

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

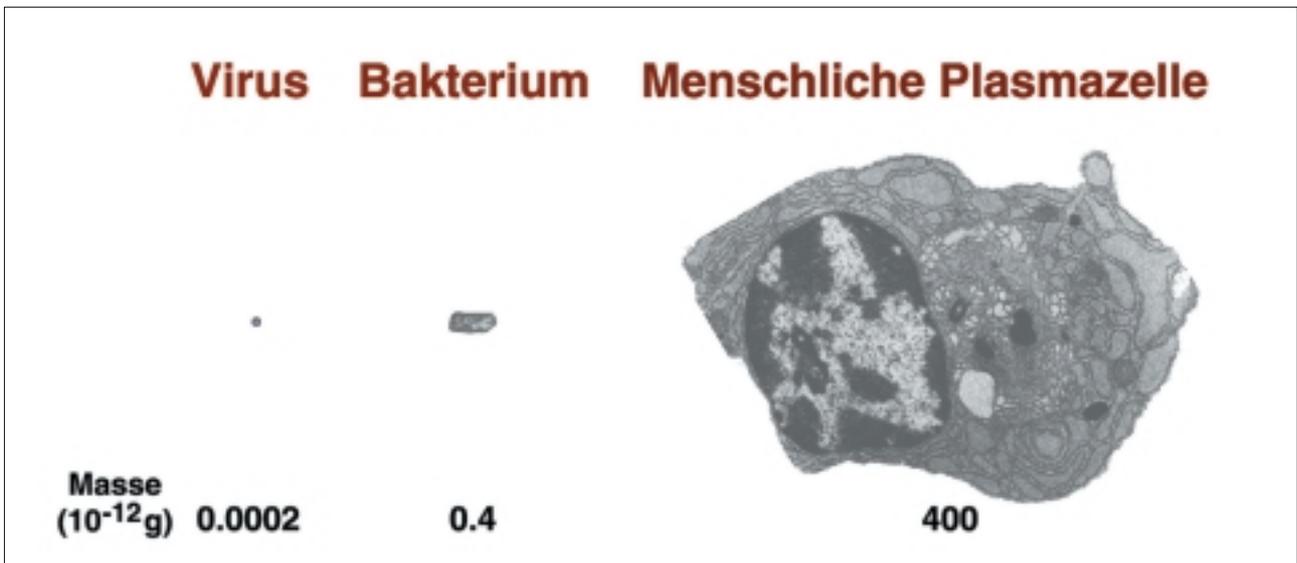


Abbildung 1 Ungefähre Dimensionen und Massen (10^{-12} g = 0.000'000'000'001 g) eines Adenovirus, eines Bakteriums und einer Plasmazelle. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen aus ultradünngeschnittenen Präparaten stammen aus einem Lehrbuch der Zellbiologie (Lodish et al. 2000).

