

Institut für Med. Virologie

➤ HELMUT-RUSKA-HAUS <

Direktor: Prof. Dr. med. D. H. Krüger

Nationales Konsiliarlaboratorium für Hantaviren

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Charitéplatz 1

10117 Berlin

Postadresse: 10098 Berlin

Tel. +49-30-450-52 50 92

Fax +49-30-450-52 59 07

www.charite.de/virologie/



Praktikum

Grundmethoden der Virologie

für den Masterstudiengang
Molekulare Lebenswissenschaft
(Modul MB-A17-1 Virus-Wirt-Interaktionen)

Wintersemester 2011/2012

Verantwortlicher HSL
Praktikumsbeauftragte

Prof. Dr. D. H. Krüger
PD Dr. M. Reuter

Tel. 450-52 50 92
Tel. 450-52 52 01

Gruppe 1

	Di, 17.01.12	Mi, 17.01.12	Do, 19.01.12	Fr, 20.01.12
10:00-10:30	Arbeitsschutz			Stein
10:30-11:00			Stein	HHT
11:00-11:30			Röteln-HHT	
11:30-12:00			Liquordiagn.	Stein
12:00-12:30				Kasuistiken
12:30-13:00			Priemer	
13:00-13:30	AG Reuter	AG Reuter	Zellzucht	
13:30-14:00	R/M Systeme	R/M Systeme		
14:00-14:30				Edelmann/ Kersten
14:30-15:00				Real-Time
15:00-15:30				
15:30-16:00			AG Rang	PCR
16:00-16:30			Interferon	
16:30-17:00				
17:00-17:30				AG Rang
17:30-18:00				Interferon

	Di, 24.01.12	Mi, 25.01.12	Do, 26.01.12	Fr, 27.01.12
10:00-10:30	Heider			
10:30-11:00	TCID50			Heider
11:00-11:30	CMV-Ag, Infl-Ag			TCID50
11:30-12:00		AG Bogner	AG Schönrich	
12:00-12:30	Priemer	Elektronen-	Immunhisto-	
12:30-13:00	Zellzucht	mikroskopie	chemie	
13:00-13:30			Apoptose	AG Schönrich
13:30-14:00	Ettinger			Immunhisto-
14:00-14:30	HIV-Resistenz			chemie
14:30-15:00				Apoptose
15:00-15:30				
15:30-16:00	AG Rang	Hofmann		
16:00-16:30	Interferon	Diagnostik	AG Rang	
16:30-17:00			Interferon	Abschlußbespr.
17:00-17:30		Prof. Krüger		
17:30-18:00		Tutorial		

Gruppe 2

	Di, 17.01.12	Mi, 17.01.12	Do, 19.01.12	Fr, 20.01.12
10:00-10:30	Arbeitsschutz	Ettinger		
10:30-11:00		HIV-Resistenz		
11:00-11:30				
11:30-12:00				
12:00-12:30	Edelmann/ Kersten			
12:30-13:00				
13:00-13:30	Real-Time	AG Rang	AG Reuter	AG Reuter
13:30-14:00	PCR	Interferon	R/M Systeme	R/M Systeme
14:00-14:30				
14:30-15:00				
15:00-15:30				
15:30-16:00				
16:00-16:30	AG Rang			
16:30-17:00	Interferon			AG Rang
17:00-17:30				Interferon
17:30-18:00				

	Di, 24.01.12	Mi, 25.01.12	Do, 26.01.12	Fr, 27.01.12
10:00-10:30				
10:30-11:00			Stein	Heider
11:00-11:30			Röteln-HHT	TCID50
11:30-12:00	AG Schönrich	AG Schönrich	Liquordiagn.	
12:00-12:30	Immunhisto-	Immunhisto-		
12:30-13:00	chemie	chemie		
13:00-13:30	Apoptose	Apoptose		Stein
13:30-14:00				HHT
14:00-14:30				Priemer
14:30-15:00	Heider		AG Bogner	Zellzucht
15:00-15:30	TCID50		Elektronen-	
15:30-16:00	CMV-Ag, Infl-Ag		mikroskopie	Stein
16:00-16:30		Hofmann		Kasuistiken
16:30-17:00	Priemer	Diagnostik		Abschlußbespr.
17:00-17:30	Zellzucht	Prof. Krüger		
17:30-18:00		Tutorial		

Inhalt

	<u>Seite</u>
Wirtskontrollierte Restriktion und Modifikation von Bakterienviren (Arbeitsgruppe Reuter)	1
Elektronenmikroskopie (Arbeitsgruppe Bogner)	13
Immuncytochemische Analyse von herpesviralen Infektionen und Detektion von Apoptose (Arbeitsgruppe Schönrich)	18
Zellkulturen (C. Priemer)	27
Virusdiagnostik (Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Hofmann)	33
Antivirale Chemotherapie (Arbeitsgruppe Diagnostik – H. Heider)	35
Röteln und Liquordiagnostik (Arbeitsgruppe Diagnostik – A. Stein)	39
Quantitativer Nachweis von Epstein-Barr-Virus-DNA mittels real-time PCR am LightCycler (Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Ettinger, S. Kersten)	49
HIV-Diagnostik (Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Ettinger)	55
Aktivierung des angeborenen Interferonsystems durch Hantaviren <i>in vitro</i> (Arbeitsgruppe Rang)	61

Wirtskontrollierte Restriktion und Modifikation von Bakterienviren

Arbeitsgruppe Reuter

Die Beobachtung, dass bestimmte Bakterienstämme die Vermehrung von Bakterienviren (Bakteriophagen) stark einschränken, obwohl diese sich zuvor gut auf einem anderen Stamm vermehrten, führte Anfang der fünfziger Jahre zur ersten Beschreibung des Phänomens der wirtskontrollierten Restriktion von Bakteriophagen. Die Erklärung dieses Phänomens gelang Werner Arber Anfang der 1960er Jahre: Verantwortlich für die Hemmung der Phagenvermehrung war die sequenzspezifische, endonukleolytische Spaltung der viralen DNA durch **Restriktionsendonukleasen**. Einige der Phagen-Genome entgehen der Restriktion und werden durch wirtseigene **Methyltransferasen** modifiziert, was sie zur weiteren Vermehrung auf diesem Wirtstamm befähigt. Diese Modifikationen lassen sich wegen ihrer Reversibilität nach Passage über einen anderen Wirtstamm leicht von Wirtsbereichsmutationen des Bakteriophagen unterscheiden. DNA-Restriktion und -Modifikation sind die molekularen Prozesse, die das Phänomen der wirtskontrollierten Restriktion verursachen. Die Modifikation umfasst die Methylierung definierter Nukleotide innerhalb der spezifischen von der Restriktionsendonuklease erkannten DNA-Sequenz. DNA-Methyltransferase und Restriktionsendonuklease eines **Restriktions- und Modifikationssystems** erkennen dieselbe DNA-Sequenz. Die bakterieneigene DNA wird nach der Replikation durch die DNA-Methyltransferase methyliert und dadurch vor der Spaltung durch die korrespondierende Restriktionsendonuklease geschützt. Eindringende, fremde DNA, z. B. virale DNA bei Infektion des Bakteriums durch Bakteriophagen, wird durch die Restriktionsendonuklease gespalten, da sie nicht entsprechend methyliert ist. Die Funktion der Restriktions-/Modifikationssysteme ist der Schutz der prokaryotischen Zelle vor unkontrolliertem Eindringen fremder genetischer Elemente.

Entsprechend ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden Restriktions-/Modifikationsenzyme in vier verschiedene Klassen eingeteilt (vereinfacht in Tab. 1 dargestellt). Typ II-Restriktions-Modifikationsenzyme sind am weitesten verbreitet und strukturell einfach aufgebaut. Methyltransferase und Restriktionsendonuklease sind unabhängige Enzyme. Typ-II-Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA spezifisch meist innerhalb ihrer aus vier bis acht Basenpaaren bestehenden palindromischen Erkennungssequenz. Die spezifische DNA-Erkennung und -Spaltung hat Typ II-Restriktionsenzyme zu unentbehrlichen Hilfsmitteln in der Molekularbiologie werden lassen

(Restriktionskarten, Klonierungen, Möglichkeit der Veränderung von Genen). Gegenwärtig sind etwa 3800 Restriktionsenzyme mit etwa 300 verschiedenen DNA-Spezifitäten identifiziert. Von 39 Restriktionsendonukleasen gibt es Informationen über deren dreidimensionale Struktur.

Typ	Strukturmerkmale	Cofaktoren der Spaltung	DNA-Spaltung
I	multifunktional; drei verschiedene Untereinheiten, drei strukturelle Gene	Mg ²⁺ , ATP, AdoMet	schneiden zufällig und weit entfernt zwischen zweien ihrer asymmetrischen Erkennungssequenz
II	einfach; separate Enzyme für Restriktion und Modifikation, zwei strukturelle Gene	Mg ²⁺	schneiden innerhalb oder in der Nähe ihrer meist symmetrischen Erkennungssequenz
III	multifunktional; zwei verschiedene Untereinheiten, zwei strukturelle Gene	Mg ²⁺ , ATP	schneiden in definiertem Abstand zu ihrem asymmetrischen Erkennungsort
IV	Restriktionsendonuklease ohne dazugehörige DNA-Methyltransferase	Mg ²⁺ , GTP	schneiden nur ⁵ C- oder ⁴ C-methylierte DNA-Erkennungsorte

Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale verschiedener Typen von Restriktions-/Modifikationsenzymen (vereinfacht). Innerhalb der Typen I und II existieren Unterfamilien bzw. Untergruppen. EcoRII zählt zur Untergruppe IIE der Typ-II-Enzyme.

Restriktions-/Modifikationssysteme können in den Bakterienzellen chromosomal, durch Plasmide oder durch Phagen kodiert werden. Bei der Untersuchung von *Escherichia coli* Isolaten auf Restriktion verschiedener Bakteriophagen wurde das EcoRII-System auf dem Resistenzplasmid N3 selektiert. Die Gene für die Restriktionsendonuklease und Methyltransferase sind kloniert, sowie deren Nukleotidsequenzen bestimmt. Sie werden von verschiedenen Strängen in konvergenter Richtung transkribiert. Restriktionsendonuklease und Methyltransferase erkennen die spezifische Sequenz 5'-↓CCA/TGG. Der Pfeil symbolisiert die Spaltposition, die Methylgruppe wird auf das zweite C übertragen (C5-Position) und schützt die genomische DNA vor Restriktion.

T3 ist ein virulenter Bakteriophage, dessen Genom ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül mit terminaler Redundanz ist. Es umfasst etwa 38.740 bp (mit 3 EcoRII-Erkennungsorten). Nach Adsorption an einen permissiven Wirtstamm erfolgt die Injektion der

DNA, beginnend mit dem linken Ende des Genoms. Noch während der Injektion setzt die frühe Transkription durch die wirtseigene RNA-Polymerase ein. Nachdem das Gen 1 transkribiert ist, übernimmt die neusynthetisierte phageneigene RNA-Polymerase die weitere Transkription. Notwendige Voraussetzung für die Replikation der Phagen-DNA ist der nukleolytische Abbau der Wirts-DNA durch phagencodierte Nukleasen. Das erste vom linken Ende des T3-Genoms codierte Protein ist ein S-Adenosylmethionin-hydrolysierendes Enzym (SAMase), das den Methyl donor (S-Adenosylmethionin) zerstört und damit eine intrazelluläre Methylierung der Phagen-DNA verhindert. Das T3-Genom ist nachweislich völlig unmethyliert.

EcoRII ist eine **Restriktionsendonuklease** mit ungewöhnlichen Anforderungen an ihr Substrat. Zur Enzymaktivität braucht sie, im Gegensatz zu konventionellen Typ-II-Restriktionsendonukleasen, die nur einen Erkennungsort für die erfolgreiche DNA-Spaltung benötigen, die kooperative Wechselwirkung mit zwei Erkennungsorten. Einzelne Erkennungsorte oder Erkennungsorte, die auf einem DNA-Molekül sehr weit voneinander entfernt sind, werden nicht gespalten. Die Effizienz der funktionellen Kooperativität verringert sich mit zunehmendem Abstand zwischen den Erkennungsorten, wobei die maximal tolerierte Distanz etwa bei 1 kb liegt.

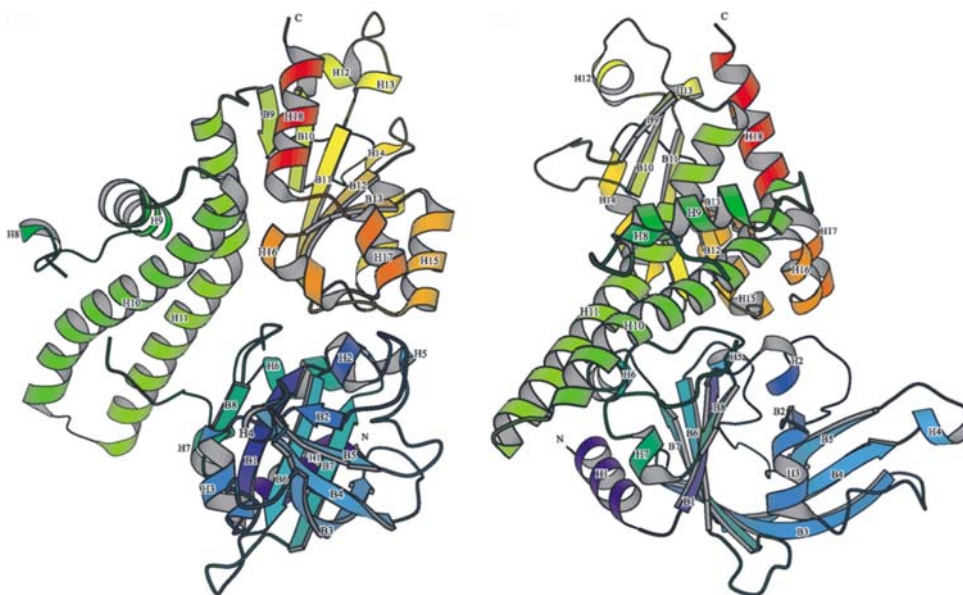


Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur eines EcoRII-Monomers (Zhou et al., 2004).

Die EcoRII-Gesamtstruktur besteht aus 18 α -Helices und 13 β -Strängen und ist in zwei Domänen geteilt, die durch eine flexible „Gelenkstruktur“ verbunden sind: eine N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-172), die Linkerregion (Aminosäuren 173-193) und eine C-terminale Domäne (Aminosäuren 194-404) (Abb. 1). Die N-terminale Domäne stellt eine

(zusätzliche) DNA-Bindungsdomäne dar, hat aber keine katalytische Aktivität. Die C-terminale Domäne zeigt die typische Topologie einer TypII-Restriktionsendonuklease mit einem zentralen fünfsträngigen β -Faltblatt umgeben von α -Helices. Die DNA-Bindungsdomänen beider EcoRII-Monomere binden zunächst einen der beiden EcoRII-Erkennungsorte in der DNA, den Aktivator oder allosterischen Effektor. Diese Bindung geht mit Konformationsänderungen des Proteins einher und aktiviert die beiden Endonuklease-Domänen, den zweiten EcoRII-Erkennungsort (Substrat) zu binden und zu spalten.

Biochemische Analysen haben gezeigt, dass die isolierte C-terminale Domäne (EcoRII-C) mit einer etwa 100-fach höheren Reaktionsgeschwindigkeit spaltet als der EcoRII-Wildtyp. EcoRII-C enthält demnach alle essentiellen strukturellen und funktionellen Komponenten einer TypII-Restriktionsendonuklease und kann jeden einzelnen Erkennungsort innerhalb einer DNA spalten. Durch Strukturvergleiche der C-terminalen EcoRII Endonuklease-Domäne mit den sehr ähnlich aufgebauten Restriktionsendonukleasen NgoMIV und Cfr10I, konnte das aktive Zentrum von EcoRII vorhergesagt werden. In dieses aktive Zentrum wurde eine DNA mit einem EcoRII-Erkennungsort modelliert und festgestellt, dass der Zugang zum aktiven Zentrum partiell von der N-terminalen Domäne blockiert wird. Das aktive Zentrum von EcoRII ist also für die Substrat-DNA *a priori* nicht zugänglich.

Die EcoRII-Kristallstruktur und insbesondere die Beobachtung, dass die EcoRII-Restriktionsendonuklease durch die Entfernung der N-terminalen Proteindomäne aktiviert wird, suggeriert, dass EcoRII durch einen Autoinhibitionsmechanismus reguliert wird: die N-terminale Domäne (inhibitorische Domäne) blockiert die funktionelle endonukleolytische Domäne. In Abwesenheit von DNA liegt die Restriktionsendonuklease EcoRII als inaktives Dimer vor. In diesem inaktiven Zustand sind nur die N-terminalen Domänen (Effektor-Domänen) für DNA zugänglich, während das aktive Zentrum im C-terminalen Teil von EcoRII durch die N-Termini räumlich blockiert wird. In Anwesenheit von DNA bindet das erste DNA-Molekül zunächst an die Effektor-Domänen und führt zu Konformationsänderungen, die dann die Bindung eines zweiten DNA-Moleküls an die C-terminalen Domänen ermöglichen. Dieser Mechanismus der strengen Kontrolle der Aktivität war bisher nur für Transkriptionsfaktoren und eukaryotische Signaltransduktionsproteine beschrieben und ist das erste Beispiel, dass Restriktionsendonukleasen über diesen Mechanismus reguliert werden können. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass die Kontrolle der enzymatischen Aktivität von EcoRII über den β -Strang 1 (B1) und die α -Helix 2 (H2) reguliert wird. Deletion einer dieser beiden Sekundärstrukturelemente schaltet die Autoinhibition vollständig aus und führt zu einer konstitutiv aktivierten Restriktionsendonuklease, die jeden einzelnen EcoRII-Erkennungsort spaltet.

