

Den Viren auf der Spur

Hochauflösende Mikroskopie in der Zelle

Wir besuchen die älteste virologische Forschungsstätte der Welt. Sie wurde 1910 von Friedrich Loeffler aufgebaut und ist heute Hauptstandort des gleichnamigen Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit (Friedrich-Loeffler-Institut, FLI). Bei bestem Wetter kommen wir auf der Insel Riems im Greifswalder Bodden an. Im Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie des FLI werden wir von PD Dr. Stefan Finke empfangen. Uns führt eine besonders interessante Methode, mit der die Forscherinnen und Forscher den Weg von Viren in lebenden Zellen verfolgen können, auf die Insel. Gemeint ist die „Hochauflösende Lebendzell Video-Mikroskopie“.

„Wir möchten die Krankheitserreger und die von ihnen ausgehenden Risiken verstehen, um sie gezielt bekämpfen zu können.“, erklärt uns Stefan Finke zu Beginn unseres Rundgangs. Die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler erforschen hier im Labor Infektionsstrategien von Viren und beschäftigen sich mit Fragen wie: „Wie gelangt das Virus vom Ort der Infektion zum Zielort, zum Beispiel dem Gehirn oder andere Organen?“ oder „Welche Zellen werden dann im Gehirn infiziert?“ An ausgewählten, veterinärmedizinisch relevanten Viren werden die Erreger-Wirtszell-Interaktionen untersucht.

Und so funktioniert's

Im Labor erläutert uns Stefan Finke die Funktionsweise der angewendeten optischen Methode. Bei der Laser-scanning Fluoreszenzmikroskopie regen ein oder meh-

tere Laser durch Licht aktivierbare Fluorophore an. Das können sowohl fluoreszierende Substanzen als auch fluoreszierende Proteine sein. „Auf Basis des grün fluoreszierenden Proteins einer Qualle (*Aequorea victoria*) und anderer natürlich vorkommender Fluoreszenzproteine wurden in den letzten Jahren unterschiedlichste und in verschiedenen Farben fluoreszierende Proteine entwickelt.“, erklärt Stefan Finke. „In Kombination mit Proteinen in Viren oder Zellen können die auf diese Weise „fluoreszenzmarkierten“ Proteine und Proteinkomplexe direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop in lebenden Zellen untersucht werden.“ Dabei werden die Präparate kontinuierlich mit Laserlicht bestrahlt und so die fluoreszierenden Proteine angeregt. Die zeitgleiche Detektion des freigesetzten Fluoreszenzlichtes ermöglicht die schnelle Lokalisation der Fluorophore im dreidimensionalen Raum der Zellen. Entsprechend können dynamische Vorgänge bzgl. des intrazellulären Transportes von Proteinen, Proteinkomplexen oder vollständigen Viren über die Zeit visualisiert und in deren Dynamik analysiert werden.

Die Kombination der konfokalen Laserscanmikroskopie, bei der Streulicht durch eine winzige Lochblende abgefangen wird und nur Lichtsignale aus dem scharf abgebildeten Bereich der Probe zum Detektor durchgelassen wird, mit sehr schnellen und extrem sensitiven Scanverfahren, bei denen einzelne Photonen detektiert werden können, ermöglicht „Live Virus Imaging“ in Echtzeit.

„Wir messen optische Ebenen mit Schichtdicken von 0,7 Mikrometern. Streulicht aus anderen Ebenen wird blockiert.“, beschreibt Stefan Finke. „Das Licht um den fokussierten Lichtpunkt gelangt zum Detektor und es entstehen optische Schnittbilder mit hohem Kontrast und einer optischen Auflösung von ca. 180 Nanometern. Bildpunkte, die weiter als 180 Nanometer voneinander entfernt sind, werden als zwei individuelle Punkte wahrgenommen. Oft werden mehrere optische Ebenen umfassende Bildstapel aufgenommen, die mit speziellen Computerprogrammen zu 3D-Animationen rekonstruiert werden können und so einen dreidimensionalen Einblick in die Struktur einer Zelle erlauben.“