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-

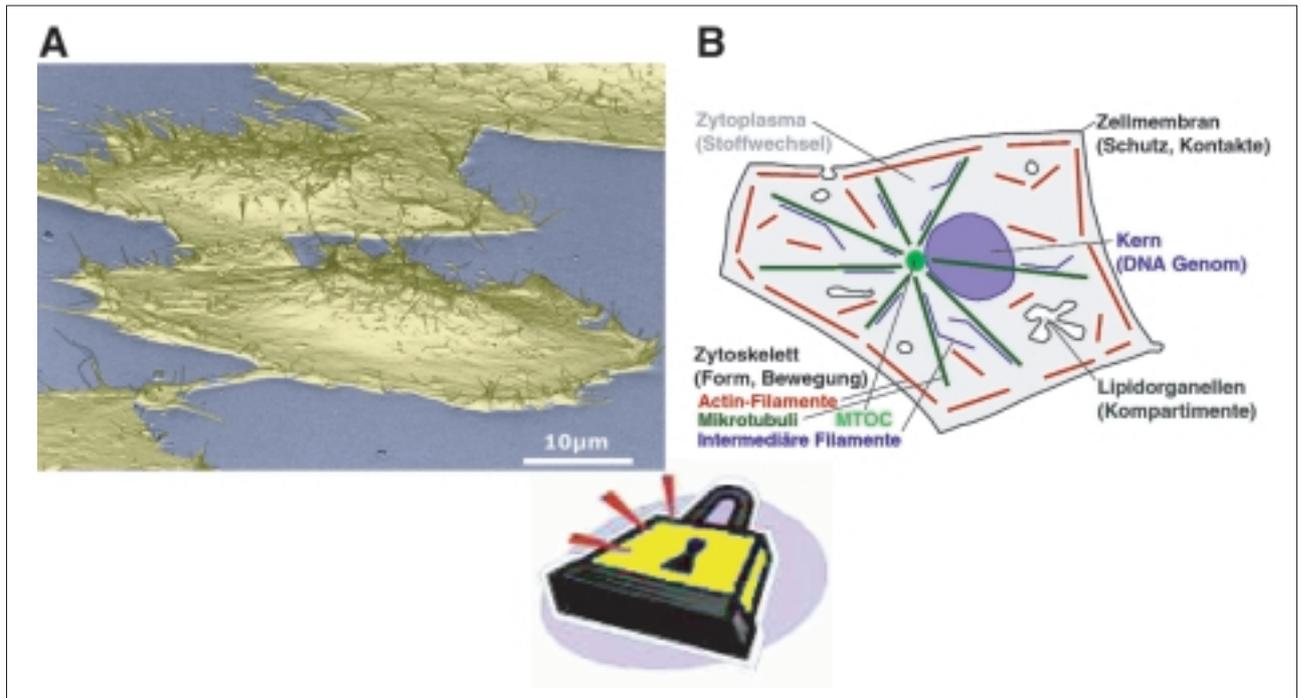


Abbildung 2 A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme kultivierter menschlicher HeLa-Zellen (Bild R. Stidwill und K. Boucke). B) Vereinfachte schematische Darstellung einer menschlichen oder tierischen Zelle mit Organellen.

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-

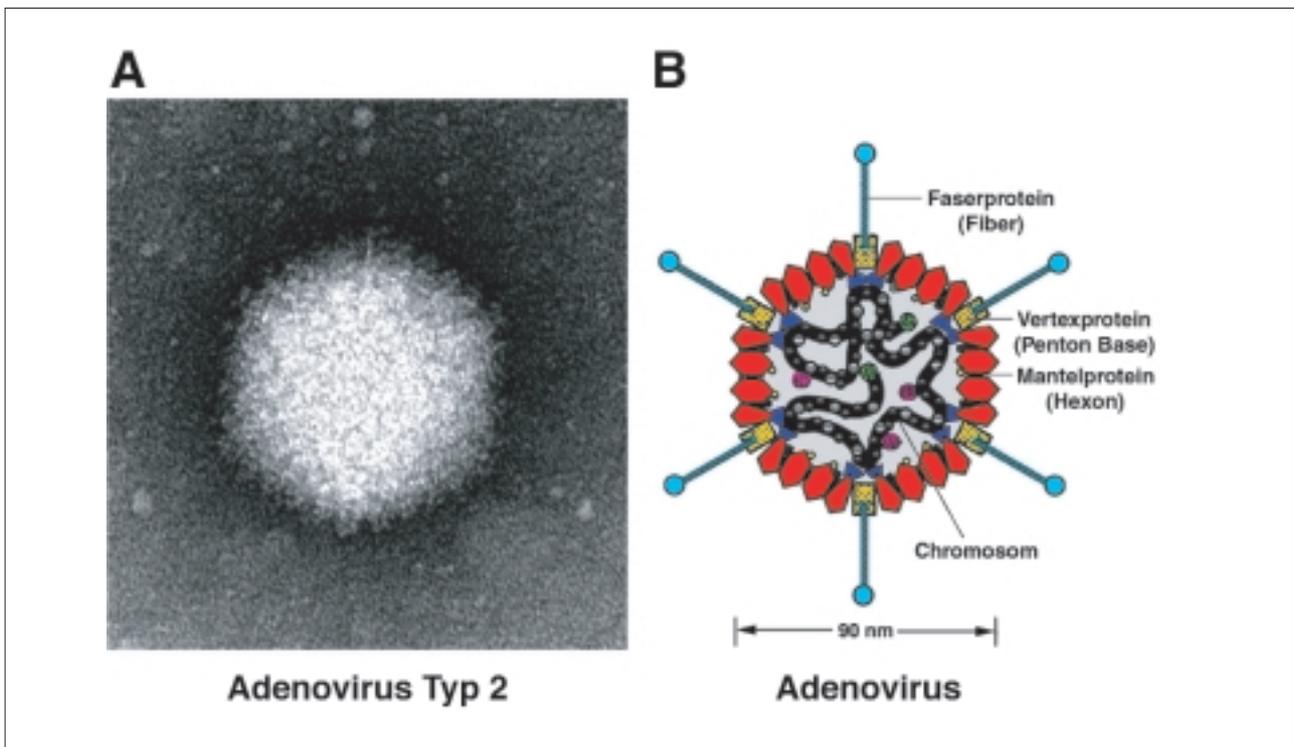


Abbildung 3 A) Transmissionselektronenmikroskopische Abbildung eines isolierten Adenovirus des Typs 2 nach Kontrastierung mit Ammoniummolybdat (Bild K. Boucke). B) Schematische Darstellung des Adenovirus.

