

Aktuelle Perspektiven in der molekularen Virologie

F. Schwarzmann, R. Wagner, J. Mayer, U. Reischl, H. Wolf
 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Direktor:
 Prof. Dr. Dr. H. Wolf) der Universität Regensburg

Für ihre Vermehrung sind Viren auf den Stoffwechsel und die zelluläre Infrastruktur höherer Organismen angewiesen. Diese aber verfügen über sehr effektive Abwehrmechanismen. Der Einsatz moderner virologischer Methoden ermöglicht detaillierte Untersuchungen der Beziehungen zwischen Virus und Wirtsorganismus auf molekularer Ebene und führt zu einem Einblick in die Strategien, die Viren anwenden, um die Kontrollsysteme des Wirts zu umgehen und Nachkommenviren zu erzeugen. In Kenntnis der molekularbiologischen Vorgänge bei der Infektion bzw. der Replikation von Viren gelingt es dem Menschen in zunehmendem Maße gegenzusteuern. Dies kann auf molekularbiologischem Weg, z. B. über die Entwicklung geeigneter Impfstoffe, geschehen, oder die Viren werden sogar als Werkzeuge zur gezielten Therapie bestimmter, beispielsweise genetisch bedingter Krankheiten benutzt. Aufbauend auf dem gegenwärtigen Stand der virologischen Forschung werden neue Wege der Impfstoffentwicklung und Gentherapie aufgezeigt. Entwicklung neuer wie auch Verbesserung bestehender Testsysteme auf der Grundlage virologisch-molekularbiologischer Entwicklungen führten zu einer Steigerung von Spezifität und Sensitivität des Nachweises von viralen Erregern.

Schlüsselwörter: virale Pathogenese, Immunmodulation, Onkogene, Vakzine, Gentherapie

F. Schwarzmann, R. Wagner, J. Mayer, U. Reischl, H. Wolf (Regensburg/Germany): Actual Perspectives in Molecular Virology

For reproduction viruses depend on the metabolism of higher organisms that use a variety of different antiviral mechanisms for defense. Insights into virus-host cell interactions and in the strategies viruses employ to produce progeny virions were possible by sophisticated methods of modern virology. Knowing about the molecular mechanisms during infection and replication we have been able to counteract viral attacks on the molecular level by rationally designed vaccines. On the other hand these viruses can be used as molecular vector tools for treatment of e. g. genetically determined diseases. On the basis of new molecular-biological methods the sensitivity of detection of infectious agents and diagnosis of diseases could be drastically improved.

Key words: viral pathogenesis, immune modulation, oncogenes, vaccine, gene therapy

Viren sind einfach aufgebaute Strukturen aus Nukleinsäure (DNS oder RNS), Proteinen und Lipiden. Da sie über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen, sind sie zu ihrer eigenen Vermehrung auf andere Organismen angewiesen. Die bemerkenswerteste Eigenschaft der Viren liegt in ihrer Fähigkeit, mit einem Minimum an eigener Erbinformation einen weit aus komplexeren Wirtsorganismus für ihre Zwecke zu nutzen. Im Zuge der Evolution haben allerdings die Wirtsorganismen ver-

schiedene spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen gegen die manchmal sogar tödlichen Erreger entwickelt. Das Spektrum erstreckt sich vom primitiven Restriktionsendonukleasesystem der Bakterien bis zum äußerst komplex aufgebauten Immunsystem der Wirbeltiere mit humoraler und zellulärer Immunantwort. Trotz vielfältiger antiviraler Mechanismen gelingt es den Viren dennoch, Nachkommenviren freizusetzen und damit ihren Bestand in der Population zu sichern.

Wie sich Viren der Kontrolle des Immunsystems entziehen

Um im Wirtsorganismus in Gegenwart eines intakten Immunsystems Nachkommenviren produzieren zu können, werden zwei unterschiedliche Strategien beobachtet. Der Weg z. B. der Rhino-, Orthomyxo- oder Togaviren ist die möglichst *rasche und effektive Replikation und Produktion von Nachkommenviren*, ehe der Organismus mit einer spezifischen Immunantwort reagieren kann. Im Verlauf der Infektion kommt es zur vollständigen Eliminierung der Viren im Organismus und zum Aufbau einer Immunität gegen den Erreger. Unterschiede in Oberflächenantigenen, die beispielsweise bei Rhino- und Adenoviren zu einer großen Anzahl verschiedener Serotypen führen, verschaffen den Viren einen kleinen, aber entscheidenden Vorteil gegenüber der Immunabwehr der Wirtsindividuen.

Andere Viren verfolgen eine andere Strategie und führen nach der Erstinfektion zu *persistierenden oder latenten Infektionen*, in deren Verlauf sie über einen längeren Zeitraum in der Lage sind, Nachkommenviren zu produzieren, ohne vollständig aus dem Organismus eliminiert zu werden. Um sich auf Dauer im Organismus behaupten zu können, haben gerade diese Viren modulatorische Mechanismen entwickelt, die die Immunantwort des Wirts stören oder erheblich einschränken (13).