Aufgabenstellung

1. Tag

Reinigung der Restriktionsenzyme EcoRII und EcoRII-ΔH2

Experiment 1: aus *E.coli* JM109 (pDK1, pQERII) und *E.coli* JM109 (pDK1, pQERII-ΔH2) mittels Ni-NTA Affinitätstechnologie, Kontrolle der Reinigung über SDS-PAGE

Experiment 2: Vergleichender Plaquetest mit dem Bakteriophagen T3 auf EcoRII- bzw. EcoRII-ΔH2 exprimierenden *E. coli*-Stämmen (*in vivo*-Restriktion)

2. Tag

Experiment 3: Vergleichende Restriktionsspaltung von pBR322- und T3-DNA durch gereinigte Restriktionsenzyme EcoRII und EcoRII-ΔH2 (*in vitro*-Restriktion)

Auswertung der Experimente

Experiment 1: Bewertung des Reinigungserfolges der Proteine

Experiment 2: Auszählung der T3 - Plaques und Berechnung des T3-Titers auf den beiden *E. coli*-Stämmen

Experiment 3: Analyse der DNA-Spaltmuster

Versuchsablauf

Vorbereitung von Indikatorzellen für die Phagen-Titration und Präparation der Zellpellets für die Proteinreinigung

Je 150 ml LB-Medium (+ 1 % Glucose, 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin) werden mit einer Einzelkolonie von *E.coli* JM109 (pDK1, pQERII) und *E.coli* JM109 (pDK1, pQERII-ΔH2) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Zur Induktion der Expression der Gene, die für die Restriktionsendonukleasen kodieren, werden 0,2 mM IPTG zugegeben und die Kulturen über Nacht bei 18°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Für die Gewinnung der Zellpellets zur Proteinreinigung (Experiment 1) werden je 50 ml *E.coli* JM109 (pDK1, pQERII) und JM109 (pDK1, pQERII-ΔH2) Kulturen 20 min bei 4°C und 4500 rpm in der Megafuge 1.0 R (Heraeus) zentrifugiert. Der Rest der Kulturen wird als Indikatorzellen für den Plaquetest (Experiment 2) genutzt. Ferner wird eine Übernachtskultur von *E.coli* JM109 (pDK1) in LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) angezogen.

Für alle Zentrifugationsschritte Eppendorf Zentrifuge 5402 bzw. Hettich Zentrifuge 2404 benutzen, Proben immer im Eisbad bearbeiten.

Ni-NTA Beads

- 2 x 150 µl 50 %ige Ni-NTA Bead-Suspension zentrifugieren (2 min, 3000 rpm, +4°C), Überstand abnehmen und verwerfen
- Zugabe von je 1,5 ml sterilem Aqua bidest, Beads durch vorsichtiges Schwenken resuspendieren, anschließend zentrifugieren (2 min, 3000 rpm, +4°C), Überstand abnehmen und verwerfen
- Zugabe von je 1,5 ml sterilem Lysepuffer, Beads durch vorsichtiges Schwenken resuspendieren, anschließend zentrifugieren (2 min, 3000 rpm, +4°C), Überstand abnehmen und verwerfen. Vorgang ein weiteres Mal wiederholen und Eppendorf-Gefäße nach dem Zentrifugieren im Eisbad belassen. Den Überstand erst kurz vor der Verwendung der Beads abnehmen und verwerfen.

Proteingele (Augenschutz und Handschuhe tragen, Zugabe von TEMED unter dem Abzug!) (es werden 2 Gele / Gruppe gegossen)

	Trenngel (12%ig)	Sammelgel (5%ig)
2 M Tris-Puffer (pH 8,8)	3,75 ml	-
1 M Tris-Puffer (pH 6,8)	-	1,3 ml
Acrylamid (40%ig)	6,1 ml	1,3 ml
SDS (10%ig)	200 µl	100 µl
APS (10%ig)	200 µl	100 µl
Aqua bidest	9,7 ml	7,2 ml
TEMED	40 µl	20 µl

(+ ~ 30µl Bromphenolblau-Lösung)

Weiterbearbeitung der Zellpellets

3. Ultraschall-Behandlung 4 x 12 s je Probe (je 1 min Pause zwischen den Intervallen)
 Einstellungen: Timer: Hold
 Duty Cycle: Constant
 Output control: Stufe 6

Die Proben sollten nach der Ultraschallbehandlung deutlich dünnflüssiger sein!

4. Zentrifugation der Proben (30 min, 14000 rpm, +4°C)
5. Überstände (Rohlysate) in neue Eppendorfgefäße pipettieren
6. Zugabe der Rohlysate zu vorbereiteten Beads, Eppendorfgefäße mit Parafilm verschließen (~ 10µl Rohlysate für Proteingel-Kontrolle im Eis/H₂O-Bad stehen lassen)

7. 30 min Inkubation im Eis/H₂O-Bad im Kühlraum
8. Zentrifugation der Beads (2 min, 3000 rpm, +4°C)
9. Pipettieren der Überstände in frische Eppendorfgefäße, für Proteingel-Kontrolle im Eis/H₂O-Bad stehen lassen.
10. Zugabe von je 1,5 ml Lysepuffer zu den Beads (1. Waschschrift), durch vorsichtiges Schwenken resuspendieren, anschließend zentrifugieren (2 min, 3000rpm, +4°C), Überstand in frische Eppendorfgefäße überführen, im Eis/H₂O-Bad stehen lassen.
11. Zugabe von je 1,5 ml Lysepuffer (2. Waschschrift), siehe Punkt 10
12. Zugabe von je 1,5 ml Waschpuffer (3. Waschschrift), siehe Punkt 10
13. Zugabe von je 1,5 ml Waschpuffer + 20 mM Imidazol (4. Waschschrift), siehe Punkt 10
14. Elution der Proteine mit je 3 x 100 µl Elutionspuffer (Waschpuffer + 100 mM Imidazol) Eppendorfgefäße nicht schwenken, Beads nur vorsichtig resuspendieren und nach dem Zentrifugieren Überstände abnehmen, siehe Punkt 10

Kontrolle der Protein-Reinigung über SDS-PAGE

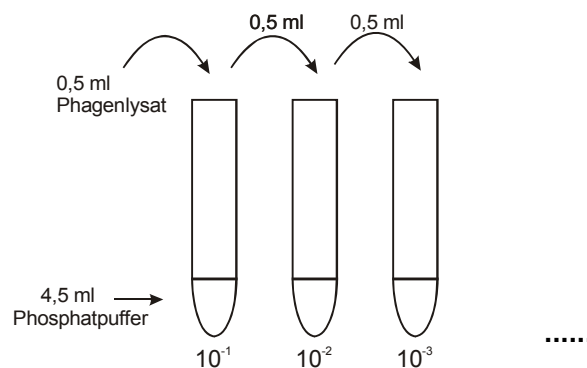
Gel 1 EcoRII				Gel 2 EcoRII-Δ H2			
Bahn	Probe	µl	H ₂ O(µl)	Bahn	Probe	µl	H ₂ O(µl)
1	Marker	8	-	11	Kontrolle	2	8
2	Kontrolle	2	8	12	Marker	8	-
3	Rohlysat	2	8	13	Rohlysat	2	8
4	ÜS n. beads	2	8	14	ÜS n. beads	2	8
5	Wasch1	15	-	15	Wasch1	15	-
6	Wasch3	15	-	16	Wasch3	15	-
7	Wasch4	15	-	17	Wasch4	15	-
8	Elution1	5	5	18	Elution1	10	-
9	Elution2	5	5	19	Elution2	10	-
10	Elution3	5	5	20	Elution3	10	-

- Zugabe von 10 µl Probenpuffer zu jeder Probe (außer Marker), kurz mischen und zentrifugieren.
- 3 min bei 72°C denaturieren, sofort auftragen
- Laufbedingungen: 1 x TG-Puffer, 90 V (Sammelgel), 120 V (Trenngel)
- Nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel verlassen hat, Gele abnehmen, fixieren und färben/entfärben:
- Fixieren: 10 min in 10 % Essigsäure / 30% Ethanol
- Färben: 15 min in Coomassie-Färbelösung
- Entfärben: abwechselnd je 20 min 10 % Essigsäure / 30% Ethanol und 10 min Aq bidest

Vergleich der Plattierungseffektivität des Bakteriophagen T3 auf
Experiment 2: *E.coli*-Stämmen mit und ohne EcoRII-R/M-System (*in vivo*
Restriktion)

Das Lysat des Bakteriophagen T3 wurde auf Wirtszellen angezüchtet, die weder die *E. coli* Dam- noch die *E.coli* Dcm-Methyltransferase enthalten. Ihre Genome sind demzufolge nicht methyliert.

Vom Bakteriophagen-Lysat wird eine Verdünnungsreihe bis 10^{-7} hergestellt (jeweils 0,5 ml Bakteriophagen-Lysat + 4,5 ml Phosphatpuffer).



Von den unten angegebenen Verdünnungsstufen werden jeweils 0,5 ml mit 0,3 ml der Indikatorzellen und 3 ml Deckagar (ca. 50 °C) gemischt und sofort auf LB-Agarplatten gegeben. Es werden 2 Platten pro Verdünnungsstufe angelegt.

Verdünnungsstufe	<i>E. coli</i> JM109(pDK1)	<i>E. coli</i> JM109(pDK1, pQERII-WT)	<i>E. coli</i> JM109(pDK1, pQERII-ΔH2)
10^{-1}			
10^{-2}			
10^{-3}			
10^{-4}			x
10^{-5}			x
10^{-6}	x	x	x
10^{-7}	x	x	
10^{-8}	x	x	
Titer			
rel. e.o.p.			

Zur Plauebildung werden die Platten ca. 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.Tag

Experiment 3: Vergleichende Restriktionsspaltung von pBR322- und T3-DNA durch EcoRII und EcoRII-ΔH2 (*in vitro* Restriktion)

Die T3 Phagen-DNA wurde aus einem hochtitrigen Phagenlysat durch Phenolextraktion und anschließendem CsCl-Dichtegradienten gereinigt. Die pBR322 Plasmid-DNA wurde aus *E.coli* GM 1674 (pBR322) mittels Qiagen Maxipräp hergestellt.

Die gereinigten Enzyme (Eluate 2) werden jeweils unverdünnt, 1: 5 und 1: 10 verdünnt (in Dialysepuffer) eingesetzt (siehe Tabelle).

Restriktionsansatz

Bahn	Ansatz	Mastermix (μl)	Mastermix 2 (μl)	Enzym (μl)	H ₂ O (μl)
1	pBR322/ Negativkontrolle	18	-	-	2
2	pBR322/ Positivkontrolle Mval (10 U/μl)	18	-	1	1
3	pBR322/ EcoRII Eluat 2 (unverdünnt)	18	-	1	1
4	pBR322/ EcoRII Eluat 2 (1:5)	18	-	2	-
5	pBR322/ EcoRII Eluat 2 (1:10)	18	-	2	-
6	pBR322/ EcoRII-ΔH2 Eluat 2 (unverdünnt)	18	-	1	1
7	pBR322/ EcoRII-ΔH2 Eluat 2 (1:5)	18	-	2	-
8	pBR322/ EcoRII-ΔH2 2 (1:10)	18	-	2	-
9	Marker (Genaxxon, 1 kb ladder, 3μl)	-	-	-	-
10	T3/ Negativkontrolle	-	18	-	2
11	T3/ Positivkontrolle Mval (10 U/μl)	-	18	1	1
12	T3/ EcoRII Eluat 2 (unverdünnt)	-	18	1	1
13	T3/ EcoRII Eluat 2 (1:5)	-	18	2	-
14	T3/ EcoRII Eluat 2 (1:10)	-	18	2	-
15	T3/ EcoRII-ΔH2 Eluat 2 (unverdünnt)	-	18	1	1
16	T3/ EcoRII-ΔH2 Eluat 2 (1:5)	-	18	2	-
17	T3/ EcoRII-ΔH2 2 (1:10)	-	18	2	-
18	Marker (Boe II, 5 μl)	-	-	-	-

Mastermix 1 (10X):

20μl 10x Uni-Puffer

20μl pBR 322 (100 ng/μl)

140 μl H₂O

Mastermix 2 (10x):

20μl 10x Uni-Puffer

20μl T3 DNA (100 ng/μl)

140 μl H₂O

Die Restriktionsspaltansätze werden in einem Eisbad pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C werden die Proben (je 20 μl) mit 2 μl einer 10 x konzentrierten Stopplösung gemischt, kurz abzentrifugiert und auf ein 0,7 % Agarosegel (5μl Serva DNA Stain Clear G/100 ml Gellösung) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA

erfolgt in 0,5 x TBE-Puffer bei ca. 90 mA. Nach dem Lauf wird das Spaltpattern fotografisch dokumentiert.

Auswertung der Experimente

Experiment 1: Bewertung des Erfolges der Proteinreinigung

Achten Sie auf Proteingehalt, Molekulargewicht und Reinheit der Enzyme.

Experiment 2: Phagentitrationstest

Die Plaques werden gezählt, die Titer (Beispielrechnung s. unten) und die relative Plattierungseffizienz berechnet.

Der Quotient aus dem Virustiter auf dem nicht-permissiven Stamm und dem Virustiter auf dem permissiven Stamm wird als **relative Plattierungseffizienz (rel. e. o. p.)** bezeichnet und ist Ausdruck für die **Restriktion** der Virusvermehrung.

Beispiel zur Titerberechnung:

Verdünnung	Platte	Plaques pro 0,5 ml	Wichtungsfaktor
10 ⁻⁵	1	210	1
	2	195	1
10 ⁻⁶	1	18	0,1
	2	23	0,1
10 ⁻⁷	1	2	0,01
	2	1	0,01
Summe		449	2,22

$$\text{Titer (PFU/ml): } 449 / (2,22 \times 10^{-5} \times 0,5) = 4,04 \times 10^7 \text{ PFU/ml}$$

Experiment 3: Analyse der DNA-Spaltpattern

Anhang

Phosphatpuffer	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	8,9 g
	KH_2PO_4	3 g
	NaCl	5 g
	mit H_2O auf 1l auffüllen	
LB-Flüssigmedium	Bacto-Tryptone	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
LB-Platten	Vor dem Autoklavieren 15 g Agar Noble zu einem Liter Medium zugeben.	
LB-Deckagar	Vor dem Autoklavieren 7 g Agar-Noble zu einem Liter Medium zugeben.	
10 x TBE-Puffer	Tris-Base	54 g
	Borsäure	27,5 g
	0,5 M EDTA pH 8,0	20 ml
	mit H_2O auf 1l auffüllen	
10 x TG-Puffer	Tris-Base	15,1 g
	Glycine	94 g
	10% SDS	50 ml
	mit H_2O auf 1l auffüllen	
10 x Universalpuffer (pH 7.6)	Kaliumacetat	1 M
	Tris-acetat	250 mM
	Magnesiumacetat	100 mM
	β -Mercaptoethanol	5 mM
	BSA	100 $\mu\text{g/ml}$
10 x Stoplösung	Bromphenolblau	0,42 %
	EDTA	200 mM
	Ficoll	15 %
Lysepuffer	NaH_2PO_4 pH 8,0	50 mM
	NaCl	300 mM
	β -Mercaptoethanol	10 mM
Waschpuffer	NaH_2PO_4 pH 6,0	50 mM
	NaCl	1M
	Glycerol	10%
	Triton X-100	0,1%
	β -Mercaptoethanol	10 mM
Elutionspuffer	Imidazol 100 mM in Waschpuffer	
Probenpuffer (3x)	Tris-HCl pH 6,8	150 mM
	SDS	6%
	Bromphenolblau	0,3%
	Glycerol	30%
	DTT	100 mM
Dialysepuffer	Tris/HCl pH 7.6	20 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Glycerin	50 %

Literatur

Mücke M, Krüger DH, Reuter M: Diversity of Type II restriction endonucleases that require two DNA recognition sites. Nucl. Acids Res. 31 (2003) 6079-6084

Reuter M, Mücke M, Krüger DH: Structure and function of Type IIE restriction endonucleases: From a plasmid that restricts phage replication to a new molecular DNA recognition mechanism. In: Restriction Endonucleases (Pingoud A, ed). Springer, Berlin Heidelberg New York 2004, pp 261-295

Zhou XE, Wang Y, Reuter M, Mücke M, Krüger DH, Meehan EJ, Chen L: Crystal structure of Type IIE restriction endonuclease EcoRII reveals an autoinhibition mechanism by a novel effector-binding fold. J. Mol. Biol. 335 (2004) 307-319

Szcepek M, Mackeldanz P, Möncke-Buchner E, Alves J, Krüger DH, Reuter M: Molecular analysis of restriction endonuclease EcoRII from *Escherichia coli* reveals precise regulation of its enzymatic activity by autoinhibition. Mol. Microbiol. 72(4) (2009) 1011-1021

Elektronenmikroskopie

Arbeitsgruppe Bogner

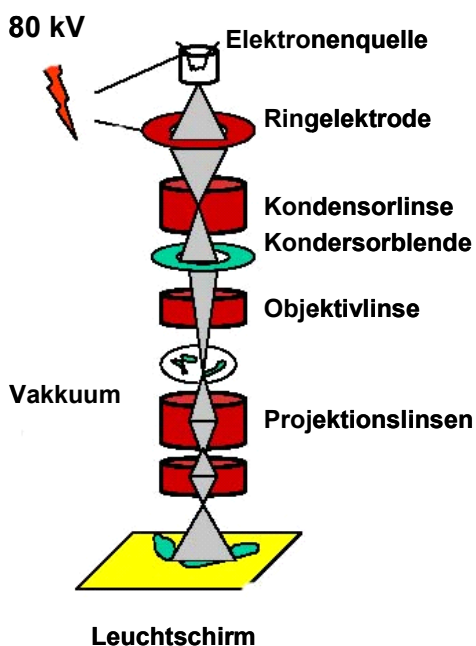
Die Elektronenmikroskopie wurde erst in den 1930er Jahren von Helmut und Ernst Ruska entwickelt. Die erste Beschreibung von Elektronen lieferte Thompson 1894. Einige Jahre später wurde von De Broglie der wellenartige Charakter von Elektronen beschrieben. 1926 konnte Busch nachweisen, dass Elektronen durch magnetische Linsen abgelenkt werden.

Ein Elektronenmikroskop ist ein Mikroskop, das das Innere oder die Oberfläche einer Probe mit Elektronen abbilden kann. Die Auflösung des Elektronenmikroskops ist durch die Wellenlänge begrenzt. Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben, kann mit einem Elektronenmikroskop eine wesentlich höhere Auflösung erreicht werden. Diese wird durch die Gleichung von De Broglie verdeutlicht:

$$\lambda = \frac{h}{m \times v}$$

Dies zeigt, dass je höher die Geschwindigkeit v des Elektrons ist, desto kleiner die Wellenlänge λ .

