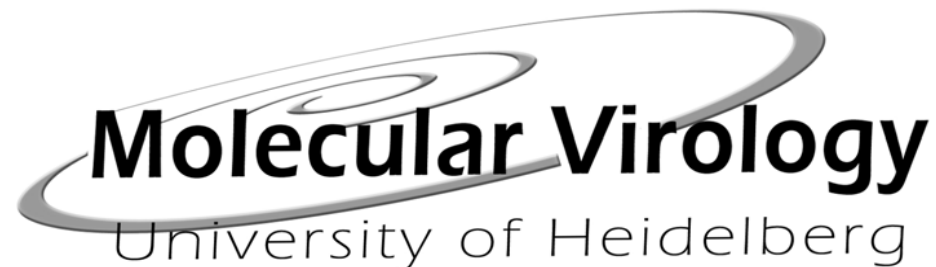


Molekulare Mechanismen der Pathogenese bei Infektionskrankheiten

Virusaufbau, Replikationszyklus, Klassifikation, **Virusnachweisverfahren**



Ralf Bartenschlager

Abteilung Molekulare Virologie, Hygiene Institut

INF345, 1. OG

<http://molecular-virology.uni-hd.de>

Virologische Diagnostik: Was kann ich nachweisen?

Erregernachweis

Virus

- Virusanzucht: infektiöses Agens
- Elektronenmikroskopie: Partikel

Virusbestandteile

Proteine

- Immunfluoreszenz
- Antigen-ELISA (EIA)
- Western-Blot (Immunblot)

Nukleinsäure

- PCR
- RT-PCR

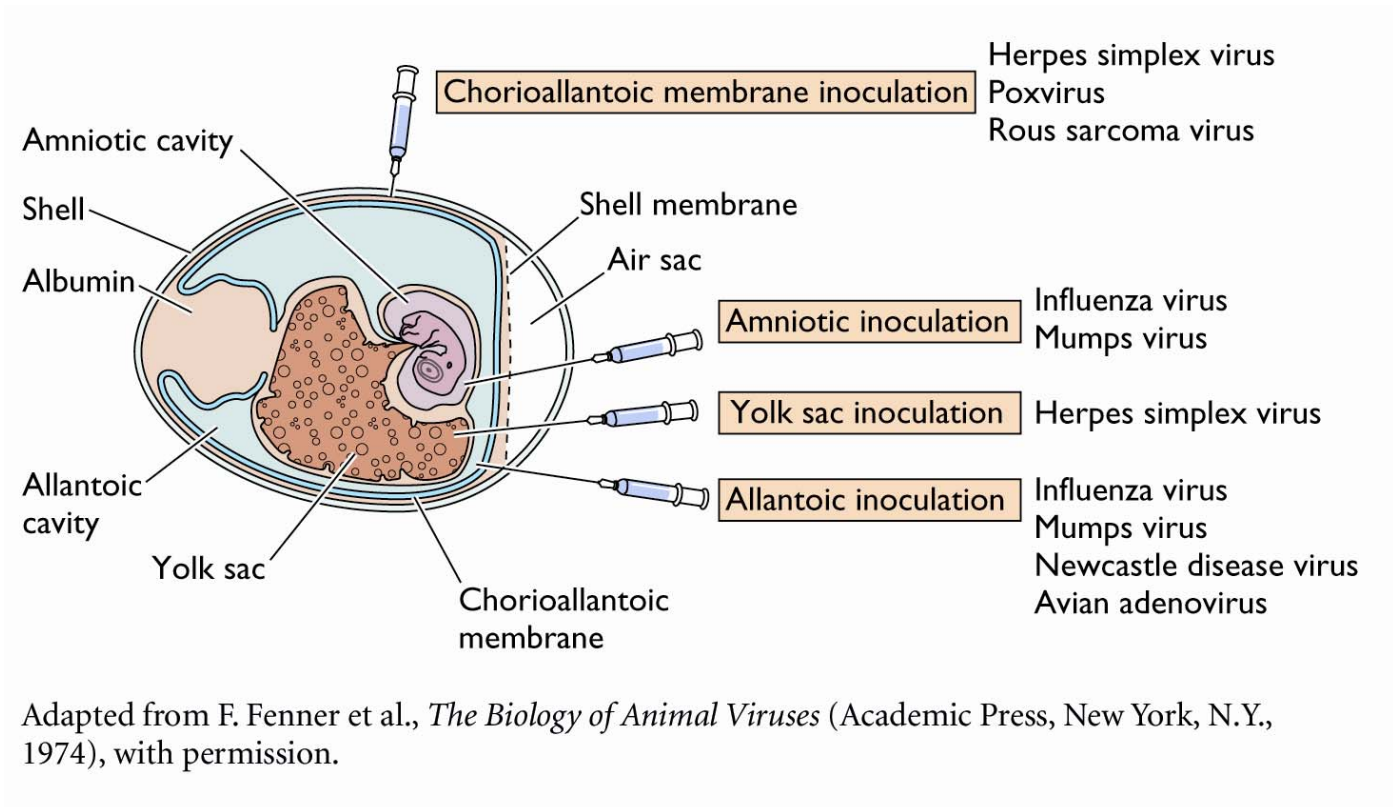
Antikörpernachweis

Immunantwort auf Virusinfektion

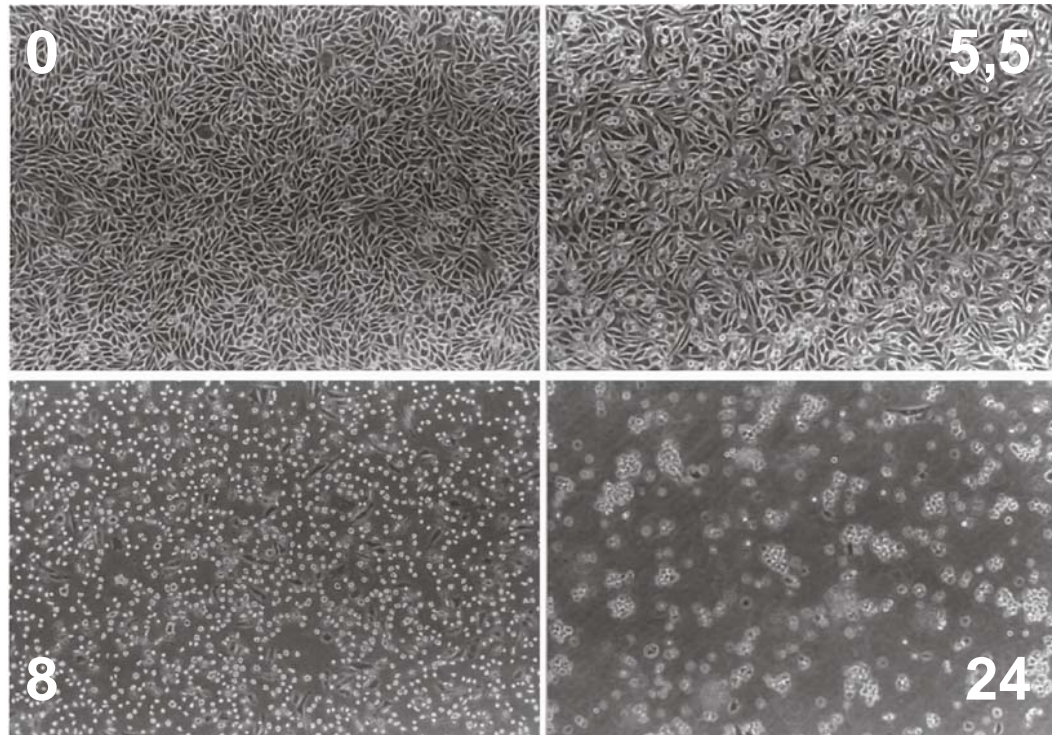
Antikörper gegen virale Proteine

- Komplement-Bindungsreaktion
- Hämagglutinations-Hemmtest
- Antikörper-ELISA
- Westernblot
- Immunfluoreszenz
=> IgG, IgM, IgA

Vermehrung von Viren im Hühnerei



Vermehrung von Viren in Zellkulturen

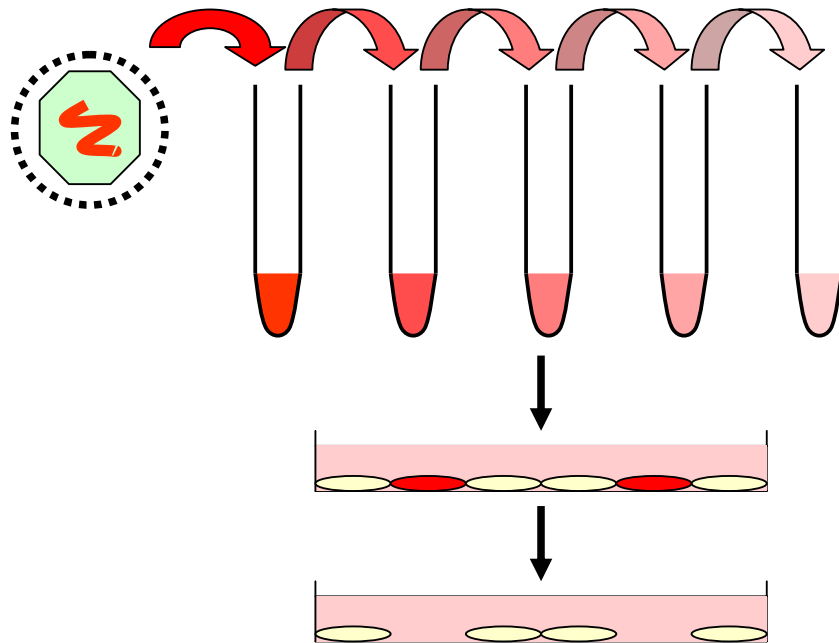


Infektion von epithelialen HeLa-Zellen mit Poliovirus (Picornavirus)

Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (in Stunden)

fortschreitende Lyse der Zellen

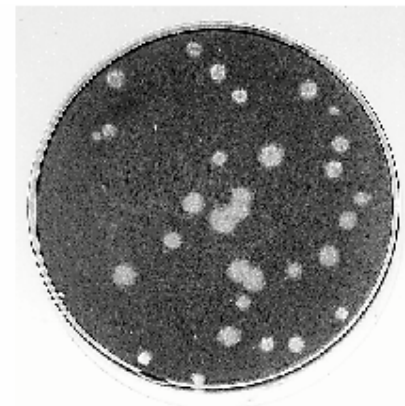
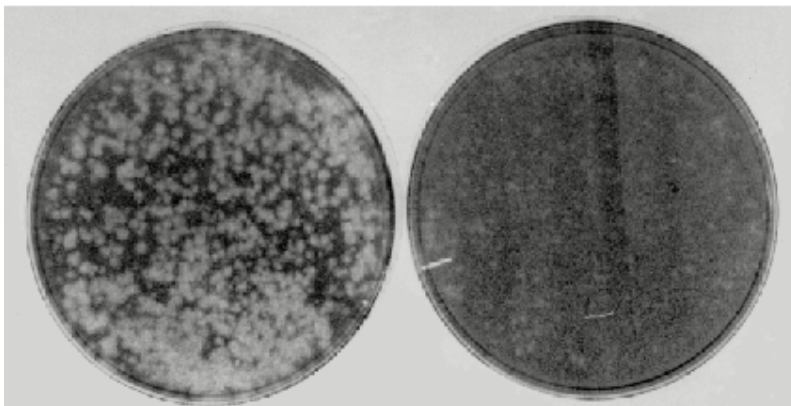
Plaque-Test: Titrierung von Viren



Serielle Verdünnung des Ausgangsmaterials

Ausbringen der Virus-Verdünnungen auf susceptible Zellen

Überschichten mit zähem Methylcellulose-Medium, um die freie Diffusion der Viren zu verhindern.

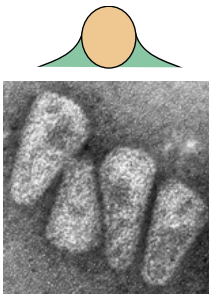


Methoden zur Analyse der Partikelmorphologie

Electron Microscopy

Negative stain

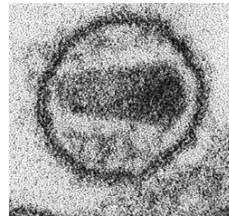
Particles are fixed and stained;
simple method, revealing few structural details



isolated HIV cores

Thin section

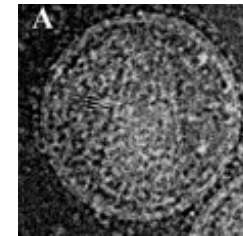
Particles are fixed, embedded in plastic, stained and sectioned;
only section of particle visible



mature HIV particle

Cryo-EM

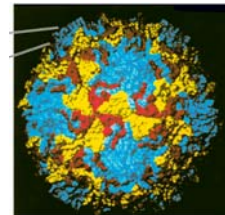
Unfixed and unstained particles in vitreous ice;
little contrast, superimposition of 3D structure, signal results directly from density, computer-aided analysis gives high resolution



mature HIV particle

X-ray crystallography

Very high resolution (atomic details), but very regular organization required



polio virus

Antigen-Nachweis: ELISA (EIA)

Antigen-ELISA

HBs-Antigen
HBe-Antigen
HIV-p24

Rotavirus
Adenovirus
Astrovirus
Norovirus

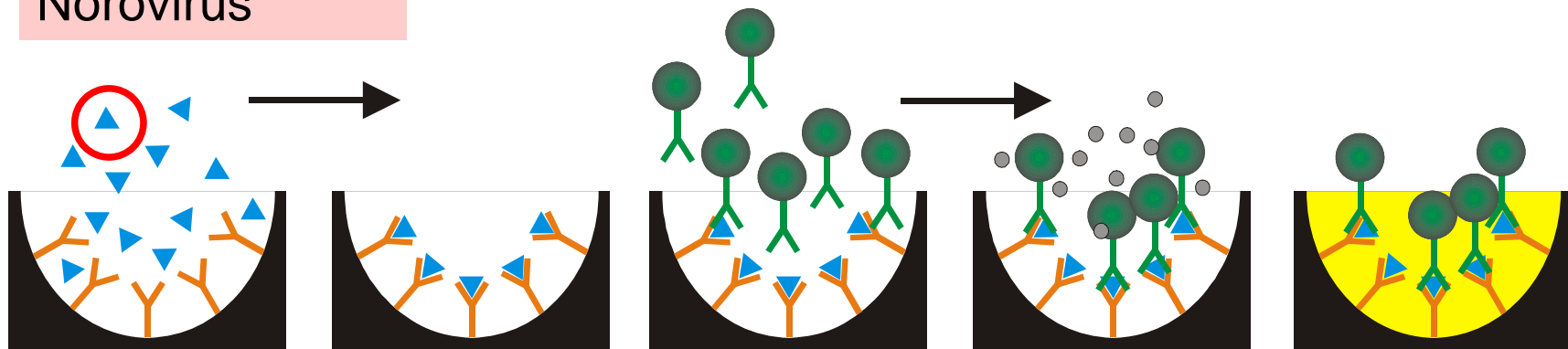
Virales Antigen

Indicator

Second antibody

Viral antigen

Capture antibody



Serologische Nachweismethoden

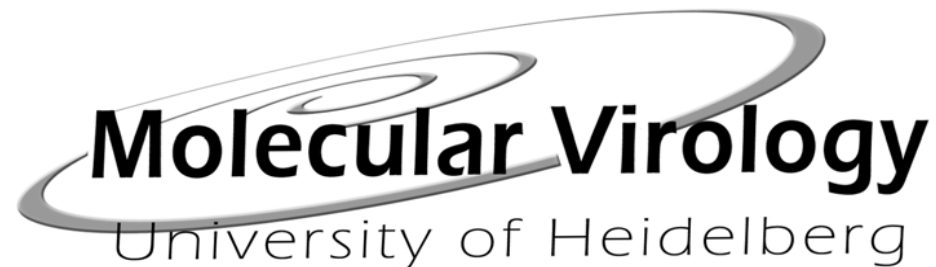
Nachweis virus-spezifischer Antikörper

- Enzym-Immunoassay (ELISA, EIA)
- Westernblot (Immunblot)
- Immunfluoreszenz (direkt oder indirekt)
- Hämagglutinations-Hemmtest
- Komplement-Bindungsreaktion (KBR)

Vor- und Nachteile verschiedener diagnostischer Verfahren

	Vorteile	Nachteile
Virusanzucht	Auch für unbekannte Viren Beweist Infektiösität	Sehr langsam, teuer, schwierig
Elektronenmikroskopie	‚Catch all‘, auch nicht kultivierbare Viren; keine virusspezifischen Reagentien benötigt	Sehr insensitiv Teure Ausstattung benötigt
Immunfluoreszenz	Schnell; Differenzierung möglich	Auswertung schwer objektivierbar; nur für manche Erreger möglich
Antigen-ELISA	Schnell; quantitativ; gut standardisierbar	Wenig sensitiv
PCR RT-PCR	Schnell; quantifizierbar	Falsch Positive durch Kontamination möglich
Antikörper-ELISA	Automatisierbar; sensitiv; weit verbreitet; Qualitätssicherung Etabliert; Suchtest	Diagnostisches Fenster bei akuten Infektionen; ‚Serumnarben‘
Western Blot	Hohe Spezifität, Differenzierung möglich; Bestätigungstest	Diagnostisches Fenster Nicht quantitativ, nicht automatisierbar