Virale Modulation der Immunreaktion: Bei verschiedenen Viren konnte eine Reihe von viruskodierten Proteinen identifiziert werden, die direkt die Immunabwehr des Wirts beeinflussen (s. Tab. I) (13). Die durch Interferon (IFN) vermittelten antiviralen Mechanismen sind das Ziel verschiedener viraler Proteine. Epstein-Barr-Virus (EBV) kodiert beispielsweise für ein Interleukin-10-Homolog, das die Synthese von *IFN γ* und *IL-2* in T-Helferzellen hemmt und damit eine Immunreaktion unterdrückt (17, 46). Zwei kleine, während der Latenz abundant transkribierte, aber nicht translatierte RNS-Moleküle (EBER-1/2) bewirken ebenfalls eine Hemmung IFN-induzierter antiviraler Mechanismen. Durch Inaktivierung der IFN-induzierten Proteinkinase DAI (p68), die eine Phosphorylierung und dadurch eine Inaktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF2 der Translation bewirkt, wird eine Hemmung der Translation verhindert (8). Eine entsprechende Aktivität wurde ebenfalls für Adenoviren beschrieben, die in der späten Phase der lytischen Infektion zwei vergleichbare RNS synthetisieren (VA-RNS) (28). Adenoviren kodieren ferner für Proteine,

ÜBERSICHT

Tab. I Beispiele für Viren mit immunmodulatorischen Proteinen

Virus	Virales Genprodukt	Immunantwort
Epstein-Barr-Virus	BCRF1; IL-10-Homolog EBER-1 und EBER-2 (RNS)	Zytokine IFN-induz. Kinase DAI (p68)
Herpes-simplex-Virus 1 und 2	gC1 gE gI	Komplement Immunglobulin G, Fc-Teil Immunglobulin G, Fc-Teil
Vaccinia-Virus	VCP	Komplement
Adenovirus	VA-RNS E3-14,7K E3-10,4/14,5K E1B-19K E3-gp19K	IFN-induz. KinaseDAI (p68) TNF TNF TNF CTL-Antwort; HLA1-Transport
Zytomegalovirus	UL-18	CTL-Antwort; β_2 -Mikroglobulin
HIV	TAR	IFN

die virusinfizierte Zellen vor einer Zerstörung durch TNF, ein inflammatorisch wirksames Zytokin, schützen (49).

Auch das Komplementsystem ist Ziel immunmodulatorisch aktiver viraler Proteine. Vaccinia-Viren (22) und Herpes-simplex-Virus (16) binden Komplementfaktoren und unterbrechen damit die Komplementkaskade, die zur Lyse der infizierten Zellen führt. Außerdem verfügt Herpes-simplex-Virus (HSV) über Proteine mit Bindungsaffinität für den konstanten Fc-Teil von Immunglobulin G, wodurch ebenfalls die Komplementreaktion behindert wird (2).

Die Erkennung virusinfizierter Zellen durch MHC-I-restringierte, zytolytische T-Zellen ist ein weiteres Ziel viraler Immunmodulation. Manche Viren, wie z. B. Adeno- oder Zytomegalovirus (CMV), verursachen eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche, indem sie deren Transport auf die Zelloberfläche auf unterschiedliche Weise stören und so die Präsentation prozessierter viraler Antigene auf der Zelloberfläche verhindern (5, 49). Durch den Einsatz rekombinanter Vaccinia-Viren (s. u.) zur Expression von einzelnen Proteinen in hoher Konzentration in verschiedenen Zelllinien konnte in unserem Labor kürzlich auch ein entsprechender Effekt für eines von drei regulatorisch wirksamen, *immediate-early*-Genen der lytischen Replikation von EBV gezeigt werden (4).

Zelluläre Modulation der viralen Genexpression: Beim Epstein-Barr-Virus, einem humanpathogenen Herpesvirus, spielt neben den oben beschriebenen Mechanismen zur direkten Modulation der Immunreaktion die zelltyp- und gewebespezifische Expression des viralen Genoms vielleicht die wichtigste Rolle bei der Persistenz (29,

51). Aktive Replikation und Produktion von Nachkommenviren bleibt dadurch beispielsweise bei EBV oder Papillomviren auf solche Zellschichten und Gewebe im Körper beschränkt, die nicht für das Immunsystem zugänglich sind (1, 14, 38, 50). So ist es möglich, daß EBV ständig an bestimmten Lokalisationen im Körper, wie z. B. in der Ohrspeicheldrüse oder der Gebärmutter, produziert wird, ohne daß eine humorale Immunantwort gegen virale Proteine des lytischen Zyklus nachzuweisen ist. In den Zellen, die ein Reservoir für das Virus darstellen, wie z. B. wenig differenzierte, epitheliale Gewebe oder B-Lymphozyten einer bestimmten Differenzierungsstufe, wird virale DNS nur synchron zur Replikation der Wirtszell-DNS vermehrt (latente Replikation). Auf ähnliche Weise entgehen Papillomviren der Elimination durch das Immunsystem des Wirts, indem nur in den ausdifferenzierten, äußeren epithelialen Hautzellen (Keratinocyten) infektiöse Viruspartikel produziert werden (37, 41). Herpes-simplex-Virus I zieht sich nach der Primärfektion in Neuronen des ZNS zurück, wo es, ohne zu replizieren und ohne virale Proteine zu synthetisieren, vom Immunsystem nicht erkannt werden kann. Varicella-Zoster-Virus persistiert in ähnlicher Weise nach der Erstinfektion in sensorischen Neuronen. Durch verschiedene Stimuli können diese Viren zur Replikation angeregt werden, in deren Verlauf benachbarte Gewebe lytisch infiziert und Nachkommenviren freigesetzt werden.