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-

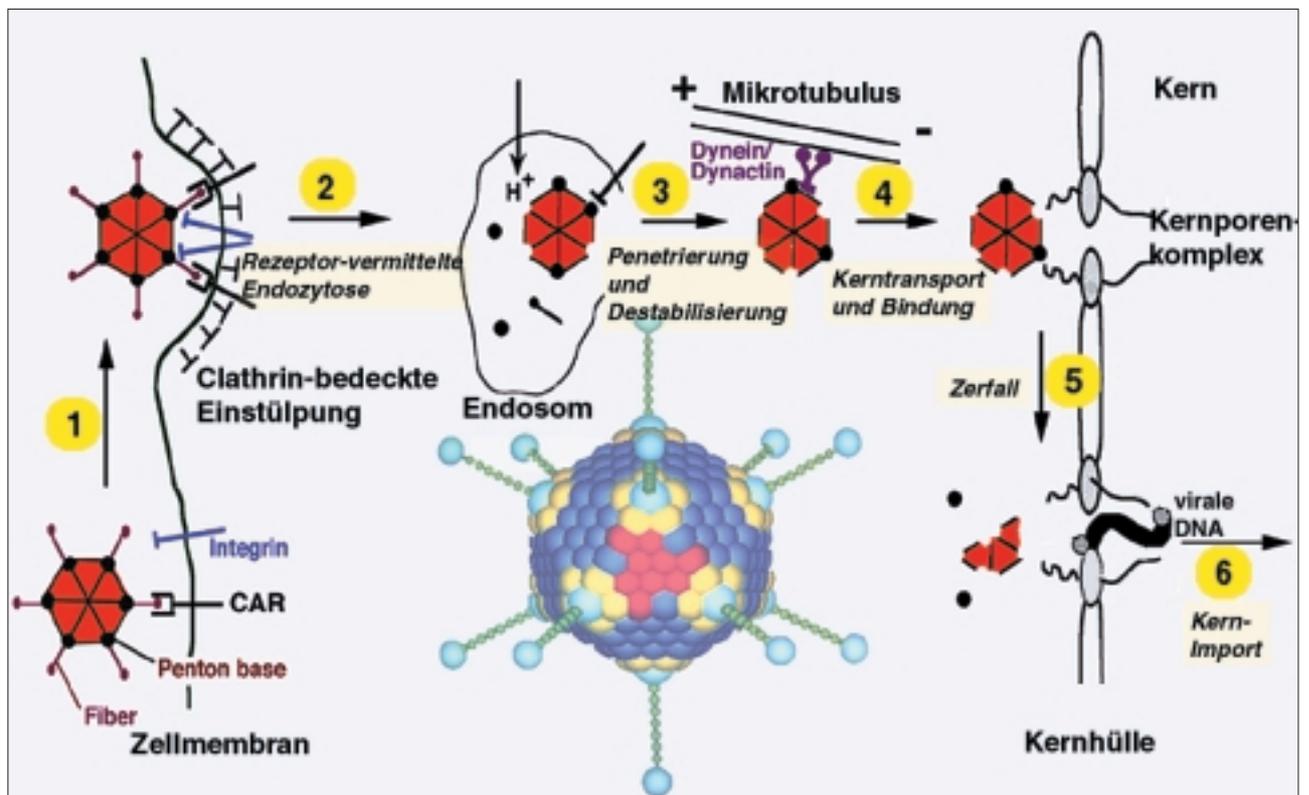


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Adenovirus-Eintritts in die Zelle. (siehe auch Stidwill and Greber 2000).

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.