Aufbau eines Elektronenmikroskops



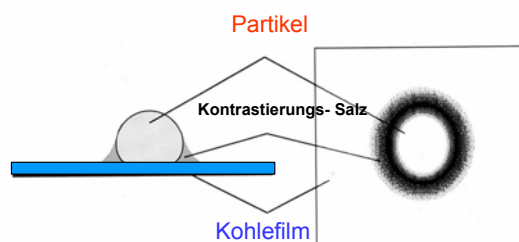
Die Elektronenquelle, die so genannte Kathode, erzeugt im glühenden Zustand Elektronen, die durch einen Zylinder gebündelt und in Richtung Anode beschleunigt werden.

Man benötigt darüber hinaus ein Vakuumsystem, da einerseits die Elektronenquelle nicht zu sehr aufgeheizt wird und andererseits es nicht zur Ablenkung der Elektronen durch Kollision mit Luftmolekülen kommt.

Die magnetischen Linsen haben die gleiche Funktion wie die eines Lichtmikroskops.

Bei der Elektronenmikroskopie gibt es unterschiedliche Methoden, die Proben sichtbar zu machen. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist die **Negativkontrastierung**. Hierbei wird nicht das Objekt gefärbt, sondern nur die Umgebung, so dass das Objekt, die vom Kontrastierungsmittel ausgeschlossenen Bereiche umfasst.

Bei der konventionellen Elektronenmikroskopie werden Proteine, die aus Atomen mit niedriger Ordnungszahl bestehen und damit Elektronen schlecht streuen, mit einem Material kontrastiert, das aus Atomen mit hoher Ordnungszahl, die Elektronen sehr gut streuen, besteht. Das Objekt hat nun genügend hohen Kontrast für die Abbildung im Elektronenmikroskop. Als Kontrastierungsmittel werden Schwermetallsalze verwendet (Uranylacetat, Phosphorwolframsäure).

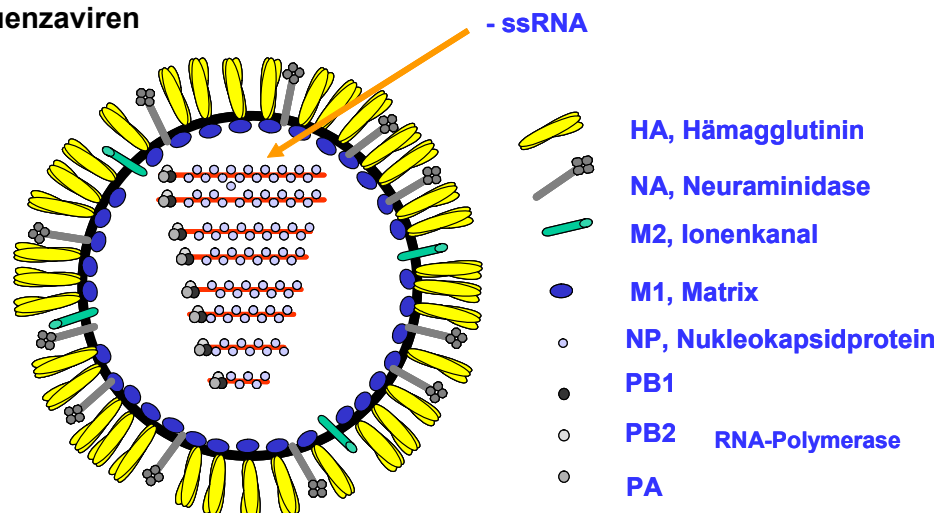


Im Praktikum wird eine Negativkontrastierung von nichtpathogenen Influenzaviren und ein Immunostaining des humanen Cytomegalievirus durchgeführt.

Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae. Das Genom besteht aus acht Segmenten einzelsträngiger RNA mit negativer Orientierung.

Aufbau von Influenzaviren

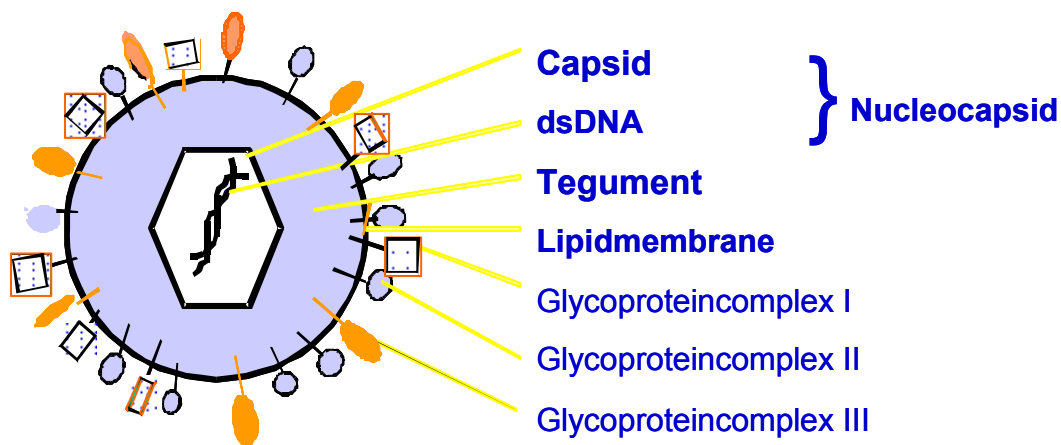


Das Nukleokapsid bestehend aus der RNA, die von dem Kapsidprotein umgeben ist. An 5'Ende der RNA befindet sich die RNA-Polymerase (PB1, PB2 und PA). Das Nukleokapsid ist umgeben von der Hülle, die die viralen Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sowie den Ionenkanalbildner M2 enthält. Zwischen Nukleokapsid und Hülle befindet sich das Matrixprotein M1.

Humanes Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviridae und zur Unterfamilie der β -Herpesviren. Das Genom besteht aus einer doppelsträngigen DNA und hat eine Größe von 230 kb.

Aufbau von HCMV



Die doppelsträngige DNA befindet sich in dem ikosaedrischen Kapsid. Dieses ist umgeben von einer Proteinschicht, dem so genannten Tegument. Daran schließt sich die Lipidhülle mit den eingelagerten viralen Glykoproteinen an.

Praktikumsaufgabe

1. Negativkontrastierung von Influenzaviren

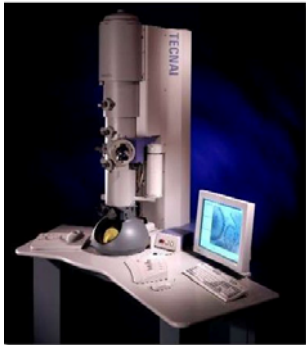
- a. 40 µl Virussuspension auf einen Streifen Parafilm geben
- b. kohlebedampftes Grid auf die Suspension legen (Kohle zeigt nach unten)
- c. Inkubation: 5 min
- d. Grid auf einen Tropfen mit Wasser od. HEPES-Puffer pH 7.5 überführen
- e. Grid auf einen Tropfen 4% Uranylacetat legen
- f. Inkubation: 20 s
- g. Grid auf ein nasses Filterpapier legen und trocknen lassen

2. Immunstaining von HCMV

Verwendet werden mit Kohle-bedampfte Nickelgrids.

- | | | |
|-----|--|-----------|
| 1. | 40 µl Virussuspension | 5 min |
| 2. | 1% BSA in Puffer (Tris, HEPES) | 15 min |
| 3. | 1. Antikörper (gegen gB) | 45 min |
| 4. | waschen mit Puffer | 3 x 1 min |
| 5. | 2. Antikörper (anti-Maus Gold-konj.) | 45 min |
| 6. | waschen mit 1%BSA in Puffer | 2x 1 min |
| 7. | waschen mit Puffer | 3x 1 min |
| 8. | waschen mit Aqua bidest. | 1 min |
| 9. | 1% Glutaraldehyd in Puffer | 2 min |
| 10. | 4% Uranylacetat | 20 s |
| 11. | Grid auf nasses Filterpapier legen, trocknen | |

Die Proben werden am Elektronenmikroskop des Robert-Koch-Instituts (Technai mit CCD-Kamera) bei einer konstanten Spannung von 120 kV angeschaut. Die Grids werden auf einem Probenhalter fixiert und anschließend in den Strahlengang eingeschleust.



Technai 9

Immuncytochemische Analyse von herpesviralen Infektionen und Detektion von Apoptose

Arbeitsgruppe Schönrich

Einleitung

Eine interessante Forschungsrichtung an der Nahtstelle zwischen Immunologie und Virologie beschäftigt sich mit den Mechanismen, durch die Viren sich dem Zugriff des Immunsystems entziehen (virale Immunevasion). Insbesondere die große DNA-Viren wie die Mitglieder der Herpesvirus-Familie kodieren für zahlreiche Proteine, die in die Auseinandersetzung mit den Immunzellen des Wirtes eingreifen. Dabei können die Immunzellen (z. B. Dendritische Zellen) selbst von bestimmten Herpesviren infiziert werden (virale „Counterattack“).

Für den Nachweis der Herpesviren müssen virale Proteine durch immunhistochemische Methoden angefärbt werden. Die im Rahmen von Infektionen mit Herpesviren synthetisierten viralen Proteine werden entsprechend dem Zeitpunkt eingeteilt, zu dem sie nach der Infektion in der Zelle gebildet werden. Die sehr frühen oder *immediate early* (IE)-Proteine entstehen zuerst und zwar unabhängig von der Neusynthese anderer Virusprodukte. Danach folgen zeitlich die *delayed early* (E)-Proteine; sie sind von der Anwesenheit der IE-Proteine abhängig. Die späten oder *late*-Proteine werden gegen Ende des Replikationszyklus gebildet und stellen Strukturproteine dar, die am Aufbau der Virionen wesentlich beteiligt sind. Als Konsequenz der Virusinfektion können Immunzellen physisch eliminiert werden, indem der programmierte Zelltod (Apoptose) über verschiedene Mechanismen induziert wird. Daraus kann eine lokale oder systemische Immunsuppression resultieren, die dem Virus eine ungehinderte Replikation ermöglicht.

Aufgabenstellung

In diesem Praktikumsteil soll der immunhistochemische Nachweis von herpesviralen Proteinen durchgeführt werden (Experiment 1). Außerdem soll Apoptose in infizierten Zellen detektiert werden (Experiment 2).

Experiment 1: Immuncytochemische Analyse von infizierten Zellen

Material

- 24-Loch-Platten (enthalten Deckgläschen mit einem einschichtigen Rasen von HCMV-infizierten HEF-Zellen)
- PBS-Lösung
- 4 % Paraformaldehyd-Lösung
- 1 % Triton-Lösung
- 5 % Glycerol-Lsg.
- Lösungen mit primären Antikörpern gegen IE-Protein, Early-Proteine und Late-Proteine
- Lösungen mit sekundären Antikörpern

Vorbereitung

Ein Streifen Parafilm wird auf der Laborbank mit Tesafilm befestigt. Darauf wird ein Tropfen PBS gegeben. Daneben werden weitere Tropfen mit folgenden Lösungen platziert (Reihenfolge beachten): 4 % PFA-Lsg., PBS, 1 % Triton-Lsg., PBS, PBS, PBS, PBS. Eine zweite Tropfenreihe wird darunter in der gleichen Weise aufgebaut.

Wichtig: Deckgläschen sind sehr zerbrechlich; die Seite des Deckgläschens mit dem infizierten Zellrasen darf nie austrocknen!

Durchführung

- Nimm die Deckgläschen mit der Pinzette und lege sie in den ersten Tropfen (PBS; Seite mit dem Zellrasen nach unten) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 30 Sek.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf den Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (4 % PFA-Lsg.) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 3 Min.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf den Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (PBS) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 30 Sek.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf den Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (1 % Triton-Lsg.) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 4 Min.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf den Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (PBS-Lsg.) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 10 Sek.

- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf dem Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (PBS) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 30 Sek.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf dem Deckgläschen und lege sie in den nächsten Tropfen (PBS) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Warte 1 Min.
- Entferne schnell die restliche Flüssigkeit auf dem Deckgläschen und lege sie in den letzten Tropfen (PBS) der ersten bzw. zweiten Reihe
- Bereite eine feuchte Kammer vor (Petrischale mit einem feuchtem Filterpapier) und lege einen Objektträger hinein
- Lege ein Deckgläschen mit dem Zellrasen nach oben auf den Objektträger (Der Zellrasen darf nicht austrocknen!)
- Gib 40 µl der Lsg. mit dem primären Antikörper darauf
- Inkubiere für 45-60 Min. bei 37°C
- Bereite zwei neue Reihen mit jeweils 4 Tropfen PBS-Lsg. vor
- Nimm die Deckgläschen und wasche sie in den PBS-Tropfen (Verweildauer im PBS: 10 Sek., 30 Sek., 2 Min., 5 Min.)
- Platziere die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach oben auf dem Objektträger (Der Zellrasen darf nicht austrocknen!)
- Gib 40 µl der Lsg. mit dem sekundären Antikörper darauf
- Inkubiere für 45-60 Min. bei 37°C
- Nimm die Deckgläschen und wasche sie in den PBS-Tropfen (Verweildauer im PBS: 10 Sek., 30 Sek., 2 Min., 5 Min.)
- Nimm neue Objektträger und gib 2 Tropfen 5 % Glycerol-Lsg. darauf. Platziere die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten in die Tropfen.
- Nun können die Zellrasen mit dem Immunfluoreszenz-Mikroskop analysiert werden (Vorsicht: Die Deckgläschen können sich leicht auf dem Objektträger bewegen, so dass die Zellen abgerieben werden!)

Experiment 2: Detektion von Apoptose in Zellen

Einleitung

Zellen werden hauptsächlich durch zwei Wege aus dem lebenden Organismus eliminiert: Nekrose und Apoptose.

Zellen, die durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel durch mechanische Verletzung verletzt werden, sterben durch Nekrose. Hierbei wird die Cytoplasmamembran zerstört und die Zelle

entlässt das Zellinnere mit Organellen und Enzymen in die Umgebung. Dies führt zu lokalen Entzündungsreaktionen im Organismus.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Apoptose um ein streng regulierten programmierten Zelltod, der nur in der betroffenen Zelle abläuft. Es ist ein Vorgang, der für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzellig lebenden Organismus essentiell ist. Während der Apoptose kommt es zu vielfältigen zellulären Änderungen, die auch im Laufe dieses Praktikums nachgewiesen werden sollen:

- Änderung in der Symmetrie der Lipiddoppelschicht der Membran
- Kondensation des Chromatins
- Abschnürung von Vesikeln (blebbing)
- DNA Fragmentierung

Apoptose kann über zwei Wege eingeleitet werden: von außen durch Immunzellen, **extrinsischer Weg**, oder aufgrund von zellinternen Prozessen, **intrinsischer Weg**.

Der extrinsische Weg wird meistens von Immunzellen ausgelöst, die mit ihrem Todes-Liganden (Fas-Ligand) an den Rezeptor (Fas-Rezeptor) auf der betroffenen Zelle binden. Dadurch kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Bildung des DISC-Komplexes (death-inducing signaling complex). Hierbei handelt es sich um mehrere Caspasen, die dann kaskadenartig final zur Aktivierung einer DNase und anderen Effektormechanismen führt. Dies führt schließlich zur Fragmentierung der DNA.

Der intrinsische Weg wird durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytoplasma der Zelle eingeleitet. Hierbei kommt es wieder zur Aktivierung von Caspasen, die wiederum zur Aktivierung von DNasen führen.

Viren, wie zum Beispiel das Herpes-simplex-Virus (HSV), können zelltypabhängig die Induktion von Apoptose verhindern oder diese gezielt induzieren.

Aufgabenstellung

In diesem Teil des Praktikums werden Zellen mittels verschiedener Stimuli für Apoptose sensibilisiert und anschließend lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Als Stimuli dienen zum einen die Infektion mit dem HSV, die Zugabe des Fas-Liganden CD95L und die Zugabe des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin (STS).

Die Einleitung der Apoptose über den extrinsischen Weg wird durch Zugabe des Fas-Liganden (CD95L) zu den Zellen ausgelöst. Dieser bindet spezifisch an den Fas-Rezeptor (CD95) der Zelle und induziert in dieser Apoptose. Der intrinsische Weg wird durch die Zugabe von Staurosporin eingeleitet.

Früh zu Beginn der Apoptose kommt es zur Änderung in der Asymmetrie der Cytoplasmamembran. Hierbei werden Phosphatidylserin-Moleküle von der Innenseite der Membran auf die Außenseite transloziert (flipping). Annexin V bindet calciumabhängig spezifisch an Phosphatidylserine. Durch Kopplung von Annexin V mit dem Fluorophor FITC (Fluorescein-Isothiocyanate) können apoptotische Zellen im Fluoreszenzmikroskop in diesem Praktikum nachgewiesen werden. Annexin V bindet nicht an normal intakte Zellen. Um nekrotische Zellen zu identifizieren, werden die Zellen zusätzlich zur Annexin V Färbung mit Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid interkaliert in die DNA. Bei Zellen, die sowohl positiv für Annexin und Propidiumiodid sind, handelt es sich um nekrotische Zellen.

Darüber hinaus soll die Fragmentierung der DNA in apoptotischen Zellen im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

ACHTUNG!

Ethidiumbromid und Propidiumiodid sind kanzerogene Stoffe, die in die DNA interkalieren. Beim Arbeiten mit diesen Stoffen sind **Handschuhe** zu tragen!

Die 24-well-Platten enthalten **infektiöse HSV-Partikel!** Deshalb sind die Platten nur unter der **Sterilbank** zu öffnen und ansonsten geschlossen zu halten!

Generell sind beim Arbeiten **Handschuhe** und **Kittel** zu tragen!!!

Versuchsdurchführung

Analyse der Morphologie und Membranintegrität

Alle Beobachtungen werden in das beigefügte Arbeitsblatt eingetragen!

24-well-Platte	Co	HSV	Fas	HSV+	STS	HSV+
	1	2	3	Fas 4	5	STS 6
1. Kontrolle						
2. Trypanblaufärbung						
3. AnnexinV/Propidiumiodid Färbung						
4. DNA-Lyse						

Lichtmikroskopische Betrachtung

- Reihe 1 betrachten
- Reihe 2: Zugabe 50 µl Trypanblau (unter Sterilbank!) und Betrachten

Arbeiten unter der Sterilbank

- **Reihe 3-4: Medium absaugen**
- **Reihe 3: Zugabe von 200 µl Annexinpuffer**
- **Reihe 4: Zugabe von 300 µl Lysispuffer**
- **Reihe 3: Absaugen** von Annexinpuffer und Zugabe von **100 µl Annexin-V-Lösung**
- **Reihe 4: zähes Lysat** in beschriftete **Eppendorftube** überführen
- Platte **15 min** in **Kühlschrank**
- **Reihe 3: Absaugen** Annexin-V-Lösung und Zugabe **200µl Annexinpuffer**

Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

- **Reihe 3: Annexin-V Färbung**
- **Reihe 3: unter Sterilbank Zugabe von 10 µl Propidiumiodidlösung**

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird die Membranintegrität (Annexin-V; Reihe 3) und die Kernmorphologie (Propidiumiodide; Reihe 3) lebender, früh- und spät-apoptotischer und HSV-infizierter Zellen verglichen.