Das oben geschilderte zelltyp- und differenzierungsspezifische Verhalten dieser Viren wird durch die Regulation des viralen Genoms durch Faktoren der Wirtszelle gesteuert. Einer der ersten und mittlerweile am genauesten charakterisierten »molekularen Schalter« ist der *origin of replication* der Polyomaviren (SV40). Dieser Bereich er-

wies sich nicht nur als essentiell für die Virusreplikation, sondern auch für die zeitlich abgestimmte Expression der frühen und späten Gene (45). Der exakten Analyse dieses Bereichs verdanken wir das heutige Bild von Kontrollregionen viraler, aber auch zellulärer Gene.

Die Umsetzung der viralen genetischen Information wird auf verschiedenen Stufen der Expression reguliert. Im regulatorisch wirksamen Promotorbereich eines Gens befinden sich einzelne, *cis*-wirksame Elemente, die durch Wechselwirkung mit *trans*-wirksamen Proteinfaktoren aktivierenden oder reprimierenden Einfluß auf die Transkriptionsrate ausüben. Zu den *trans*-wirksamen Faktoren gehören allgemein benötigte Transkriptionsfaktoren oder Enzyme der Transkriptionsmaschinerie wie auch zelltypspezifische Regulationsfaktoren, die die Expression eines Gens auf eine bestimmte Gewebeschicht beschränken. Auch viruskodierte Regulatorproteine binden an diese Elemente und steuern den kaskadenartigen Ablauf der lytischen Genexpression. Andere Regulationsmechanismen greifen auf posttranskriptionaler Ebene, wie beispielsweise dem *processing* und dem Transport der RNS, auf der Ebene der Translation oder auf posttranslationaler Ebene durch Proteinmodifikationen, Transportregulation oder Degradation an.

Die Latenz einiger Viren, wie z. B. EBV, wird vorwiegend durch die Kontrolle der Expression sehr früher (*immediate early*) Schaltgene des lytischen Replikationszyklus kontrolliert (29). Ähnliches gilt für die Latenz von HSV in Neuronen. Eine für Neuronen spezifische Isoform des Transkriptionsfaktors OCT-2 konnte als Inhibitor eines *immediate-early*-Schaltproteins und dadurch als negativer Regulator der Replikation von HSV in Neuronen identifiziert werden (25).

Wie bereits erwähnt, kodieren Viren aber auch für Faktoren, die die Expression zellulärer nichtviraler Gene steuern, wie Immunmodulatoren, oder sie wechselwirken mit der Translationsmaschinerie der Wirtszellen, um eine Expression von Wirts-RNS, zugunsten der viralen Genexpression, einzuschränken (*host shut-off*). Für Herpes-simplex-, Pocken- und Influenzaviren wurde z. B. eine Degradation der Wirts-RNS, eine Konkurrenz mit zellulären RNS durch verschiedene Mechanismen für Varicella-Zoster-Virus oder eine Veränderung der Spezifität des Translationsapparats durch Polioviren beschrieben (20).

Eine spezifische Detektion der Boten-RNS ermöglicht nicht nur den Nachweis der Präsenz eines Erregers, sondern liefert darüber hinaus eine Aussage über dessen Akti-

vität. Für die Erkennung bestimmter Krankheitsverläufe kann dies von entscheidender Bedeutung sein (z. B. chronisch aktive EBV-Infektion, Reaktivierungen von EBV und CMV bei Immunsupprimierten). Eine Kombination der PCR-Technik und der In-situ-Hybridisierung erlaubt heute den Nachweis in Geweben und selbst in einzelnen Zellen, in denen Viren latent (d. h. ohne die Expression viraler Proteine) persistieren (35).

Viren steuern die Proliferation ihrer Wirtszellen

Viren, die über längere Zeit in einem Wirt persistieren, zeigen oft eine starke Unterdrückung ihres pathogenen Potentials, so daß der Wirtsorganismus keinen lebensbedrohlichen Schaden nimmt. Ein Mechanismus kann die Suppression von Immunfunktionen betreffen, um autoaggressive Reaktionen gegen infizierte Zellen oder Organe zu verhindern (12). Einen anderen Mechanismus stellt die bereits besprochene zelltyp- und differenzierungsabhängige Kontrolle der Genexpression dar, die wichtige Gewebe vor einer virusinduzierten Zerstörung schützt. So z. B. verhindert der von der Differenzierung der Wirtszelle abhängige Übergang von der Latenz zum lytischen Zyklus der Virusvermehrung bei EBV in den wenig differenzierten Basalzellen epithelialer Gewebe eine Zerstörung nicht ersetzbarer Zellschichten.

Manche Viren besitzen nun aber zusätzlich die Fähigkeit, die Proliferation ihrer Wirtszellen positiv zu beeinflussen, indem sie die Regulation des Zellzyklus modulieren. Der Vorteil, den die Viren daraus tragen, mag in der Vergrößerung der Zahl von Wirtszellen oder in der Tatsache liegen, daß manche Viren zur Replikation eine aktiv replizierende Wirtszelle benötigen. Manchmal aber geraten Zellen, die eine solche Modulation der zellulären Proliferation zeigen, aus der Kontrolle des Wirts, und es kommt, initial mitverursacht durch virale Genprodukte, zur malignen Entartung von Zellen.

