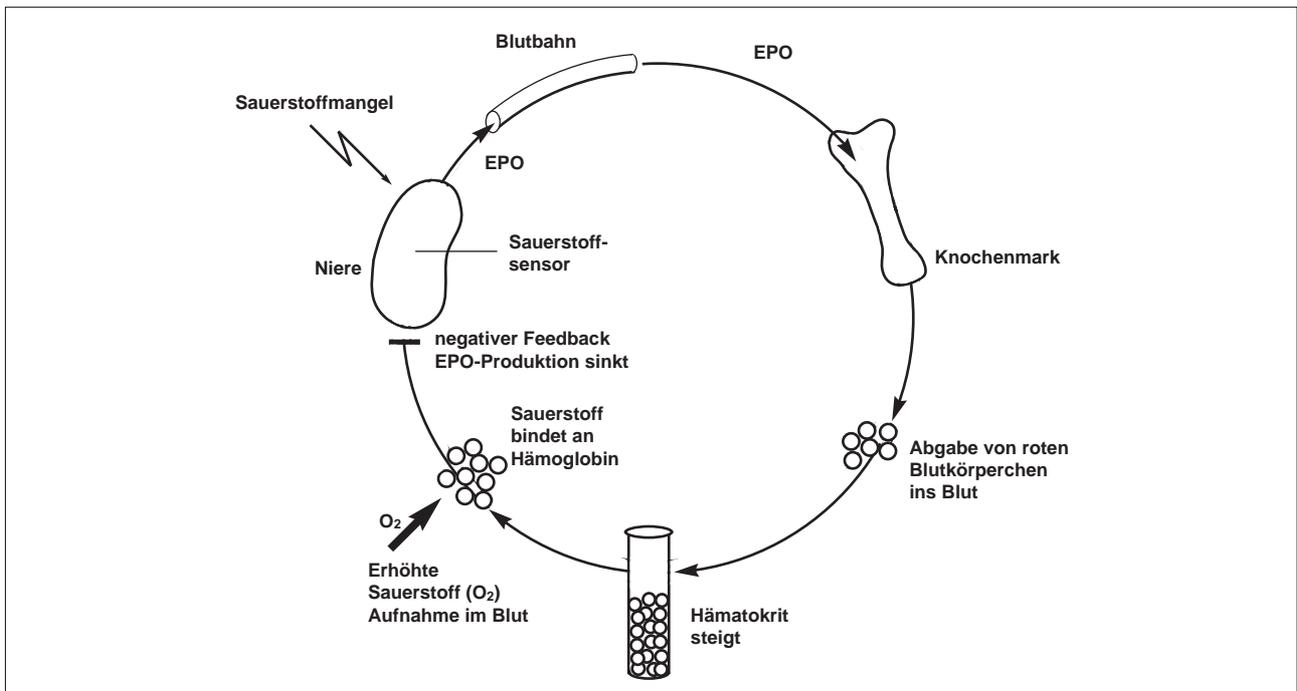


Abbildung 1 Sauerstoffmangel bewirkt eine erhöhte Produktion von EPO. Via Blut gelangt EPO ins Knochenmark, wo vermehrt rote Blutkörperchen produziert und ins Blut abgegeben werden. Somit kann das Blut mehr Sauerstoff aufnehmen. In der Folge sinkt der EPO-Blutspiegel auf Normalwerte zurück.

thelin-1 im Blut zu einem Zusammenziehen der Gefäße, was letztlich zu einer Erhöhung des Blutdruckes führen kann.

Als letztes, aber nichtdestoweniger wichtiges Beispiel, sei der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor erwähnt. Dieser Faktor wird in denjenigen Zellen produziert, welche die Blutgefäße innen auskleiden (sog. Endothelzellen). Unter Sauerstoffmangelbedingungen führt dieser Wachstumsfaktor zur Entstehung von neuen Blutgefäßen. Dies ist

von grösster Bedeutung während des ganzen Lebens, z.B. während der embryonalen Entwicklung (Blutgefäßbildung in entstehenden Organen), bei der Wundheilung (Ersatz der verletzten Blutgefäße) oder, leider, auch beim Wachstum von Tumoren. In der Tat durchläuft ein Tumor während seines Wachstums einen Sauerstoffmangelzustand, der v.a. im Zentrum des Tumors offensichtlich wird (Abbildung 3). Um diesen Sauerstoffmangel auszugleichen werden grosse Mengen des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors von Tumorzellen her-

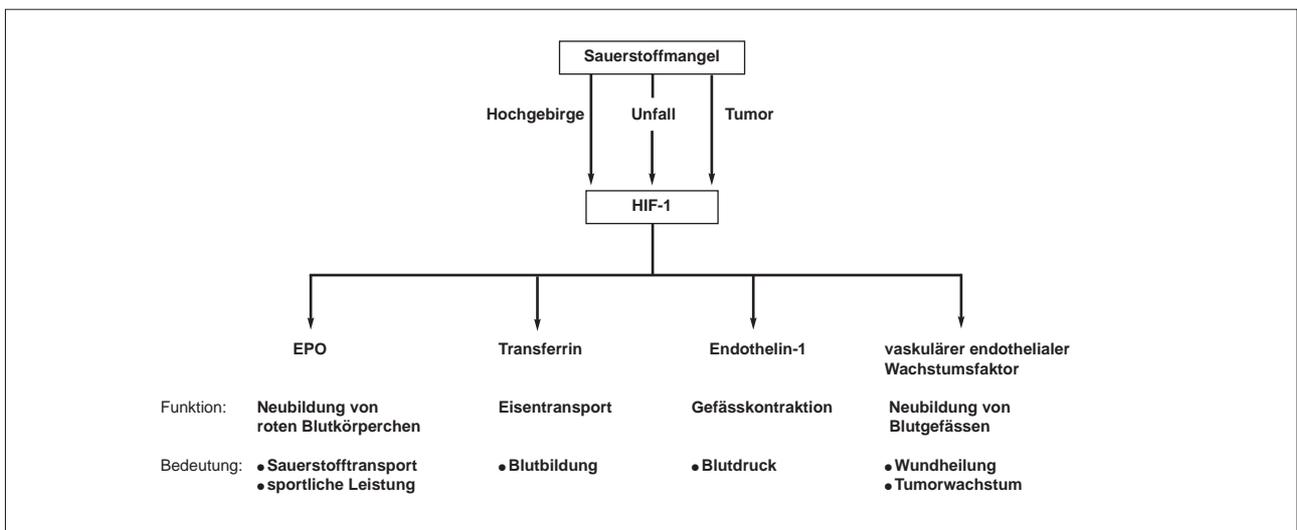


Abbildung 2 Sauerstoffmangel bewirkt einen erhöhten Gehalt an HIF-1, ein Faktor, der die Synthese von EPO, Transferrin, Endothelin-1 und vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor kontrolliert.

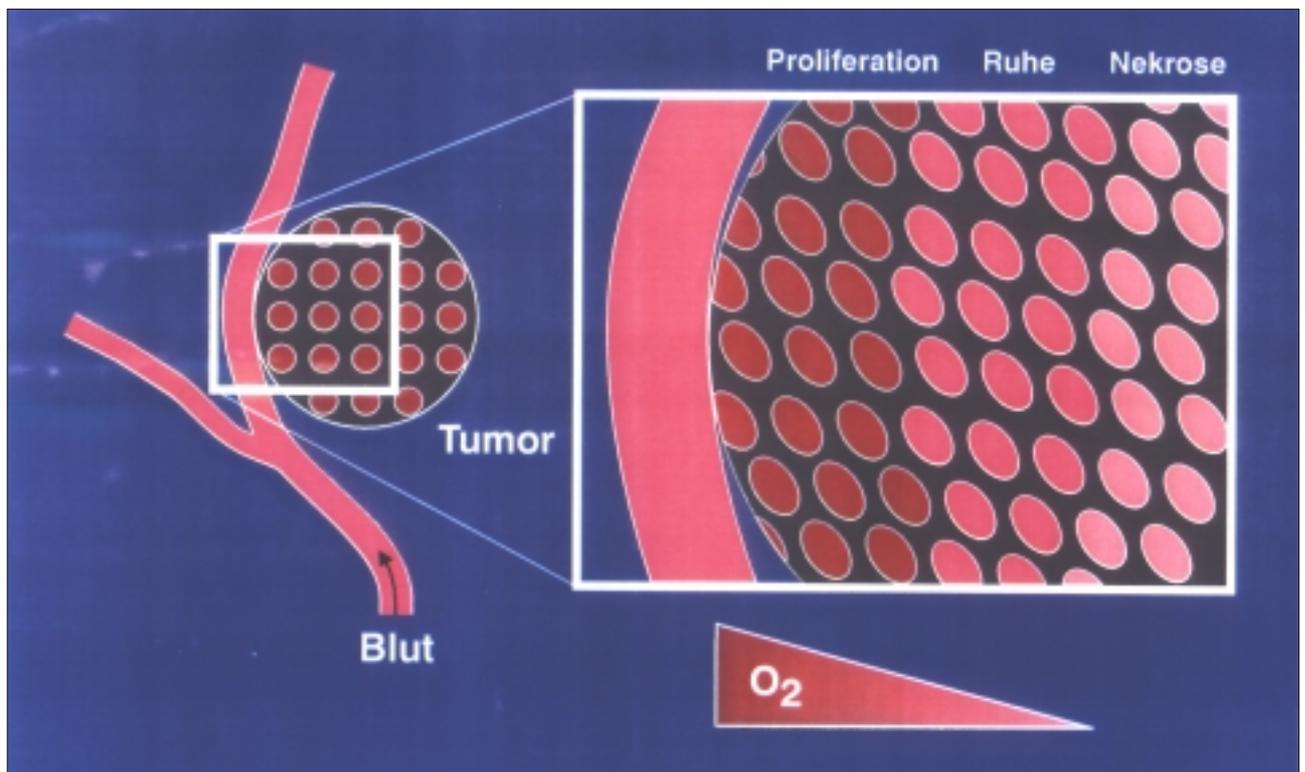


Abbildung 3 Schema der Sauerstoffversorgung in einem soliden Tumor.

gestellt, welches dazu führt, dass Blutgefäße in den Tumor einwachsen und somit die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet. Mit anderen Worten, der Tumor benützt die körpereigene Strategie der Blutgefäßneubildung zwecks Aufrechterhaltung der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr.

HIF-1: Der Dirigent der zellulären Antwort auf Sauerstoffmangel

Wie weiss eine Zelle, dass sie einem Sauerstoffmangel ausgesetzt ist? Alle Zellen unseres Körpers besitzen einen noch unbekanntem Sensor für Sauerstoff, wahrscheinlich auf der Zelloberfläche, der das Signal «Sauerstoffmangel» (Hypoxie) in das Innere der Zelle weiterleitet. In der Zelle wird das Signal von einem Faktor wahrgenommen und an das genetische Informationszentrum, den Zellkern, weitergeleitet. Der Faktor, der das Signal «Sauerstoffmangel» aufnimmt und weiterleitet, heisst HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1). Einmal im Zellkern angelangt, bindet HIF-1 an ganz spezifische Abschnitte der genetischen Information und veranlasst damit die gezielte Ueberproduktion an beispielweise EPO, Transferrin, Endothelin-1 oder vas-

kulären endothelialen Wachstumsfaktor. Oder anders ausgedrückt: HIF-1 ist der Dirigent, der das Zusammenspiel der sauerstoffabhängigen Faktoren dirigiert sobald ein Sauerstoffmangelzustand eintritt.

Zusammen mit anderen Arbeitsgruppen haben wir HIF-1 wissenschaftlich analysiert und festgestellt, dass HIF-1 eine sehr wichtige Rolle im Organismus spielt. So sind Mausföten, die kein HIF-1 besitzen, nicht entwicklungsfähig und kommen nicht zur Welt. Ueberrascht hat uns die Tatsache, dass dieser Faktor bei eintretendem Sauerstoffmangel sofort, d.h. innert Sekunden, den betreffenden Zellen zur Verfügung steht. Normalisiert sich die Sauerstoffzufuhr, verschwindet HIF-1 innerhalb von Minuten wieder. Ganz offensichtlich hat die Natur im Laufe der Evolution einen Mechanismus entwickelt, der eine sofortige Anpassung an verminderte Sauerstoffzufuhr unserer Zellen erlaubt.

Zielsetzung

Wie reagieren unsere Zellen auf Sauerstoffmangel? Obschon einige Zusammenhänge bereits bekannt sind, sind wir noch weit davon entfernt, diese Frage

vollständig beantworten zu können. Wir suchen gegenwärtig nach dem «Sauerstoff-Sensor», analysieren im Detail die Mechanismen der HIF-1-Steuerung und untersuchen dessen Wirkung auf die Familienmitglieder der Sauerstoff-abhängigen Faktoren, insbesondere von EPO. Weiter interessiert uns die Auswirkung eines hohen Gehaltes von EPO im Blut auf den Gesamtorganismus (s. konkretes Beispiel unten). Für unsere Forschung setzen wir sowohl Zellkultur- als auch Mausmodelle ein.

Was bedeutet unsere Grundlagenforschung für den Patienten?