Verlauf von Virusinfektionen und Virus-vermittelte Zellschädigung



Ralf Bartenschlager

Abteilung Molekulare Virologie, Hygiene Institut

INF345, 1. OG

<http://molecular-virology.uni-hd.de>

Ausbreitung von Virusinfektionen

Lokal: Infektion und Pathogenese am Ort des Viruseintritts

Ausbreitung durch Infektion benachbarter Zellen

Epithel (und manchmal regionale Lymphknoten) betroffen

Respirationstrakt: Influenzavirus, Rhinoviren, Coronaviren

Gastrointestinaltrakt: Rotaviren

Haut: Papillomaviren

Systemisch: Ausbreitung im Organismus vom Ort der primären Infektion auf verschiedenen Wegen

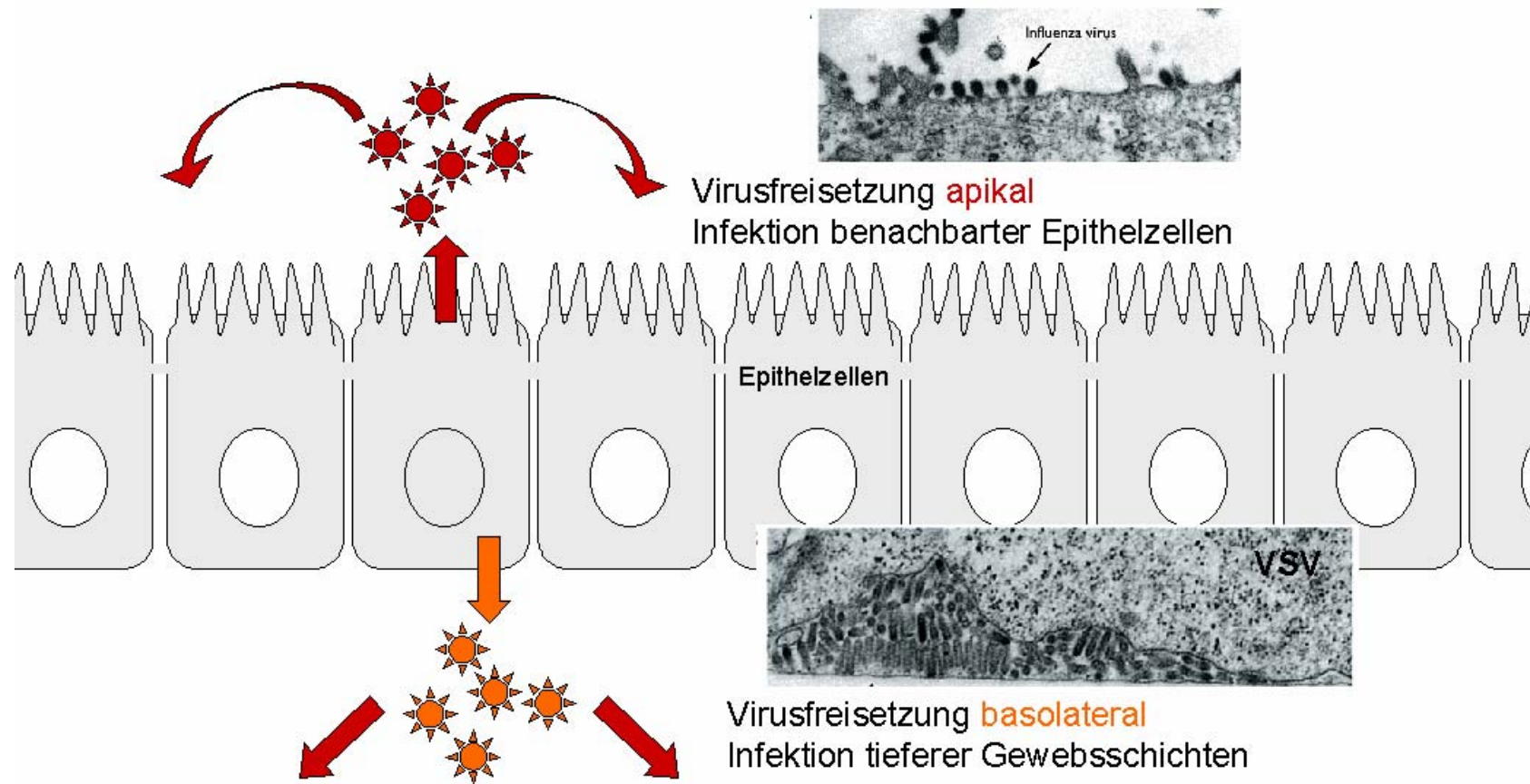
frei im Plasma: Picornaviren, HBV, Gelbfieberevirus

Lymphozyten-assoziiert: EBV, HIV, HTLV

Monozyten/Makrophagen-assoziiert: Dengue Virus, HIV, Masernvirus

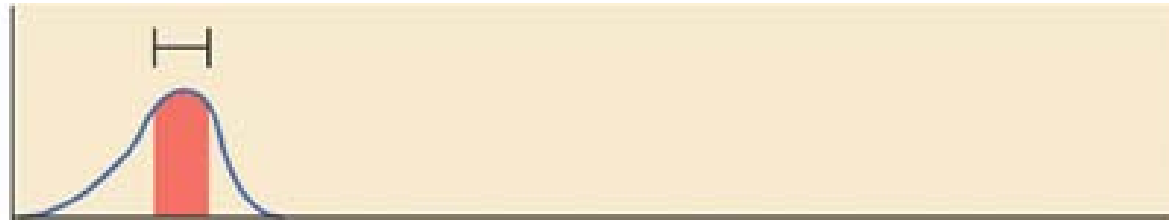
Neuronal: Herpesviren, Tollwutvirus, Poliovirus