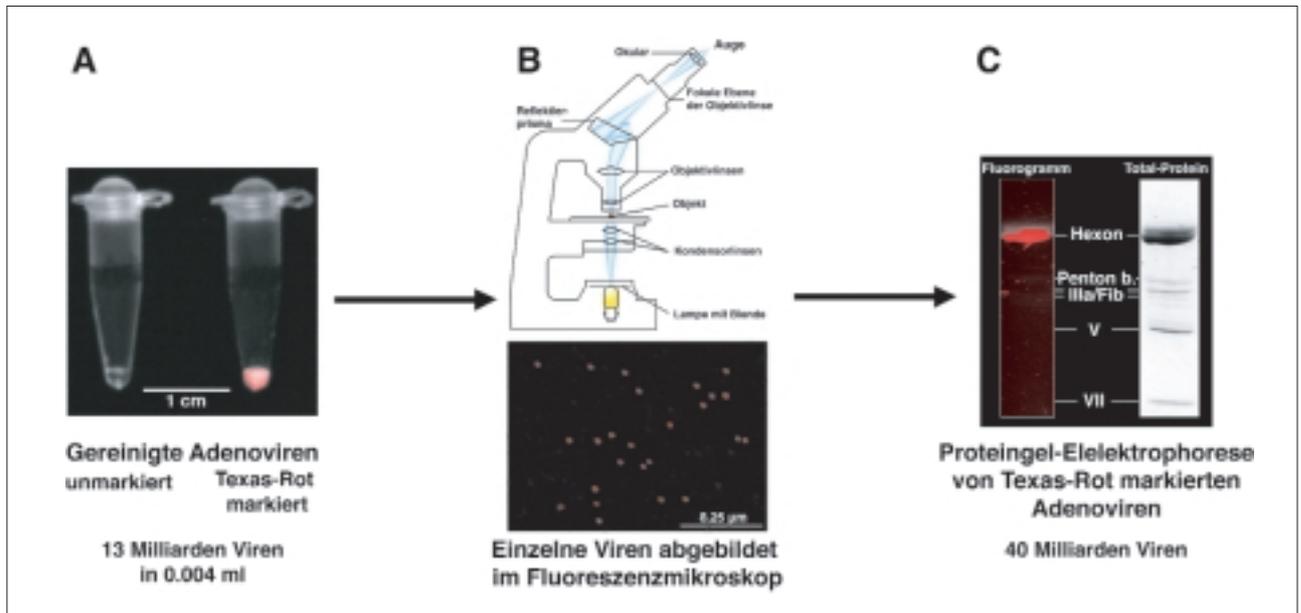


Abbildung 5 Gereinigte Texas-rot markierte Adenoviruslösung im Reaktionsgefäß (A), als Einzelpartikel abgebildet im Fluoreszenzmikroskop (B) und biochemisch analysiert durch Proteingel-Elektrophorese und Fluorographie (C). Für Details, siehe (Nakano and Greber 2000).