Daß Viren an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein könnten, wurde bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts an übertragbarer Leukämie bei Hühnern vermutet. Die molekulare Analyse des viralen Genoms zeigte, daß die transformierenden Bereiche nicht spezifisch für Retroviren sind, sondern aus dem zellulären Genom stammen und, begünstigt durch die Besonderheiten des Replikationszyklus der Retroviren, aus dem Genom der Wirtszelle übernommen wurden. Über molekularbiologische Analyse verschiedener transformierender Retrovi-

Tab. II Beispiele verschiedener Kategorien retroviraler Onkogene

	Onkogene	Retrovirus
Wachstumsfaktoren	Sis	Simian-Sarkom-Virus
Signalrezeptoren und Tyrosinkinasen	ErbB	Avian-Erythroblastose-Virus
	Fms	SM-Katzen-sarkomvirus
Tyrosinkinasen, membranassoziiert	Src	Rous-Sarkom-Virus
	Abl	Abelson-murine-Leukämievirus
G-Proteine	Ras	Rattensarkomvirus
Proteinkinasen im Zytoplasma	Mos	Moloney-murine-Sarkomvirus
Nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren	Jun	ASV17
	Fos	FBJ-murine-Osteosarkomvirus
Hormonrezeptoren	ErbA	AEV-ES4

ren und verschiedener Tumoren wurde bis heute eine Reihe von zellulären Proto-onkogenen identifiziert, die normalerweise wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung erfüllen (3) (s. Tab. II). Aufgrund verschiedener Mutationen können die Eigenschaften der Proteine so verändert sein, daß die normale Kontrolle des Zellzyklus entgleisen kann und die Zellen Wachstumsvorteile erhalten. Diese Vorteile können z. B. Retroviren ausnutzen, indem sie derart mutierte Onkogene in ihr Genom aufnehmen (s. Tab. II). Eine Expression dieser Funktionen ist aber nicht essentiell für die Virusreplikation.

Obwohl DNS-Viren keine Onkogene aufweisen, wie sie für Retroviren beschrieben sind, verfügen einige über Proteine, die durch Interaktion mit zellulären Regulatorgenen zur Lockerung der Wachstumskontrolle einer infizierten Zelle führen. Im Gegensatz zu den Onkogenen der RNS-Viren sind diese Faktoren, soweit bekannt, für die Replikation der DNS-Viren unerlässlich. Zwei zelluläre Kontrollproteine des Zellzyklus, das Retinoblastomprotein p105 Rb und das Protein p53 (23, 48), kristallisierten sich in letzter Zeit als Ziele der Modulation durch verschiedene Viren heraus (s. Tab. III). Diese zellulären Proteine haben Einfluß auf die Regulation des Zellzyklus und wurden ursprünglich bei der molekularbiologischen Analyse von verschiedenen Tumoren entdeckt, wo sie oft

als mutierte Formen vorliegen oder deletiert sind. Aufgrund der Tatsache, daß unter bestimmten Konstellationen eine Deletion beider Allele oder Mutationen, die einen Verlust der Funktion zur Folge haben, die Entstehung von Tumoren fördern, spricht man auch von Antionkogenen, obwohl dies sicher nicht für alle Mutationen zutrifft (23).

Verschiedene Viren, wie z. B. SV40-Virus, Adenovirus Typ 5, Papillomvirus und auch EBV, beeinflussen die Funktion dieser zellulären Faktoren auf teils unterschiedlichen Wegen (6, 48). Diese Interaktion mag für die Viren positive Auswirkungen auf die Proliferation der Wirtszellen haben. Durch verschiedene Ereignisse, wie z. B. Mutationen der zellulären Proteine p53 oder p105 Rb oder Deregulation der viralen Modulatoren, kann es wie bei den Retroviren zur Entstehung von Tumoren kommen.

Auch wenn Assoziationen von Viren mit Tumoren in bestimmten Fällen bekannt sind und die Erreger meist auch im Tumor nachzuweisen sind, ist deren Rolle bei der Pathogenese nicht gesichert, solange der tumorerzeugende Mechanismus auf molekularer Ebene nicht geklärt ist. Dies gilt beispielhaft für das Epstein-Barr-Virus, das mit unterschiedlichen Neoplasien, wie Nasopharynxkarzinom (NPC) (52), Burkitt-Lymphom (BL) (32) und Hodgkin-Krankheit (HD, Hodgkin's disease) (9, 31, 33), assoziiert ist. Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung konnte die Assoziation von NPC und EBV auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden (52). Einzelne Gene haben zwar in Zellkultur transformationsähnliche Eigenschaften, und das Virus ist in der Lage, B-Lymphozyten zu immortalisieren, ein in vivo transformierendes Onkogen ist allerdings bislang nicht beschrieben worden. Die Entstehung eines Tumors stellt einen Mehrstufenprozeß dar, wobei Viren unter bestimmten Umständen begünstigende Kofaktoren darstellen. In

Tab. III Beispiele viraler Proteine in Wechselwirkung mit Regulatorproteinen des Zellzyklus p53 und p105 Rb

Virus	Virales Genprodukt	Zelluläres Zielprotein
Epstein-Barr-Virus	BZLF1 EBNA5	p53 p53, p105 Rb
Adenovirus	E6 E7	p53 p105 Rb
SV40-Virus	großes T-Ag	p53, p105 Rb
Papillomvirus	E1A E1B	p105 Rb p53

diesem Zusammenhang könnte z. B. durch EBV bei einer Schwächung des Immunsystems die Anzahl EBV-Genom-tragender, prämaligener Zellen oder entsprechender Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums, die für bestimmte Mutationen differenzierungsbedingt prädestiniert sind, durch die immortalisierenden Eigenschaften des Virus so vergrößert werden, daß die Zufallswahrscheinlichkeit für die Entstehung eines bestimmten Tumors erhöht wird. Verschiedene mögliche Rollen sind für das Hepatitis-B-Virus (HBV) und die Entstehung des primären Leberzellkarzinoms (PHCC) beschrieben (11). Obwohl eine chronische Infektion von HBV eindeutig zu einem stark erhöhten Risiko für PHCC führt, konnte kein einzelnes Genprodukt in allen Tumoren für die maligne Entartung verantwortlich gemacht werden. Vielmehr ist die Entstehung des Tumors das Produkt verschiedenster zellulärer und virusinduzierter Veränderungen des zellulären Genoms und möglicherweise dem Einfluß regulatorischer viraler Proteine unterworfen.