Je besser man die oben genannten Mechanismen kennt, desto gezielter kann ein neuer Therapieansatz formuliert werden:

- Ein Herzinfarkt oder ein Hirnschlag haben zur Folge, dass kleinere oder grössere Regionen der Herzmuskulatur, bzw. des Gehirns für eine bestimmte Zeit ungenügend mit Sauerstoff versorgt wurden. Der Arzt spricht von einer Ischämie. Es wird versucht, bei solchen Patienten die natürliche Reaktion auf Sauerstoffmangel zu intensivieren, in dem man beispielsweise HIF-1 in die geschädigte Region einbringt. Dies könnte z.B. mittels Injektion von gentechnologisch hergestelltem HIF-1 erfolgen, oder aber durch das Einschleusen der genetischen Information (DNS) von HIF-1 («Gentherapie»). Als Alternative ist es denkbar, nicht den Dirigenten (HIF-1) ins Spiel zu bringen, sondern ausgesuchte Familienmitglieder der sauerstoffabhängigen Faktoren, wie beispielsweise den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, der die Gefässneubildung beschleunigt, oder EPO, das gemäss unseren Forschungsdaten eine schützende Funktion auf die Gehirnzellen haben könnte.
- Therapeutische Ansätze ergeben sich ebenfalls bei der Wundheilung. Zu beachten gilt, dass die Blutgefässe in der unmittelbaren Umgebung der Wundränder beschädigt sind. Zugabe von HIF-1 oder des vaskulären endothelialen Faktors könnte den Heilungsprozess beschleunigen. Dies ist bei schweren Verletzungen wie beispielsweise bei schweren Verbrennungen von allererster Priorität. Wie aber steht es mit kleineren Wunden, bei denen auch ein kosmetischer Gesichtspunkt

zu berücksichtigen gilt? Hier wäre allenfalls eine Verlangsamung des Wundverschlusses eher angezeigt. In einer Zusammenarbeit mit dem Kinderspital Zürich gehen wir gegenwärtig der Frage nach, warum Wunden bei einem Föten narbenfrei verheilen, d.h. regenerieren, während dem beim Erwachsenen diese Regenerationsfähigkeit nicht mehr vorhanden ist und es somit zur Narbenbildung kommt. Wir haben erste experimentelle Hinweise dafür, dass die sauerstoffarme Umgebung, in welcher sich der frühe Fötus normalerweise entwickelt, eine wichtige Rolle spielen könnte. Gelingt es uns diesen Mechanismus zu entschlüsseln, öffnen sich viele Türen zur Behandlung von Wunden.

- Bei der Tumorentstehung möchten wir die Hypothese testen, ob die gezielte Zerstörung von HIF-1 den Tumorstadium verlangsamen oder gar stoppen kann. In der Tat beobachten wir im Mausmodell, dass Tumoren, die kein HIF-1 produzieren, markant langsamer wachsen im Vergleich zu solchen, die HIF-1 besitzen. Beim Menschen könnte man sich verschiedene Ansätze zur Verminderung der HIF-1-Produktion vorstellen, z.B. durch Zugabe eines Antikörpers, der die Wirkung von HIF-1 neutralisiert. Solche Antikörper werden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und getestet.

Ein Beispiel aus unserer Forschungstätigkeit

Hoher Blutdruck ist eine der häufigsten Todesursachen unserer Konsumgesellschaft. Der Kontraktionszustand der Blutgefässe ist wesentlich beteiligt an der Einstellung des Blutdruckes: je enger die Gefässe, desto höher der Blutdruck, der aufgebaut werden muss, um den Bluttransport zu gewährleisten. Zur Untersuchung der Wirkung einer erhöhten Anzahl von roten Blutkörperchen auf die Blutgefässe haben wir das Erbgut einer Maus gezielt dahingehend verändert, dass die Maus übermässig viel EPO produziert. Wir waren sehr überrascht, dass trotz einer Verdoppelung der Anzahl roter Blutkörperchen und einem Hämatokritwert von 80% (!), diese sog. transgene Maus sich unauffällig verhielt und insbesondere keine Erhöhung des Blutdruckes und der Herzfrequenz zeigte. Offensicht-

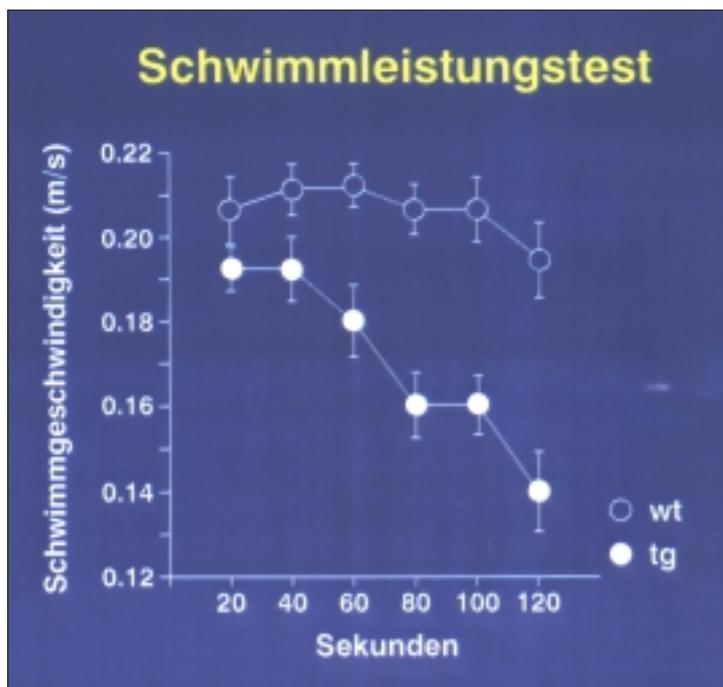


Abbildung 4 Die Schwimmleistung einer transgenen Maus mit einem Hämatokritwert von 80 % ist markant reduziert. wt = Kontrolltiere (sog. Wildtyp), tg = transgene Tiere.

lich ist die Maus in der Lage, mit dieser extremen Bluteindickung zu leben. Unser Ziel war es, den Adaptationsmechanismus zu entschlüsseln in der Hoffnung, einen Beitrag zur Behandlung von hohem Blutdruck zu leisten. Dieses eine Beispiel unserer Forschungstätigkeit am Physiologischen Institut der Universität Zürich ist in der Folge detaillierter beschrieben.

Unsere transgenen Mäuse haben einen etwa 20 Mal erhöhten EPO-Gehalt im Blut im Vergleich zu den normalen Kontrolltieren. Dieser erhöhte Gehalt führt zu einer massiv gesteigerten Produktion von roten Blutkörperchen, zu einer Verdoppelung der Blutmenge und zu einem Anstieg des Hämatokrits von rund 42% auf etwa 80%. Diesen hohem Gehalt an roten Blutkörperchen sieht man der Maus von blossem Auge an (Rotfärbung der Schnauze). Unerwarteterweise führt dieses zähflüssige Blut weder zu einem hohen Blutdruck noch zu Blutgerinnsel. Die Untersuchung dieser Mäuse, die in enger Zusammenarbeit mit der Kardiologie des Universitäts-Spitals Zürich erfolgte, ergab, dass die Blutgefäße der transgenen Mäuse stark erweitert sind. Die wohl berühmteste körpereigene Substanz, die eine Gefässerweiterung bewirken kann, ist das kurzlebige Gas Stickstoffmonoxid, besser bekannt als NO. In der Tat konnten wir feststellen, dass die Produktion

an NO in den Zellen, die die Blutgefäße auskleiden (endotheliale Zellen) stark erhöht ist (Das Enzym, das endotheliales NO synthetisiert, heisst eNOS.) Blockiert man die NO-Produktion, so können unsere Tiere nicht mehr adaptieren. Insgesamt lieferten diese Beobachtungen den ersten Beweis, dass NO eine schützende Rolle im lebenden Organismus ausübt. Weitere Experimente stehen nun an, wie z.B. das Testen verschiedener blutdruckregulierender Medikamente, die Quantifizierung der Endothelin-1-Produktion, die Untersuchung der Blutgerinnung sowie die Bestimmung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes.

Es lag auf der Hand, ebenfalls die «sportliche Leistung» unserer Maus mit einem Hämatokrit von 80% zu bestimmen. Hierfür liessen wir unsere Tiere nicht radfahren, sondern schwimmen. So wurde in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Universität Zürich die Schwimmgeschwindigkeit der Tiere zwei Minuten in digitalisierter Form aufgenommen. Im Vergleich zu den wildtyp Kontrollgeschwistern konnten die transgenen Tiere während 40 Sekunden mithalten. Danach aber nahm die Schwimmleistung rapide ab (Abbildung 4). Wir vermuten, dass die hohe Zähflüssigkeit des Blutes den Transport in den Blutgefässen zu stark beeinträchtigt. Trotz der hohen Sauerstofftransportkapazität ist also die «sportliche Leistung» der Tiere massiv eingeschränkt.

___Dank

Dieses eine Beispiel soll nicht nur erläutern, was unser Team erforscht, sondern auch darauf hinweisen, dass unsere Untersuchungen mit Hilfe anderer Institute erleichtert oder gar erst möglich gemacht werden. Ferner soll dieses Beispiel die Notwendigkeit des Einsatzes von gentechnologisch veränderten Tieren festigen. Ohne tatkräftigen Einsatz der Mitglieder meiner Arbeitsgruppe (Abbildung 5) und ohne finanzielle Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds sowie vieler anderen Stiftungen und Spenden wäre unsere Forschungsarbeit nicht möglich gewesen. Bei allen möchte ich mich ganz herzlich bedanken!

Literatur

HIF-1 Übersichtsartikel:

Gassmann M. and Wenger R.H., «HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia.» *News in Physiological Sciences* 12, 214–218, 1997

Wenger R.H. and Gassmann M., «Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1.» *Biological Chemistry* 378, 609–616, 1997

EPO-Überexpression in transgenen Mäusen:

Ruschitzka F., Wenger R.H., Stallmach T., Quaschnig T., de Wit C., Wagner K., Labugger R., Kelm M., Noll G., Rülcke T., Shaw S., Lindberg R.L.P., Rodenwaldt B., Lutz H., Bauer C., Lüscher T.F. and Gassmann M., «Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin.» *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 11609-11613, 2000.



Abbildung 5 Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Max Gassmann.

Beobachtung des Viruseintritts in Zellen:

Viren, blinde Passagiere der Zellen

Prof. Dr. Urs F. Greber *)



___ Forschungsgebiet

Viren haben mannigfaltige Eigenschaften. Sie übertragen einerseits Krankheiten, können aber andererseits in veränderter Form als Träger therapeutischer Gene in der molekularen Medizin eingesetzt werden. Wie Zellen besitzen auch Viren ein passives Schutzschild aus Proteinen oder Lipiden, der den genetischen Bauplan, die Nukleinsäure, vor äusseren Einflüssen schützt. Viren können sich allein nicht vermehren. Sie brauchen dazu Wirtszellen und haben Wege gefunden, durch die sie sich Zugang zu den zellulären Produktionsstätten verschaffen. Dabei überwinden sie Barrieren und öffnen zum richtigen Zeitpunkt ihre eigene Schutzhülle, was oft mit kompletter Unterjochung der Zelle und sogar mit dem Zelltod enden kann. Wenn es uns gelingt, diese viralen Strategien zu verstehen, besitzen wir nicht nur eine Grundlage zur Bekämpfung von Viren, sondern haben auch die einzigartige Möglichkeit, neue Einsichten in die Verhaltensmuster lebender Materie zu gewinnen. Hier wird beschrieben, wie unsere Arbeitsgruppe den Prozess des Zelleintritts der Adenoviren analysiert, und was uns diese Experimente über die Funktionsweise von Zellen sagen können.

*) Prof. Dr. Urs F. Greber
Zoologisches Institut der Universität Zürich
Abteilung für Zellbiologie
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich

Tel. 01 635 48 41
Fax 01 635 68 22
e-mail ufgreber@zool.unizh.ch
www.unizh.ch/zool/greber_lab

Nachdruck mit Quellenangabe gestattet.

___ Viren und Zellen

Viren findet man in allen lebenden Systemen. Sie sind fast alltägliche Begleiter der Menschen (*Doerfler 1996; Morse 1993*). Viren sind winzig und haben oft nur etwa einen Tausendstel der Masse von bakteriellen Zellen und ein Millionstel der Masse menschlicher Blutzellen (*Abbildung 1*). Neue Formen von Viren tauchen in unregelmässigen Abständen immer wieder in der Bevölkerung auf, was Furcht und Schrecken auslösen kann. Viren können gefährliche Krankheiten verursachen, wie zum Beispiel Hirnhautentzündungen durch West-Nil-Viren, Hämolyse durch Ebolaviren oder AIDS durch menschliche Immundefizienz-Viren (HIV). Andere Viren, wie Influenzaviren, Rhinoviren, Adenoviren, Echoviren oder Pneumoviren sind verantwortlich für grippeartige Erkrankungen, Hepatitisviren verursachen Leberschäden, Herpesviren Fieberbläschen und Papillomaviren gewisse Formen von Krebs. Virale Infektionen werden durch das körpereigene Immunsystem bekämpft, was die Virenpartikel oft stark reduziert und zur Genesung des Individuums führen kann (*Zinkernagel 1996*). Infektiöse Viren werden von einem Organismus zum andern durch Körperkontakt mittels Tröpfchen, Körperflüssigkeiten, Insektenstichen oder durch Nahrungsaufnahme übertragen. Bei vielen viralen Infektionen sind nur bestimmte Organe des Wirts betroffen. Zielorgane der Grippeviren umfassen die Atemwege und den Magen-Darm Trakt, das HIV zielt auf die Zellen des Blutsystems, Herpes und Papillomaviren auf Epithelzellen der Haut und des Genitaltrakts sowie manchmal auch auf Nervenzellen. Die Gründe für die Selektivität viraler Infektionen liegen oft in der Kompetenz der Viren, die Pforten zu den Zielzellen zu öffnen.