Die Auflösungsgrenze optischer Mikroskope lag lange Zeit knapp unterhalb von 200 Nanometer. Der Physiker Ernst Abbe begründete 1873 diese untere Grenze mit der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes. Sobald der Abstand zweier Objekte kleiner ist als die halbe Lichtwellenlänge, kann das Auge sie aufgrund der Beugung

des Lichtes nicht mehr voneinander unterscheiden. Sie verschwimmen zu einem Objekt. Neue Entwicklungen in der Fluoreszenzmikroskopie führten in den letzten Jahren zur Entwicklung von „Superresolution“-Mikroskopen, mit denen die Auflösungsgrenze in der Lichtmikroskopie auf ca. 30 Nanometer reduziert wurde. Für die Entwicklung der „Superresolution“-Mikroskopie und deren Nutzen für die Bearbeitung zellbiologischer Fragen gab es in diesem Jahr den Nobelpreis für Chemie für einen deutschen und zwei amerikanische Forscher. Entsprechende Mikroskope werden von Partnern des FLI, wie der Tel Aviv Universität, betrieben und innerhalb von Kooperationen genutzt.

Der Trick mit der Fluoreszenz

„Um die Wege von Viren in lebenden Zellen verfolgen zu können, werden sie zunächst genetisch so verändert, dass sie fluoreszenzmarkierte Proteine produzieren. Mit Lasern bestimmter Wellenlänge werden diese photoaktivierbaren Proteine dann angeregt und leuchten. So werden die Viren sichtbar gemacht.“, zeigt uns der begeisterte Virologe auf einem Bildschirm (Abb. 1).

info

invasive Methoden = zerstörende Methoden

Zerstören die Gewebe oder Untersuchungsobjekte, um z. B. nachzuweisende Stoffe in Agenzien zu lösen. Untersuchungsobjekte meist nur einmal verwendbar.

Beispiele:

Chemische Analyse von Inhaltsstoffen
ELISA-Test
DNA-Analysen

nicht-invasive Methoden = nicht-zerstörende Methoden

Indirekte Messung von physiologischen oder chemischen Eigenschaften; wirken von außen auf das Objekt ein und verletzen bzw. schädigen nicht; für Untersuchungen lebender Zellen geeignet

Beispiele:

Chlorophyllfluoreszenzanalyse
Spektroskopie in UV und sichtbaren (UV/VIS)
Wellenlängenbereich sowie im Nahinfrarot (NIR)
Ultraschallmessung