Lokale und Systemische Virusbreitung

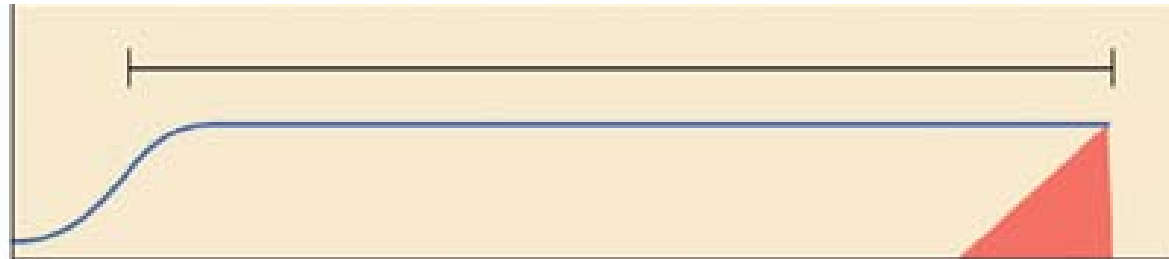


Verlaufsformen viraler Infektionen

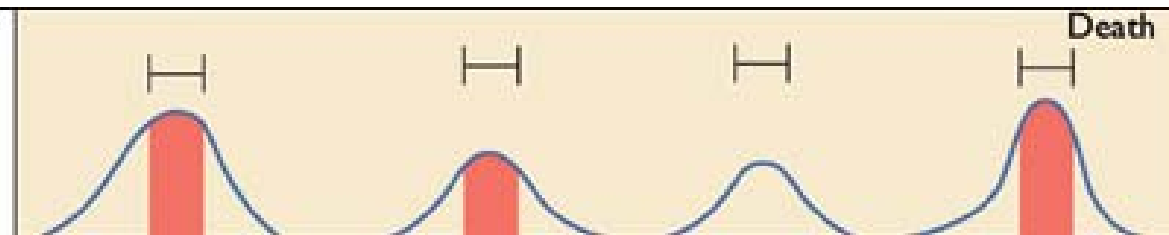
Akut selbst-limitierend



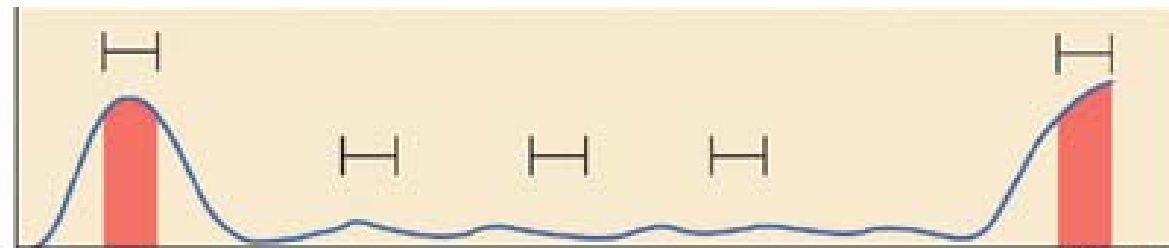
Chronisch persistierend



Latent persistierend, reaktivierend



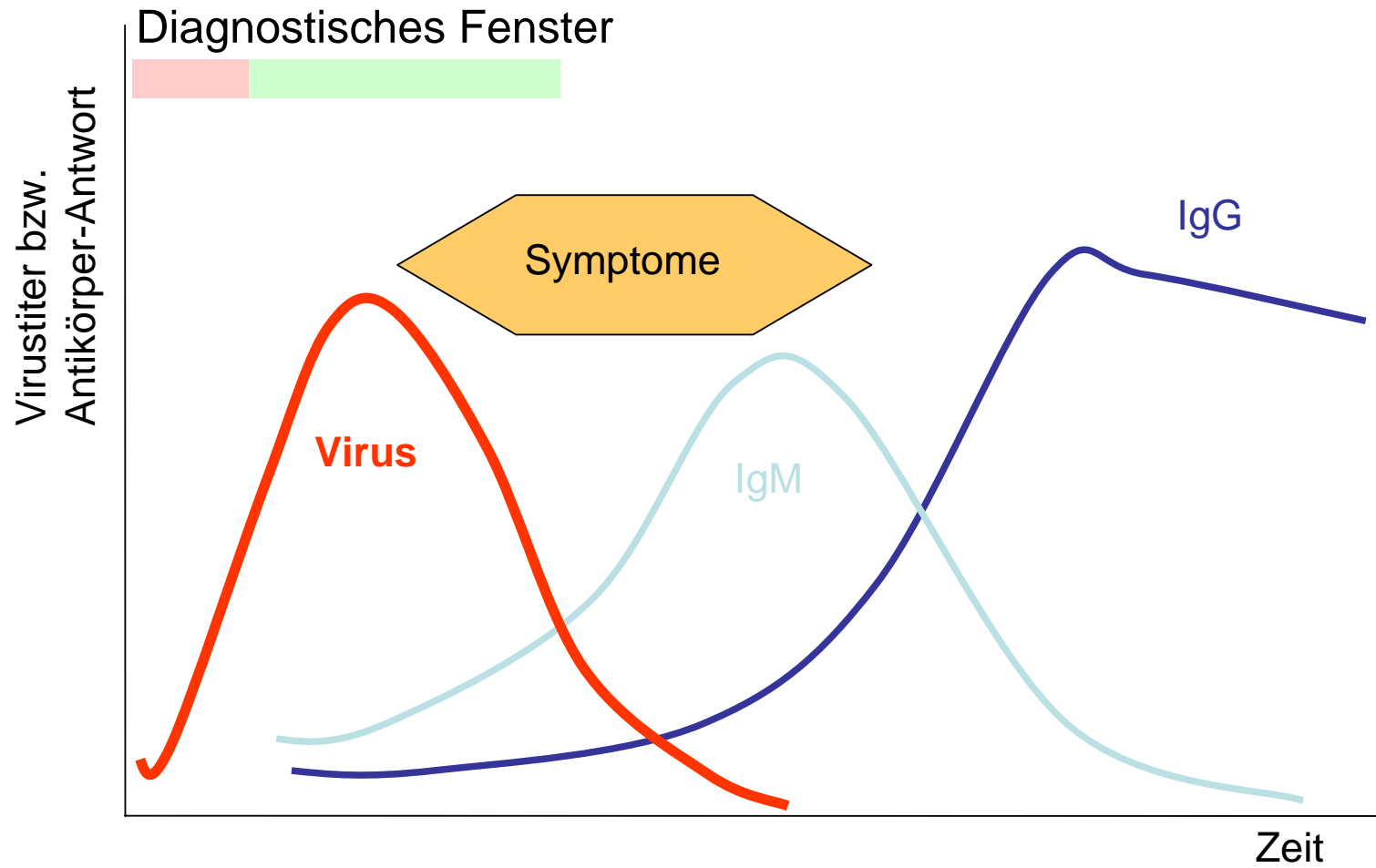
Chronisch progredient



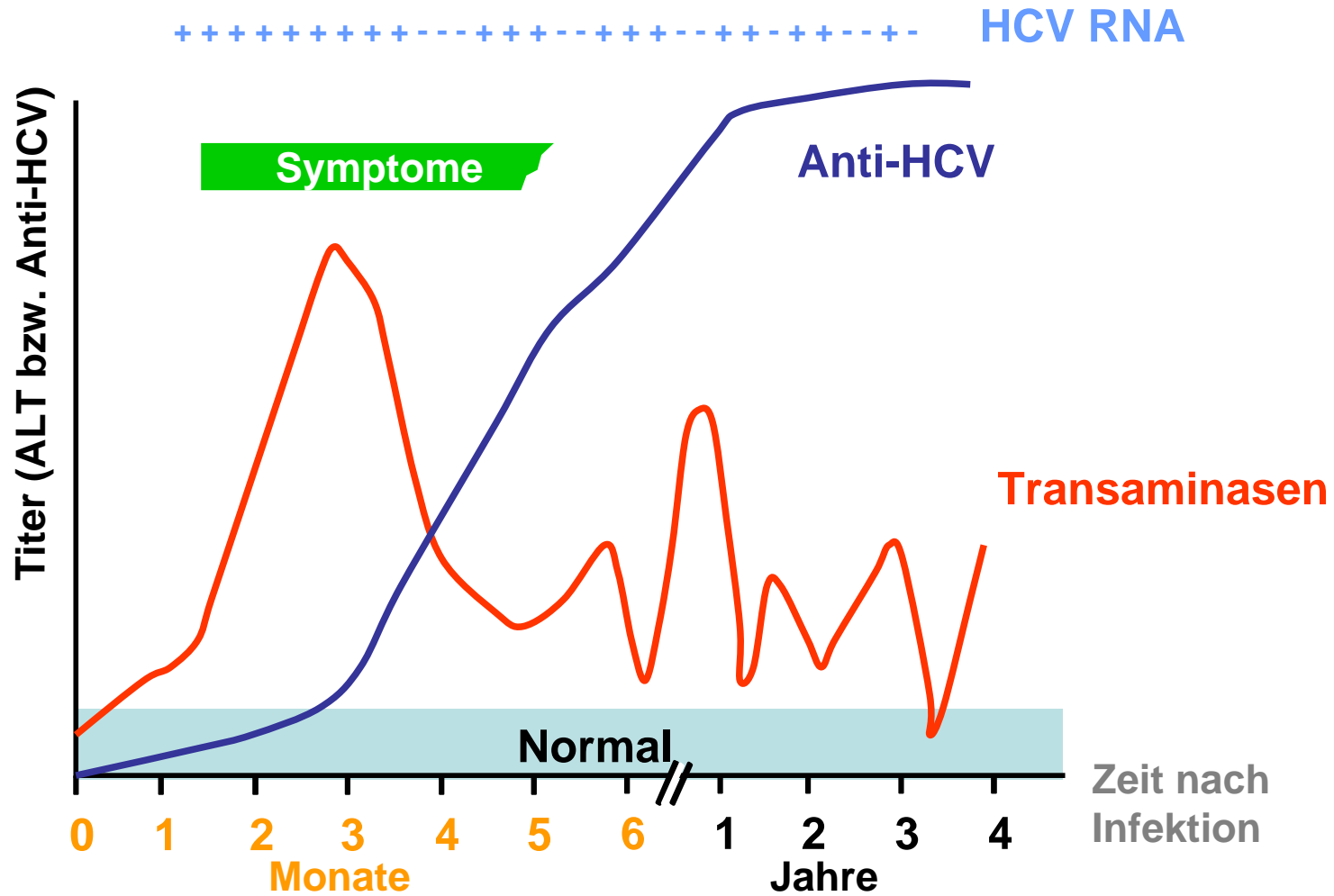
Time

Death

Akute Virusinfektion



Chronisch Persistierende Virusinfektion



Persistente Virusinfektionen

Persistenz = Virus verbleibt dauerhaft (oft lebenslang) im Körper

- chronische Persistenz: quasi dauerhafte Virusproduktion
- latente Persistenz: Virus-freie Phasen

Table 16.2 Some persistent viral infections of humans

Virus	Site of persistence	Consequence
Adenovirus	Adenoids, tonsils, lymphocytes	None known
Epstein-Barr virus	B cells, nasopharyngeal epithelia	Lymphoma, carcinoma
Human cytomegalovirus	Kidney, salivary gland, lymphocytes?, macrophages?, stem cells?, stromal cells?	Pneumonia, retinitis
Hepatitis B virus	Liver, lymphocytes	Cirrhosis, hepatocellular carcinoma
Hepatitis C virus	Liver	Cirrhosis, hepatocellular carcinoma
Human immunodeficiency virus	CD4 ⁺ T cells, macrophages, microglia	AIDS
Herpes simplex virus types 1 and 2	Sensory and autonomic ganglia	Cold sore, genital herpes
Human T-lymphotropic virus types 1 and 2	T cells	Leukemia, brain infections
Papillomavirus	Skin, epithelial cells	Papillomas, carcinomas
Polyomavirus BK	Kidney	Hemorrhagic cystitis
Polyomavirus JC	Kidney, central nervous system	Progressive multifocal leukoencephalopathy
Measles virus	Central nervous system	Subacute sclerosing panencephalitis, measles inclusion body encephalitis
Rubella virus	Central nervous system	Progressive rubella panencephalitis
Varicella-zoster virus	Sensory ganglia	Zoster (shingles), postherpetic neuralgia