Zellen bestehen aus Wasser, Eiweissen (Proteinen), Fetten (Lipiden), Zuckern, Nukleinsäuren (DNA und RNA), Metaboliten und anorganischen Salzen. Sie

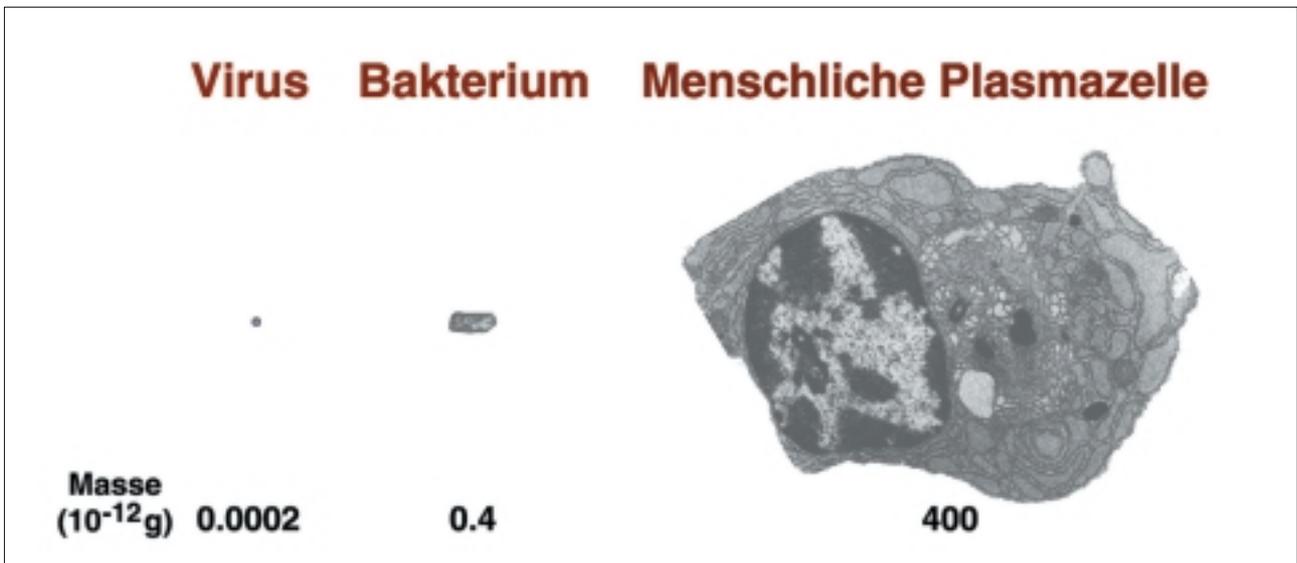


Abbildung 1 Ungefähre Dimensionen und Massen (10^{-12} g = 0.000'000'000'001 g) eines Adenovirus, eines Bakteriums und einer Plasmazelle. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen aus ultradünngeschnittenen Präparaten stammen aus einem Lehrbuch der Zellbiologie (Lodish et al. 2000).

sind in sich geschlossene Systeme, die jedoch in der Lage sind, externe Energiezuflüsse und Signale in Wachstum und Teilung umzusetzen (Abbildung 2A). Der tierische Körper enthält viele verschiedener Zelltypen, die in Geweben und Organen zusammenarbeiten oder frei in den Körperflüssigkeiten zirkulieren. Zellen sterben und werden im Organismus fortlaufend erneuert und verändert. Die funktionellen Einheiten aller Zellen sind die Organellen (Abbildung 2B). Die lipidreiche Zellmembran grenzt die Zelle gegen aussen ab und schützt vor Aggressoren, ermöglicht aber die Kommunikation mit Nachbarzellen. Das Zytoskelett aus dünnen Filamenten (Aktin), dicken Filamenten (Mikrotubuli) und intermediären Filamenten vermittelt Stabilität und durch seine Dynamik auch Bewegung. Zwischen den Filamenten, im sogenannten Zytoplasma, liegen lipidhaltige Kompartimente, in denen spezielle und oft auch gefährliche Stoffwechselreaktionen stattfinden, wie zum Beispiel der Abbau zelleigener und fremder Komponenten. Der Bauplan und die Anleitung zur Weitergabe vererbbarer Merkmale der Zelle sind in den aus Nukleinsäuren bestehenden Genen des Zellkerns und der Mitochondrien, den Kraftwerken der Zelle, gespeichert und werden dort verwaltet. Wie die einzelnen Organellen aufgebaut und geschützt sind, welche Aufgaben sie erfüllen und wie sie mit andern Organellen zusammenarbeiten sind wichtige Fragestellungen der modernen Zellbiologie. Ein nützlicher Ansatz zur Lösung solcher Fragen ist, zelluläre und virale Prozesse mit Hilfe der Mikroskopie zu analysieren.

___Die Entdeckung der Zellen

Die Mikroskopie ist ein altbewährtes Hilfsmittel der Zellanalyse. Die ersten mikroskopischen Untersuchungen lebender Materie wurden im 17. Jahrhundert durch den Italiener Galileo durchgeführt, der die feinen Härchen der äusseren Hautschicht von Fliegen bereits im Jahre 1614 beschrieb (Harris 1999). Erst die Entwicklung besser geschliffener Linsen durch verschiedene holländische Optiker erlaubte es dann dem Engländer Hooke, das erste Mehrfachlinsen-Mikroskop zu bauen und damit in feingeschnittenem Kork die ersten mikroskopisch kleinen Hohlräume organischer Materie zu entdecken. Abgeleitet vom lateinischen «cella», kleiner Raum oder Nische, nannte er diese Einheiten «Zellen». Die ersten überzeugenden Dokumentationen lebender Zellen gelangen um 1672 dem Engländer Grew und dem Italiener Malpighi, die sich unabhängig voneinander mit der Mikroanatomie von Pflanzen befassten. Diese Studien zeigten, dass pflanzliches Gewebe zu einem grossen Teil aus Aggregaten kleiner Kammern besteht. Malpighi befasste sich auch eingehend mit mikroskopischen Untersuchungen des tierischen Körpers und verwendete dazu verschiedene histologische Techniken. Sein Name findet sich heute noch in medizinischen Ausdrücken wie Malpighische Gefässe, Malpighische Zellen oder Malpighische Körperchen. Die ersten Blutzellen wurden vom holländischen Mikroskophersteller Leeuwenhoek um 1674 beschrieben. Obwohl Leeuwenhoek gelegentlich ge-

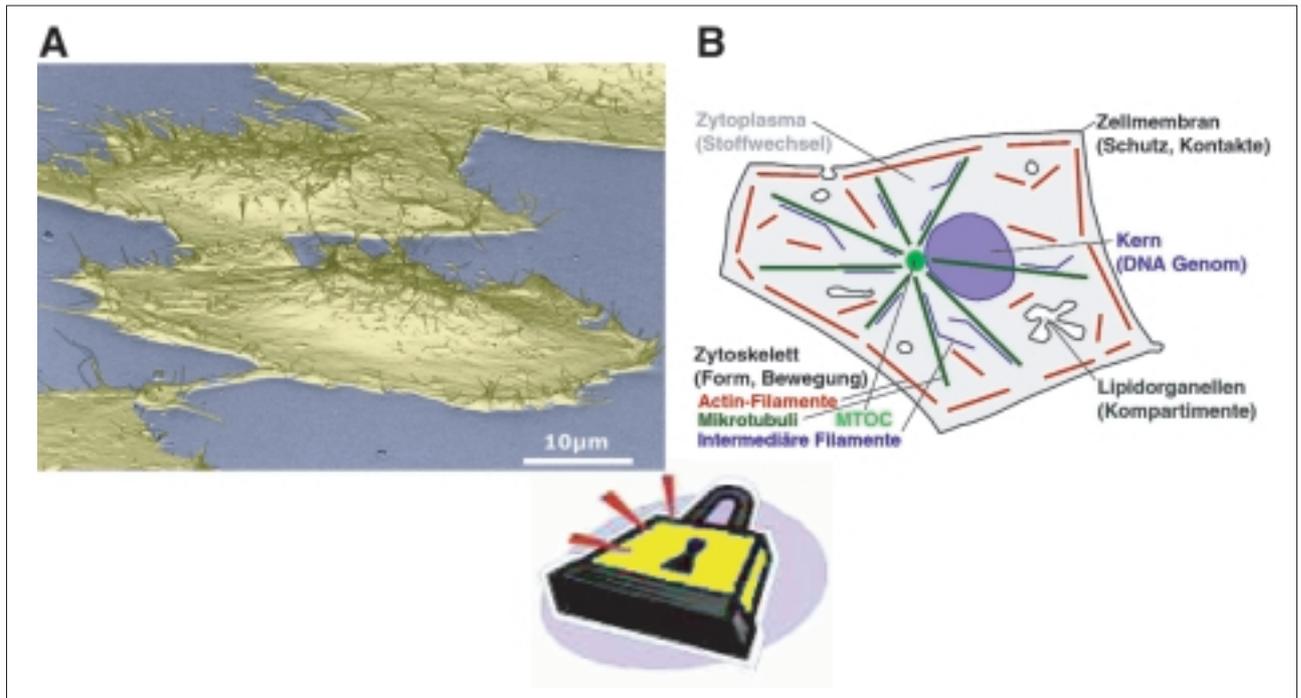


Abbildung 2 A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme kultivierter menschlicher HeLa-Zellen (Bild R. Stidwill und K. Boucke). B) Vereinfachte schematische Darstellung einer menschlichen oder tierischen Zelle mit Organellen.

wisse interne Strukturen in seinen Blutzellpräparaten beobachtete, geht die erstmalige Beschreibung und Benennung eines Zellorganells, des Zellkerns, 1833 auf das Konto des Engländers Robert Brown. Dies schuf nicht nur die Grundlage für eine umfassende Erklärung der Mechanismen, mit denen vererbte Merkmale übertragen werden, sondern ermöglichte 1841 dem Deutschen Remak auch eine Erklärung des Ursprungs der Zelle, nämlich, durch Zweiteilung einer existierenden Zelle in praktisch identische Tochterzellen. Diese Idee wurde dann vom Deutschen Physiologen Virchow übernommen und weiterentwickelt.

___ Von den Viren zur modernen Biologie

Der Begriff «Virus» stammt aus dem Lateinischen und bedeutet ursprünglich «Gestank, Gift», später auch «Schädling» und «infektiöse Mikrobe». Die ersten Viren, pflanzliche Tabakmosaikviren, wurden 1892 durch die Filtrationsexperimente Dimitry Ivanovsky's als submikroskopische Einheiten, kleiner als Bakterien, identifiziert. Kurze Zeit später wurde durch die Deutschen Löffler und Frosch 1898 das erste tierische Virus angereichert, das Maul- und Klauenseuchevirus, und im Jahre 1901 beschrieb der Amerikaner Reed das erste menschliche Virus, das

Gelbfieberevirus. Aus Filtraten menschlicher oder tierischer Exkremente haben 1915 der englische Biologe Twort und unabhängig davon der Franzose D'Herelle bakterielle Viren (Bakteriophagen) entdeckt und gezeigt, dass diese sich an die Oberfläche des Bakteriums anheften, die Zelle penetrieren und sich im Zellinnern reproduzieren. Wenn die infizierte Zelle stirbt, gelangen die Viren ins Medium und infizieren von dort neue Zellen. Dank der kurzen Generationszeit der Phagen liessen sich einzelne Infektionsereignisse direkt durch sogenannte «Plaquetests» auf Indikatorzellen nachweisen. Dieser erste quantitative Ansatz zur Analyse eines sich selbst replizierenden lebenden Systems war die Grundlage dafür, dass sich in den 40er und 50er Jahren Physiker, wie der Deutsche Delbrück, und Mediziner, wie der Italiener Luria, mit der Frage befassten, wie die Selbstreplikation eines lebenden Systems gelingt. Dieser neue experimentelle Ansatz hatte einen entscheidenden Einfluss auf die keimende Molekularbiologie und ermöglichte später die revolutionäre Entdeckung der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 (Watson and Crick 1953).