Analyse der Fragmentierung der DNA im Agarosegel

Gießen des 1 % Agarosegels

- Aufkochen der 1 % Agarosegellösung in Mikrowelle (ständige Kontrolle, dass es **nicht überkocht!**)
- **VORSICHT HEISS!**
- Flasche mit **Handschuhen** anfassen und zum Abkühlen draußen stehen lassen
- Gelkammer abkleben mit Autoklavierband und Spacer einsetzen
- Ausgekühlte Agaroselösung eingießen
- Aushärten lassen
- 100 µl Ladepuffer zu Lysat geben
- 1,5 µl DNA-Marker in 1. Geltasche pipettieren
- je 20 µl in Geltasche pipettieren; **ACHTUNG** viskoses Lysat mit DNA-Fäden!
- Gel bei 100 V laufen lassen (30-45 min)
- Gel für 10 min in Ethidiumbromidbad färben
- mit **Handschuhen** Gel unter UV-Licht anschauen

	Co 1	HSV-F 2	Fas 3	HSV+Fas 4	STS 5	HSV+STS 6
Generelle Morphologie						
Trypanblaufärbung						
Annexin V-Färbung						
Propidiumiodid-färbung						
DNA-Analyse						

Literatur

Cytomegalovirus Protocols

J. Sinclair, ed., Humana Press, 2000

Herpesvirus Simplex Virus Protocols

S. M. Brown and A. R. MacLean, Humana Press, 1998

Molekulare Virologie,

S. Modrow /D. Falke/U. Truyen, Spektrum-Verlag, 2. Auflage, 2003

Apoptose

CD95's deadly mission in the immune system

P.H. Krammer, Nature, 407, 789-795, 2000

Abkürzungen

E: *Early*-Proteine

HCMV: Humanes Cytomegalievirus

HEF: Human embryonic fibroblasts

HSV-1: Herpes simplex Virus Typ 1

IE: *Immediate Early*-Proteine

L: *Late*-Proteine

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFA: Paraformaldehyd

SDS: Natriumdodecylsulfat

STS: Staurosporin

TAE: Tris/Acetat/EDTA Elektrophorese-Puffer

Zellkulturen

C. Priemer

Einleitung

Die Kultivierung animaler Zellen gehört zu den Standardmethoden in der Zell- und Molekularbiologie und ist ein wichtiges Hilfsmittel in der animalen Virologie.

Zellkulturen stellen im Gegensatz zu anderen Kultivierungssystemen ideale, relativ einheitliche Wirtssysteme für die Arbeit mit Viren dar. Sie bieten die Grundlage für die Isolierung und Vermehrung von Viren und werden in der Routinediagnostik von Viruskrankheiten sowie zur Entwicklung, Herstellung und Prüfung von Impfstoffen verwendet.

Definition wesentlicher Termini

Zellkultur wird die Vermehrung und das Wachstum von Zellen *in vitro* genannt. Die Zellen organisieren sich hierbei nicht mehr in Gewebe. Eine durch Trypsinbehandlung eines geeigneten Gewebes bereitete Zellsuspension wird in Petrischalen oder Kulturflaschen überführt. Die Zellen können an der Oberfläche anhaften und sich durch Teilung zu einem einschichtigen Zellrasen (Monolayer) vermehren oder durch ständige Bewegung in Suspension gehalten werden. Sind die Zellen durch Teilung so dicht gewachsen, dass sie einander berühren, endet das Wachstum durch Kontaktinhibition.

Passagieren: Transferieren von Zellen von einem Kulturgefäß in ein anderes, wobei eine Verdünnung der Zellen erfolgt und die Zellen sich erneut teilen können. Bei Monolayer-Kulturen erfolgt die Passage durch Ablösen von der Oberfläche und Vereinzeln der Zellen mittels einer Trypsin-Versen-Behandlung.

Zellkulturmedien: Für die isolierten Zellen muss unter *in vitro*-Bedingungen ein Milieu geschaffen werden, das eine optimale Proliferation erlaubt. Medien werden aus biologischen Bestandteilen und gepufferten physiologischen Salzlösungen zusammengesetzt.

Salzlösungen dienen der Erhaltung physiologischer Bedingungen und des pH-Wertes. Die biologischen Bestandteile beinhalten bei den synthetischen Medien chemisch definierte Substanzen, die für das Zellwachstum essentiell sind. Die Medien werden mit Serum supplementiert, um ein optimales Wachstum über längere Zeit zu ermöglichen. Durch Zugabe von Antibiotika sollen Bakterienkontaminationen vermieden werden.

Primärkultur

Kulturen aus Zellen, Geweben oder Organen, die einem Organismus entnommen wurden.



Zelllinien

Eine Primärkultur besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Durch Klonierung kann man aus einzelnen Zellen homogene Zelllinien gewinnen.



diploide Zelllinie



permanente Zelllinie

begrenzt haltbar, 75 % der Zellen besitzen gleichen Karyotyp wie normale Zellen der Spezies

unbegrenzte Subkultivierung

Suspensionskulturen: Zellen flotieren im Nährmedium.

Oberflächenkulturen: Zellen wachsen auf einer Unterlage.

Nach der Morphologie unterscheidet man:

- epitheloid wachsende Zellen; das sind mosaikartige Schichten mit wenig Interzellularsubstanz und
- fibroblastoid wachsende Zellen; sie wachsen spindelförmig und faserbildend.

Literatur

1. LINDL, T., BAUER, J.: Zell- und Gewebekultur. 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1989.
2. MAYER, A., BACHMANN, P. A. et al.: Virologische Arbeitsmethoden Bd. 1, Gustav Fischer Verlag Jena, 1974.
3. PAUL, J.: Zell- und Gewebekulturen. W. de Gruyter Verlag Berlin, 1980.
4. MORGAN, S. J., DARLING, D. C.: Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford, 1994.

Aufgabenstellung

Aus einer Kulturflasche mit konfluent gewachsenen humanen embryonalen Lungenfibroblasten soll eine neue Subkultur mit 800 000 Zellen in einer Mikrogewebekulturflasche (25 cm² Wachstumsfläche) angelegt werden.

1. Herstellen einer Zellsuspension

Zelllinie: Fi 301; humane embryonale Lungenfibroblasten; diploid; bis zu 30 Passagen möglich.

Methode: Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung. Es ist darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu lange mit der Trypsin-EDTA-Lösung in Kontakt bleiben. Lange Einwirkzeiten können die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen. Die Temperatur für die Trypsineinwirkung ist bei 37 °C optimal, deshalb sollte die Lösung vorgewärmt werden.

Der Trypsinierungsprozess sollte unter dem Mikroskop beobachtet werden. Eine optimale Einwirkzeit ist gegeben, wenn die Mehrheit der Zellen sich von der Unterlage abgehoben hat und abgerundet in der Trypsinierungslösung schwimmt.

Material: 1 Mikroflasche mit konfluent gewachsenen Fibroblasten
Trypsin-EDTA-Lösung 37 °C (STV-Lösung)
PBS
Vorgewärmtes frisches Medium (MEM, 7,5 % fötales Kälberserum,
Antibiotikazusatz)
Pipettierhilfe
Sterile Pipetten
Sterile Kulturflasche

Durchführung

- Verbrauchtes Kulturmedium abgießen.
- Zellen mit PBS waschen, PBS abgießen.
- 1 ml STV-Lösung in die Kulturflasche geben, nicht direkt auf den Zellrasen pipettieren.
- Nach kurzem Schwenken unter Befeuchtung des Zellrasens mit STV-Lösung diese abgießen.
- Zellen bei 37 °C für 1-2 Minuten inkubieren.
- Anschließend mikroskopische Beobachtung des Ablösens des Zellrasens.
- Resuspendieren der Zellen durch Zugabe von 5 ml Medium.
- Abspülen der Zellen von der Gefäßwand und Vereinzeln durch wiederholtes Pipettieren.
- 0,1 ml Zellsuspension für die Zellzahlbestimmung entnehmen.

2. Zellzahlbestimmung

Für ein optimales Wachstum spielt die anfänglich zugesetzte Zellzahl eine entscheidende Rolle. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur langsam, zu dicht ausgesäte Zellen müssen zu oft subkultiviert werden, wobei jede Subkultivierung für nicht transformierte Zelllinien die Gesamtlebensdauer der Zelllinie verkürzt.

Mittels Trypanblau-Anfärbung kann man zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Der Test beruht darauf, dass lebende Zellen Trypanblau nicht aufnehmen, während sich bei toten Zellen sowohl Cytoplasma als auch Kern anfärben.

Soll eine Zellzählung wiederholt werden, muss der Testansatz neu gemischt werden, da sich bei mehr als fünf Minuten Inkubationszeit des Testansatzes die Zahl der angefärbten Zellen stark erhöhen kann. Trypanblau wirkt cytotoxisch.

Material: Hämocytometer (FUCHS-ROSENTHAL)

Zellsuspension

Trypanblau-Lösung (0,2 %-ig)

Pipetten 1 ml

Mikroskop

Durchführung:

- Deckglas und Oberfläche der Zählkammer reinigen.
- Ränder der Zählkammer leicht anfeuchten, Deckglas auf die Zählkammer schieben. Das Erscheinen der „Newtonringe“ zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist.
- Reagenzglas mit 0,9 ml Trypanblau-Lösung vorbereiten.
- 0,1 ml gut durchmischte Zellsuspension in Trypanblau-Lösung pipettieren, gut durchmischen.
- Suspension in Zählkammer durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer füllen, wobei Kapillarkräfte diese selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugen; auf keinen Fall über- oder unterfüllen.
- Zellen unter dem Mikroskop auszählen. Dabei ist darauf zu achten, dass Zellen, die auf den Linien liegen, nicht doppelt gezählt werden. Dies ist zu vermeiden, indem nur solche Zellen gezählt werden, die oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen.
- Alle 16 großen Quadrate auszählen.
- Berechnung der Zellzahl / ml Zellsuspension: Gezählte Zellen x Kammerfaktor (312) x Verdünnungsfaktor (10).

3. Anlegen einer Subkultur mit 800 000 Zellen

- Berechnung der Zelleinsaat:
Gegeben: Gezählte Zellzahl / ml.
Gewünscht: 800 000 Zellen / x ml.
Zellzahl (gezählt) : gewünschte Zellzahl = 1 ml : x.

$$\text{Zelleinsaat (ml)} = \frac{\text{Gewünschte Zellzahl}}{\text{Zellzahl (gezählt)}}$$

- Berechnete Zelleinsaat in neue Kulturflasche pipettieren.
- Kultur mit frischem Kulturmedium (ca. 5 ml) ergänzen.

4. Auswertung

- Nach 4 (bzw. 3) Tagen mikroskopische Beurteilung der angelegten Zellkultur anhand der Ausbreitung der Zellen auf der Wachstumsfläche.
- Ermittlung des Zellwachstums nach 4 (bzw. 3) Tagen durch Bestimmung der Zellzahl pro Kulturflasche. Der Quotient gezählter Zellen durch die Zellzahl der Einsaat ergibt eine quantitative Aussage über das Zellwachstum:

$$\text{Zellwachstum} = \frac{\text{Ernte}}{\text{Einsaat}}$$

Virusdiagnostik

Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Hofmann

Die Diagnostik viraler Infektionserreger spielt eine wesentliche Rolle bei der Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten. Neben vielen lange bekannten humanpathogenen Viren (z.B. Herpes- oder Hepatitisviren) treten neue (z.B. SARS-Coronavirus) oder sogenannte „reemerging“ Viren (z.B. Vogelgrippe-Virus H5N1) im diagnostischen Alltag auf. Die hohe Mutationsfreudigkeit vieler dieser Viren kann zum Auftreten neuer Geno- oder Subtypen führen, die möglicherweise mit den gängigen präventiven und therapeutischen Maßnahmen nicht mehr bekämpft werden können. Das rechtzeitige Erkennen sowohl der Erreger als auch deren Veränderungen stellt die große Herausforderung der modernen virologischen Diagnostik dar. Heute steht nicht mehr nur der alleinige Nachweis des Erregers im Vordergrund, sondern der behandelnde Arzt möchte auch wissen, wie hoch die Viruslast bei seinem Patienten ist, welcher Subtyp vorliegt, wie er therapieren kann und am besten auch noch eine Abschätzung des therapeutischen Erfolgs. Insbesondere durch die zuletzt genannten Forderungen hat sich das Spektrum der virologischen Diagnostik in den letzten Jahren verändert. So ist die Methode der Isolation infektiöser Viren aus Patientenmaterial (Koch'sche Postulate!), die bei vielen Fragestellungen den Goldstandard darstellt, aus zahlreichen Labors verschwunden bzw. spielt nur noch eine untergeordnete Rolle. Sensitivere und schnellere Methoden wie Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) treten trotz eingeschränkter Aussagekraft an die Stelle der Virusisolation. Klassische serologische Nachweisverfahren, wie die Komplementbindungsreaktion, Hämagglutinations- und –hemmteste oder auch Immunfluoreszenzteste werden aufgrund ihrer teilweise limitierten Aussagekraft und des hohen subjektiven Faktors beim Abarbeiten und Ablesen durch automatisierbare Verfahren wie Enzymimmunoassays ersetzt. Auf der anderen Seite nehmen NAT einen immer breiter werdenden Raum in der Diagnostik ein, da sie nicht nur schnelle Hinweise liefern können, sondern auch die Basis für viele weitere Untersuchungen wie Geno- und Serotypisierungen oder Resistenztestungen darstellen.

Die zweite große Herausforderung an die Laboratoriumsmedizin ist die Arbeit auf der Basis standardisierter Verfahren und Vorschriften. In den letzten Jahren sind Qualitätsnormen sowohl für Europa als auch für die jeweiligen Länder definiert worden. Viele virologische Labors in Deutschland arbeiten bereits nach diesen Qualitätsrichtlinien und haben sich

akkreditieren lassen. Dies bedeutet einen großen zeitlichen und finanziellen Aufwand für das Labor, führt aber gleichzeitig zu einer qualitativ hochwertigen und zuverlässigen Diagnostik.

Sie werden während Ihres Praktikums einen Rundgang durch die diagnostische Abteilung des Instituts machen und dabei die modernen Methoden der Diagnostik und die Eckpfeiler des Qualitätsmanagements kennenlernen.

Antivirale Chemotherapie

Arbeitsgruppe Diagnostik – H. Heider

Wirkungsmechanismen von Antiherpetika

Die antivirale Selektivität der Nukleosidanaloga beruht auf ihrer Phosphorylierung durch herpesvirale Nukleosidkinasen und, nach der weiteren Phosphorylierung zum Triphosphat durch zelluläre Kinasen, auf der spezifischen Hemmung der viralen DNA-Polymerase mit oder ohne Einbau in die DNA.

Herpes-simplex-Virus Typ1 (HSV-1) induziert eine Desoxypyrimidinkinase, die – im Gegensatz zu analogen zellulären Enzymen – Bromvinyldeoxyuridin (BVDU) zum Mono- und Diphosphat phosphoryliert. Nur der letzte Phosphorylierungsschritt zum Triphosphat erfolgt durch zelluläre Kinasen. BVDU-Triphosphat wird durch die HSV-1-DNA-Polymerase in die virale DNA eingebaut, welches wiederum eine Hemmung der Expression „später“ mRNA und Proteine zur Folge hat.

Aciclovir (ACV) wird nur bis zum Monophosphat kinasiert, zelluläre Enzyme katalysieren die weiteren Schritte. Der Einbau von ACV-Triphosphat in die DNA führt wegen des Fehlens einer 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch, und es entsteht ein stabiler ternärer Komplex mit der viralen DNA-Polymerase, deren Funktion dadurch irreversibel gehemmt wird.

Die **Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)** induzierte Kinase phosphoryliert BVDU nur zum Monophosphat. Daher wird HSV-2 durch BVDU nicht gehemmt. Die Wirkung von ACV gegen HSV-2 ist analog der gegen HSV-1.

Varicella-Zoster-Virus (VZV) induziert ebenfalls eine Desoxynukleosidkinase. Die Wirkungsprinzipien der Nukleosidanaloga BVDU und ACV sind wie für HSV-1 beschrieben.

Zytomegalievirus (CMV) wird nicht durch BVDU und kaum durch ACV gehemmt. Ganciclovir (GCV) ist eine Weiterentwicklung von ACV mit einem breiteren Wirkungsspektrum. Wegen seiner relativ hohen Toxizität ist die Anwendung auf schwere CMV-Infektionen beschränkt. GCV wird in CMV-infizierten Zellen selektiv kinasiert. An der Phosphorylierung zum Monophosphat ist eine viruscodierte Phosphotransferase (UL 97) geringer Substratspezifität beteiligt. GCV-Triphosphat hemmt die virale DNA-Polymerase und wird in die Virus-DNA inkorporiert.

Foscavir (PFA) ist ein Pyrophosphat analogon, das die DNA-Synthese nach dem Prinzip der Produkthemmung inhibiert. Es hat ein relativ breites antivirales Spektrum, wird jedoch wegen seiner Nephrotoxizität nur bei schweren CMV-Infektionen eingesetzt.

Antiherpetika-Resistenzen

Für HSV-1, HSV-2 und VZV gilt, dass Resistenz gegen die Nukleosidanaloga zu etwa 90 % durch Mutationen im Desoxypyrimidinkinase-Gen bedingt ist. Deletionen führen zum Ausfall dieses Virusproteins, Punktmutationen zu einer geringeren Phosphorylierung der Antiherpetika. Die selteneren Mutationen im DNA-Polymerase-Gen erhöhen die Diskriminierung des Enzyms gegen diese Substratanaloga.

Mutationen in den Genen für die Proteinkinase (UL 97) und die DNA-Polymerase (UL 54) von CMV determinieren die Ganciclovir-Resistenz, während Resistenz gegen Foscavir ausschließlich durch Mutationen im Polymerase-Gen bedingt ist.