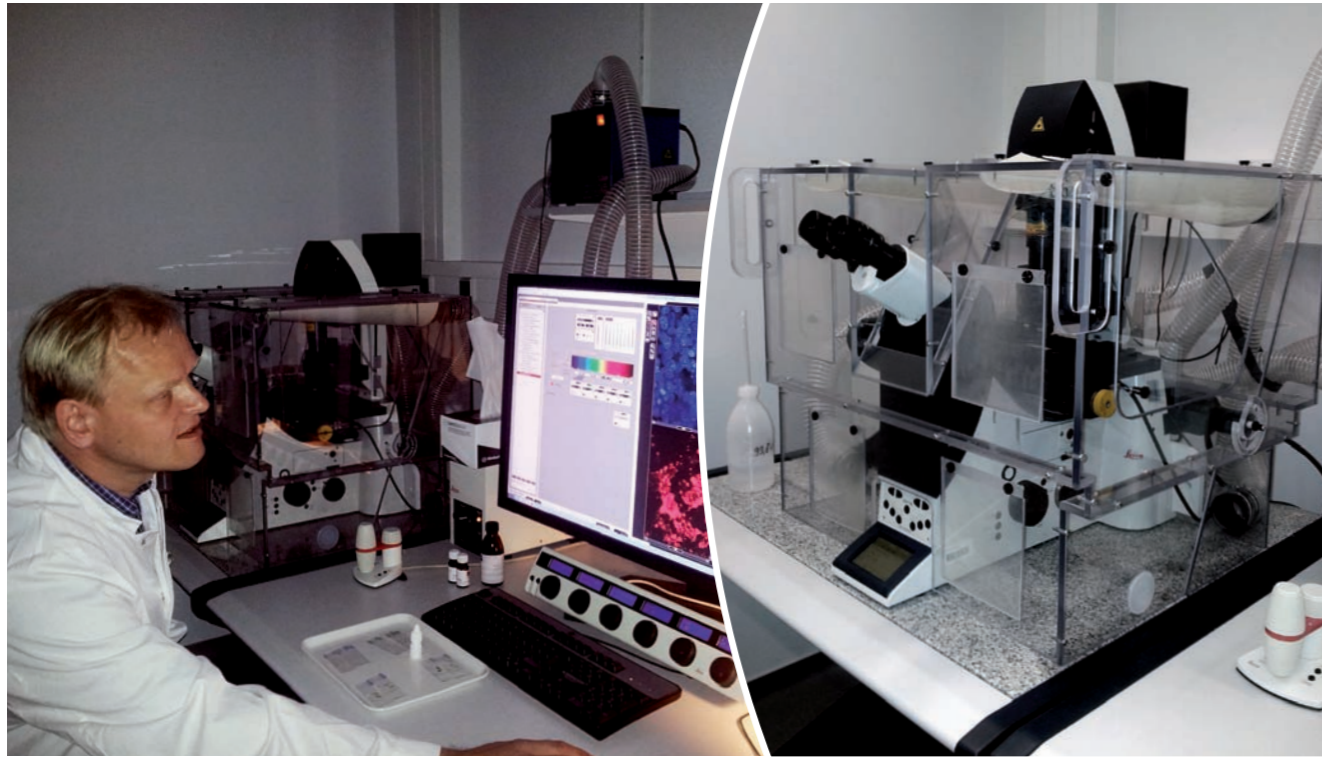


Abbildung 1: Auswertung am Monitor

Das Tollwutvirus, mit dem sich die Forschergruppe von Stefan Finke überwiegend beschäftigt, ist stäbchenförmig, 160 Nanometer lang und 60 Nanometer im Durchmesser. „Es ist also etwas zu klein um direkt mit unserem Mikroskop gesehen zu werden.“, stellt Stefan Finke klar. „Durch die Fluoreszenzmarkierung leuchten die Viren allerdings mit einem Durchmesser von ungefähr 400 Nanometer und werden so für uns sichtbar. Beobachten wir die fluoreszierenden Viruspartikel in lebenden Zellen, sprechen wir auch gerne von „Live Virus Imaging““.

Bewegung der Viren in lebenden Zellen

Herkömmliche fluoreszenzmikroskopische Methoden oder elektronenmikroskopische Analysen, sind „invasive Methoden“. Hierbei werden die beobachtete Zielzelle und alle darin stattfindenden Prozesse fixiert. Beim Live Cell Imaging, als einer „nicht-invasiven“ Untersuchungsmethode, wirkt lediglich das Anregungslicht auf die Zelle ein. Zelltötende Präparationsschritte sind nicht notwendig. Durch die Verwendung von sehr sensitiven Photodetektoren und eine optimierte optische Ausstattung können Vorgänge in lebenden Zellen bei minimalem Anregungslicht untersucht werden, ohne dass photo-toxische Effekte auf die Zelle zu erwarten sind.

„Wir versuchen Infektionsschritte in den lebenden Zellen direkt zu beobachten und dynamische Interaktionen mit Zellstrukturen aufzuklären. Da wir lebende Zellen unter-

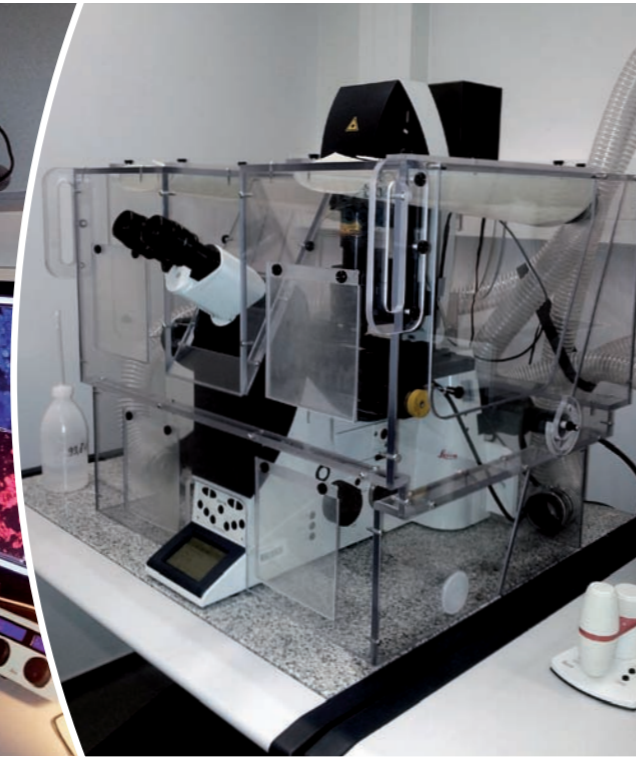


Abbildung 2: Inkubator

suchen, müssen wir optimale Konditionen für sie unter dem Mikroskop schaffen“, erklärt Stefan Finke und weist auf ein durchsichtiges Gehäuse in dem sich das Live-Cell Mikroskop befindet (Abb. 2). „Die Zellen dürfen dabei nicht zerstört werden. Die Haube aus Plexiglas stellt einen Inkubator dar, in den 37 Grad Celsius warme Luft geblasen wird. So können wir die Temperatur optimal und konstant einstellen.“