Virus-induzierter cytopathischer Effekt (CPE)

Lytische versus nicht lytische Viren

Lytische Viren zerstören die infizierte Wirtszelle direkt (z.B. zur Virusfreisetzung)

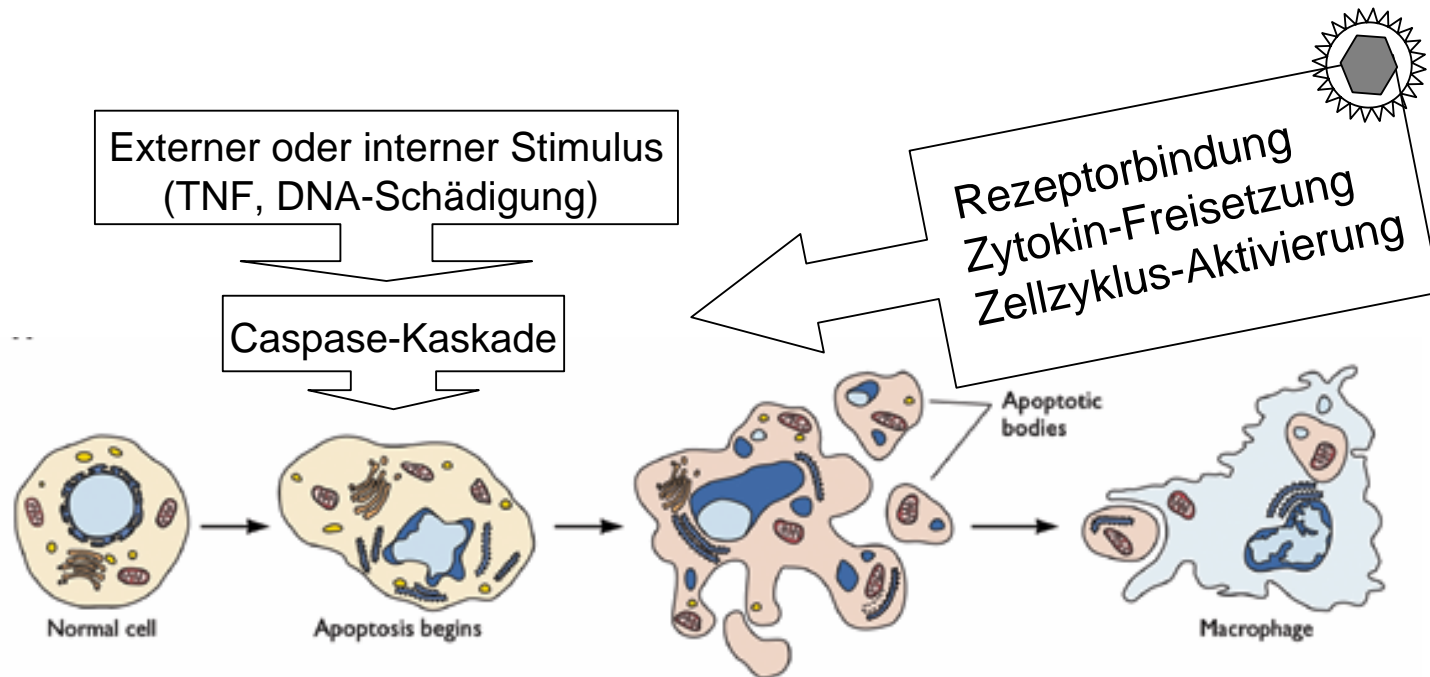
Nicht lytische Viren können den Zellmetabolismus verändern, führen jedoch nicht zum Zelltod (z.B. transformierende Viren). Zerstörung der infizierten Zelle durch das Immunsystem (CTL) möglich (Immunpathogenese)

Nekrose versus Apoptose

Nekrose ist die Zerstörung der Zelle, z.B. durch toxische Virusproteine. Zellbestandteile werden frei und vermitteln eine Entzündung

Apoptose = programmierter Zelltod, ausgelöst durch Signaltransduktion
Die Zelle zerstört sich selbst, wobei die Bestandteile in Vesikel verpackt und nicht frei werden

Apoptose



- Segregation des Chromatins
- Kondensation des Zytoplasmas
- Veränderungen der Zellmorphologie (Protuberanzen)
- Fragmentierung des Zellkerns
- Ablösen von Zellfragmenten als ‚apoptotic bodies‘
- Abbau der apoptotic bodies durch Makrophagen

Apoptose

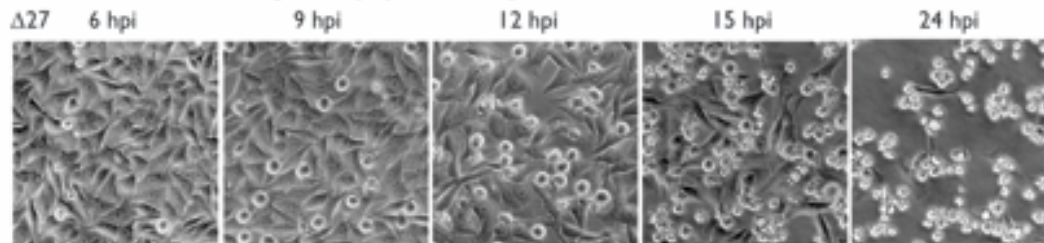
Virusinfektion kann Apoptose induzieren oder durch virale Faktoren modulieren

Beispiel: Die Infektion von Epithelzellen mit *Herpes simplex Virus* (HSV) induziert die Apoptose, die durch das virale Protein **ICP27** verhindert wird

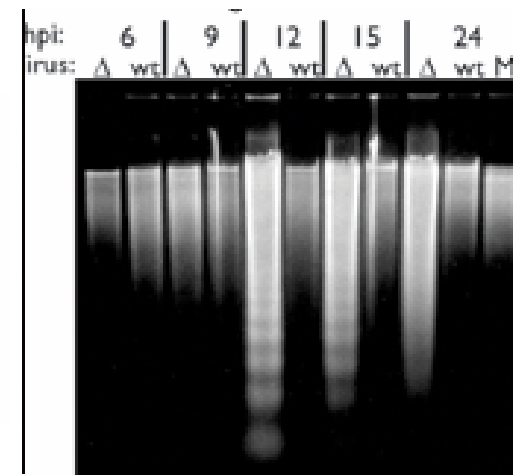
Infektion mit HSV-1 Δ ICP27 führt innerhalb von 24 h zum Zelltod durch Apoptose

Bildung von ‚apoptotic bodies‘

b Membrane blebbing and apoptotic body formation



DNA-Fragmentierung



Virusvermittelte Zellschädigung

Störung der Zellfunktion

Deregulation des Zellzyklus oder Zellstoffwechsels
Ausschalten der Wirts-Proteinsynthese
Modulation der Ausschüttung von Zytokinen, Transmittern, Hormonen

Zerstörung der Wirtszelle

Zytotoxische Virusproteine
Lyse
Apoptose
Bildung von Riesenzellen (Synzytien)

Immunvermittelte Schädigung

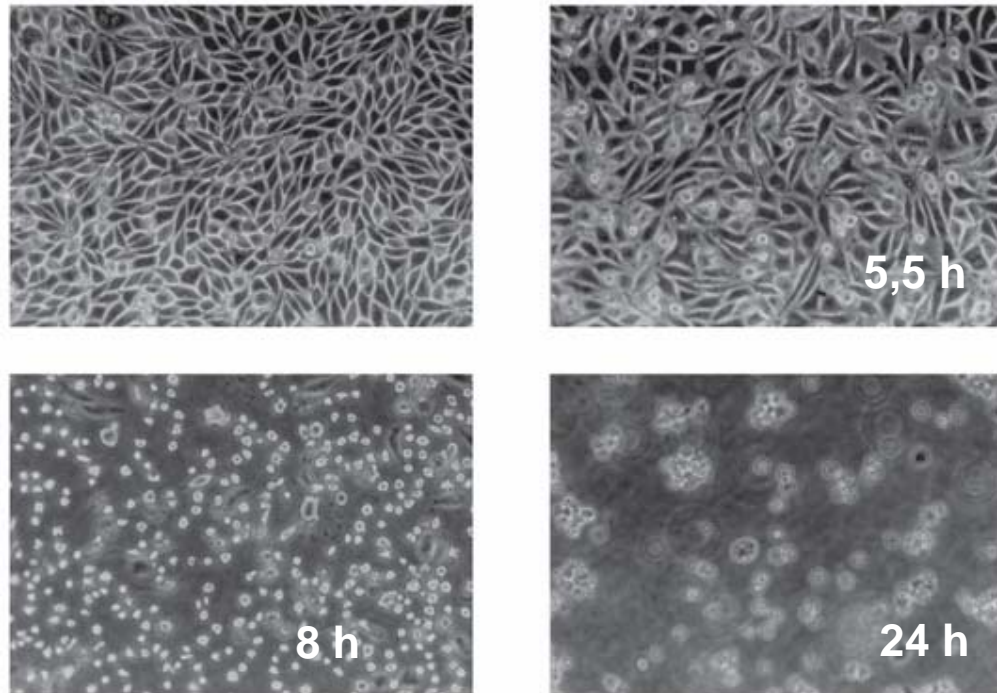
Erkennung und Zerstörung infizierter Zellen durch das Immunsystem
Immunpathologische Reaktion (systemische Effekte von IFN, DTGS, Komplement, Immunkomplexe)