Empfindlichkeitstestung von HSV-1 gegenüber Aciclovir

1. Infektion

Mikroskopische Kontrolle des Zell-Monolayers (humane embryonale Lungenfibroblasten) in den 96-well-Platten

Die folgenden Schritte werden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt: **Steril arbeiten! Handschuhe tragen!**

- Vorbereiten der Virusverdünnungen in Medium ohne Serum (MEM):
HSV-1-Patientenisolat: 10^{-1} bis 10^{-8}
- Absaugen des Mediums

- 1x Waschen mit 0,2 ml Medium ohne Serum (MEM)
- Infektion mit 0,2 ml/well der jeweiligen Virusverdünnung
- 4 Parallelbestimmungen pro Verdünnung
- Kontrollen nicht vergessen!**
 - Zellkontrolle ohne Virus und ohne Substanz
 - Zellkontrolle ohne Virus mit der jeweiligen Substanzkonzentration (auf Zytotoxizität)
 - Positivkontrolle mit Virus und ohne Substanz
- Adsorption: 1 h, 37°C, CO₂-Inkubator (5 Vol % CO₂)
- Absaugen des Inokulums (Kontaminationsgefahr!)
- Zugabe von 0,2 ml/well Overlay-Medium (MEM+2 % fötales Kälberserum), das folgende Substanzkonzentrationen (µM) enthält:
Aciclovir (ACV): 0,5; 1; 5; 10
- Je Hemmstoffkonzentration eine 96-well-Platte anlegen
- Viruskontrollen erhalten nur Medium ohne Substanz
- Zellkontrollen erhalten entweder nur Medium oder Medium mit der jeweiligen Substanzkonzentration.
- Inkubation: 48-72h; 37°C; CO₂-Inkubator (5Vol %)

2. Auswertung

- Mikroskopische Auswertung des bereits fixierten* Zell-Monolayers im Lichtmikroskop

* Fixierung erfolgt durch Mitarbeiter des Instituts

- Medium absaugen
- Fixieren mit 0,2 ml/well Ethanol/Aceton (95:5); 30 min; -20 °C
(In diesem Zustand kann die Platte bei -20 °C gelagert werden)
- Beurteilung, ob zytopathischer Effekt (CPE) in den verschiedenen Virusverdünnungen und in Gegenwart der Hemmstoffe auftritt und Protokollierung auf beiliegendem Formblatt
- Berechnung des Virustiters für jede Platte als die Verdünnung, bei welcher 50 % der wells CPE zeigen (50 % tissue culture infectious dose; TCID₅₀) auf beiliegendem Formblatt
- Umrechnung TCID₅₀ /ml in plaque-forming-units (PFU)/ml:
PFU/ml = 0.7 x TCID₅₀ /ml

- Grafische Ermittlung der 50 % Hemmdosis (ID₅₀) für Aciclovir gegen das HSV-1-Patientenisolat

Anhang:

- **Literatur**

De Clercq E.:

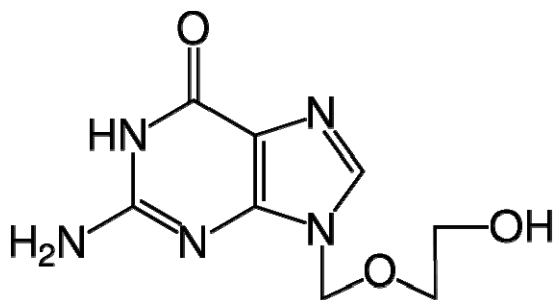
Molecular targets for antiviral agents.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (JPET)

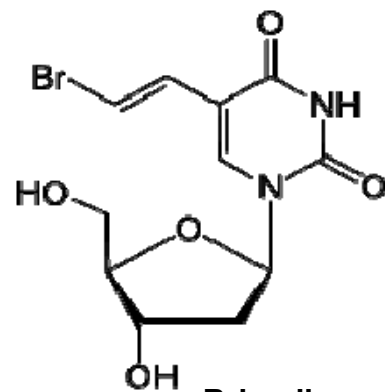
297 (2001) 1-10

- **ID₅₀-Werte gegenüber HSV-1:** $\leq 3\mu\text{M}$ sensitiv

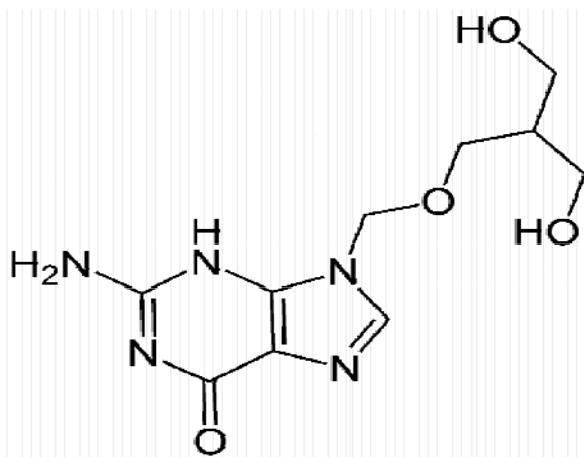
Strukturformeln



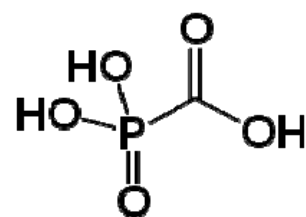
Aciclovir



Brivudin



Ganciclovir



Foscavir

Röteln

Arbeitsgruppe Diagnostik – A. Stein

Die Röteln sind eine klassische Kinderkrankheit, doch 50 % der Infektionen im Kindesalter bleiben asymptomatisch. Das Rötelnvirus wird postnatal durch Tröpfcheninfektion übertragen. Es ist weltweit verbreitet; der Mensch ist der einzige Wirt. Zivilisatorische Einflüsse und unvollständige Durchimpfung der Bevölkerung führen infolge Verzögerung der Durchseuchung zu sporadischen Infektionen bei Erwachsenen, mit entsprechender Wahrscheinlichkeit der vertikalen Übertragung in der Schwangerschaft.

Virus: Umhülltes RNA-Virus; Strukturproteine: Core-Protein C, Glykoproteine E1 und E2 der Virushülle. E1 besitzt Hämagglutinin-Funktion und ist deshalb einerseits für die Infektion der Wirtszellen, andererseits für die Diagnostik von großer Bedeutung.

Symptome/Erkrankungen: Typisches kleinfleckiges Exanthem mit Kopfschmerzen, subfebrilen Temperaturen, Lymphknotenschwellungen, Katarrh der oberen Luftwege und Konjunktivitis. Eine Rötelnvirus-Primärinfektion im 1. Trimenon der Schwangerschaft führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Rötelnembryopathie.

Siehe auch Merkblatt für Ärzte vom Robert-Koch-Institut www.rki.de

http://www.rki.de/clin_151/nn_504470/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Roeteln.html

Hämagglutinationshemmtest (HHT)

(nach den Mutterschaftsrichtlinien vorgeschriebener Test für das Screening der Schwangeren)

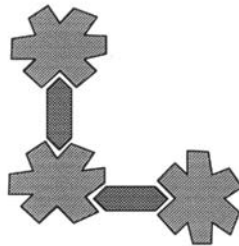
Testprinzip: Die Bestimmung basiert auf der Fähigkeit des Rötelnvirus, Erythrozyten zu agglutinieren. Durch spezifische Antikörper in der Probe wird diese Agglutination gehemmt.

AbleSEN des Röteln-HHT

Prinzip



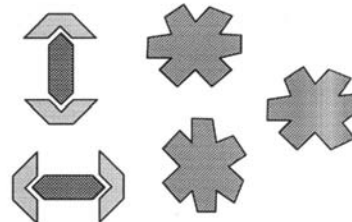
Keine Röteln-Antikörper
im Serum vorhanden



↳ Hämagglutination
Erys bilden einen „Teppich“



Röteln-Antikörper
im Serum vorhanden



↳ Hemmung der Hämagglutination
Erys sinken auf den Boden



Die letzte Serumverdünnung mit
vollständiger Hemmung zählt !
Titer = reziproke Verdünnung

Diagnostische Bedeutung:

Ein Titer von 1:32 oder höher gilt als Schutz vor einer Röteln-Infektion. Bei einem Titer <8 liegt keine Immunität vor. Bei einem Titer von 8 oder 16 muss zur Klärung der Immunitäts-lage zusätzlich ein ELISA durchgeführt werden. Liegt kein Schutz vor, ist eine Röteln-Schutzimpfung angezeigt (Kontraindikation: Schwangerschaft). Bei Verdacht auf eine frische Infektion kann die Serumprobe mit Hilfe eines ELISA auf spezifische Röteln-IgM-Antikörper untersucht werden.

Testdurchführung:

Patientenserum:

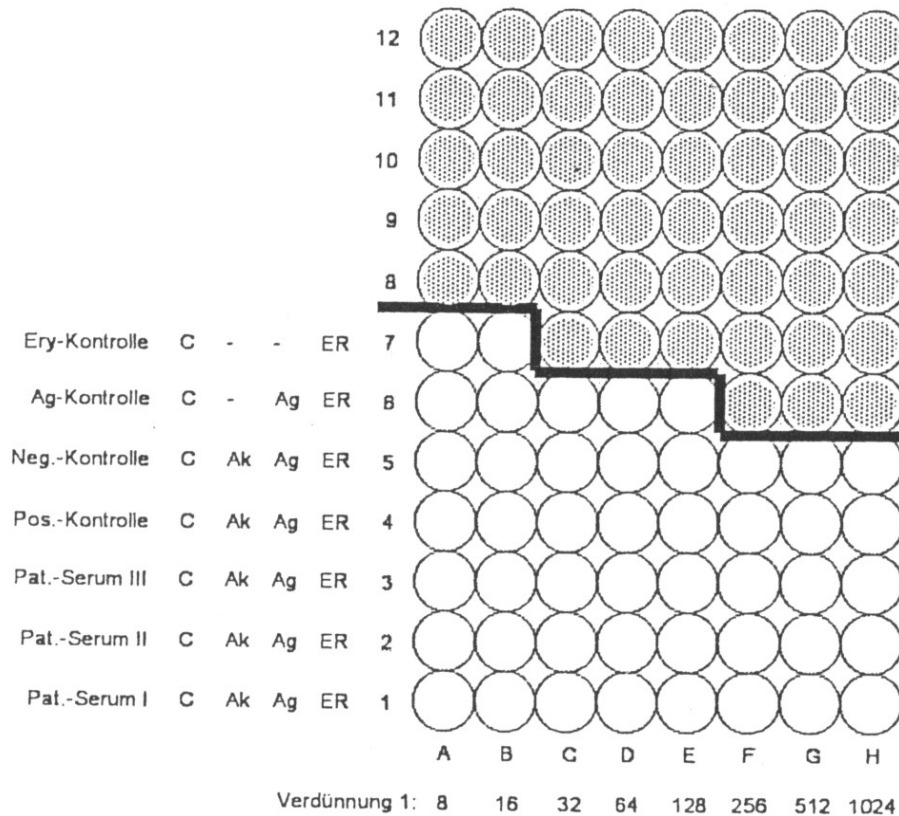
1. Patientenserum I
2. Patientenserum II
3. Patientenserum III

Kontrollen:

1. negatives Kontroll-Serum
2. positives Kontroll-Serum
3. Erythrozyten-Kontrolle (ohne Antigene und Serum)
4. Antigen-Kontrolle (ohne Serum)

Pro Patienten- und Kontroll-Serum werden 8 Vertiefungen (z. B. Reihe A bis H), für die Antigen-Kontrolle werden 5 und für die Erythrozyten-Kontrolle mindestens 2 Vertiefungen benötigt.

Pipettierschema für Röteln-HHT



1. Je 25 µl CANM-Lösung (CaCl₂, Rinderalbumin, NaCl, MgSO₄) in jede benötigte Vertiefung pipettieren.
2. Verdünnung der Patienten- und Kontrollseren: Je 25 µl der vorbehandelten Patienten- bzw. Kontroll-Seren in die 1. Vertiefung (A1-A5) der entsprechenden Reihe pipettieren. Eine Verdünnungsreihe bis zur 8. Vertiefung (A-H) durch Überpipettieren von je 25 µl herstellen. Aus der 8. Vertiefung werden 25 µl verworfen.
→ Die Vorbehandlung wurde bereits durchgeführt: Adsorption der Seren durch Kaolinbehandlung und Wärmeinaktivierung bei 56 °C, zur Ausschaltung thermolabiler und thermostabiler Inhibitoren der Hämagglutination.
3. Für die Antigenkontrolle 25 µl des gebrauchtsverdünnten Röteln-Antigens in die 1. Vertiefung der Antigen-Kontrolle pipettieren. Durch Überpipettieren eine Verdünnungsreihe (A-E) herstellen. Aus der 5. Vertiefung (E) werden 25 µl verworfen.

4. Je 25 µl gebrauchtsverdünntes Röteln-Antigen in jede Vertiefung der Patienten- und Kontroll-Seren pipettieren (A1/A5-H1/H5) (nicht in Antigen- und Erythrozytenkontrolle).
5. Platte gut schütteln und 1 Stunde bei Raumtemperatur (+ 18 bis 25 °C) stehen lassen.
6. Human-Erythrozyten-Suspension resuspendieren! Je 25 µl der gebrauchtsverdünnten Erythrozyten-Suspension in jede Vertiefung pipettieren.
7. Platte schütteln und bei Raumtemperatur erschütterungsfrei und vor direkter Sonnenstrahlung geschützt über Nacht stehen lassen.

Bewertung:

- Die höchste Serumverdünnungsstufe, bei der die vollständige Hemmung der Agglutination als scharf begrenzter Knopf vorliegt, gibt den Antikörper-Titer der Patienten- und Kontroll-Seren an.
- Die Bewertung der Testansätze kann erst erfolgen, wenn die Erythrozyten-Kontrolle vollständig sedimentiert ist, d. h. der Erythrozytenknopf scharf begrenzt ist.
- Erst dann ist der Titer der Patienten- und Kontroll-Seren abzulesen. Der Titer ist durch Vergleich mit der Erythrozyten-Kontrolle festzulegen.
- Die Bewertung der vollständigen Hemmung der Agglutination kann durch das Schrägstellen der Platte erleichtert werden. Nur scharf begrenzte Knöpfe bilden beim Schrägstellen der Platte eine „Nase“. Vertiefungen, in denen die Agglutinationshemmung nicht vollständig ist, verändern ihr Bild durch das Schrägstellen der Platte nicht oder deutlich geringer als in den Vergleichskavitäten.
- Die Ablesung erfolgt gegen einen hellen Hintergrund.
- Die positiven Kontroll-Seren müssen den angegebenen Titer ± 1 Titerstufe erreichen.
- Das negative Kontroll-Serum muss in jeder Vertiefung eine Agglutination zeigen.
- Die HA-Aktivität der Antigen-Kontrolle wird ermittelt, indem die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch eine deutliche Agglutination zu sehen ist, abgelesen wird.
- Das Antigen liegt in 4 bis 8 HA-Einheiten vor. Beim Vorliegen von 1 HA-Einheit kommt es noch zur deutlichen Agglutination der Erythrozyten.
- In der Antigen-Kontrolle muss die Agglutination deshalb beim Vorliegen von 4 HA-Einheiten in der 1. und 2. Vertiefung, beim Vorliegen von 8 HA-Einheiten in der 1., 2. und 3. Vertiefung gefunden werden.

	Titer	Bewertung
Negativkontrolle		
Positivkontrolle		
Patientin I		
Patientin II		
Patientin III		

Frage:

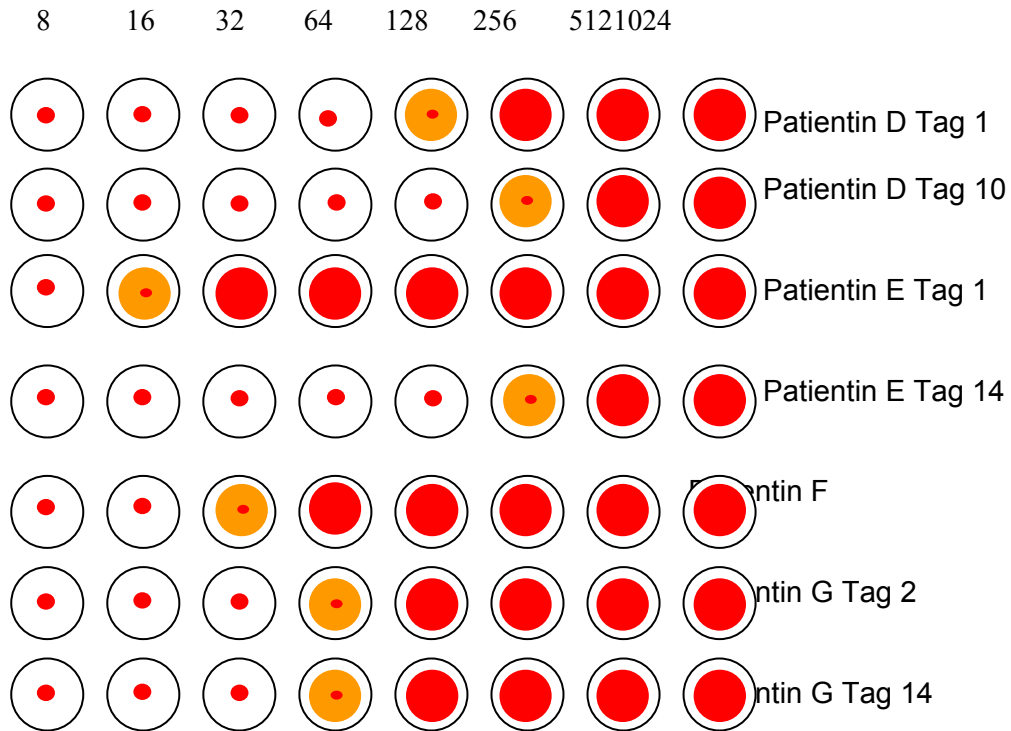
Eine Frau in der frühen Schwangerschaft hat vor kurzem Kontakt zu einem an Röteln erkrankten Kind. Bewerten Sie anhand der ermittelten Daten für die Patienten I-III das Ansteckungs- und Erkrankungsrisiko! Was ist zu tun?