Bereits im Jahre 1911 gelang dem Amerikaner Rous die Isolation des ersten Krebs verursachenden Virus, des Hühner-Rous-Sarcoma-Virus aus der Familie der Retroviren. Ein Retrovirus kann mit Hilfe eines sei-

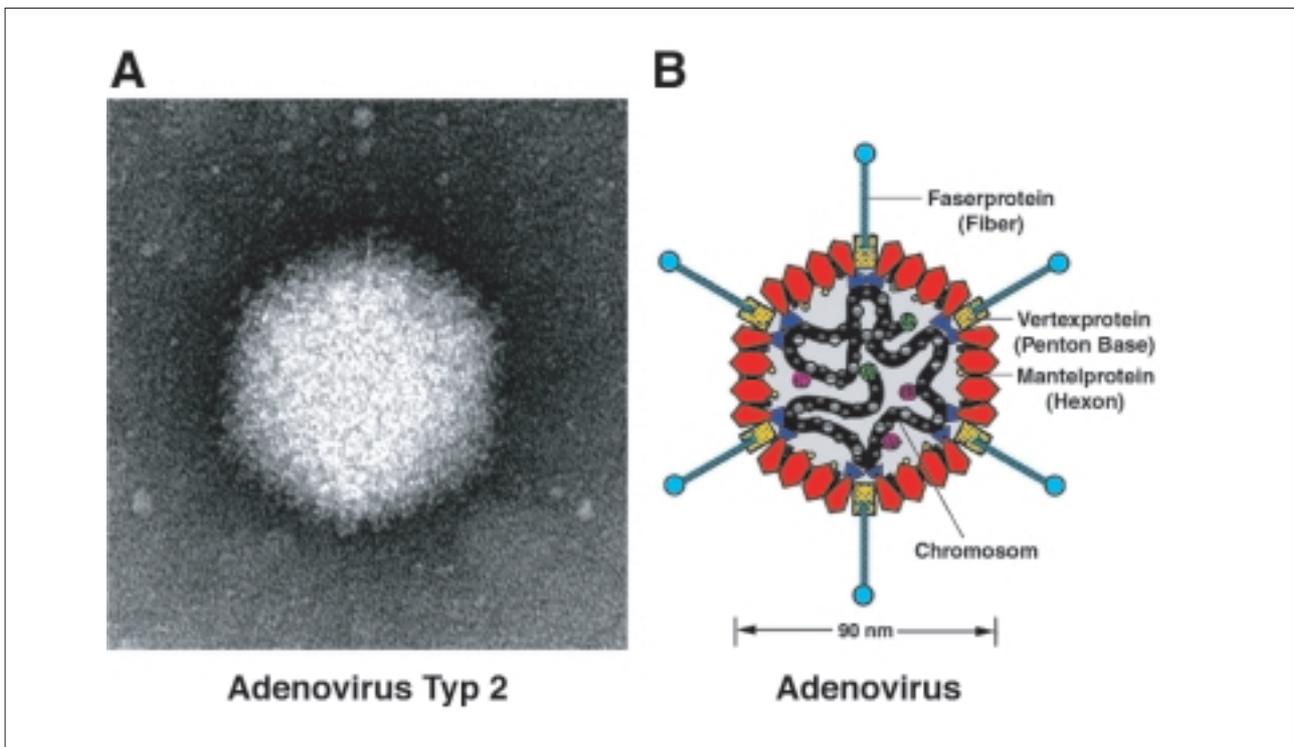


Abbildung 3 A) Transmissionselektronenmikroskopische Abbildung eines isolierten Adenovirus des Typs 2 nach Kontrastierung mit Ammoniummolybdat (Bild K. Boucke). B) Schematische Darstellung des Adenovirus.

ner Enzyme, der reversen Transkriptase, sein RNA-Erbgut in DNA übersetzen. Die Entdeckung der reversen Transkriptase in unabhängigen Experimenten durch die Amerikaner Temin und Baltimore 1970 war dann entscheidend für die Identifizierung des ersten transformierenden Gens, des retroviralen Src Gens durch die Amerikaner Bishop und Varmus im Jahre 1976 (Vogt 1997). Dass es sich dabei nicht um ein viruspezifisches Gen handelte, sondern um ein Gen zellulären Ursprungs, hat mitgeholfen, eine neue Disziplin, die Genetik des zellulären Wachstums zu schaffen. Weitere entscheidende Fortschritte für unser heutiges Verständnis der Zelle waren die Entwicklung und Anwendung der Elektronenmikroskopie an biologischem Material durch Porter, Fullam und Palade sowie die Methode der biochemischen Fraktionierung von Zellen und Geweben durch De Duve und KollegenInnen (De Duve 1991). Die Kombination dieser Methoden mit metabolischen Studien und Lokalisierungsexperimenten in den 50er Jahren ermöglichte neue Erkenntnisse der Korrelation zwischen Struktur und Funktion von Zellorganellen. Seit den 60er Jahren versuchte man zelluläre Eigenschaften auch durch Enzyme beschleunigte biochemische Reaktionen zu erklären, und formulierte dazu das Prinzip der Proteinmaschinen, die durch Koordination ihrer mobilen Teile

molekulare Kollisionen weitgehend vermeiden und mannigfaltige Aufgaben an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle ausführen (Kinosita 1999).

Zur eingehenden Analyse zellulärer Prozesse können Viren als Sonden verwendet werden. So sind Adenoviren in den vergangenen 40 Jahren zu einem der bestuntersuchten Modellsysteme viraler Infektionen geworden (Abbildung 3A, Shenk 1996). Dabei wurden grundlegende zelluläre Mechanismen entdeckt, wie zum Beispiel das Spleissen von Boten-RNA, Aspekte der Immunsuppression oder regulierter Transport von Protein und Nukleinsäuren zwischen dem Kern und dem Zytoplasma. Adenoviren sind zudem wichtige Modelle zum Studium der transkriptionellen Gen-Regulation und der Replikation der DNA. Dank der hohen Effizienz der Genübertragung sind gentechnisch veränderte Adenoviren auch brauchbare Mittel zu Therapieversuchen von bislang unheilbaren Krankheiten, wie zum Beispiel von Kopf-Nacken-Tumoren (McCormick 1999).

___Wie Viren in Zellen eindringen

Welches sind nun die molekularen Mechanismen, mit denen das Adenovirus in die Wirtszelle ge-

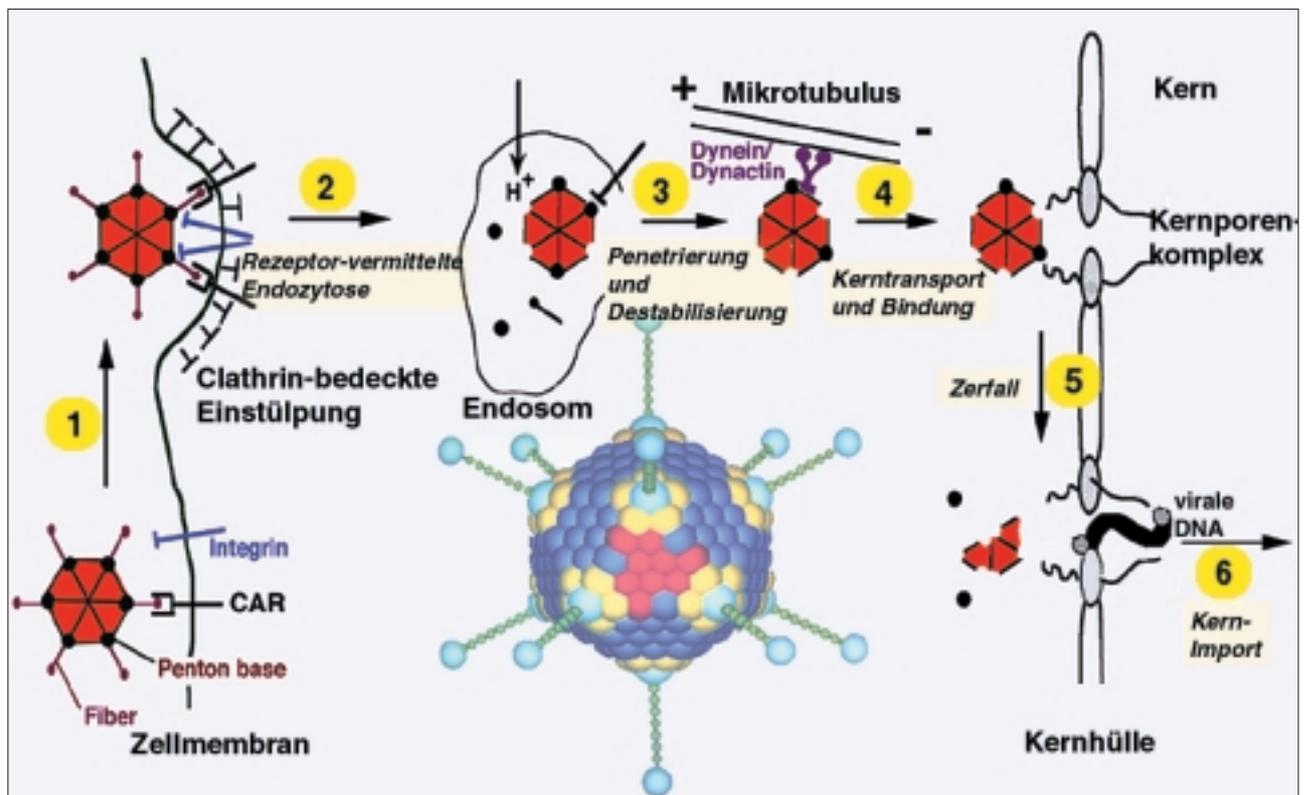


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Adenovirus-Eintritts in die Zelle. (siehe auch Stidwill and Greber 2000).

langt? Viren sind im Gegensatz zu Zellen tote Materie und können sich selber nicht reproduzieren. Der Grund für die Lebllosigkeit der Viren liegt in der äusserst kompakten und ökonomisch aufgebauten viralen Struktur, die das Erbgut schützt. Das virale Erbgut enthält einerseits die Instruktionen zum Bau der Viren und andererseits Befehle zur Steuerung zellulärer Funktionen. Obwohl Viren aus den gleichen Bausteinen bestehen wie Zellen, sind sie im Gegensatz zu Zellen alleine nicht in der Lage, externe Energie aufzunehmen und zur Replikation zu verwenden. Viren müssen deshalb eng mit den Zellen kooperieren, was sie oft durch gezielte Manipulation erzwingen. Es sind die fein aufeinander abgestimmten viralen Gene und die sie umgebende Hülle, die solche Manipulationen erlauben (Abbildung 4). Mit Hilfe der Hülle dockt das Virus an zelluläre Oberflächenproteine oder Zucker an, welche normalerweise für Interaktionen zwischen Zellen und deren strukturierter Umgebung bestimmt sind. Das Adenovirus besitzt selbst keine Lipide und verwendet zum Andocken an die Zelle sein eigenes Fiberprotein (Abbildungen 3B und 4). Eine Fiber bindet mit hoher Affinität an ein spezielles Protein der Zelloberfläche, den sogenannten Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR, Bergelson et al. 1997). CAR allein genügt aber nicht für den Viruseintritt,

sondern es braucht dazu mindestens einen weiteren zellulären Rezeptortyp, nämlich Integrine (Wickham et al. 1993). Wenn das virale Kapsidprotein «Penton Base» an die Integrine bindet, werden in der Zelle verschiedene Signale erzeugt, die unter anderem die Dynamik des Zytoskeletts und das Zellwachstum stimulieren. Mit diesen Signalen sichert sich das Virus einen erfolgreichen Eintritt in die Zelle und seine eigene Vermehrung. Weitere Signale stimulieren den eigentlichen Viruseintritt in die Zelle. Das erfolgreiche Virus nützt dazu ein zelluläres Bedürfnis aus, nämlich Nahrung und Teile der Zelloberfläche durch das Einstülpfen von Membranen aufzunehmen, die sogenannte Endozytose. Das Adenovirus benützt einen spezifischen Weg der Stoffaufnahme, die Clathrin vermittelte Endozytose (Abbildung 4, Schritt 2), und streift bereits in diesem frühen Infektionsstadium seine Fiberproteine ab (Greber et al. 1993; Nakano et al. 2000). Clathrin, ein Hüllprotein zellulärer Membranen, ist zentral für die Knospung bestimmter Vesikeln (Marsh and McMahon 1999).