Einige Viren haben erstaunliche Strategien entwickelt, um vom Ort der Infektion zum Gehirn zu gelangen. „Das Tollwutvirus nutzt Transportmechanismen innerhalb der Nervenbahnen, die wir noch nicht in allen Details kennen. Um diesen Mechanismen auf die Spur zu kommen, züchten wir in speziellen Objektkammern Nervenzellen, die quer durch die „Kammer“ hindurch Zellfortsätze (Axone) bilden. Diese lebenden Nervenzellen infizieren wir mit fluoreszenzmarkierten Viren und verfolgen dann unter dem Mikroskop ihre Bewegungen.“

Über die Geschwindigkeit der Bewegungen kann man sehen, welche Mechanismen beteiligt sind. Das Tollwutvirus bewegt sich sowohl anterograd – vom Zellkörper zum Ende des Axons – als auch retrograd also genau entgegengesetzt. Wobei der Transport vom Zellkörper weg mit ungefähr 3,4 Mikrometer pro Sekunde fast doppelt so schnell geht, wie in die andere Richtung. Für beide Transportrichtungen werden sogenannte Motorproteine



Abbildung 3: Weide Insel Riems

benutzt. „Die genaue Charakterisierung der Transportvorgänge ist für unsere Forschung besonders wichtig. Welche Zellstrukturen sind beteiligt oder ist das Virus sogar in der Lage, zelluläre Transportvorgänge für die eigene Ausbreitung zu manipulieren?“ Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe um Stefan Finke zusammen mit Kooperationspartnern in einem aktuellen Beitrag in der Zeitschrift PLOS Pathogens zeigen, dass das Tollwutvirus nicht nur die Motorproteine nutzt, sondern die Geschwindigkeit dieser Transportprozesse offensichtlich beeinflusst und so einen effizienteren Virustransport erzielt.

Grundlagenforschung für die spätere Impfstoffentwicklung

Die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie ist eine wichtige Technologie zur Erforschung dynamischer Prozesse in Zellen. Insbesondere können Virusinfektionen und der Einfluss von Virus-Wirt-Interaktionen und deren Dynamik auf die Vermehrung der Krankheitserreger in Zellen, deren Ausbreitung im Organismus und auf die Fähigkeit, Krankheiten auszulösen einen entscheidenden Einfluß haben. Kenntnisse über diese Vorgänge können in Zukunft wichtige Grundlagen für die zielgerichtete Entwicklung von neuen Impfstoffen und für neuartige Ziele antiviraler Therapien sein.

Die Lebendzell-Mikroskopie allein reicht trotz ihrer vielfältigen Methoden nicht aus, komplexe Wirt-Virus-Interaktionen umfassend zu erforschen“, betont Stefan Finke. „Weitere Methoden wie die Massenspektrometrie als Nachweis- und Analyseverfahren für Proteine und Proteinkomplexe und Techniken zur gezielten Herstellung gentechnisch veränderter Virusmutanten sind für die Erforschung molekularer Virus-Wirt Interaktionen unabdingbar.“

Die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des FLI versuchen Synergieeffekte zwischen humanmedizinischer und veterinärmedizinischer Forschung zu schaffen und zu nutzen. Mit den verwendeten Infektionsmodellen werden Eigenschaften unterschiedlicher Viren verglichen und auf Basis dieser Untersuchungen neue Strategien im Bereich der angewandten Forschung ermöglicht. „Letztlich machen wir in unserem Labor Grundlagenforschung. Wir wollen verstehen, welche Eigenschaften der Viren die Krankheit auslösen. Haben wir diese Fragen geklärt, können wir sie gentechnisch verändern und gezielt abgeschwächte Viren mit verminderter Infektionskraft herstellen. Damit bereiten wir den Weg für die Impfstoffentwicklung oder die Herstellung von neuartigen Medikamenten.“

Für den ForschungsReport unterwegs waren Dr. Antje Töpfer und Dr. Michaela Nürnberg

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
 Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
 Federal Research Institute for Animal Health

PD Dr. Stefan Finke
 Friedrich-Loeffler-Institut,
 Institut für Molekulare Virologie und Zellbiologie,
 Greifswald – Insel Riems

E-Mail: stefan.finke@fli.bund.de