Patientin I:

Patientin II:

Patientin III:

Bitte bearbeiten Sie folgende Aufgaben zum Thema Röteln:



Schematisch dargestellt sind die Ergebnisse des Röteln-Hämagglutinationshemmtestes

1. Lesen Sie die Röteln-Antikörpertiter ab
2. Beurteilen Sie die Situation, davon ausgehend, dass die Patientinnen schwanger sind (SSW unbekannt) und Kontakt zu einem Kind mit Röteln hatten.
3. Welche zusätzliche Diagnostik würden Sie anfordern?
4. Welche zusätzlichen anamnestischen Fragen würden Sie stellen?
5. Welche Maßnahmen würden Sie empfehlen?

Patientin D

Patientin E

Patientin F

Patientin G

Liquordiagnostik

1. Allgemeines zum Liquor

Definition: klare, farblose, eiweißarme, fast zellfreie Flüssigkeit

Lokalisation: inneres Liquorsystem (Ventrikel, Zentralkanal des Rückenmarks) und äußeres Liquorsystem (Subarachnoidalraum)

Funktion: hydromechanischer Schutz, keine nutritive Funktion

Volumen: 100-200 ml beim Erwachsenen, bei Säuglingen 40-60 ml

Produktion: durch Ultrafiltration in Plexus choroidei 70 % (350 µl/min)
durch Ultrafiltration von Blutplasma durch die Hirnkapillaren 18 %
plus Wasser, das bei Glucose-Verbrennung in Hirnzellen freigesetzt wird

Ultrafiltration: Eintritt von Elektrolyten
aktiver, energieverbrauchender Transfer von Glucose
Albumin-Transfer (Pinozytose) Konzentrationsgefälle 1:200
in Abhängigkeit von der Molekülgröße schwerer IgG > IgA >> IgM
Konzentrationsgefälle IgG 1:400

Resorption: von venösen Abschnitten der Kapillaren in den weichen Hirnhäuten
insbesondere in den sogenannten Pacchioni-Granulationen

2. Blut-Liquor-Schrankenstörung: Quotienten nach Prof. Reiber

Ursache: Verminderter Liquorfluss durch a) verringerte Produktion, b) mechan. Behinderung, c) verringerte Rückresorption
Fließgeschwindigkeit nimmt ab → mehr Proteine treten aus dem Blut über & bei konstanter intrathekale Synthese steigt die Proteinkonzentration

Ziel: Beurteilung der Entstehungsursache für im Liquor nachgewiesene Immunglobuline (u. a.)
Ig-Erhöhung durch „Schrankenstörung“ oder intrathekale Synthese

Beurteilung mit Hilfe des Reiberschemas (s.u.)

Verhältnis von Albumin in Liquor und Blut (wird nicht im ZNS produziert)

$$Q_{Alb} = \text{Albumin}_{Liq} / \text{Albumin}_{Ser}$$

Verhältnis der Immunglobuline in Liquor und Blut

$$\text{z.B. } Q_{IgG} = \text{IgG}_{Liq} / \text{IgG}_{Ser}$$

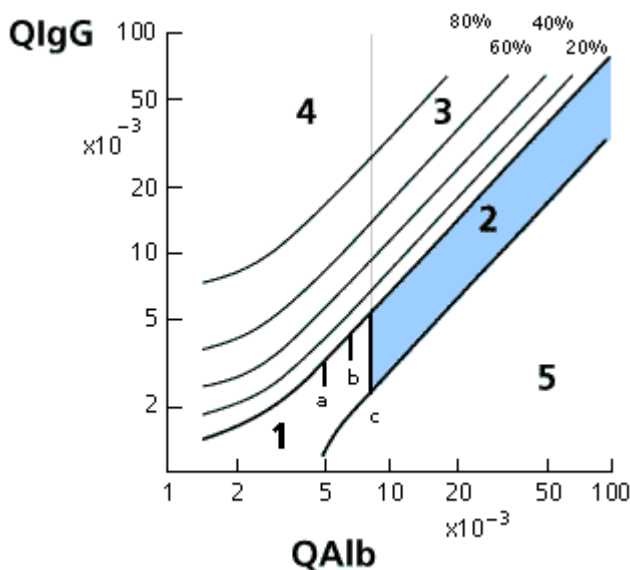
Abhängigkeit: Verhältnis der Konzentrationsgradienten von Albumin und Immunglobulinen ist nicht linear (Berechnung nach Link) sondern hyperbelförmig (nach Reiber) über 4000 Patienten untersucht → empirische Hyperbel jetzt auch theoretisch abgeleitet aus Diffusionsgesetzen

Limes: Hyperbole-beschreibende Formel zur Berechnung des oberen Grenzbereiches¹⁾

$$Q_{limIgG} = 0,93 \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 6 * 10^{-6}} - 1,7 * 10^{-3}$$

$$Q_{limIgA} = 0,77 \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 23 * 10^{-6}} - 3,1 * 10^{-3}$$

$$Q_{limIgM} = 0,67 \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 * 10^{-6}} - 7,1 * 10^{-3}$$



Schema nach Reiber

- 1 Normal
- 2 reine Schrankenstörung
- 3 Schrankenstörung & intrathekale Ak-Synthese
- 4 reine intrathekale Ak-Synthese
- 5 Nonsens

- a 15 Jahre
- b 40 Jahre
- c 60 Jahre

3. Antikörperindex (AI)-Berechnung

Erreger-spezifische Quotienten:

Verhältnis erregerspezifischer Antikörper in Liquor und Serum

$$\text{z. B. } Q_{\text{HSV-IgG}} = \text{HSV-IgG}_{\text{Liq}} / \text{HSV-IgG}_{\text{Ser}}$$

Berechnung des erregerspezifischen Antikörper-Index:

$$\text{z.B. } \text{AI}_{\text{HSV-IgG}} = Q_{\text{HSV-IgG}} / Q_{\text{IgG}} \text{ bzw. } Q_{\text{lim IgG}} \text{ (kleineren Wert verwenden)}$$

Normbereich 0,5-1,5; erhöht > 1,5; signifikant erhöht > 4

Beispiele:

Erkrankung	Zellzahl im Liq	Albumin im Liq	Ig-Klassen im Liq	Verlauf
Bakt. Meningitis	hoch granulozytär	Hoch	normal, (IgA)	steigt in Stunden, fällt in Tagen
Neuro-Borreliose	Aktivierte B-Zellen (IgM) in Frühphase	Hoch	IgM, IgA, IgG	AI Jahre erhöht, Schranke normal
Neuro-Tbc	Normal	Hoch	IgA, IgG	
Neuro-Syphilis		Normal	IgG, IgM, typ. kein IgA	AI Jahre erhöht
GBS (Poly-radikulitis)	Normal	stark erhöht n. 2-3 Wo	normal	Spinalwurzel-schwellungen
Chron. entzündl. Prozess (MS, Autoimmun, ZNS-Lupus, Optikus-Neuritis)	Normal	Normal	IgG, IgM polyspezifische Immunreaktion	MRZ: Mas (60 %) Rub (60 %) VZV (50 %) HSV (25 %) Auto-Ak (10 %)
Degener. Erkrkg. (Alzheimer, CJK)	Normal	Normal	normal	
Virusinfektionen	Gering mononukleär	eher normal	kein IgA	AI Monate bis Jahre erhöht

konstante krankheitstypische Muster, immunologisch „untypischer“ Verlauf

andere neuroimmunologische Regulation (nicht IgM, IgA → IgG) ⇒ erhöhter AI spricht nicht immer für akute Infektion, sondern

a) akute Erkrankung (außer bei erhöhtem IgA-AI bei bakteriellen Erkrankungen)

b) postakute Phase ohne klinische Relevanz

c) Teilreaktion einer polyspezifischen Immunantwort bei akuten der chronisch entzündlichen Prozessen (MS, Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung)

Seminarpräsentation: AI-Berechnung aus der Praxis (Ai_liqti.xlw Arbeitsblatt Liquorwerte)

Besonderheiten:

HSV-Enzephalitis: HSV_{IgG}AI **erst 7-10 Tage** nach Klinikbeginn erhöht (Max d 25)
kann über Monate und Jahre persistieren

HSV_{IgM}AI <50%, HSV_{IgA}AI <20% erhöht in später Phase

VZV-Meningitis: VZV_{IgG}AI **schon 1-6 Tage** nach Klinikbeginn erhöht (Max d 12)

	VZV _{IgM} AI selten, VZV _{IgA} AI fast nie erhöht
VZV-Ganglionitis:	VZV _{IgG} AI noch 2 Jahre nach Rekonvaleszenz erhöht (1 Fall) wichtigstes Kriterium zur DD bei Fazialisparese (VZV, Borreliose)
HIV-Enzephalitis	in Abhängigkeit vom Stadium HIV-AI erhöht I-47% II-67% III-84% in Phase III bei 20% ohne Klinik HSV _{IgG} AI erhöht

Bitte bearbeiten Sie folgende Aufgaben zum Thema Liquordiagnostik:

Masern-Antikörperindex

Patient mit unklarer neurologischer Symptomatik 64 Jahre, männlich

Werte aus dem Liquorlabor:

Albumin Liquor	228 mg/l
Albumin Serum	45,5 g/l
IgG Liquor	93,4 mg/l
IgG Serum	8,1 g/l

$$Q_{\text{gesamt IgG}} =$$

$$Q_{\text{lim IgG}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

Masern-IgG Liquor= 1,1 AU (arbitrary units)
Masern-IgG Serum= 89,6 AU

$$Q_{\text{spez}} =$$

$$\text{Masern-AI} =$$

Wie interpretieren Sie diesen Befund?

a)

b)

Welche weiterführenden Untersuchungen empfehlen Sie, um die Diagnose zu untermauern?

zu a)

zu b)

Quantitativer Nachweis von Epstein-Barr-Virus-DNA mittels real-time PCR am LightCycler

Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Ettinger, S. Kersten

1. Theoretische Einführung

1.1 Epstein-Barr-Virus (EBV)

- humanpathogenes behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae
- Hauptübertragungsweg: Tröpfcheninfektion oder Kontaktinfektion (besonders Speichel) bzw. Schmierinfektion
- Infektionen im Kindesalter - meist keine Symptome; jugendliche oder erwachsene Infizierten zu 30–60% mit infektiöser Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber mit hohem Fieber, Lymphknotenschwellungen); ab 40. Lebensjahr ca. 98% infiziert
- Virus persistiert in B-Lymphozyten lebenslang, kann wie alle Herpesviren bei Immunsuppression reaktivieren (z.B. nach Knochenmarkstransplantation, KMTx)
- Virus kann zur Entstehung von verschiedenen seltenen Krebserkrankungen führen

1.2 EBV-Diagnostik

- ELISA: Viruscapsid-Struktur-Antigen (VCA)-IgG, -IgM; EBNA-1-IgG
- Immunoblot: weitere Ak-Differenzierung und Aviditätsbestimmung bei unklarer Konstellation
- PCR: EBV-DNA-Direktnachweis
 - quantitativ => aus EDTA-Blut zur Bestimmung der Viruslast für zuverlässige Einschätzung von EBV-Reaktivierung bei Immunschwäche (bei Immungesunden meist nicht sinnvoll, da im Blut auch das latente Genom nachweisbar ist); bei EBV-assoziiertem Lymphom nach Organtransplantation
 - qualitativ => ggf. aus Liquor bei Verdacht auf Meningoenzephalitis

1.3. Quantitativer Nachweis von EBV-DNA

- 1) Isolierung der EBV-DNA aus der Probe
- 2) Real-time PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
 - Amplifikation eines 74-bp-großen Abschnitts des für das nicht-glykosylierte Membranprotein BNRF1 p143 von EBV kodierenden Gens
 - Detektion des entstehenden PCR-Produkts durch Messung eines nach dem TaqMan-Prinzip generierten Fluoreszenzsignals in der Elongation

- 3) Computer-gestützte Analyse des Reaktionsverlaufs mit Bestimmung des Cp-Wertes (crossing point)
- 4) Quantifizierung von EBV-DNA anhand einer Eichgeraden

1.4. Prinzip der real-time PCR unter Verwendung des TaqMan-Prinzips

1.4.1 PCR

- molekularbiologische Methode, mit der gezielt DNA-Abschnitte vermehrt werden können

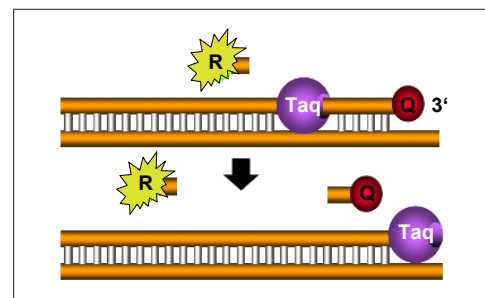
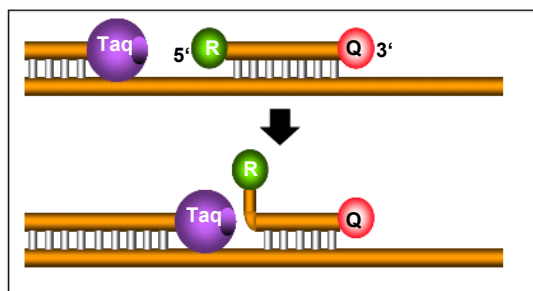
- Amplifikation benötigt:


- zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), die komplementär an der Ziel-DNA binden und Größe des PCR-Produkts (Amplifikat) bestimmen
- thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase
- Desoxynukleosid-Triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

- Amplifikationszyklus besteht allgemein aus:

1. Denaturierung (Aufschmelzen doppelsträngiger DNA; 95°C)
2. Annealing (Binden der Primer; etwa 55 - 60°C)
3. Elongation (Verlängern der Primer; 72°C)

1.4.2 TaqMan-Prinzip



- Neben Primern hybridisiert TaqMan-Sonde (= markiertes Oligonukleotid) spezifisch an Ziel-DNA (= Target)
- Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter (R) und am 3'-Ende mit einer die Fluoreszenz löschenden Komponente, dem Quencher (Q) markiert
- trifft die Taq-Polymerase bei der Amplifikation auf die doppelsträngige DNA aus Target und Sonde bedingt ihre 5'-Nukleaseaktivität den hydrolytischen Abbau der Sonde
- Reporter wird freigesetzt; dessen räumliche Trennung vom Quencher ist mit der Entstehung eines definierten Fluoreszenzsignals  verbunden

2. Geräte und Hilfsmittel

für DNA-Präparation: Vortex Mixer
Heizblock
Tischzentrifuge

für real-time PCR: LightCycler Instrument 2.0 (Roche)
Zentrifuge für LightCycler-Karussell
Glaskapillaren mit Deckel

Allgemein: Eppendorfpipetten
Pipettenspitzen mit Filter
Reaktionsgefäße (Eppendorfbecher)

3. Reagenzien

für DNA-Präparation: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
Ethanol (96%) (Merck)

für real-time PCR: LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche)
Uracil-DNA-Glycosylase (UNG), hitzelabil, 1U/µl (Roche)
Nuklease-Free Water (Promega)
fetales Kälberserum (FKS), Seromed

Primer-Sonden-Gemisch mit
EBV-Primer 1 und 2 (je 2,5 mM)
EBV-spezifische Sonde, FAM/TAMRA-markiert (0,75 µM)
Sonde für Interne Kontrolle, DYXL/BHQ2-markiert (0,75 µM)

Interne Kontrolle (IC; Plasmid pEBV-IC, 250.000 cp/ml)
Zellkulturüberstand (ZKÜ, 2×10^5 cp/ml)
Positivkontrolle (PK; Plasmid pEBV-Standard, 3.000 cp/ml)

4. Durchführung

Alle Arbeiten werden mit Handschuhen ausgeführt!

4.1 Herstellen von Verdünnungen des Zellkulturüberstandes

Nr.	ZKÜ-Verdünnung	Verdünnungs- faktor	fetales Kälberserum	Virustiter
(1)	-	-	-	200.000 cp/ml
(2)	100 µl (Nr. 1)	1:4	300 µl	50.000 cp/ml
(3)	60 µl (Nr. 1)	1:10	540 µl	20.000 cp/ml
(4)	60 µl (Nr. 2)	1:40	540 µl	5.000 cp/ml
(5)	60 µl (Nr. 3)	1:100	540 µl	2.000 cp/ml

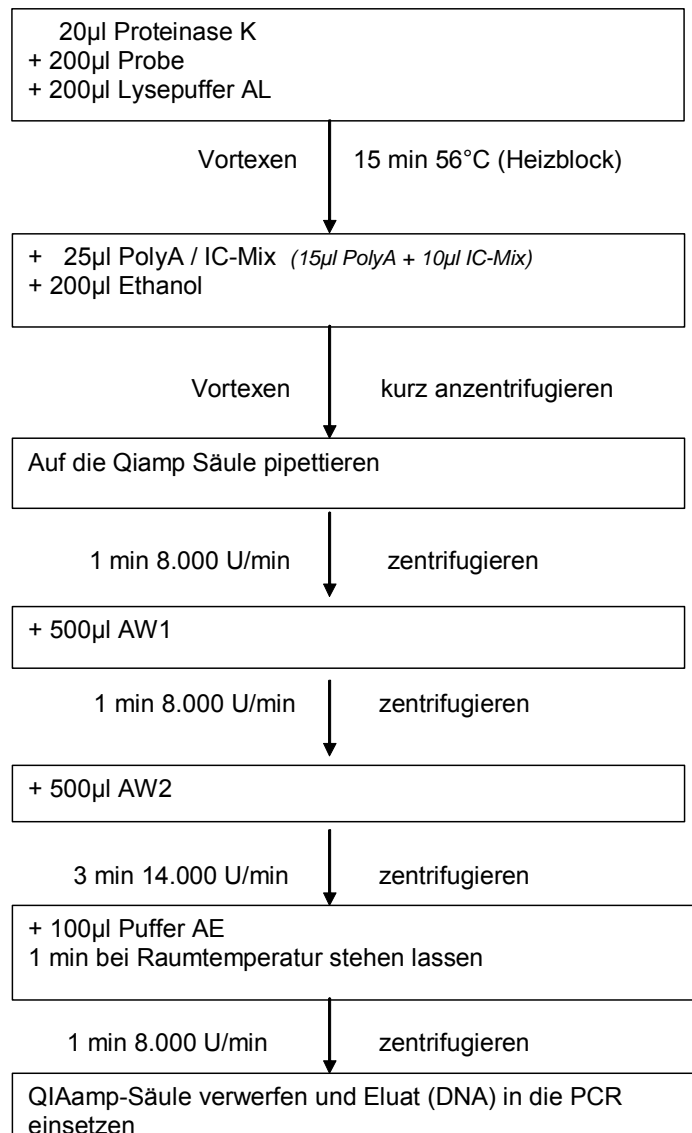
4.2 Isolierung der EBV-DNA (je n=1)