Transformation

Insertionsmutagenese
virale Onkogene

Akute Zellschädigung: Zytopathischer Effekt

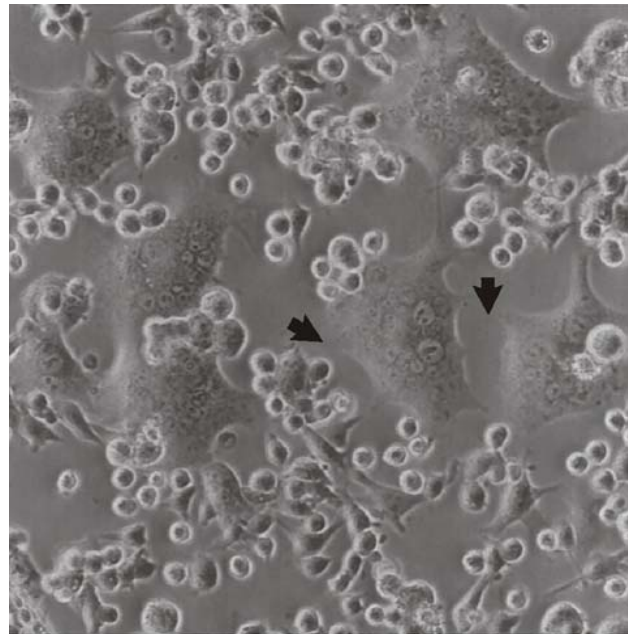
Zell-Lyse (z.B. Poliovirus in Zellkultur); Abrunden der Zellen, Verlust der Adhäsion, Zelltod



Zytopathische Effekte in Zellkultur können schnell (Enteroviren, Herpes Simplex Virus), langsam (Rötelnvirus, Cytomegalie-Virus) oder gar nicht (manche Arenaviren, Paramyxoviren, Hepatitis C Virus) auftreten

Bildung von Syncytien

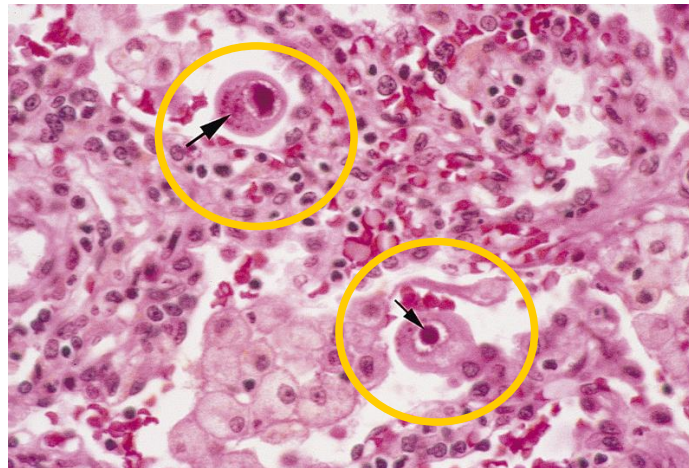
Virale Glykoproteine werden oft in die Zellmembran infizierter Zellen eingebaut. Sie können dann mit den Rezeptorproteinen uninfizierter Zellen interagieren und die Zellfusion auslösen. Es bilden sich vielkernige Riesenzellen = Syncytien



**Bildung von
Riesenzellen (= Syncytien)
nach retroviraler Infektion**

Einschlusskörper

Infektion mit manchen Viren kann bereits lichtmikroskopisch durch so genannte Einschlusskörper (im Zellkern oder Zytoplasma) bestimmt werden

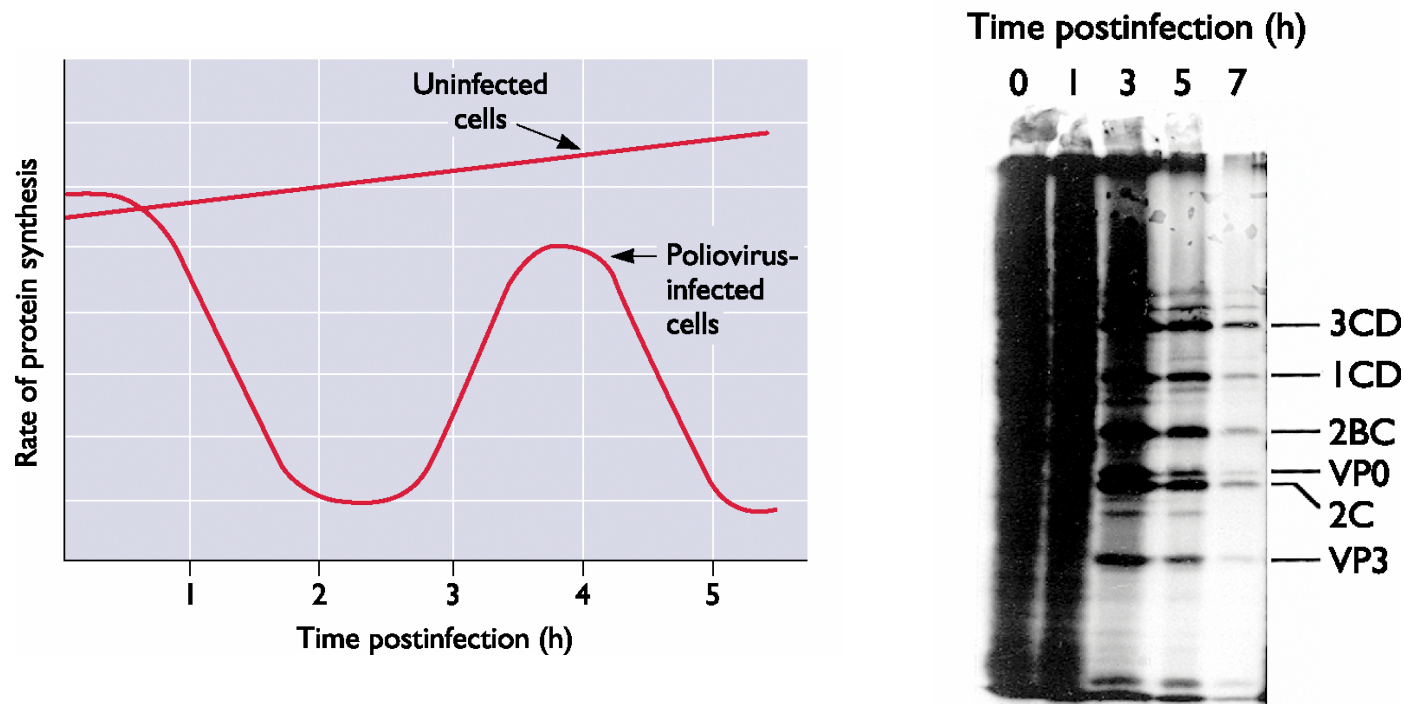


Histologie:
„Eulenaugen“ ,
Cytomegalie
= intranukleäre
Einschluss-
körperchen

Virus-vermittelte Veränderungen der Wirtszelle

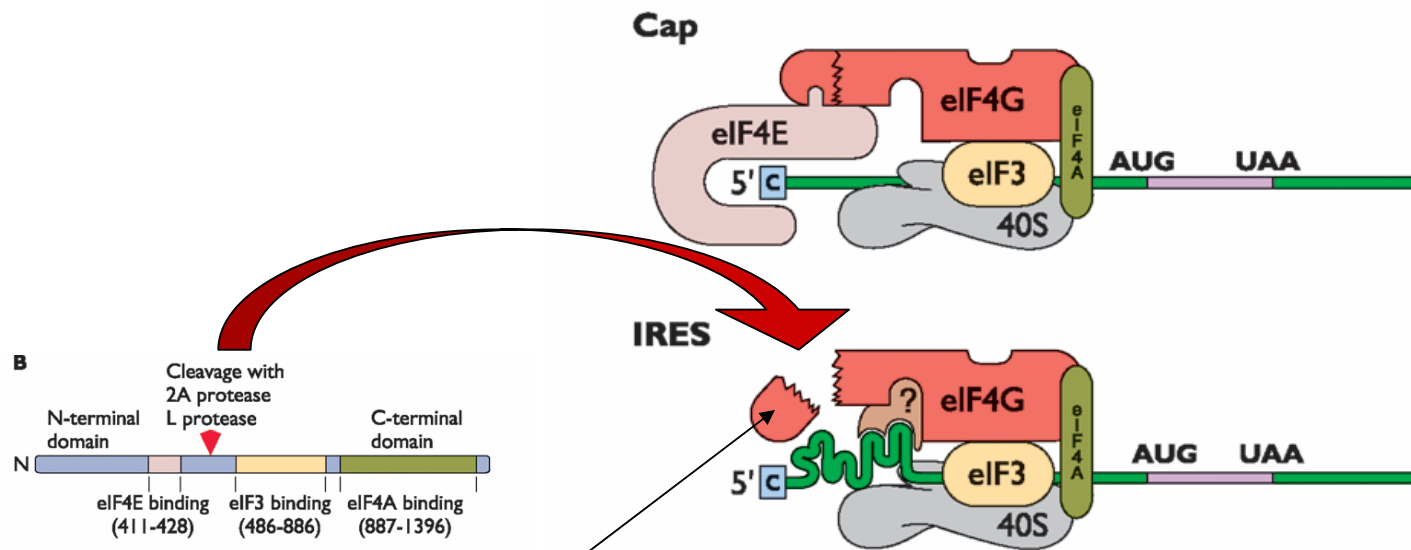
- Auslösung/Modulation der Apoptose
- Inhibition der Translation (Cap-abhg. Translat. (Poliov.), Cap-snatching (Influenza))
- Hemmung der RNA-Transkription (Poliovirus 3C Prot. spaltet Tbp, TFIIC-Komplex)
- Inhibition des RNA-Exportes (z.B. ICP27 von HSV)
- Hemmung der DNA-Replikation
- Inhibition des vesikulären Transportes (RNA-Virus induzierte Membranvesikel)
- Veränderungen der Membranpermeabilität (z.B. Sindbis Virus)
- Veränderungen des Zytoskeletts