Gelangen Viren mittels Endozytose ins Zellinnere, so laufen sie Gefahr, vom zelleigenen Verdauungsapparat, den Lysosomen, zersetzt zu werden. Auch in diesem Fall haben die Viren eine Lösung zu ihren

Gunsten gefunden. Die Adenoviren, zum Beispiel, verlassen das leicht angesäuerte, gefährliche Milieu und dringen mittels eines weitgehend unbekanntem Mechanismus ins Zytosol vor (*Abbildung 4, Schritt 3*). Das Zytosol ist wegen der hohen Dichte von Protein und Lipid und der grossen Wahrscheinlichkeit von Bindungsreaktionen ein beträchtliches Hindernis für die freie Beweglichkeit viraler Strukturen und zellulärer Organellen. Die Zelle hat für ihre eigenen Transportbedürfnisse verschiedene Lösungen gefunden. Zum Beispiel werden gewisse Elemente des Zytoskeletts als Translokationsschienen mit den dazu passenden Motorproteinen verwendet (*Mermall et al. 1998; Vallee and Sheetz 1996*). «Schmalspurschienen» bestehen aus Aktinproteinen und dienen vorwiegend der lokalen Verschiebung von Transportgut, während auf der «Normalspur» bestehend aus Tubulin grössere Distanzen überwunden werden können. Eine entscheidende Rolle beim Transport spielt die Wahl des Zugpferds, das typischerweise nur in eine bestimmte Richtung läuft (*Stidwill and Greber 2000*). Wie diese Selektion für virale oder zelluläre Fracht geschieht, ist bis heute weitgehend unbekannt. Im Falle des Adenovirus wissen wir aber, dass der Mikrotubuli abhängige Dynein-Dynactin Komplex als Motor für den Kerntransport mit einem vom Kern weg laufenden Motor konkurriert, was bedeutet, dass Motoren unterschiedlicher Transportrichtung fast gleichzeitig an das Virus binden (*Suomalainen et al. 1999*). Eine grundsätzlich andere Transportart besteht darin, die Fracht an ein Ende einer Transportschiene zu heften und je nach Bedarf die Länge der Schiene zu verkürzen oder zu verlängern. Wie das Aktinzytoskelett als dynamische Schiene für Transportzwecke verwendet werden kann, wurde anhand von intrazellulären Bakterien und Vakziniaviren aus der Pockenvirusfamilie entdeckt (*Dramsı and Cossart 1998; Machesky and Way 1998*).

Manche DNA Viren, zum Beispiel Adenoviren, Herpesviren oder Papillomaviren, aber auch Retroviren, zum Beispiel das HIV, versuchen ihre Gene direkt im Zellkern, dem Schaltzentrum der Zelle, zu deponieren. Eine Voraussetzung dazu ist die Ueberwindung der Zytosol-Barriere. Ist das Adenovirus dann am Zellkern angekommen, dockt es mit grosser Genauigkeit an die sogenannten Kernporenkomplexe an (*Abbildung 4, Schritt 4 und Greber et al. 1997*). Erst dort, am Ende seiner Reise, nimmt es das Signal zum

endgültigen Zerfall auf und entledigt sich seines Kapsids (*Abbildung 4, Schritt 5*). Die Voraussetzungen für den Viruszerfall sind vielfältig. Wir wissen zum Beispiel, dass dazu eine Reihe von strukturellen Veränderungen im Kapsid notwendig sind, unter anderem der Abbau und Verlust von stabilisierenden Proteinen (*Greber et al. 1996*). Werden diese stabilisierenden Komponenten nicht rechtzeitig inaktiviert, kann das Virus seine DNA wohl zum Zellkern, aber nicht in den Zellkern hinein bringen, da es selbst zu gross ist, um durch die Kernporen zu schlüpfen. Ueber den Mechanismus des eigentlichen Kernimports der DNA ist sehr wenig bekannt, ausser, dass eine physiologisch intakte Kernhülle mit funktionellen Kernporenkomplexen notwendig ist (*Abbildung 4, Schritt 6*).

___Wie man «blinde Passagiere» beobachtet

Obwohl der physikalische Durchmesser eines Viruspartikels um ein Mehrfaches kleiner sein kann als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts, ist es möglich, einzelne Virenpartikel im Lichtmikroskop unter Fluoreszenzbeleuchtung sichtbar zu machen. Dazu koppeln wir gereinigte Adenoviren im Reagenzglas mit einem fluoreszierenden Farbstoff, zum Beispiel mit dem rot fluoreszierenden «Texas-Rot», so dass ein paar Hundert Farbstoffmoleküle an ein Viruspartikel gebunden werden (*Abbildungen 5A und 5B*). Die meisten der Farbstoffmoleküle sind dabei an der Aussenseite des Kapsids gebunden, am sogenannten Hexonprotein (*Abbildung 5C*). Die andern Kapsidproteine, Penton Base, Fiber und das Protein IIIa, oder interne Proteine, wie die DNA bindenden Proteine V und VII, werden nicht markiert. Einzelne markierte Virenpartikel können wir dann im Fluoreszenzmikroskop beobachten (*Nakano and Greber 2000*). In einem typischen Infektionsexperiment geben wir eine geringe Menge fluoreszierender Viren zu menschlichen Testzellen, die auf einem optisch durchlässigen Glasplättchen haften (*Abbildung 6A*). Die Viren finden dann mit erstaunlicher Treffsicherheit ihren Weg zum Zellkern (*Abbildung 6B*), genauso wie unbehandelte Viren (*Greber et al. 1997*). Sie haben demnach die Schlüssel zu den verschiedenen Pforten gefunden und nisten sich in der Zelle ein, ohne dass diese etwas Wirksames dagegen unternimmt.

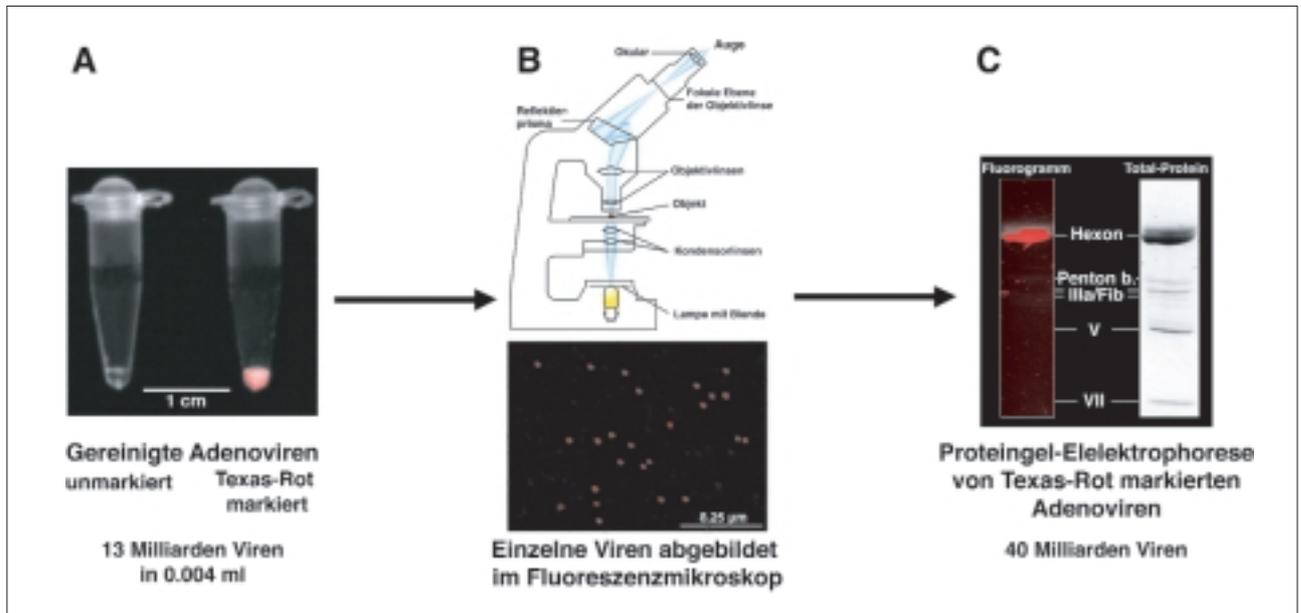


Abbildung 5 Gereinigte Texas-rot markierte Adenoviruslösung im Reaktionsgefäß (A), als Einzelpartikel abgebildet im Fluoreszenzmikroskop (B) und biochemisch analysiert durch Proteingel-Elektrophorese und Fluorographie (C). Für Details, siehe (Nakano and Greber 2000).

Fluoreszierende Viren erlauben uns, die Geschwindigkeit einzelner Ereignisse während der ersten Infektionsschritte zu messen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen konnten wir zum ersten Mal sehen, dass sich einzelne Viren über Strecken von einigen Mikrometern in Zeitintervallen

von Sekunden sowohl zum Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOC) in der Nähe des Kerns, wie auch überraschenderweise vom Kern weg bewegen (Suomalainen et al. 1999). Diese Elementargeschwindigkeiten sind beachtlich und entsprechen etwa der Geschwindigkeit eines Hochleistungszugs

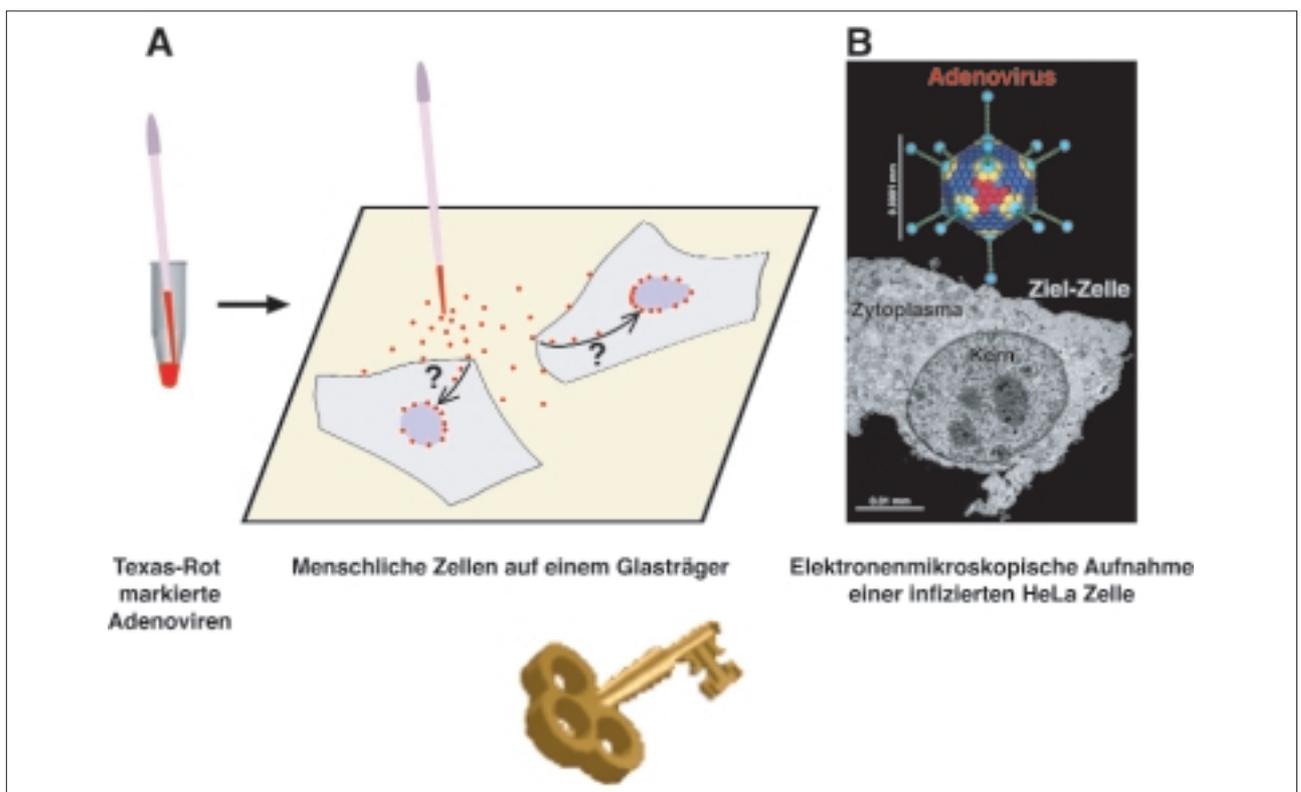


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Zellinfektion mit fluoreszierenden Adenoviren (A) und elektronenmikroskopische Abbildung einer infizierten HeLa Zelle mit schematischer Darstellung des Adenovirus (B). Zu beachten sind die unterschiedlichen Vergrößerungen der Abbildungen.

von rund 200 km/h, wenn man die Mikrotubuli, die einen Durchmesser von etwa 30 nm haben, als eine Schiene von einem Meter und das Adenovirus als 3 Meter grosse Lokomotive betrachtet. Die Summe der viralen Elementargeschwindigkeiten ergibt die Populationsgeschwindigkeit. Diese ist zum Zellkern hin gerichtet und beträgt je nach Zelltyp zwischen 0.2 bis 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, ist also etwa 60 mal kleiner als die einzelnen Elementargeschwindigkeiten. Diese Messwerte stimmen sehr gut mit Beobachtungen chemisch fixierter infizierter Zellen überein, in denen eine maximale Anreicherung der Viren am Kern nach 60 bis 90 Minuten gemessen wurde (Nakano and Greber 2000). Die meisten viralen Bewegungen erfolgen entlang der Mikrotubuli, was man besonders gut sehen kann, wenn die Mikrotubuli mit einem Mikrotubuli assoziierten Protein (MAP) markiert sind, an das ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt ist. Wenn in einer bestimmten Phase der Infektion die vom Kern weg gerichteten Bewegungen weniger häufig auftreten, kann ein einzelnes Viruspartikel über Dutzende von Mikrometern zum Zellkern hin laufen und Durchschnittsgeschwindigkeiten bis zu 30 Mikrometer pro Minute erreichen (Abbildung 7). Im Normalfall erfolgen beide Bewegungen alternierend über Distanzen von wenigen Mikrometern, was zeigt, dass neben dem Ausmass der Bewegungen auch deren Häufigkeit die Transportrichtung bestimmt. Entscheidend ist auch die Fähigkeit der einzelnen Virenpartikel, den Mikrotubuli-abhängigen Motorapparat der Zelle überhaupt zu nutzen. Gelingt dies nicht, bleiben die Viren im Zytosol stecken. Weiterführende Experimente in unserer Arbeitsgruppe zielen nun darauf, die Signale zu charakterisieren, welche die Viren an die Mikrotubuli binden lassen und die Transportrichtung entlang der Mikrotubuli bestimmen.

