

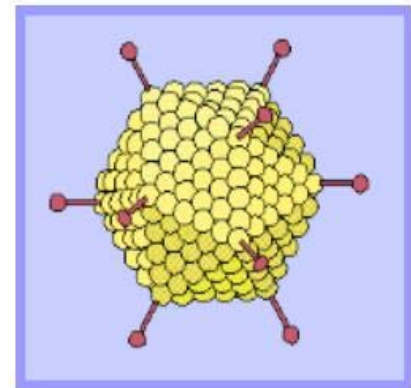
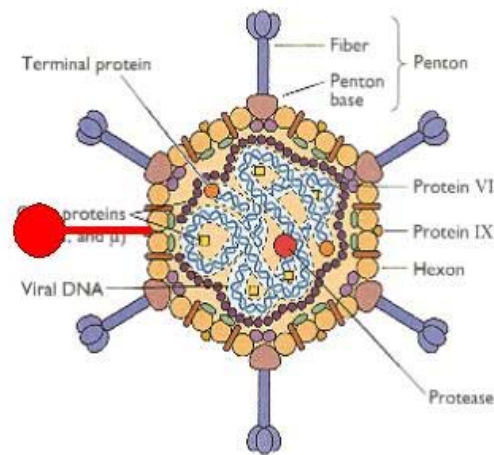
Single Virus Tracing:

Visualisierung einzelner Viren auf Ihrem Infektionsweg in lebende Zellen

Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Mit der neuen Technik "Single Virus Tracing" (SVT) steht ein neues, bildgebendes Verfahren zur Verfügung, das die Visualisierung einzelner Viren auf ihrem Infektionsweg in eine lebende Zelle erlaubt [G. Seisenberger, M.U. Ried, T. Endreß, H. Büning, M. Hallek, C. Bräuchle, Science **2001**, 294, 1929-1932.]. Das Virus wird mit nur einem fluoreszierenden Farbstoffmolekül gelabelt, um Störungen der Virus-Zellwechselwirkung auszuschließen und unter rein physiologischen Bedingungen arbeiten zu können. Mit einer hohen räumlichen Auflösung von 40 nm und einer großen zeitlichen Auflösung von 10 ms wird das Fluoreszenzsignal des Labels über hochsensitive Einzelmolekülmikroskopie verfolgt und die Bahn des Virus sichtbar gemacht. Damit können die einzelnen Stadien einer Virusinfektion im Detail beobachtet werden. Es können z.B. das Zuwandern des einzelnen Virus auf die Zellmembran, die Bindung mit dem Rezeptor an der Zelloberfläche, das Durchdringen der Zellmembran, die Diffusion des im Endosom verpackten Virus sowie die Freisetzung des Virus in das Zytoplasma der Zelle beobachtet werden, um nur einige Prozesse zu nennen. Auch der Transport der Viren mit Hilfe von Motorproteinen zum Zellkern und letztlich die Niederlegung der DNA im Zellkern kann im Einzelnen studiert werden. Alle diese Vorgänge werden in einem Film aufgenommen bei dem jedes Bild mit hoher Genauigkeit den Ort des Virus und den Zeitpunkt des Geschehens festhält. Die Methode eröffnet damit sozusagen den Zugang zum "Drehbuch" einer Virusinfektion. Das Verfahren hat ein hohes Anwendungspotential in den Bereichen Biologie, Pharmazie und Medizin sowohl bei der Bekämpfung von Virusinfektionen (Abb.1, Abb. 2) als auch bei der Entwicklung von Viren als Gefahren im Bereich der Gentherapie.