Inhibierung der Proteinsynthese in Poliovirus-infizierten Zellen



Mechanismus: Zerstörung der eIF-4G Untereinheit
cap-unabhängige Initiation bei Poliovirus

Poliovirus-vermittelte Spaltung von eIF-4G inhibiert die Cap-abhängige Translation



Keine eIF4E-Bindung

Picornaviren enthalten interne Bindungsstellen für die ribosomale 40S-UE und benötigen deswegen kein Cap. Die zelluläre Translation wird abgeschaltet; nur noch virale RNA wird translatiert.

Cap snatching (Influenza)

Cleavage

m⁷Gpppm⁶AmpC(m)pAp.....UpUpGpApCp...

13

Initiation

(-) strand RNA

UpCpCpUpUpUpUpCp...

m⁷Gpppm⁶AmpC(m)pAp.....UpUpGp

13



Elongation

UpCpCpUpUpUpUpCp...

m⁷Gpppm⁶AmpC(m)pAp.....UpUpGpGPCpApApApApGp...

13

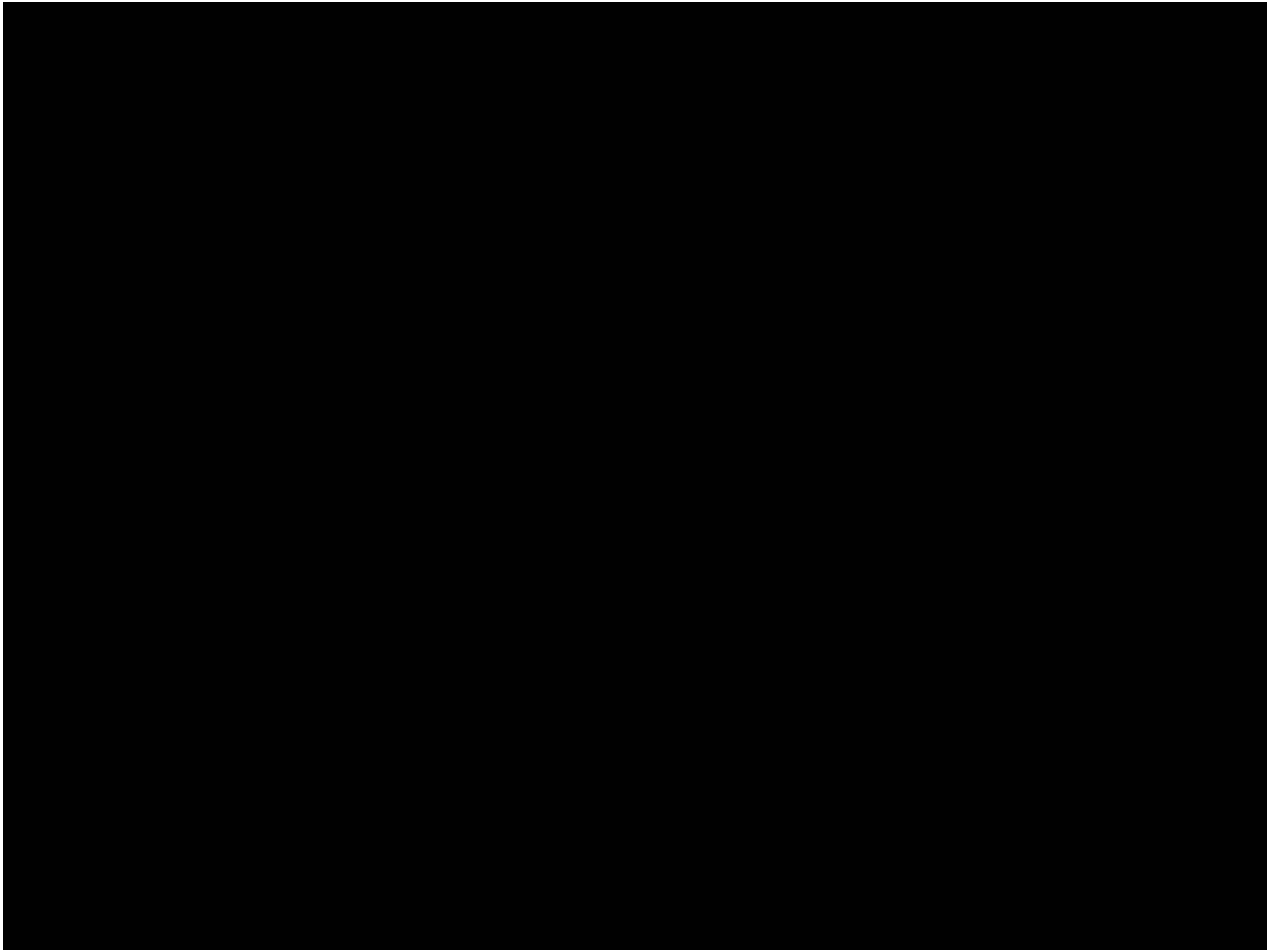
Abschneiden von zellulären mRNAs nahe dem 5'Ende (10-13 nt)