Expressionssysteme für rekombinante Proteine auf der Grundlage viraler Systeme

Gerade die limitierte Anzahl von Leserahmen und der dazugehörigen Kontrollregionen, die durch virale Genome kodiert werden, erlaubte in der Vergangenheit detaillierte Studien zur Regulation der viralen Genexpression.

Die Kenntnis der Funktionsweise der SV40-Promotor-*enhancer*-Einheit in Kombination mit dem *large T antigen* führte bereits frühzeitig zur Entwicklung von Zellkultursystemen, um ausgesuchte Antigene in eukaryotischen Zelllinien unter Kontrolle dieses Promotors zu exprimieren (10, 45). Begünstigt wurde dieses Vorhaben durch die hohe Aktivität vieler viraler Promotoren und eine oft geringe Gewebespezifität, die die Expression eines Fremdgens unter Kontrolle desselben Promotors in unterschiedlichen Zelltypen zulassen. Dementsprechend sind die derzeit am häufigsten verwendeten Promotoren von SV40, Zytomegalovirus (CMV) und Rous-Sarkom-Virus (RSV), abgeleitet. Mittels *stabil transfizierter Zelllinien*, mit Expressionsplasmiden, die in das zelluläre Genom integriert sind, lassen sich große Mengen und – im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen – oft korrekt gefaltete und posttranslational modifizierte Proteine exprimieren. Dies ist von Bedeutung, da biologische Funktionen, wie die enzymatische Aktivität oder die Immunogenität exprimier-

ter Proteine, oft von der intakten Faltung und korrekten Modifikation abhängig sind. Basierend auf grundlegenden Arbeiten zur Replikation von EBV wurden sog. »EBNA-Vektoren« (27, 53) entwickelt, die die stabile Expression eines rekombinanten Proteins in B-Lymphozyten von *episomalen Expressionsplasmiden* erlauben.

Nicht nur ausgesuchte Bereiche viraler Kontrollelemente, sondern ganze Viren werden mittlerweile zur Expression viraler oder zellulärer Proteine herangezogen. Als erstes und wohl bekanntestes Beispiel unter den derzeit zur Expression rekombinanter Antigene verwendeten Viren sollen hier die Vaccinia-Viren aufgeführt werden. Die *Konstruktion rekombinanter Vaccinia-Viren* wird durch die Tatsache möglich, daß das Thymidinkinase-(TK-)Gen einen nicht essentiellen Abschnitt im Genom von Vaccinia-Viren darstellt und als Selektionsmarker benutzt werden kann (7, 26). Die Herstellung rekombinanter, d. h. gentechnisch veränderter, Vaccinia-Viren erfolgt durch homologe Rekombination. Das Fremdgen wird dabei mittels flankierender, zum Vaccinia-Virus-TK-Gen homologer, Sequenzen von einem speziellen Plasmid auf den Virusvektor durch Rekombination übertragen. Auf einem ähnlichen Prinzip basiert die *Herstellung von rekombinantem Bakulovirus*, einem Insektenvirus, das die Darmzellen von Schmetterlingslarven befällt und Überdauerungsformen bilden kann, die durch eine dicke Polyhedrin-(PH-)Proteinhülle vor Umwelteinflüssen geschützt sind (39). Rekombiniert man in einem Kointransfektionsexperiment das Fremdgen in das PH-Gen des Virus, resultiert ein PH-negativer Virusphänotyp. Diese rekombinanten Viren zeichnen sich durch das Fehlen von Überdauerungsformen in der infizierten Zelle aus und können lichtmikroskopisch identifiziert werden.

Eine neue Generation von Expressionsvektoren basiert auf dem Replikon des Semliki-Forest-Virus (SFV). Das Fremdgen wird hier zunächst in einen SFV-Vektor inseriert und *in vitro* in RNS umgeschrieben. Diese kann durch Elektroporation effizient in Säugerzellen eingebracht werden. In der Wirtszelle katalysiert die RNS ihre eigene Replikation und führt – auf Kosten der zellulären Boten-RNS – zu einer massiven Überproduktion des heterologen Proteins. Zusätzlich können durch Kointransfektion verpackungsdefizienter RNS die *in vitro* transkribierten rekombinanten RNS in Säugerzellen zu infektiösen, nicht jedoch replikationskompetenten Nachkommenviren verpackt werden. Mit den resultierenden virushaltigen Transfektionsüberständen

kann ein breites Spektrum unterschiedlichster Säugerzellen infiziert werden. Innerhalb von 75 h wird in den infizierten Zellen rekombinantes Protein bis zu einem Gesamtproteingehalt von 25% produziert (24).