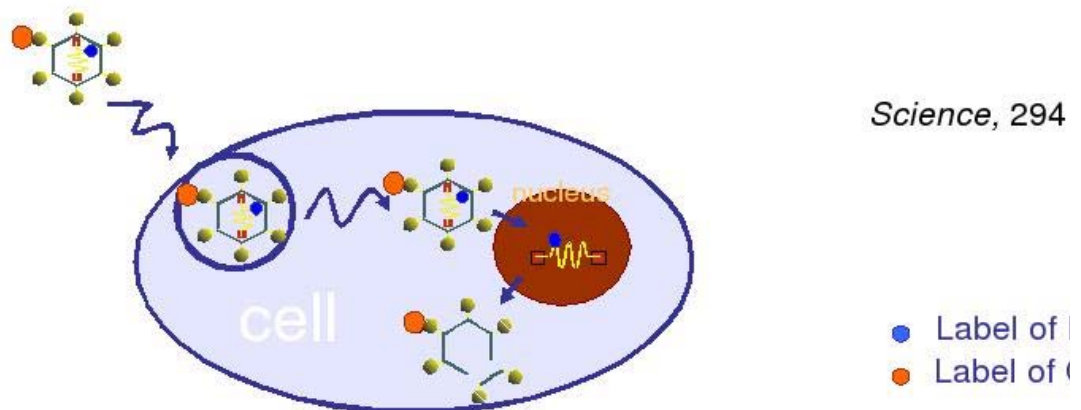
Viruses and Human Diseases



| Virus | Capsid [nm] | Genome [kB] | Disease |
|--------------------------------|-------------|-------------|----------------|
| Adeno V. | 60-90 | 36 (DNA) | pharyngitis |
| Herpes Simplex V. | 100 | 150 (DNA) | recurrent cold |
| Human Immunod. V. (HIV) | 100 | 8-10 (RNA) | AIDS |
| Hepatitis B V. | 42 | 3.2 (DNA) | Hepatitis B |
| Influenza V. | 75-80 | 15 (RNA) | flu |

Abbildung 1 Viren und Viruserkrankungen des Menschen.

General Scheme: Single Virus Tracing



| | |
|-----------------------|---|
| Many questions | <ul style="list-style-type: none"> • How does the virus cross the cell membrane ? • What type of cell compartments does the virus use ? • What modes of motion of the virus can be observed ? • What type of transport mechanisms are involved ? • How does the virus / DNA come into the nucleus ? • What is the time course (kinetic scheme) of these processes ? <p>-> „movie script“ of the infection</p> |
| Three goals | <ul style="list-style-type: none"> • Understanding of the infectious entry pathway • Develop strategies for antiviral drugs to limit the virus • Use of the virus as gene shuttle and improvement / refinement of gene targeting (gene therapy...) |

Abbildung 2 Single Virus Tracing - Überblick

Um die Viren, die jeweils nur mit einem Fluoreszenzmolekül gelabelt sind, sichtbar zu machen, wird mit einer hochempfindlichen Detektion das Fluoreszenzlicht einzelner Moleküle gesammelt (Abb.3).

Dies wird durch die eingesetzte Einzelmolekültechnik ermöglicht. Eine zusätzliche Voraussetzung neben einer hochempfindlichen Detektion ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die eine hohe Quantenausbeute und eine große Anzahl an Photozyklen aufweisen bevor sie Photobleichen. Der Farbstoff kann z.B. kovalent an das Kapsid und/oder an die DNA des Virus angebunden werden (Abb.2). Das so gelabelte Virus kann dann im Mikroskop als Fluoreszenzpunkt beobachtet werden.