1) Verdünnungen des Zellkulturüberstandes (1) – (5) (siehe 4.1)

a. aus FKS => Negativkontrolle

Isolierung erfolgt nach dem Manual aus dem QIAamp DNA Mini Kit (siehe Kurzprotokoll)

4.2.1 Kurzprotokoll zur Isolierung von Virus-DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit



4.3. Herstellen des Mastermixes für die real-time PCR

Reaktionsbestandteile	15 Reaktionen
Nuklease-Free Water	115 µl
Polymerase-Mix 1 aus dem LightCycler®	60 µl
FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe Kit	
UNG	5 µl
Primer-Sonden-Mix	60 µl

4.4 Beladen der Kapillaren

je Reaktionsansatz werden pipettieren: 15 µl Mastermix
+ 5 µl DNA-haltiges Eluat

Ansatz	DNA	Ansatz	DNA
1	ZKÜ (1)	7	ZKÜ (4)
2	ZKÜ (1)	8	ZKÜ (4)
3	ZKÜ (2)	9	ZKÜ (5)
4	ZKÜ (2)	10	ZKÜ (5)
5	ZKÜ (3)	11	NK
6	ZKÜ (3)	12	Std. (2x 10 ⁵)
		13	PK

4.5 Starten des LightCyclers

Gerät einschalten	<ul style="list-style-type: none"> • Rechner, Bildschirm, LightCycler und Drucker einschalten • <i>LightCycler software 4</i> mit Doppelklick öffnen • Eingabe: <i>Name:</i> User01 <i>Passwort:</i> User01 • <i>Login</i> • in Menüleiste => <i>View</i> => <i>Front</i> anklicken • in <i>LightCycler Software Vers. 4.0 New Experiment</i> anklicken
Geräte-Selbsttest	<ul style="list-style-type: none"> • in Menüleiste => <i>Options</i> • <i>Run self Test</i> anklicken
Laden der Reaktionsansätze	<ul style="list-style-type: none"> • Kapillaren mit PCR-Reaktionsansätzen in Probenkarussell setzen • in blauem Rotor-Bucket für 15 s bei 2.000 U/min in LC-Zentrifuge zentrifugieren • 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen • Probenkarussell mit Kapillaren in LightCycler setzen, Deckel schließen lassen
Auswahl des PCR-Programmes	<ul style="list-style-type: none"> • in Menüleiste => <i>Template</i> • <i>Run Templates</i> => <i>Open</i> anklicken • <i>Standard PCR Run Protocol</i> markieren: Taq-Aktivierung: 95°C 10 min 55 Zyklen: 95°C 5 s 60°C 30 s Abkühlen 40°C 30 s • <i>Open</i> anklicken • in <i>Setup</i> unter <i>Max. Seek Pos</i> die Anzahl der Kapillaren eingeben sowie Kapillargröße (20 µl)

Start des PCR-Laufs	<ul style="list-style-type: none"> • in Menüleiste => <i>Run</i> => <i>Start Run</i> anklicken • Name in <i>Save LC Experiments</i> eingeben: <u>„JJJ-MM-TT Virus“</u> (z.B. „2007-02-27 EBV“) • => <i>Save</i>
Probenbezeichnung	<ul style="list-style-type: none"> • in Menüleiste => <i>Samples</i> anklicken • in <i>Sample Data</i> Bezeichnung der Proben und Kontrollen eingeben • für Quantifizierungen unter <i>Sample Typ</i> Reaktionsansatz spezifizieren („Unknown“ für Probe; „Standard“) • bekannte Standard-Konzentration eingeben
Auswertung qualitativ Proben (FAM) Interne Kontrollen (DYXL) quantitative	<ul style="list-style-type: none"> • in Menüleiste => <i>Analysis</i> => <i>Create New Analysis</i> zwischen <i>Qualitative Detection</i> und <i>Absolute Quantification</i> wählen • <i>Channel 530 nm</i> anklicken • Punktierte Linie nach rechts ziehen bis Ergebnisse sichtbar werden • <i>Advanced</i> anklicken => Cp-Werte angezeigt • in Menüleiste => <i>File</i> => <i>Print Window</i> => <i>OK</i> • <i>Channel 705 nm</i> anklicken • in Menüleiste => <i>File</i> => <i>Print Window</i> => <i>OK</i> • zur Generierung einer Eichgeraden in <i>Absolute Quantification</i> Standards markieren • in Menüleiste => <i>Standard curve</i> anklicken => <i>Save as</i> • für Nutzung von externer Eichgerade: auswählen unter <i>Standard curve</i> => Eichgerade auswählen => <i>Use external</i> in <i>Select Object</i>

HIV-Diagnostik

Arbeitsgruppe Diagnostik – J. Ettinger

1. Theoretische Grundlagen:

Besprochen wird das diagnostische Vorgehen zur Feststellung einer HIV Infektion sowie deren Therapie (s. auch die schematische Darstellung der Westernblottechnik)

Diagnostik:

- Serologie
 - Antikörper-/p24Antigen-Nachweis im ELISA = sensitiver Suchtest (A1)
 - Antikörpernachweis im Westernblot bzw. Immunoblot = spezifischer Bestätigungstest (A2)
 - Schnelltest zum Antikörpernachweis (A3)
- Molekularbiologie
 - quantitative HIV-RNA-Bestimmung im Serum zum Therapiemonitoring
 - qualitativer HIV-RNA-Nachweis bei besonderer Indikation (Organ- und Blutspendewesen, Neugeborene von HIV-positiven Müttern, postexpositionelle Frühdiagnostik)
- andere Untersuchungen
 - CD4 Zellen quantitativ als immunologischer Marker

Therapie der HIV-Infektion: Reverse Transkriptase-Hemmer (Nukleosidale und Nicht-Nukleosidale RT-Hemmer), Protease-Hemmer, Integrasehemmer, Fusionshemmer, CCR5-Antagonisten; in aller Regel als Kombinationstherapie (HAART = highly active antiretroviral therapy).

2. Genotypische HIV-Resistenztestung mit Demonstration zum Alignment und zur Auswertung von HIV Sequenzen

In dem Praktikum soll der Stellenwert der HIV Resistenztestung für die Klinik sowie Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden diskutiert werden. An einigen Kasuistiken soll das praktische Vorgehen bei der Bewertung genotypischer Daten demonstriert (Alignment von Sequenzierungsdaten, Auswertung von Sequenzdaten über das Internet mit verschiedenen Auswertungsalgorithmen), sowie die Wertigkeit von Mutationen diskutiert werden.

HIV-Resistenztestung

Theoretische Grundlagen: Verfahren der HIV Resistenztestung

Die Grundlage für resistente HIV-Viren sind veränderte Eigenschaften der Reversen Transkriptase und Protease. Deshalb werden die Abschnitte, die für diese beiden Enzyme kodieren, aus der viralen RNA isoliert und auf Veränderungen untersucht.

Für die Analyse der entsprechenden RNA-Abschnitte stehen mit der Genotypisierung und Phänotypisierung zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Damit beide Verfahren sicher durchgeführt werden können, sollte die Viruslast mindestens 1000 Kopien/ml Plasma betragen.

Der Anteil einer Virusvariante an der Gesamtpopulation muss ca. 25 % betragen, damit diese nachgewiesen werden kann. D. h. eine nicht nachgewiesene Resistenz bedeutet nicht zwangsläufig, dass diese in der Viruspopulation nicht vorhanden ist. So können frühe Resistenzentwicklungen eventuell unerkannt bleiben, die später eine klinische Bedeutung erlangen.

- Genotypisierung

Bei der Genotypisierung wird die genetische Information der Reversen Transkriptase und Protease des Patientenvirus mit der entsprechenden Information des Wildtyp-Virus verglichen. Aufgrund der hohen Variabilität haben nicht alle Unterschiede zum Wildtyp-Virus auch Einfluss auf die Resistenz gegen Medikamente. Die entdeckten Mutationen müssen daher hinsichtlich ihrer resistenzvermittelnden Eigenschaften interpretiert werden. Dafür sind Auswertungsschemata, auch Auswertungsalgorithmen genannt, notwendig.

Vorteil der Genotypisierung ist die schnelle, relativ unkomplizierte und damit vergleichsweise günstige Durchführung der Resistenzbestimmung.

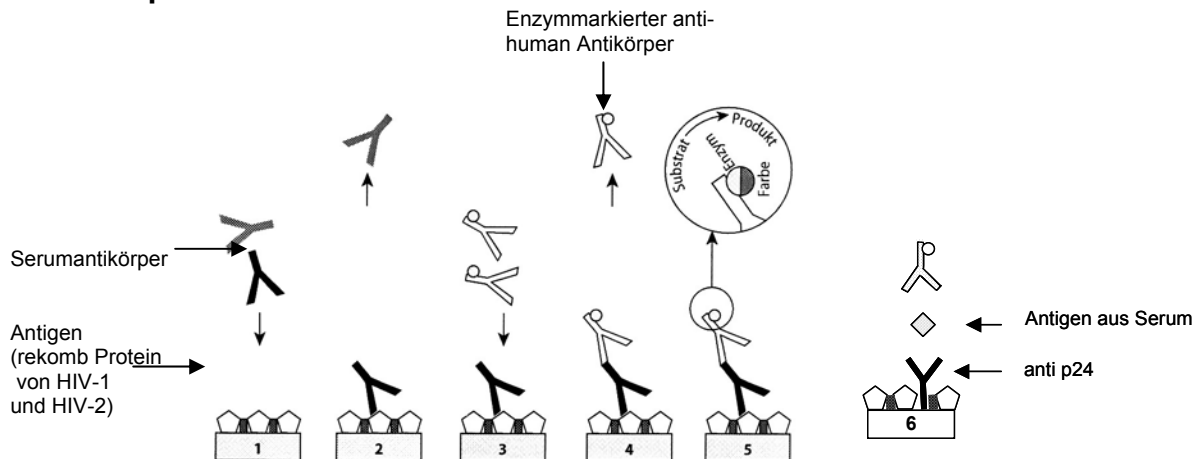
- Phänotypisierung

Bei der Phänotypisierung wird die Replikationsfähigkeit eines HIV-Patientenisolats im Vergleich zum HIV-Wildtyp in Anwesenheit von Medikamenten direkt untersucht. Es handelt sich dabei – verglichen mit der Genotypisierung – um ein aufwändigeres Verfahren. Es dauert ca. 4 – 6 Wochen, bis der Befund vorliegt und auch die Kosten sind höher.

3. Praktikum

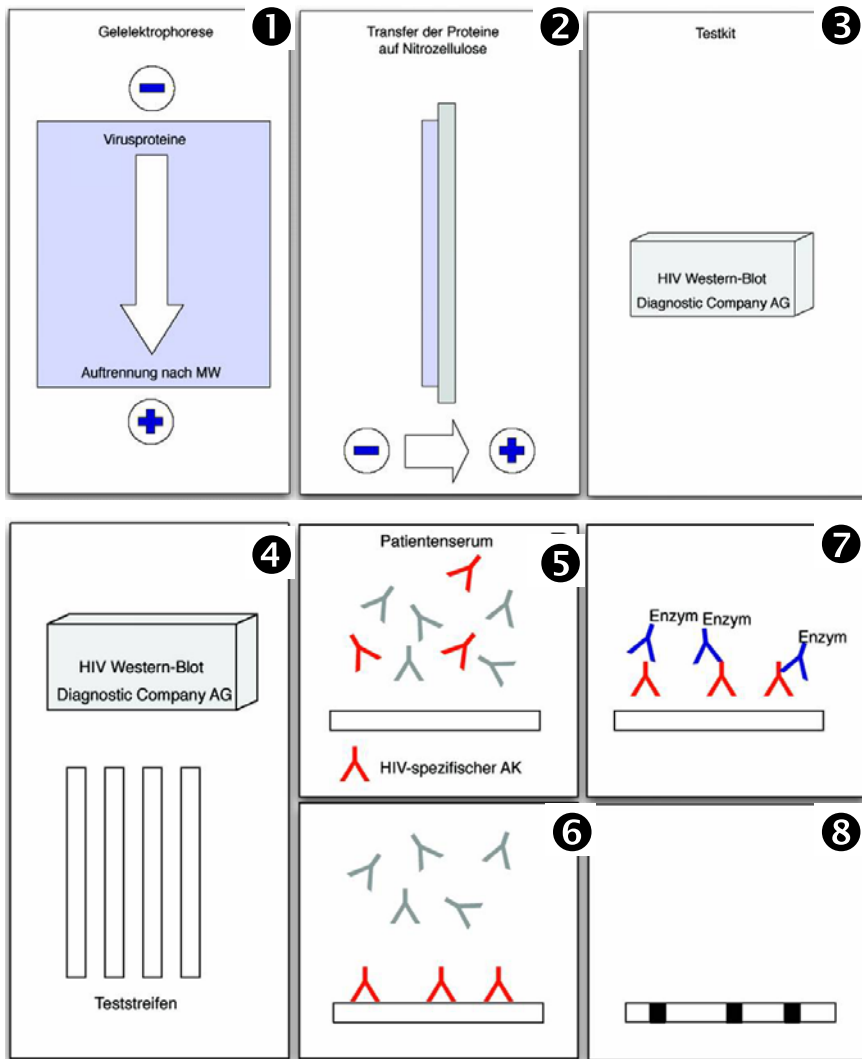
In dem Praktikum soll der Stellenwert der Resistenztestung für die Klinik sowie Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden diskutiert werden. An einigen Kasuistiken soll das praktische Vorgehen bei der Bewertung genotypischer Daten demonstriert (Alignment von Sequenzierungsdaten, Auswertung von Sequenzdaten über das Internet mit verschiedenen Auswertungsalgorithmen), sowie Wertigkeit von Mutationen und die nicht unerheblichen Kosten diskutiert werden.

A1 - Prinzip des HIV-Suchtests



1. An die feste Phase (Platte) gebundenes Antigen wird mit Serum des Patienten bzw. negativen oder positiven Kontrollseren überschichtet
2. Bindung der HIV-Antikörper an das HIV-Antigen, Auswaschen der nicht-gebundenen Antikörper
3. Zugabe eines zweiten Enzym-markierten anti-human-Antikörpers (tierischer Antikörper gegen humane Antikörper)
4. Bindung des markierten anti-human-Antikörpers an den Antigen-Antikörperkomplex, Auswaschen der nicht-gebundenen Antikörper
5. Zugabe von Chromogen, Auslösung der Enzymreaktion und Messung der optischen Dichte (Färbung) als Maß für die Menge an HIV-spezifischen Antikörpern im Patientenserum
6. Die neue Testgeneration verwendet an die feste Phase gebundene p24 Antikörper, die mit Antigen des Patienten interagieren und über einen 2. Antikörper mit Chromogen nachgewiesen werden.

A2 - Prinzip des HIV-Bestätigungstests



Herstellung der Blotstreifen

- 1.) Elektrophoretische Trennung von lysiertem HIV im SDS-Polyacrylamidgel.
- 2.) Elektrotransfer der Proteinbanden auf Nitrozellulose mit anschließender Blockierung freier Stellen durch Inertprotein, und Zertrennung der Nitrozellulose in Streifen (Blotstreifen).
- 3.) Verpackung in einen kommerziellen Testkit.

Testdurchführung im Labor

- 4.) Vorbereitung der Blotstreifen.
- 5.) Inkubation der Blotstreifen mit den zu untersuchenden Patientenseren.
- 6.) Waschen der Blotstreifen zum Entfernen der nicht gebundenen Antikörper.
- 7.) Inkubation der Blotstreifen mit Enzym-markierten Antikörpern (gerichtet gegen humanes IgG) und anschließender Substratreaktion.
- 8.) Befundung

A3 - Prinzip des HIV-Schnelltests

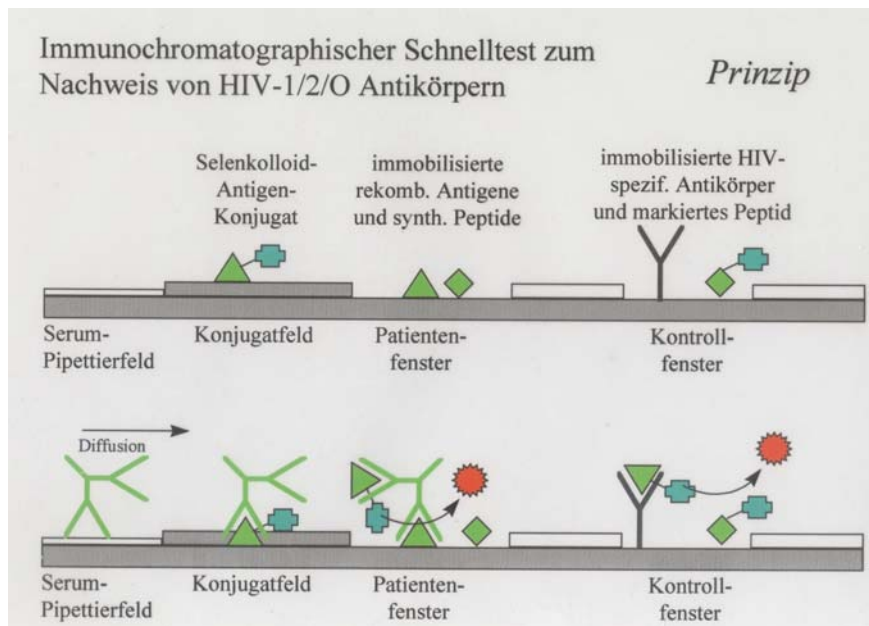
Der HIV Schnelltest ist ein optisch ablesbarer, qualitativer Immunoassay für den Nachweis von HIV-1 und HIV-2 Antikörpern in Serum und Plasma.

Die Probe wird auf das Probenfeld gegeben. Die Probe wandert durch das Konjugatfeld, löst dabei das Selenkolloid-Antigen-Konjugat und vermischt sich mit diesem. Diese Mischung läuft weiter durch die Festphase bis zu der Stelle des Patientenfensters, an der die rekombinanten HIV-Antigene und synthetischen Peptide immobilisiert vorliegen.

Falls sich Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 in der Probe befinden, binden sie an das Antigen-Selenkolloid und an das Antigen im Patientenfenster und erzeugen eine rote Linie.