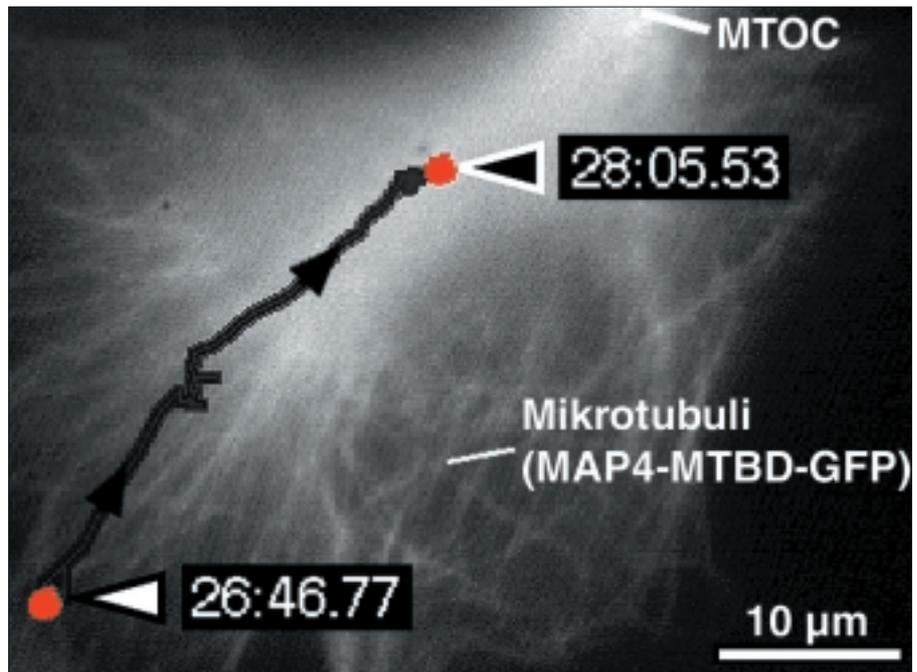


Abbildung 7 Die Bewegung eines einzelnen Texas-rot markierten Adenovirus-Partikels in einer infizierten Affenzelle während 1 Minute und 18.76 Sekunden, dargestellt durch eine schwarze Linie mit Pfeilköpfen in Netto-bewegungsrichtung. Die Aufnahmen begannen 26 Minuten und 46.77 Sekunden nach der Infektion. Mikrotubuli sind sichtbar durch die Mikrotubuli bindende Domäne (MTBD) des Mikrotubuli bindenden Proteins 4 (MAP4), die an das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt ist (für Details, siehe Text und Suomalainen et al. 1999).

___Fazit

Molekulare Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass zelluläre Prozesse fein aufeinander abgestimmt und mit Passwörtern gegen aussen geschützt sind. Viren haben gelernt, diese Passwörter zu knacken. Sie sind deshalb geeignete Sonden zur Analyse zellbiologischer Probleme, wie zum Beispiel der Frage, wie zelltypische Signalübertragungen in Raum und Zeit koordiniert sind. Grosse Fortschritte der molekularen Analysemethoden ermöglichen immer genauere quantitative Studien einzelner Ereignisse. Entscheidend wird es sein zu erkennen, welches die bedeutenden Messwerte sind, die die Spezifität und die geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen beschreiben.

___Dank

Bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für wertvolle Mitarbeit und Diskussionen, und bei Prof. Martin Billeter, Dr. Silvio Hemmi, Dr. Thomas Honegger, Andrea Greber und

Barbara Nakano für ihre konstruktive Kritik des Manuskripts. Die Arbeiten in meinem Labor wurden vom Schweizerischen Nationalfonds, der Europäischen Molekularbiologieorganisation (EMBO) und dem Kanton Zürich unterstützt.

Literatur

BERGELSON, J.M., CUNNINGHAM, J.A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E.A., KRITHIVAS, A., HONG, J.S., HORWITZ, M.S., CROWELL, R.L., AND FINBERG, R.W., «Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5», *Science* 275 (1997), 1320-1323.

DE DUVE, C. «Blueprint for a cell: the nature and origin of life» (Burlington, NC, USA: Neil Patterson Publishers, Carolina Biological Supply Company), (1991).

DOERFLER, W., *Viren* (Berlin: Springer Verlag), (1996).

DRAMSI, S., AND COSSART, P., «Intracellular pathogens and the cytoskeleton», *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998), 137-166.

GREBER, U.F., SUOMALAINEN, M., STIDWILL, R.P., BOUCKE, K., EBERSOLD, M., AND HELENIUS, A., «The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry», *EMBO J.* 16 (1997), 5998-6007.

GREBER, U.F., WEBSTER, P., WEBER, J., AND HELENIUS, A., «The role of the adenovirus protease in virus entry into cells», *EMBO J.* 15 (1996), 1766-1777.

GREBER, U.F., WILLETTS, M., WEBSTER, P., AND HELENIUS, A., «Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells», *Cell* 75 (1993), 477-486.

HARRIS, H., *The birth of the cell* (New Haven & London: Yale University Press), (1999).

KINOSHITA, K., JR., «Real time imaging of rotating molecular machines», *Faseb J* 13 (1999), S201-208.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., AND DARNELL, J., *Molecular cell biology*, 4th edition Edition, H. Lodish, ed. (New York: W.H. Freeman & Company), (2000).

MACHESKY, L.M., AND WAY, M., «Cell Motility - Actin Branches Out», *Nature* 394 (1998), 125-126.

MARSH, M., AND MCMAHON, H.T., «The structural era of endocytosis», *Science* 285 (1999), 215-220.

MCCORMICK, F., «Cancer therapy based on p53», *Cancer J Sci Am* 5 (1999), 139-144.

MERMALL, V., POST, P.L., AND MOOSEKER, M.S., «Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction», *Science* 279 (1998), 527-533.

MORSE, S.S., *Emerging viruses*, S. Morse, ed. (New York: Oxford University Press), (1993).

NAKANO, M.Y., BOUCKE, K., SUOMALAINEN, M., STIDWILL,

R.P., AND GREBER, U.F., «The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol», *J. Virol.* 74 (2000), 7085-7095.

NAKANO, M.Y., AND GREBER, U.F., «Quantitative microscopy of fluorescent adenovirus entry», *J. Struct. Biol.* 129 (2000), 57-68.

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

STIDWILL, R.S., AND GREBER, U.F., «Intracellular virus trafficking reveals physiological characteristics of the cytoskeleton», *News Physiol. Sci.* 15 (2000), 67-71.

SUOMALAINEN, M., NAKANO, M.Y., BOUCKE, K., KELLER, S., STIDWILL, R.P., AND GREBER, U.F., «Microtubule-dependent minus and plus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus», *J. Cell Biol.* 144 (1999), 657-672.

VALLEE, R.B., AND SHEETZ, M.P., «Targeting of motor proteins», *Science* 271 (1996), 1539-1544.

VOGT, P.K., «Historical introduction to the general properties of retroviruses». In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-25, (1997).

WATSON, J.D., AND CRICK, F.H.C., «Molecular structure of nucleic acids», *Nature* 171 (1953), 737.

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

ZINKERNAGEL, R.M., «Immunology taught by viruses», *Science* 271 (1996), 173-178.

Sex, Plants and Rock'n Roll

Prof. Dr. Ueli Grossniklaus *)



___Faszination Entwicklungsbiologie

Über die letzten Jahrzehnte hat sich die Entwicklungsbiologie in eines der interessantesten und dynamischsten Gebiete der modernen Biologie entwickelt. Viele Erbfaktoren, die ursprünglich isoliert wurden, weil sie für die Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* eine wichtige Rolle spielen, hat man später auch beim Menschen gefunden. Dort spielen sie eine ähnliche Rolle und können, falls nicht mehr funktionsfähig, zu Erbkrankheiten führen. Die Errungenschaften der modernen Entwicklungsbiologie und ihre Bedeutung auch für medizinische Aspekte wurde vor fünf Jahren mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin an E. Lewis, C. Nüsslein-Vollhard und E. Wieschaus, welche die Steuerung der Embryonalentwicklung bei *Drosophila* studierten, ausgezeichnet [1,2].

Die Entwicklungsbiologie hat aber eine sehr lange Geschichte und ist wohl der älteste Zweig der Biologie, geht sie doch auf den Griechischen Philosophen Aristoteles zurück. Aristoteles öffnete jeden Tag ein Ei aus dem Gelege eines Huhnes und konnte so die Bildung des Embryos und seiner Organe verfolgen. Laut Aristoteles steht am Anfang der Wissenschaft

die Neugier, und in der Tat fasziniert uns heute die Entstehung eines Embryos aus einer einzigen befruchteten Zelle noch genau so, wie das für Aristoteles in 4. Jahrhundert vor Christus der Fall war. Für mich ist die Entwicklung eines Organismus eine sich nicht erschöpfende Quelle der Neugier. Ich hatte das Privileg, schon während meiner Dissertation bei Walter Gehring die Entwicklungsvorgänge zu studieren, die zur Bildung der Eizelle in *Drosophila* führen [3]. Ich untersuchte auch, welchen Einfluss die Erbfaktoren der Mutter auf die Entwicklung des entstehenden Embryos ausüben [4]. Beide Fragen faszinieren mich noch heute, allerdings befasst sich meine wissenschaftliche Arbeit nicht mehr mit Fruchtfliegen, sondern mit Pflanzen [www.unizh.ch/botinst]. Dies hat einerseits den Grund, dass wir sehr wenig über die genetischen Grundlagen der Pflanzenentwicklung wissen und so bei Pflanzen grundlegend neue Lösungen für entwicklungsbiologische Probleme zu erwarten sind. Andererseits sind Pflanzen von so grosser sozio-ökonomischer Wichtigkeit (Nahrungsversorgung der wachsenden Erdbevölkerung), dass unbedingt mehr Grundlagen für zukünftige Anwendungen erarbeitet werden müssen.

___Generationenwechsel

Die Erbsubstanz höherer Organismen ist in einzelne Chromosomen aufgeteilt. Sich sexuell fortpflanzende Organismen haben einen doppelten Chromosomensatz, wobei eine Kopie vom Vater und die zweite von der Mutter stammt. Damit die Chromosomenzahl über Generationen hinweg erhalten bleibt, werden die Chromosomen in einer Reifeteilung (Meiose) auf die Hälfte reduziert. Die Keimzellen (Eizellen und Spermien) haben also nur die Hälfte der Chromosomen einer normalen Körperzelle. Bei der Verschmelzung der Keimzellen während der

*) Prof. Dr. Ueli Grossniklaus
Institut für Pflanzenbiologie
der Universität Zürich
Zollikerstrasse 107
CH-8008 Zürich

Tel. 01 634 82 11
Fax 01 000 00 00
e-mail grossnik@botinst.unizh.ch

Nachdruck mit Quellenangabe gestattet.

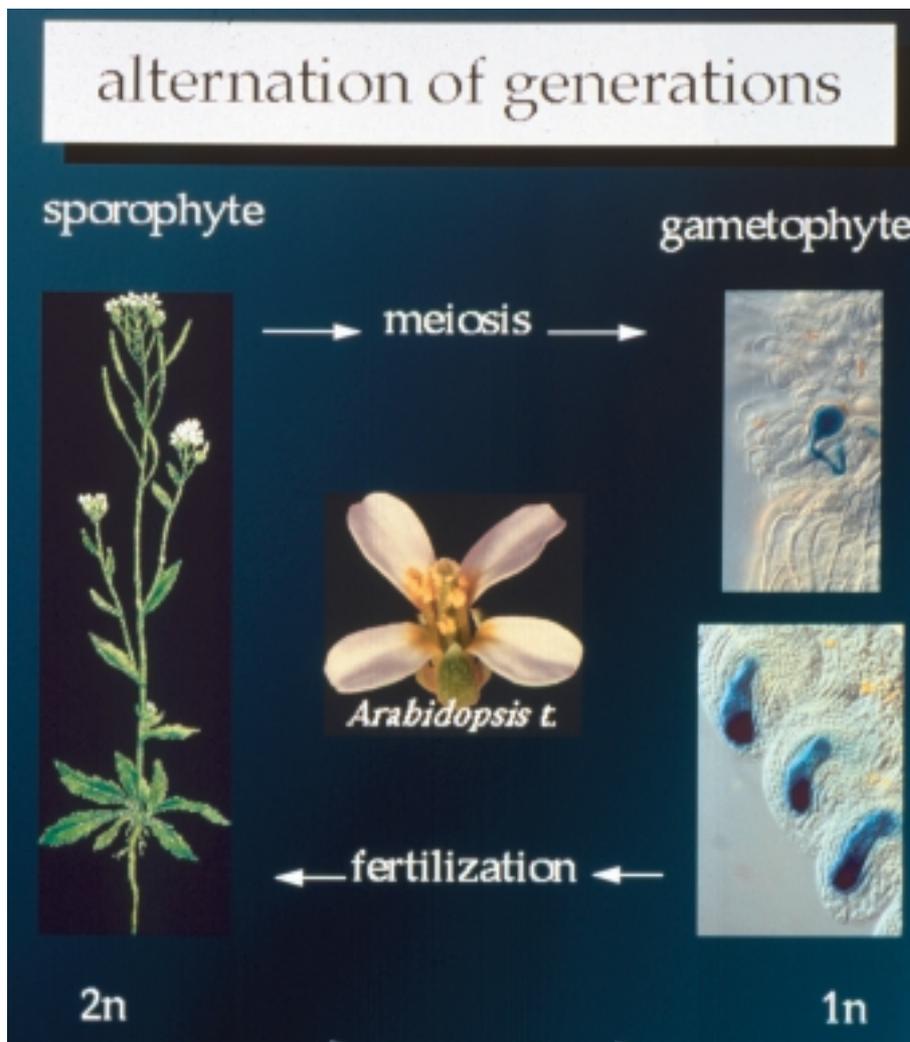


Abbildung 1 Wechsel der Generationen. Der Lebenszyklus der Pflanzen hat zwei ausgeprägte Generationen. Die Gametophyten (Pollen und Embryosack) sind blau gefärbt.