Vakzine und Therapie

Rekombinante Lebendvakzine: Andere Vektoren auf der Basis rekombinanter Viren unterschiedlicher Klassen (Papillom-, Adeno-, Herpes- und Retroviren) wurden zwischenzeitlich entwickelt und zu effizienten Expressionssystemen ausgebaut. Neben der Antigenproduktion werden einige dieser Vektoren in letzter Zeit zunehmend als Lebendvakzinekandidaten diskutiert und als Vehikel zu genterapeutischen Zwecken in modifizierter Form eingesetzt (s. u.). Der gegenüber gereinigten Antigenen möglicherweise entscheidende Vorteil einer rekombinanten Lebendvakzine liegt darin, zytolytische T-Lymphozyten (CTL) zu induzieren, die bei Infektion auch in der Lage sind, bereits infizierte Zellen zu eliminieren. Als erste Anwärter für Lebendvakzine sind rekombinante Vaccinia- und Adenoviren zu nennen (15, 42). Beide Strategien greifen auf schon erprobte Impfstämme zur Etablierung der rekombinanten Viren zurück. Bei Vaccinia-Viren liegt bereits jahrzehntelange Erfahrung mit der Impfung vor, die letztendlich zur erfolgreichen Bekämpfung und nach Angaben der WHO zur Ausrottung der Pocken geführt hat.

Bei einem Einsatz *rekombinanter Vaccinia-Viren* am Menschen müssen sorgfältig mögliche Risiken hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen neurotrophen Nebenwirkungen abgewogen werden. Wachsen der Einblick in die Funktion Vaccinia-viraler Genprodukte führte zu der systematischen Entwicklung von gentechnisch attenuierten Mutanten mit einem eingeschränkten Wirtszellspektrum, die eine produktive Infektion mit allen erwünschten immunologischen Konsequenzen zulassen, ohne mit den beschriebenen unerwünschten neuropathogenen Nebenwirkungen belastet zu sein. Gleichzeitig wurden auf der Basis von *Avipox-Viren* ebenfalls attenuierte Mutanten entwickelt, die lediglich eine abortive Infektion permissiver Zellen zulassen (34). Gegenwärtig wird geprüft, ob diese Viren noch eine entsprechende Genexpression im Wirt erlauben, um eine schützende Immunantwort hervorzurufen. Erste Versuche waren nicht voll befriedigend.

Rekombinante Adenoviren basieren im wesentlichen auf den Typen 4 und 7, die bei Angehörigen des US-Militärs als Impfstoff zugelassen sind. Zur Herstellung rekombi-

nanter Adenoviren werden definierte und in ihrer Funktion präzise charakterisierte Bereiche des viralen Genoms deletiert und durch Fremdgene ersetzt. Die rekombinanten Viren sind in der Lage, ein breites Spektrum unterschiedlicher Zellen zu infizieren, die Infektion verläuft aber, wie bei den rekombinanten Avipox-Viren, abortiv (40, 43, 44). Einwände gegen diese viralen Vakzinekandidaten kommen vor allem deshalb auf, weil Rekombination mit Wildtypviren zur unkontrollierten Verbreitung von rekombinanten Viren führen kann. Ferner ist ein Teil der Bevölkerung gegen diese Träger-viren bereits immun, so daß ein Impferfolg für das einrekombinierte Gen fraglich ist.

Partikuläre Trägersysteme – nichtinfektiöse virusähnliche Partikel – basieren hauptsächlich auf den Oberflächen- (HBsAg-) oder Kapsidantigenen (HBcAg) des HBV, auf dem TyA-Hefe-Retrotransposon-Genprodukt oder auf den gruppenspezifischen Antigenen von Retroviren (19). Durch Austausch von definierten, für die Virusmorphogenese nicht essentiellen Bereichen gegen ausgewählte Epitope des äußeren Hüllproteins können rational ausgewählte Bereiche dem Immunsystem durch ein hochimmunogenes, partikuläres und per se immunologisch relevantes Trägermolekül präsentiert werden (47).

Gentherapie: Derzeit bestimmen im wesentlichen drei virale Vektorsysteme die Entwicklung gentherapeutischer Anwendungen.

Die **retroviralen Vektorsysteme** sind am weitesten fortgeschritten und bereits in ersten Versuchen am Menschen erprobt. Diese sind meist vom Genom amphotropher Retroviren, in der Regel vom Mo-MLV (*moloney murine leukemia virus*) abgeleitet und enthalten LTR-Sequenzen des Virus als Kontrollregion und als Zielsequenz für die virale Integrase zur Integration des Vektors in das Wirtszellgenom. Funktionelle Genbereiche sind partiell durch die therapeutischen Fremdgene und die für geeignete Selektionsmarker kodierenden Bereiche ersetzt. Fehlende, jedoch für die Replikation des Virus essentielle Gene werden entweder durch Helferviren ergänzt, oder die Herstellung der rekombinanten Pseudovirionen erfolgt in Verpackungslinien, die diese benötigten viralen Produkte konstitutiv zur Verfügung stellen. Dieses Verfahren ist besonders geeignet für die Ex-vivo-Gentherapie, also zur Behandlung von Patientenzellen in Zellkultur, die nach der Einbringung des Fremdgens reimplantiert werden können. Der breite Wirtszelltropismus amphotropher Retroviren, die Zellteilung als notwendige Voraussetzung für eine sta-

bile Integration der Fremdsequenzen sowie die genetische Instabilität und lediglich ungerichtete Integration der Fremdsequenzen stellen derzeit natürliche Limitationen dieses Systems für die In-vivo-Gentherapie dar (30, 36).