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

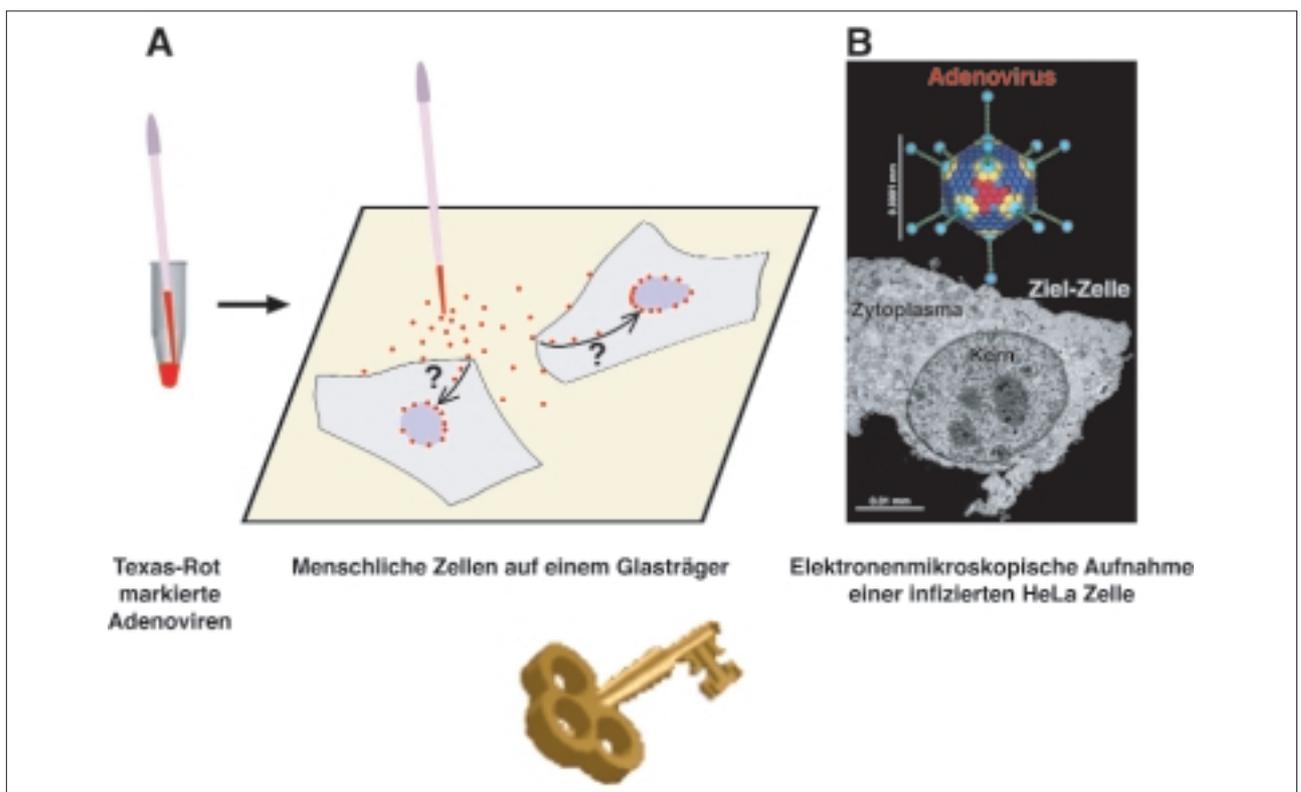


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Zellinfektion mit fluoreszierenden Adenoviren (A) und elektronenmikroskopische Abbildung einer infizierten HeLa Zelle mit schematischer Darstellung des Adenovirus (B). Zu beachten sind die unterschiedlichen Vergrößerungen der Abbildungen.

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.

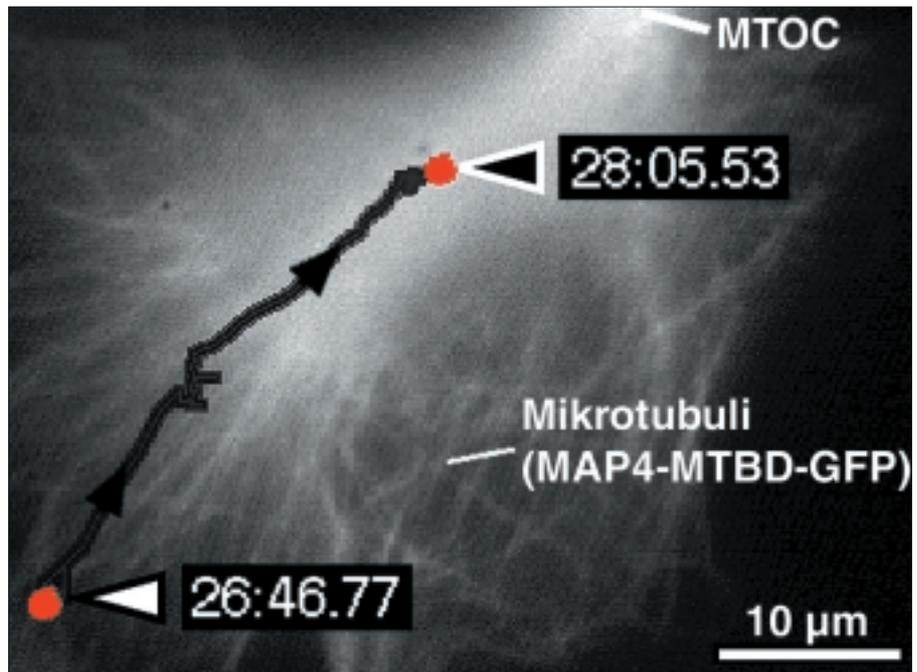


Abbildung 7 Die Bewegung eines einzelnen Texas-rot markierten Adenovirus-Partikels in einer infizierten Affenzelle während 1 Minute und 18.76 Sekunden, dargestellt durch eine schwarze Linie mit Pfeilköpfen in Netto-bewegungsrichtung. Die Aufnahmen begannen 26 Minuten und 46.77 Sekunden nach der Infektion. 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.