Befruchtung wird die ursprüngliche Chromosomenzahl wieder hergestellt. Dieser Wechsel zwischen normaler (diploider $2n$) und halbiertes (haploider $1n$) Chromosomenzahl ist bei Pflanzen viel ausgeprägter als bei Tieren. Während sich bei Tieren die Zellen, die aus einer Reifeteilung hervorgehen, direkt zu Eizellen und Spermien entwickeln, bilden die Zellen mit reduzierter Chromosomenzahl bei Pflanzen (sogenannte Sporen) eine unabhängige zweite Generation des Lebenszyklus [5]. Die Sporen untergehen Zellteilungen und bilden einen Organismus, der vollständig aus Zellen mit halbiertes Chromosomenzahl besteht und später die Keimzellen (oder Gameten) bildet. Da dieser Organismus die Gameten produziert, wird er als Gametophyt bezeichnet, während die sporenbildende Generation des pflanzlichen Lebenszyklus Sporophyt genannt wird (Abbildung 1). Bei niederen Pflanzen, z. B. Moosen, besteht der Gametophyt aus Tausen-

den von Zellen und bildet die dominante Generation des Lebenszyklus (Abbildung 2a). In der Evolution der höheren Pflanzen wurde der Gametophyt immer mehr reduziert. Während er bei Farnen noch immer freilebend, aber doch viel kleiner als der Sporophyt ist (Abbildung 2b), bestehen die Gametophyten der Blütenpflanzen aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen und entwickeln sich innerhalb der Geschlechtsorgane der Blüte. Unser Interesse gilt dem weiblichen Gametophyten oder Embryosack (Abbildung 2c), der die weiblichen Gameten bildet und sich innerhalb der Samenanlagen des Fruchtknotens entwickelt.

Modellsystem Arabidopsis

Für unsere Studien benutzen wir die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand). *Arabidopsis* birgt viele Vorteile für den Genetiker, der Entwicklungsvorgänge studieren will. Die Pflanze ist klein, hat eine kurze Generationszeit von 6 bis 8 Wochen, ist selbstbefruchtend und produziert eine grosse Anzahl von Nachkommen [6]. Eine Keimzelle von *Arabidopsis* hat nur 5 Chromosomen und das kleinste bekannte Genom (Gesamtheit aller Erbinformation) aller Pflanzen, das bis Ende 2000 ganz entschlüsselt sein wird. (www.arabidopsis.org/agi.html) Der Embryosack von *Arabidopsis* (Abbildung 2c) ist typisch für 70% der Blütenpflanzen und besteht aus nur sieben Zellen. Obschon diese Zellen alle aus einer einzelnen Spore hervorgegangen sind, haben sie sich sehr unterschiedlich entwickelt und vollführen spezifische Funktionen. Im Embryosack gibt es vier Zelltypen, zwei davon werden von je einem Spermium befruchtet (Doppelbefruchtung) und entwickeln sich zum Samen [7]. Die befruchtete

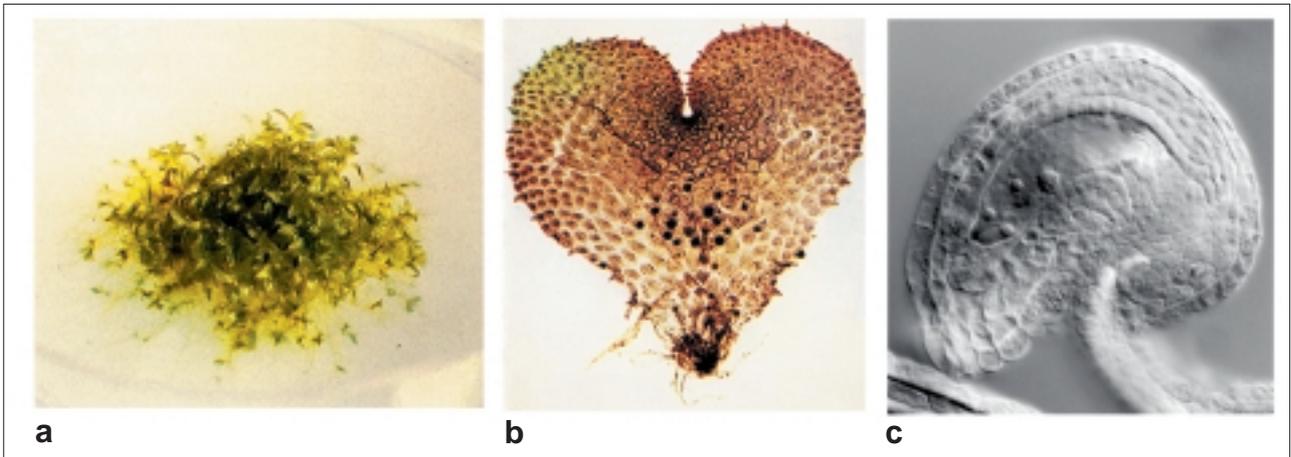


Abbildung 2 Evolution der Gametophyten. Die Gametophyten von Moos (a) und Farn (b) sind noch freilebend und bestehen aus einer grossen Anzahl von Zellen. Der weibliche Gametophyt der Blütenpflanzen entwickelt sich innerhalb der Samenanlage und besteht aus nur sieben Zellen (c).

Eizelle bildet den Embryo und schliesslich den Sämling, während die befruchtete Zentralzelle ein Nährgewebe, den Endosperm, bildet. Dieser ist ökonomisch von enormer Bedeutung macht er doch circa 80% eines Weizen-, Reis- oder Maiskorns aus. Was steuert diese so unterschiedliche Entwicklung von Embryo und Endosperm, welcher seine Existenz zu Gunsten des Embryos aufgibt? Welche Erbfaktoren führen dazu, dass die Ei- und Zentralzelle, die nur durch eine einzige Zellteilung voneinander getrennt sind, so unterschiedliche Produkte bilden? Wie wird die Arbeitsteilung (Zellspezialisierung) zwischen den Zellen des Embryosacks geregelt? Warum verschmelzen die Spermien, die durch den Pollenschlauch zum Embryosack transportiert werden, nur mit der Ei- und Zentralzelle und nicht mit ihren Schwesterzellen?

Trotz der grossen Wichtigkeit der Keimzellenbildung, Befruchtung und Samenentwicklung für die Pflanzenzucht und Samenproduktion (Saatgut, Nahrungs- und Futtermittel) liegen die genetischen Grundlagen dieser Entwicklungsprozesse noch weitgehend im Dunkeln. Nur wenige Erbfaktoren (Gene), welche diese Prozesse steuern wurden bisher identifiziert und noch weniger auf molekularer Ebene erforscht [5]. Unser Ziel ist es, in den nächsten Jahren die genetische Steuerung dieser wichtigen Prozesse besser zu verstehen und unsere Erkenntnisse auszunützen, um die Möglichkeiten der Pflanzenzucht zu verbessern. Insbesondere möchte wir einen Beitrag leisten zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche

- 1) zur Bildung der Sporen führen
- 2) die Spezialisierung der Zellen im Embryosack steuern
- 3) die Doppelbefruchtung kontrollieren
- 4) an der mütterlichen Kontrolle der Samenbildung beteiligt sind

___Potentielle Anwendungen: Apomixis

Erkenntnisse auf diesen Gebieten sind nicht nur aus der Sicht des Entwicklungsbiologen hochinteressant, sondern bergen auch ein grosses Potential für agronomische Anwendungen. Im Zentrum unserer Forschung stehen daher Entwicklungsschritte, welche langfristig eine Veränderung der Fortpflanzungsprozesse mittels Gentechnologie ermöglichen. Wir sind speziell an Apomixis interessiert [8], ein Prozess, der die exakte Vervielfältigung von Pflanzen erlaubt und bei circa 700 Pflanzen natürlich vorkommt. Apomixis wurde in Zürich seit Beginn dieses Jahrhunderts durch die Dres. A. Ernst, A. Rütishauser und G. Nagler studiert. Die Einführung von Apomixis in Kulturpflanzen verspricht soziale und ökonomische Vorteile, welche die der Grünen Revolution, die Millionen von Menschen das Leben gerettet hat, bei weitem übersteigen [9]. In apomiktischen Pflanzen sind ganz bestimmte Entwicklungsschritte während der Fortpflanzung verändert. Ein besseres Verständnis der genetischen und molekularen Grundlagen dieser Prozesse ist deshalb der erste Schritt auf dem Weg zur Entwicklung von Apomixis in Kulturpflanzen [10]. Diese

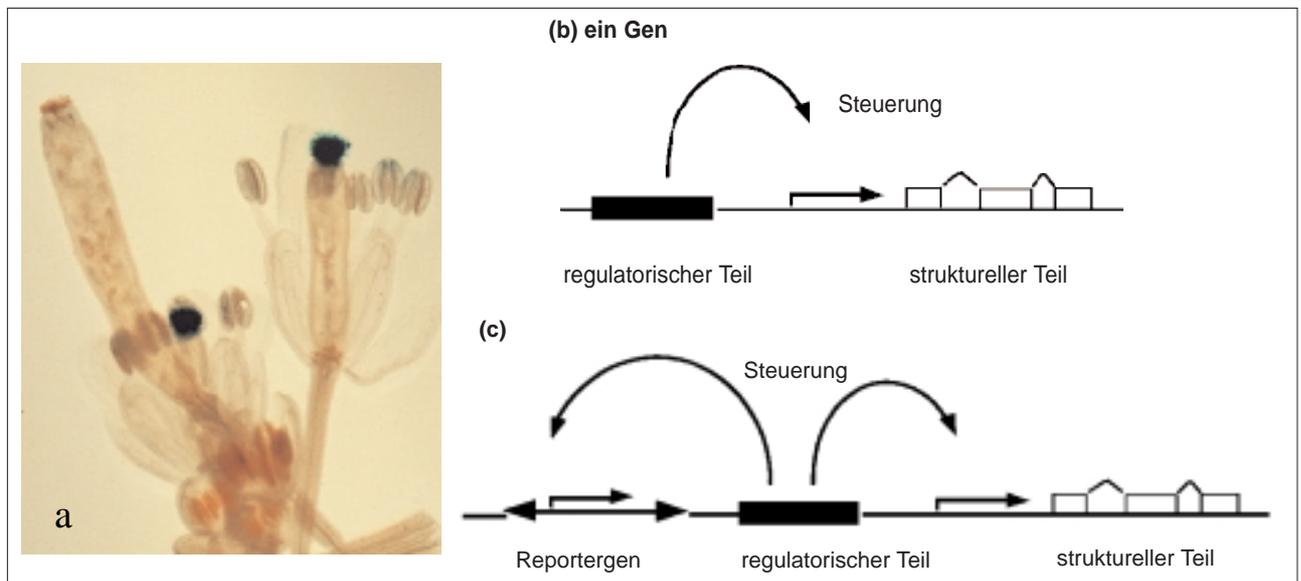


Abbildung 3 Enhancer Detektion. Ein Gen besteht im allgemeinen aus einem strukturellen Teil, der die Information für eine bestimmte Eiweisskette enthält, und einem regulatorischen Teil, der die Aktivität des Gens kontrolliert (a). Diese Kontrollsequenzen können auch auf andere Gene, zum Beispiel ein Reporter-gen, wirken (b), so dass das Reporter-gen in der gleichen Weise reguliert wird und zum Beispiel nur in den Zellen der Narbe (blaue Färbung) aktiv ist (c).

Technologie wird vor allem auch den Ländern des Südens, die heute kaum von Züchtungsprogrammen profitieren und daher jedes Jahr einen Großteil der Ernte verlieren, grosse Vorteile bringen. Daher ist es wichtig, dass die Grundlagen allgemein zugänglich sind und in der Öffentlichkeit bleiben (<http://billie.harvard.edu/apomixis>).