Im Gegensatz zu den retroviralen Vektorsystemen ist auf der Basis **rekombinanter Parvoviren** (adenoassoziierte Viren der Gruppe Dependoviren) eine positionsspezifische, stabile Integration von Fremdsequenzen auf Chromosom 19 gezeigt (21). Dadurch wäre die Gefahr einer Transformation der transduzierten Zelle durch Anschalten benachbarter Gene gegenüber den retroviralen Vektorsystemen deutlich reduziert. Die Integration erfolgt jedoch mit einer vergleichbar geringen Effizienz und resultiert oft in einer genetischen Destabilisierung des Chromosoms 19, in deren Folge DNS-Rearrangements und B-Zell-Leukämien beschrieben wurden.

Fortschritte auf dem Sektor der In-vivo-Gentherapie wurden mit den bereits erwähnten, von **Adenoviren abgeleiteten Vektoren** erzielt. Rekombinante, replikationsinkompetente Adenoviren können auch ruhende Zellen infizieren und exprimieren große Mengen des gewünschten Genprodukts.

Herpesvirusvektoren stellen derzeit die einzige Möglichkeit dar, Fremdgene in neuronale Gewebe einzuführen. Aufgrund der komplexen Regulation von HSV war es bislang schwierig, rekombinante Virusstämme herzustellen, die nicht mehr in der Lage sind zu replizieren (18). Dies ist jedoch aus Sicherheitsgründen die wichtigste Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz an Patienten.

Zusammenfassung und Ausblick

Molekularbiologische Arbeitstechniken haben wesentlich zum Verständnis der Pathobiologie beigetragen. Die Kenntnis viraler Pathogenitätsmechanismen und molekularer Regulationsabläufe eröffnete Möglichkeiten zur Prävention durch neu entwickelte rekombinante Impfstoffe und zur Intervention mittels rational konzipierter Therapeutika. Grundlegende Arbeiten, wie z. B. die Herstellung posttranslational modifizierter Proteine in eukaryotischen Expressionssystemen, Studien zur Genregulation sowie eine Reihe immunologischer Methoden wären ohne die Beiträge der molekularen Virologie und die daraus abgeleiteten Werkzeuge für die Molekularbiologie undenkbar. Im Bereich der modernen Virologie wurden Nukleinsäurenachweissysteme entwickelt, die neuerdings auch zur Typisierung und zur Schnelldiagnostik schwer

kultivierbarer bakterieller Erreger eingesetzt werden. Neue Entwicklungen auf dem Sektor der Gentherapie lassen für die Zukunft die Bekämpfung nicht nur vererbter Defekte, sondern auch erworbener Erkrankungen, wie vielleicht AIDS, zu.

LITERATUR

1. Becker, J., Leser, U., Marshall, M., Langford, A., Jilg, W., Gelderblom, H., Reichart, P., Wolf, H.: Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8332–8336 (1991)
2. Bell, S., Cranage, M., Borysiewicz, L., Minson, T.: Induction of immunoglobulin G Fc receptors by recombinant vaccinia viruses expressing glycoproteins E and I of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 64, 2181–2186 (1990)
3. Benjamin, T., Vogt, P.K.: Cell transformation by viruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. (Eds.): *Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York 1990, pp. 317–367
4. Bogedain, G., Knüchel, R., Wolf, H., Jilg, W.: Possible down-regulation of surface class I MHC by the Epstein-Barr virus lytic transactivator BRLF1. XIIIth International Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, July 25–30, 1993
5. Browne, H., Smith, G., Beck, S., Minson, T.: A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* 347, 770–772 (1990)
6. Campo, M.S.: Cell transformation by animal papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* 73, 217–222 (1992)
7. Chakrabarti, S., Brechling, K., Moss, B.: Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell Biol.* 5, 3403–3409 (1985)
8. Clarke, P.A., Schwemmler, M., Schickinger, J., Hilse, K., Clemens, M.J.: Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBEB-1 to the double stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic Acids Res.* 19, 243–248 (1990)
9. Drexler, H.G.: Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. *Biopsy material. Leuk. Lymphoma* 8, 283–313 (1992)
10. Elder, J.T., Spritz, R.A., Weissman, S.M.: Simian virus 40 as a eukaryotic cloning vehicle. *Annu. Rev. Genet.* 15, 295–340 (1981)
11. Feitelson, M.: Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 275–301 (1992)
12. Ginsberg, H.S., Lundholm Beauchamp, U., Horswood, R.L., Pernis, B., Wold, W.S., Chanock, R.M., Prince, G.A.: Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3823–3827 (1989)
13. Gooding, L.R.: Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell* 71, 5–7 (1992)
14. Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lenette, E.T., Abrams, D.I., Gonant, M.A., Petersen, V., Freese, U.K.: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral »hairy« leukoplakia, an AIDS associated lesion. *N. Engl. J. Med.* 313, 1564–1571 (1985)
15. Gu, S., Huang, T., Ruan, L., Miao, Y., Chu, C., Motz, M., Wolf, H.: Immunogenicity in human volunteers of a recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus membrane antigen. In Tursz, T. (Ed.): *EBV and human disease*. Inserm and John Libbey Eurotext, Paris 1993
16. Harris, S.L., Frank, I., Yee, A., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Friedman, H.M.: Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 prevents complement