Sind keine Antikörper gegen HIV-1 und/oder HIV-2 vorhanden, fließt das Selenkolloid-Antigen-Konjugat am Patientenfenster vorbei, und es entsteht keine rote Linie im Patientenfenster.

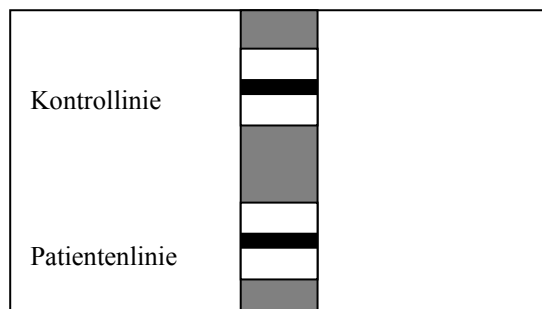
Um die Gültigkeit des Tests sicherzustellen, enthält der Assay eine als solche gekennzeichnete Verfahrenskontrolle (Kontrolllinie am oberen Rand des Tests). Färbt sich die Kontrolllinie nach Beendigung des Assays nicht rot, ist das Testergebnis ungültig, und die Probe sollte erneut getestet werden.



Interpretation der Ergebnisse:

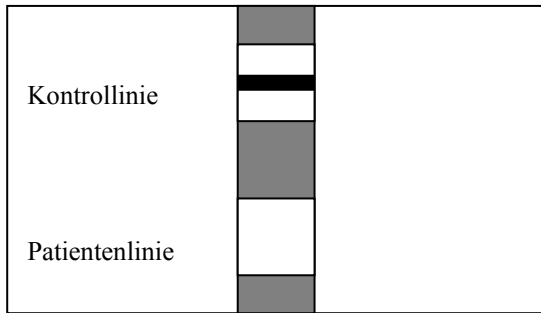
Positiv (Zwei Linien)

Eine rote Linie erscheint sowohl im Kontrollfenster („Kontrolllinie“) als auch im Patientenfenster („Patientenlinie“) des Teststreifens. Jegliche sichtbare rote Farbe im Patientenfenster sollte als positiv gewertet werden.



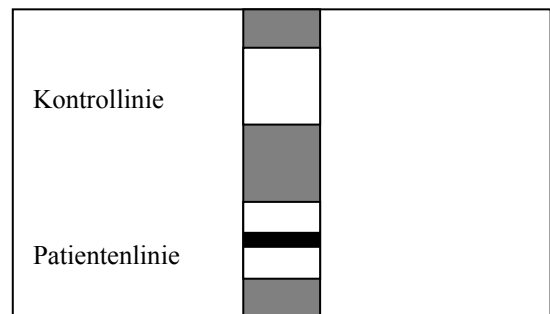
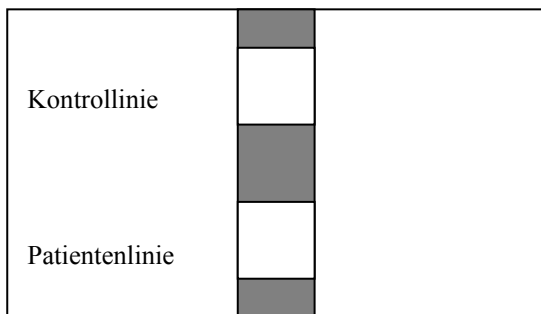
Negativ (Eine Linie)

Eine rote Linie erscheint im Kontrollfenster („Kontrolllinie“) des Teststreifens. Im Patientenfenster („Patientenlinie“) des Teststreifens erscheint keine rote Linie.



Ungültig (Keine Linie)

Erscheint im Kontrollfenster des Teststreifens keine rote Linie, ist das Ergebnis ungültig, selbst wenn im Patientenfenster des Teststreifens eine rote Linie erscheint, und der Test sollte wiederholt werden.



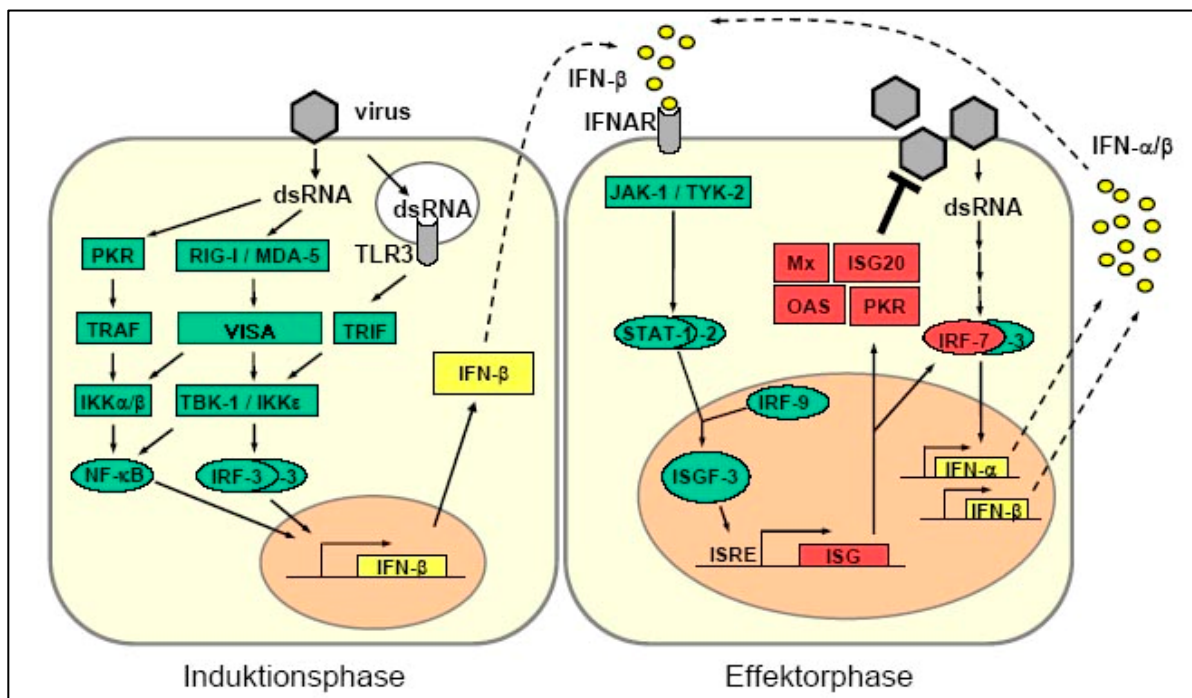
Aktivierung des intrinsischen Interferonsystems

Arbeitsgruppe Rang

1. Einleitung

Interferon-System

Ein Virus löst in infizierten Zellen generell Alarmsignale aus, die u.a. zur Produktion von **Typ I Interferon alpha/beta (IFN α/β)** und **Type III IFN-lambda (IFN λ)** führen. Diese IFN-Stimulation kann ubiquitär in nahezu allen Zellen ausgelöst werden. Innerhalb der letzten Jahre sind viele Modelle entwickelt worden, um die Aktivierung dieses intrinsischen IFN-Systems erklären zu können. Im Fokus stehen sogenannte **pattern recognition receptors (PRR)** einschließlich **RIG-ähnlichen RNA-Helikasen** und **toll like receptors (TLR)**, die konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (**pathogen associated molecular patterns, PAMP**) von Bakterien und Viren erkennen können. Die spezifische Interaktion zwischen PRR and PAMP löst die IFN-Synthese und andere angeborene Immunreaktionen aus.



Modell zur Aktivierung intrinsischer Immunreaktionen durch eine Virusinfektion. In der Induktionsphase kommt es über die Interaktion zwischen viraler RNA und zellulären Erkennungsrezeptoren (PRR) zur Expression von IFN β und IFN λ . In der anschließenden Effektorphase induzieren diese IFNe über die Aktivierung des JAK/STAT Signaltransduktionswegs die Expression IFN-induzierbarer Gene (ISG). Mit der ISG-Expression etabliert sich ein antiviraler Status, der die Zelle vor einer Virusinfektion schützt. Abbildung aus Haller, Kochs und Weber 2005 *Virology* 79: 2079.

Die Aktivierung des IFN-Systems erfolgt über die Bildung von Typ I IFN α/β und Typ III IFN λ . Diese Zytokine lösen über IFN-Typ-spezifische Oberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aus, die mit der Aktivierung des Transkriptionskomplexes ***IFN stimulated gene factor 3 (ISGF3)*** verbunden sind. Aktiviertes ISGF3 gelangt in den Kern und bindet sogenannte ***IFN stimulated response elements (ISRE)*** in den Promoterbereichen IFN-induzierbarer Gene, wodurch deren Expression stimuliert wird. Durch IFN können mehr als 1000 unterschiedliche Gene induziert und Zellen in einen **antiviralen Status** versetzt werden. Die in diesen Status versetzten Zellen in der Umgebung des primären Infektionsherds dienen als Schutzwall, um eine Ausbreitung des Virus im Wirt zu verhindern.

Eine verminderte Virulenz vieler Viren ist verknüpft mit einer starken Induktion von IFN. Dies scheint auch für Hantaviren zu gelten. *In vitro* wird IFN durch das nicht pathogene Prospect Hill Hantavirus stärker und schneller aktiviert, als durch das pathogene Hantaanvirus. Die grundlegenden Mechanismen für diese differenzielle Aktivierung des intrinsischen IFN-Systems sind nur ansatzweise bekannt (Handke et al. 2009 J. Immunol. 182:2849; Handke et al. 2010 J. Gen. Virol. 91:2351; Rang 2010 Critical Reviews in Immunology 30:515).

2. Funktionelle Untersuchung der intrinsischen IFN-Antwort

Im Praktikum sollen grundlegende Techniken durchgeführt werden, mit deren Hilfe Wirkmechanismen des angeborenen IFN-Systems charakterisiert werden können. Das IFN-System unterschiedlicher Zelllinien soll durch transiente Transfektion von Plasmid DNA stimuliert werden. Die Transfektion simuliert eine Virusinfektion und dient als Surrogatsystem für die detaillierte funktionelle Untersuchung.

2.1. Stimulation unterschiedlicher Zelllinien und funktionelle PRR Untersuchung

Es werden die humanen Nierenepithelzelllinie HEK293T und die Hepatomzelllinien HuH7 und HuH7.5 verwendet. Die HuH7.5 Zelllinie ist funktionell RIG-I defizient aufgrund einer Mutation im RIG-I Gen. Die verwendeten Zellen wachsen adherent und werden in 12er Platten so ausgesät, dass sie am folgenden Tag subkonfluent sind. Stimuliert werden die Zellen entweder mit rekombinantem IFN α (1.000 IU/ml) oder durch die Transfektion von Plasmid DNA mit Lipofektamine 2000 (siehe Tabelle 1 und 3). In einem zweiten Ansatz werden unterschiedliche Expressionsvektoren für verschiedene PRRs transfiziert, um den Effekt der PRR-Expression auf die Aktivierung des IFN-Systems zu testen (siehe Tabelle 2 und 4).

Tabelle 1) Stimulation unterschiedlicher Zelllinien

Probe	Zell-Linie	Stimulus	Ergebnis	
			%GFP pos	IFN-Antwort
1	HuH7	Ohne		
2		IFNalpha 1.000		
3		pGFP		
4	HuH7.5	Ohne		
5		IFNalpha 1.000		
6		pGFP		
7	HEK293T	Ohne		
8		IFNalpha 1.000		
9		pGFP		

Tabelle 2) PRR Überexpression in HEK293T Zellen

Probe	Zell-Linie	Stimulus	Ergebnis
			IFN-Antwort
1	HEK293T	Ohne	
2		IFNalpha 1.000	
3		pRIG-I	
4		TLR3	
5		TLR9	

Transfektionsprotokoll:

- Plasmid DNA (0,5µg) in 50µl OPTI-MEM Medium geben
- 1,5 µl Lipofectamine 2000 in 50µl OPTI-MEM Medium mischen und für 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- DNA und Lipofektamine Ansätze vereinen, kurz vermischen und 20 Min. bei RT inkubieren
- Transfektionsansatz möglichst gleichmäßig auf die Zellen einer Kavität der 12er Platte tropfen.

Tabelle 3) Pipetierschema für die GFP Transfektion (100µl Endvolumen pro Ansatz)

		Ansätze		Optimem
GFP	pGFP (____µg/µl)	4	(4 x 0,5µg) µl	(4 x 50µl) 200µl
	Lipofectamine	4	(4 x 1,5µl) 6 µl	(4 x 50µl) 200µl

Tabelle 4) Pipetierschema der PRR Transfektion (100µl Endvolumen pro Ansatz)

		Ansätze		Optimem
GFP	pGFP (____µg/µl)	2	(2 x 0,5µg) _____µl	(2 x 50µl) 100µl
	Lipofectamine	2	(2 x 1,5µl) 3 µl	(2 x 50µl) 100µl
RIG-I	pRIG (____µg/µl)	2	(2 x 0,5µg) _____µl	(2 x 50µl) 100µl
	Lipofectamine	2	(2 x 1,5µl) 3 µl	(2 x 50µl) 100µl
TLR3	pTLR3 (____µg/µl)	2	(2 x 0,5µg) _____µl	(2 x 50µl) 100µl
	Lipofectamine	2	(2 x 1,5µl) 3 µl	(2 x 50µl) 100µl
TLR9	pTLR9 (____µg/µl)	2	(2 x 0,5µg) _____µl	(2 x 50µl) 100µl
	Lipofectamine	2	(2 x 1,5µl) 3 µl	(2 x 50µl) 100µl

2.2. RNA Ernte 24 Std. nach der Transfektion

Bemerkungen: **Trifast Reagenz** enthält Phenol Guanidiniumthiocyanat

Extrakte enthalten wasserlösliche alkoholunlösliche Materialien, die UV - Adsorption ähnlich wie Nukleinsäuren haben → OD - Konzentrationsbestimmung nicht zuverlässig!

- Zellen mit PBS waschen und in 400µl Trifast -Reagenz lysieren
- Lysat mehrmals mit der Pipette auf- und abpipettieren und in 2ml Tube überführen
- Probe 5 Min. bei RT inkubieren
- Zugabe von 100µl Chloroform (ohne Zusätze) zugeben und 15'' kräftig mixen
- Probe 5 Min. bei RT inkubieren
- Homogenat 15 Min. mit 12.000 x g (**11.500 upm** Eppendorf) zentrifugieren
- farblose Oberphase (enthält RNA) in neues Tube überführen
- RNA in 0,67 x Vol Isopropanol bei -80°C 30 Min fällen
- 15 Min max speed zentrifugieren
- Pellet 1 x in 400 µl 70% EtOH waschen, trocknen und in 50µl Wasser resuspendieren
- 5µl der RNA Probe in 95µl Wasser verdünnen und OD bestimmen.

2.3. Reverse Transkription der RNA-Proben

Von den RNA Proben werden jeweils 6µl in neues Tube überführt und mit der Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reversen Transcriptase (RT) in cDNA ungeschrieben. Als Starter werden random Hexamer Primer verwendet.

Pipetierschema für die RT-Reaktion

MASTER-MIX	<u>1x</u>	<u>15 x</u>
First strand buffer (5x)	3 µl	45,0 µl
dNTP's (je 10mM)	1,5 µl	22,5 µl
DTT (0,1M)	1,5 µl	22,5 µl
Random Primer Fermentas [200ng/µl] → Verdünnung 1:8 (25ng/µl)	2 µl	30,0 µl
RNase Inhibitor (ca. 0,5pro Ansatz)	z. B. 0,5 µl	7,5 µl
M-MLV RT Invitrogen (200U/µl)	0,5 µl	7,5 µl
Endvolumen	9 µl	Je 9 µl plus 6µl
Endvolumen plus RNA	15 µl	RNA mixen

- vortexen und kurz zentrifugieren
- 90 Min bei 37°C
- 15 Min bei 70°C

2.4. Quantitative Bestimmung vom IFN-lambda mRNA mittels Light Cycler PCR

Die Menge der IFN-lambda mRNA in den hergestellten cDNA Proben wird im Light Cycler 1.0 (Roche) mit Hilfe des SYBR Green PCR Kits (Invitrogen) bestimmt.

Primer Paar PP 1)	IFN-lambda (222BP)
Primer Paar PP 2)	GAPDH (595 BP)

Cycler – Programm	
Initial activation step	2 min 95°C
Cycling 50 x:	
Denaturation	15s 95°C
Annealing	30s 60°C
Extension	40s 72°C
Acquisition	88°C

Mastermix GAPDH

Wasser	15 x	0,2 µl	Wasser	1,2 µl
BSA (1 mg/ml)	15 x	5,0 µl	BSA	30 µl
Primer f (10mM)	15 x	1,4 µl	Primer f	8,4 µl
Primer r (10mM)	15 x	1,4 µl	Primer r	8,4 µl
MM CYBRGreen	15 x	10,0 µl	MM	60,0 µl
	Endvol:	18,0 µl		

Ergebnis der QPCR

Proben Nr.	Template aus cDNA	Ct-Wert GAPDH	Ct-Wert IFN-lambda
1	HuH7		
2	HuH7 IFN		
3	HuH7 pGFP		
4	HuH7.5		
5	HuH7.5 IFN		
6	HuH7.5 pGFP		
7	HEK		
8	HEK IFN		
9	HEK pGFP		
1	HEK		
2	HEK IFN		
3	HEK pRIG-I		
4	HEK pTLR3		
5	HEK pTLR9		
6	Wasser		

Zeitliche Planung

Gruppe 1

- Do 14:30 – 18:00 - theoretische Einführung in der Bibliothek
- RNA Isolation der Zellen, die von Gruppe 2 am Vortag stimuliert wurden
- Fr 17:00 – 18:00 - Reverse Transkription der isolierten RNA
- Di 14:30 – 18:00 - quantitative PCR
- Transfektion von 293, HuH7 und HuH7.5 Zellen
- Do 15:30 – 17:30 - Immunfluoreszenz-Analyse der transfizierten Zellen
- Auswertung der Experimente in der Bibliothek

Gruppe 2

- Di 15:00 – 17:00 - theoretische Einführung in der Bibliothek
- RNA Isolation der vorbereiteten Proben
- Mi 11:00 – 16:30 - Reverse Transkription der isolierten RNA
- Pause
- quantitative PCR
- Transfektion von 293, HuH7 und HuH7.5 für Gruppe I
- Fr 16:30 – 18:00 - Auswertung der Experimente in der Bibliothek