Die Suche nach den Erbfaktoren: Gene bekennen Farbe

Wie können wir nun aber die Erbfaktoren identifizieren, die für die Entwicklungsprozesse während der Fortpflanzung eine wichtige Rolle spielen? Alle Zellen eines Organismus enthalten die exakt gleiche Erbsubstanz. Daher ist es wichtig welche dieser Gene in einer bestimmten Zelle oder während eines Prozesses ausgeprägt werden. Mit anderen Worten sind während eines Entwicklungsprozesses nur bestimmte Gene aktiv und die Zusammensetzung der Gruppe von aktiven Genen ändert sich mit dem Fortschreiten des Prozesses [11]. Die Suche nach Erbfaktoren, die während eines bestimmten Prozesses aktiv sind, gleicht der Suche nach der Nadel im Heuhaufen und wird umso schwieriger, je weniger Zellen an diesem Prozess beteiligt sind. Wie können wir einen Erbfaktor finden, der zum Beispiel nur in

der Eizelle aktiv ist? Wir benutzen dazu eine Methode (Enhancer Detektion), die zuerst für *Drosophila* entwickelt wurde und die Sichtbarmachung von aktiven Erbfaktoren ermöglicht [11,12].

Um diese Methode zu erklären, muss ich zuerst noch zwei Punkte erläutern. Erbfaktoren bestehen im allgemeinen aus zwei Komponenten. Zum einen aus DNS Sequenzen, welche die Information für ein bestimmtes Eiweiss enthalten, zum anderen aus Sequenzen, welche die Information enthalten, wo und wann dieses Gen aktiv sein soll (Figur 3b). Diese Kontrollsequenzen werden auch Enhancer genannt und können nicht nur auf das dazugehörige Gen wirken, sondern auch auf andere Gene, die sich in ihrer Nachbarschaft befinden. Diese Eigenschaft kann man nutzen, indem Gene, deren Aktivität man einfach nachweisen kann (z. B. durch eine Färbereaktion), die aber keine eigenen Kontrollsequenzen tragen, in die Erbsubstanz integriert werden (Abbildung 3c). Diese Reporter-gene können dann sozusagen die Kontrollsequenzen und die dazugehörigen Gene in der Erbsubstanz aufspüren. Mit Enhancer Detektion können also in bestimmten Zellen aktive Gene durch eine Färbereaktion identifiziert werden. So ist zum Beispiel das in Abbildung 3a gezeigte Gen nur in den Zellen der Narbe der Arabidopsis Blüten aktiv (blaue Färbung).

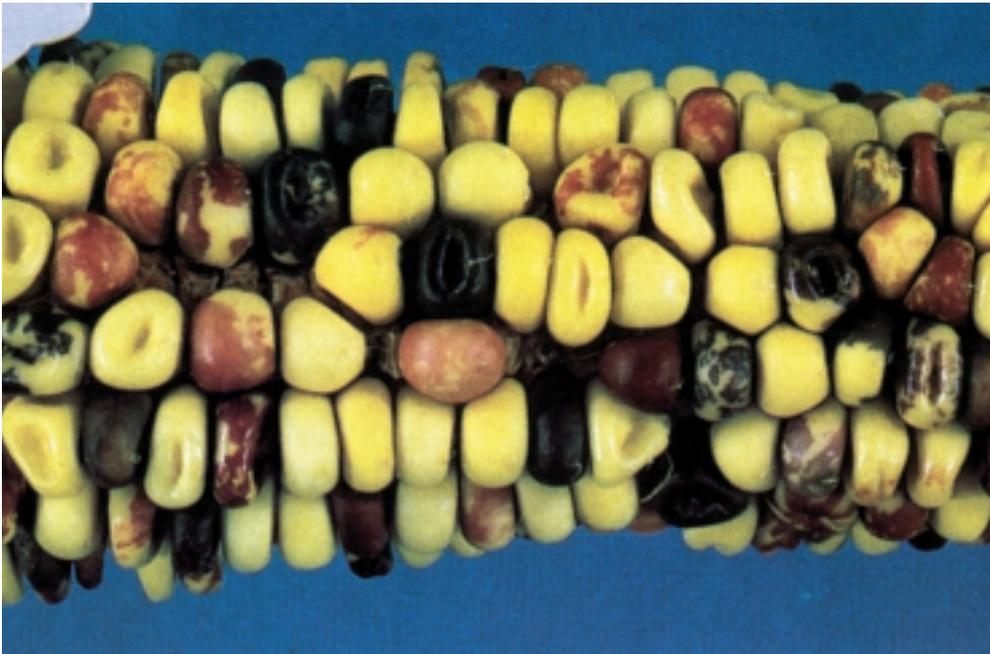


Abbildung 4 Maiskolben mit sichtbarer Aktivität von hüpfenden Genen. Ein hüpfendes Gen hat einen Erbfaktor zerstört, der für die Bildung des dunklen Pigmentes wichtig ist (gelbe Körner). Überall, wo das hüpfende Gen wieder herauspringt, entsteht ein dunkler Fleck.

___ Hüpfende Gene zeigen den Weg

Um diese Reportergene an möglichst verschiedene Stellen in der Erbsubstanz zu bringen, werden «hüpfende Gene» benutzt, die sich innerhalb der DNS bewegen können. Wir benutzen das sogenannte *Dissociator (Ds)* Element, das von Barbara McClintock, einer weiteren Nobelpreisträgerin, in den 40er Jahren in Mais entdeckt wurde [13]. Barbara McClintock hat auch aufgeklärt, dass ein zweites Gen, das *Activator (Ac)* Element, benötigt wird, damit das *Ds* Element herumhüpfen kann. Die Aktivität dieser Elemente ist in *Abbildung 4* illustriert. Ein *Ds* Element hat ein Gen zerstört, das für die dunkle Pigmentierung der Maiskörner verantwortlich ist und daher sind diese Körner gelb. Da auch das *Ac* Element vorhanden ist, kann das *Ds* Element heraushüpfen und das Pigmentgen wird wieder funktionsfähig. In Zellen, in denen das *Ds* Element herausgehüpft ist, wird ein wieder Pigment gemacht, was zu einem dunklen Fleck führt. Dieses System funktioniert auch in *Arabidopsis*. Das *Ds* Element wurde mit einem Reportergen ergänzt, das nun je nachdem ob *Ac* vorhanden ist oder nicht, hüpfen oder stabilisiert werden kann [14].

Wir haben dieses auf dem *Ds* Element basierende Enhancer Detektions System in *Arabidopsis* be-

nutzt, um circa 4000 Pflanzenlinien zu erzeugen, die alle ein solches Element an einer anderen Zelle in ihrer Erbsubstanz tragen. Wir haben dann die Fruchtknoten herausgezielt und sie für Reportergenaktivität gefärbt. Wir konnten so die allerersten Erbfaktoren identifizieren, die im Embryosack aktiv sind (*Abbildung 5*). Die Strukturen sind so klein, dass die Färbungen nur unter dem Mikroskop angeschaut

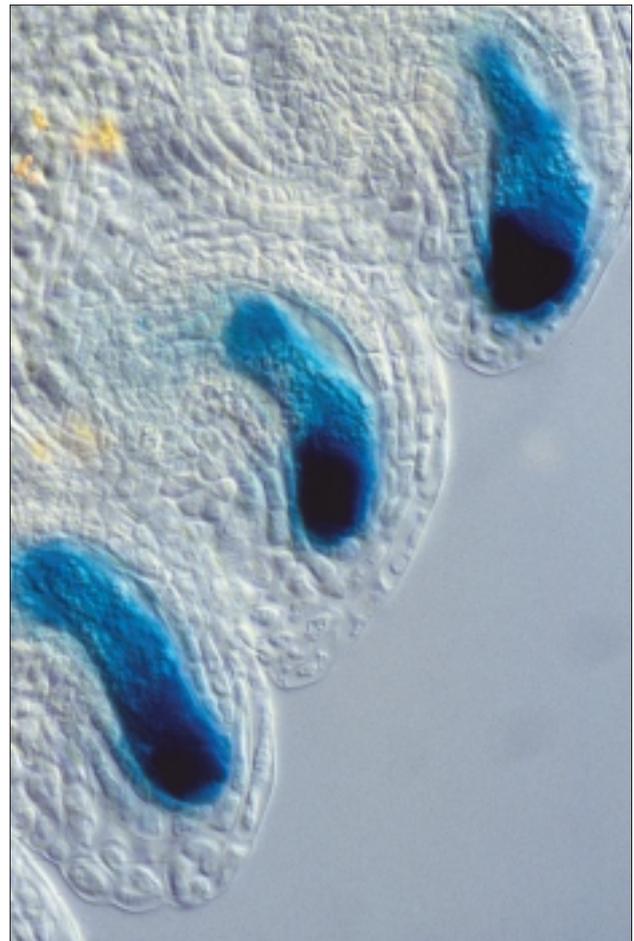


Abbildung 5 Enhancer Detektion hat ein Gen, das in den Zellen des Embryosackes aktiv ist, identifiziert. Das hier durch Färbung (blaue Färbung) sichtbar gemachte Gen ist nur in Zellen des Embryosackes, nicht jedoch in sporophytischen Zellen der Samenanlage aktiv.

werden können. Wir konnten auch Gene identifizieren, die nur in sogenannten Eiapparat aktiv sind (*Abbildung 6*) und sogar solche die nur in einer einzigen Zelle ausgeprägt werden. Gene mit so hochspezifischer Aktivität könnten auf keine andere Weise gefunden werden. Da das *Ds* Element wie eine rote Flagge die Stelle in der DNS angibt, wo sich das gesuchte Gen befindet, ist es auch ein leichtes, diese molekular zu isolieren. Wir sind dabei mehrere Gene, die nur in ganz spezifischen Zellen (z.B. der Eizelle) des Embryosackes aktiv sind, auf der molekularen Ebene zu charakterisieren. Diese Arbeiten

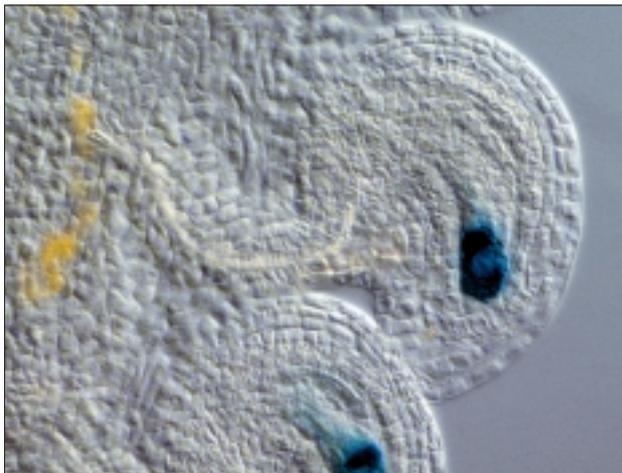


Abbildung 6 Das hier durch Färbung (blaue Färbung) sichtbar gemachte Gen ist nur in der Eizelle und zwei Helferzellen (Eiapparat) aktiv.

geben uns zum ersten Mal einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Entwicklung dieses für die Fortpflanzung und Samenbildung zentralen Organismus.

___Dank

Ich danke James Moore für *Abbildung 1* und den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre wertvolle Mitarbeit und ihren Enthusiasmus. Arbeiten in meinem Labor werden unterstützt durch die Europäische Molekularbiologie Organisation, die Novartis Forschungsförderung, den «Searle Family Trust», den Kanton Zürich und das Bundesamt für Bildung und Wissenschaft.

Literatur

- 1) Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-70.
- 2) Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. Nüsslein-Volhard C, (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- 3) Grossniklaus, U., Bellen, H.J., Wilson, C. and Gehring, W.J. (1989). P-element mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development* **107**: 189-200.
- 4) Grossniklaus, U., Cadigan, K.M. and Gehring, W.J. (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. *Development* **120**: 3155-3171.
- 5) Grossniklaus, U. and Schneitz, K. (1998). Genetic and molecular control of ovule development and megagametogenesis. *Seminars in Cell & Devl. Biol.*, 9: 227-238.
- 6) Meyerowitz, E.M. (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* **56**: 263-269.
- 7) Russell, S.D. (1992). Double fertilization. In *Sexual reproduction in flowering plants*. (Russell, S.D. and Dumas, C. eds.) International Review of Cytology 140. Academic Press, New York, USA, pp. 357-388.
- 8) Nogler, G.A. (1984). Gametophytic apomixis. In *Embryology of Angiosperms* (Johri, B.M. ed.) Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 475-518.
- 9) Grossniklaus, U., Koltunow, A. and van Lookeren Campagne, M. (1998). A bright future for apomixis. *Trends in Plant Sciences*, 3: 415-416.
- 10) Grossniklaus, U., Moore, J.M. and Gagliano, W.B. (1998). Molecular and genetic approaches to understanding and engineering apomixis: *Arabidopsis* as a powerful tool. In *Advances in Hybrid Rice Technology*. Proceedings of the 3rd International Symposium on Hybrid Rice 1996 (Virmani, S.S., Siddiq, E.A., Muralidharan, K., eds.) International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp. 187-211.
- 11) O'Kane, C. and Gehring, W.J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9123-9127.
- 12) Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K. and Gehring, W.J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & Dev.* **3**: 1288-300.
- 13) McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **36**: 344-349.
- 14) Sundaresan, V., Springer, P.S., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.A. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Dev.* **9**: 1797-1810.