- mediated cell lysis and virus neutralization. *J. Infect. Dis.* 162, 331–337 (1990)
17. Hsu, D.H., Waal Malefyt, R. de, Fiorentino, D.F., Dang, M.N., Vieira, P., Vries, J. de, Spits, H., Mosmann, T.R., Moore, K.W.: Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250, 830–832 (1990)
 18. Johnson, P.A., Miyahara, A., Levine, F., Cahill, T., Friedmann, T.: Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 66, 2952–2965 (1992)
 19. Kingsman, S.M., Kingsman, A.J.: Polyvalent recombinant antigens: a new vaccine strategy. *Vaccine* 6, 304–306 (1988)
 20. Knipe, D.M.: Virus-host-cell interactions. In Fields, B.N., Knipe, D.M. (Eds.): *Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York 1990, pp. 293–316
 21. Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., Berns, K.I.: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2211–2215 (1990)
 22. Kotwal, G.J., Isaacs, S.N., McKenzie, R., Frank, M.M., Moss, B.: Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250, 827–830 (1990)
 23. Levine, A.J.: The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. *Virology* 177, 419–426 (1990)
 24. Liljestrom, P., Garoff, H.: A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9, 1–7 (1991)
 25. Lillycrop, K.A., Latchman, D.S.: Alternative splicing of the Oct-2 transcription factor RNA is differentially regulated in neuronal cells and B cells and results in protein isoforms with opposite effects on the activity of octamer/TAATGARAT-containing promoters. *J. Biol. Chem.* 267, 24960–24965 (1992)
 26. Mackett, M., Yilma, T., Rose, J.K., Moss, B.: Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. *Science* 227, 433–435 (1985)
 27. Margolskee, R.F., Kavathas, P., Berg, P.: Epstein-Barr virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 2837–2847 (1988)
 28. Mathews, M.B., Shenk, T.: Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J. Virol.* 65, 5657–5662 (1991)
 29. Mayer, J., Reischl, U., Schwarzmann, F., Wolf, H.: Pathobiology and Epstein-Barr virus related diseases. *Biotest Bull.* (in press)
 30. Miller, A.D.: Retrovirus packaging cells. *Hum. Gene Ther.* 1, 5–14 (1990)
 31. Mueller, N., Evans, A., Harris, N.L., Comstock, G.W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B.F., Vogelmann, J.: Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 320, 689–695 (1989)
 32. Old, L.J., Boyse, E.A., Geering, G., Oettgen, H.F.: Serologic approaches to the study of cancer in animals and man. *Cancer Res.* 28, 1288–1299 (1968)
 33. Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton Dutoit, S.J., Rowe, M., Young, L.S.: Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 78, 1162–1165 (1991)
 34. Panicali, D., Paoletti, E.: Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. 1982 [classical article]. *Biotechnology* 24, 503–507 (1992)
 35. Reischl, U., Mayer, J., Wagner, R., Wolf, H.: Einsatz molekularbiologischer Techniken in der medizinischen Diagnostik. MTA (im Druck)
 36. Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G., Brown, P.O.: Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12, 2099–2108 (1993)
 37. Schneider, A., Oltersdorf, T., Schneider, V., Gissmann, L.: Distribution pattern of human papilloma virus 16 genome in cervical neoplasia by molecular in situ hybridization of tissue sections. *Int. J. Cancer* 39, 717–721 (1987)
 38. Sixbey, J.W., Lemon, S.M., Pagano, J.S.: A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *Lancet* 2, 1122–1124 (1986)
 39. Smith, G.E., Ju, G., Ericson, B.L., Moschera, J., Lahm, H.W., Chizzonite, R., Summers, M.D.: Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8404–8408 (1985)
 40. Solnick, D.: Construction of an adenovirus-SV40 recombinant producing SV40 T antigen from an adenovirus late promoter. *Cell* 24, 135–143 (1981)
 41. Stoler, M.H., Broker, T.R.: In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Hum. Pathol.* 17, 1250–1258 (1986)
 42. Tartaglia, J., Jarrett, O., Neil, J.C., Desmetre, P., Paoletti, E.: Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J. Virol.* 67, 2370–2375 (1993)
 43. Thummel, C., Tjian, R., Grodzicker, T.: Expression of SV40 T antigen under control of adenovirus promoters. *Cell* 23, 825–836 (1981)
 44. Thummel, C., Tjian, R., Grodzicker, T.: Construction of adenovirus expression vectors by site-directed in vivo recombination. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 435–446 (1982)
 45. Toozé, J.: *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY 1980
 46. Vieira, P., Waal Malefyt, R. de, Dang, M.N., Johnson, K.E., Kastelein, R., Fiorentino, D.F., Vries, J.E. de, Roncarolo, M.G., Mosmann, T.R., Moore, K.W.: Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1172–1176 (1991)
 47. Wagner, R., Fliessbach, H., Modrow, S., Brunn, A., von Wolf, H., Boeltz, T., Gelderblom, H.: Expression of HIV-1 autologous p55 and p55/gp120-V3 core particles: a new approach in HIV vaccine development. In Chanock, R.M., Ginsberg, H.S., Brown, F., Lerner, R.A. (Eds.): *Vaccines 91. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1991
 48. Weinberg, R.A.: Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138–1146 (1991)
 49. Wold, W.S., Gooding, L.R.: Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 184, 1–8 (1991)
 50. Wolf, H., Haus, M., Wilmes, E.: Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. *J. Virol.* 51, 795–798 (1984)
 51. Wolf, H., Schwarzmann, F., Bogedain, G.: Epstein-Barr virus and its interaction with the host. *Intervirology* 35, 26–39 (1993)
 52. Wolf, H., Zurhausen, H., Becker, V.: EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature N. Biol.* 244, 245–247 (1973)
 53. Yates, J.L., Warren, N., Sugden, B.: Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812–815 (1985)

└ Sonderdruckerfordernungen /
Request for reprints:

Dr. F. Schwarzmann
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Hygiene der Universität Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93053 Regensburg