mRNA-Fragment dient als Primer für virale RNA-Synthese

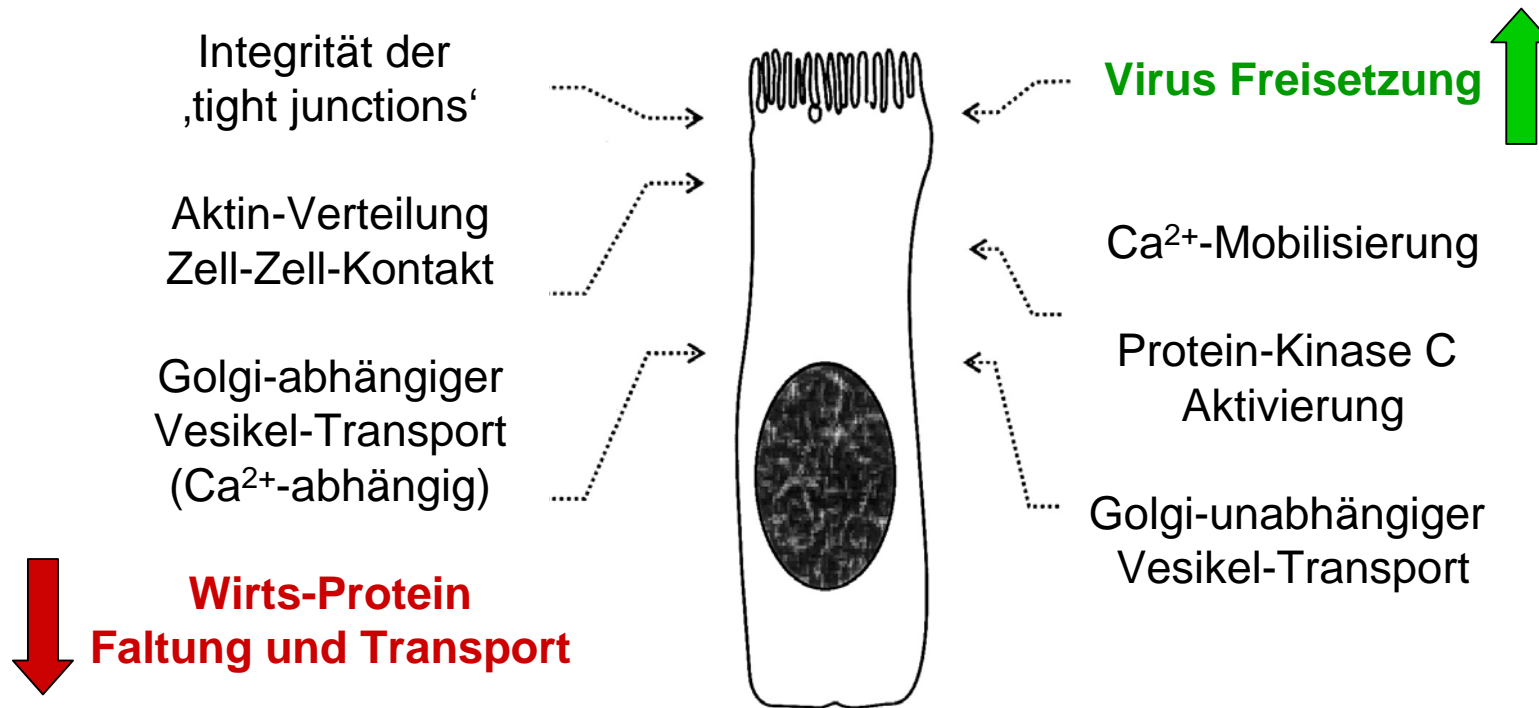
Virus-vermittelte Immunpathogenese

Table 15.15 Examples of virus-induced immunopathology

Proposed mechanism	Virus	
CD8 ⁺ T cell mediated	Coxsackievirus B	
	Lymphocytic choriomeningitis virus	
	Sin Nombre virus	
	Human immunodeficiency virus type 1	
	Hepatitis B virus	
CD4 ⁺ T cell mediated		
	Th1	Theiler's virus
		Mouse coronavirus
		Semliki Forest virus
		Measles virus
		Visna virus
		Herpes simplex virus
Th2	Respiratory syncytial virus	
Antibody mediated	Dengue virus	
	Feline infectious peritonitis virus	

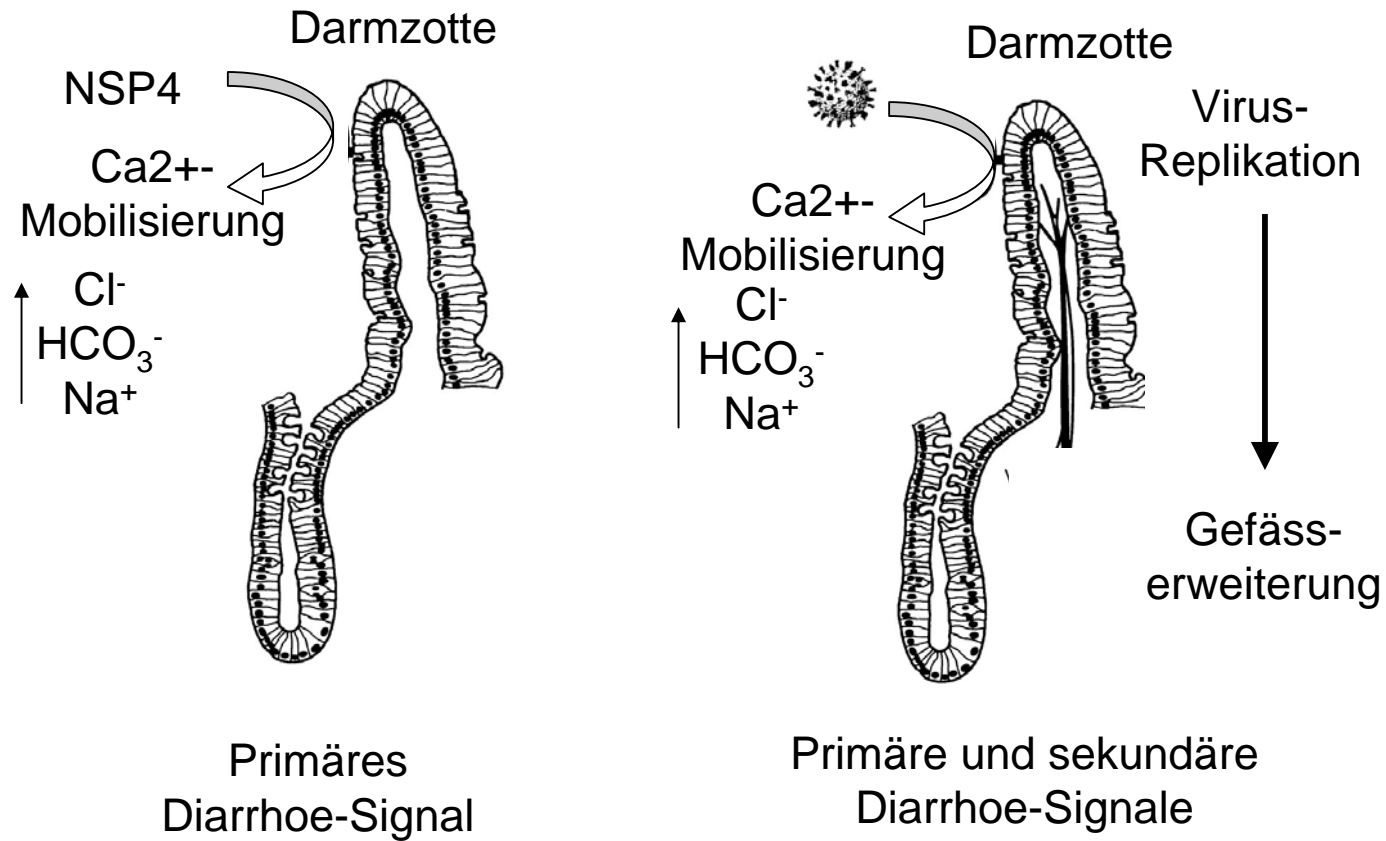


Pleiotrope Effekte der Rotavirus-Infektion und NSP4-Expression auf die Wirtszelle

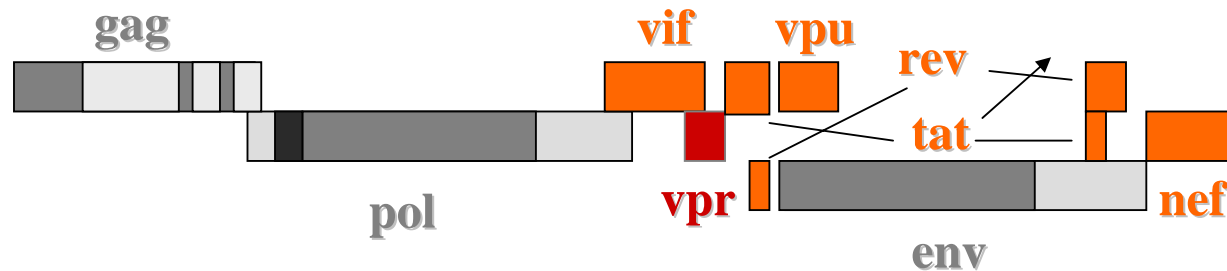


Konsequenzen der intrazellulären Ca-Mobilisierung

Veränderung des Elektrolythaushalts der Zelle durch Rotavirus führt zu Durchfall

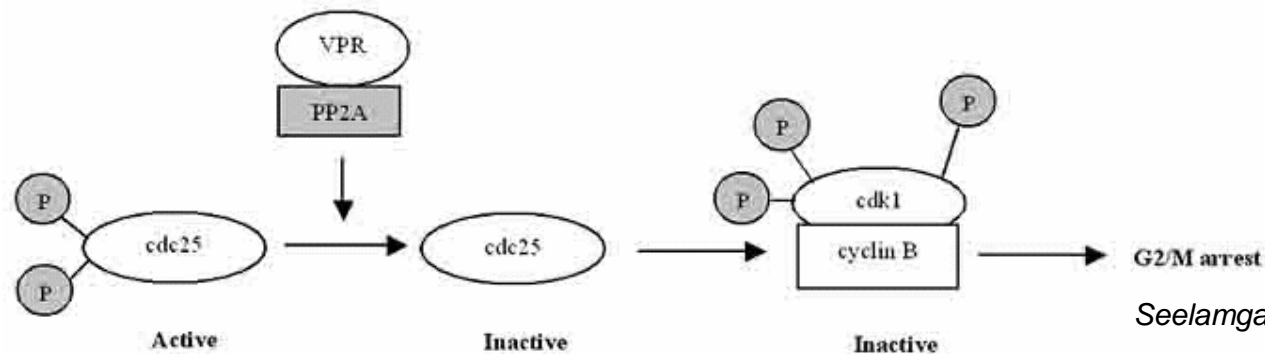


Das akzessorische Protein Vpr von HIV-1 bewirkt Zell-Zyklus-Arrest in der G2-Phase



Modell: Vpr bindet an die regulatorische Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A

- Verstärkter Kernimport von PP2A und verstärkte katalytische Aktivität
- Dephosphorylierung (Inaktivierung) von cdc25
- Hyperphosphorylierte Form von cdk1/cyclin B
- Zellzyklus-Arrest



Seelamgari et al., 2004