Setup for Multicolor Widefield Imaging with optional FCS

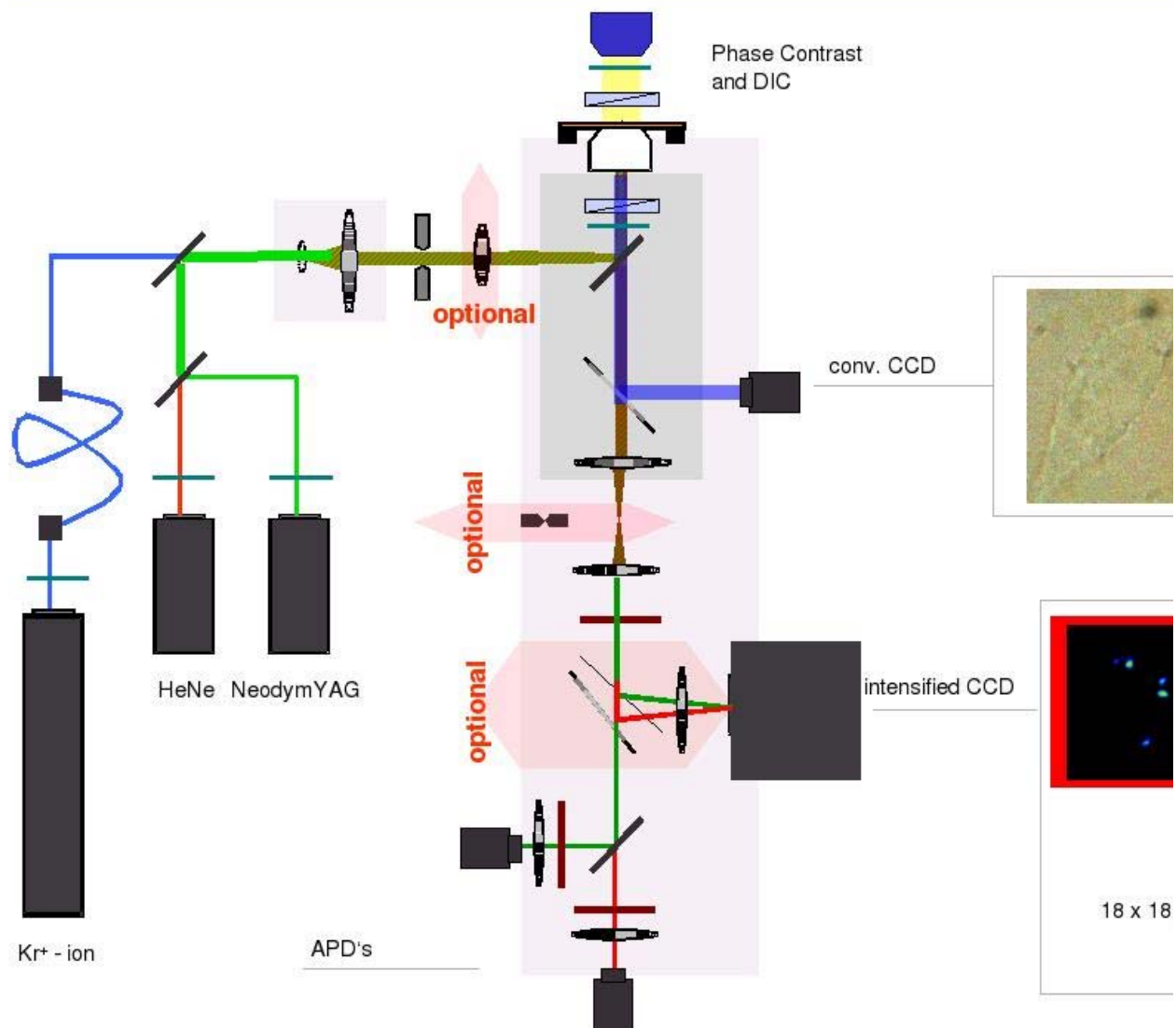


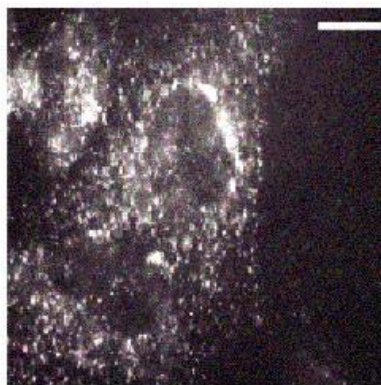
Abbildung 3 Apparativer Aufbau mit Anregungsstrahlengang (rot-grün schraffiert) und Detektionsstrahlengang (rot-grün). Die SVT Apparatur mit Einzelmolekülsensitivität besteht aus einem selbst konstruierten Weitfeld-Mikroskop und einer hochauflösenden CCD Kamera.

Single Virus Tracing vs. Conventional Fluorescence Microscopy



Single Virus Tracing

- trajectories of **individual** AA-Viruses in living HeLa Cell (10 – 1000 viruses/cell)
- location of single virus with high spatial resolution > 40 nm
- online observation with time resolution of 10 ms
- physiological conditions due to low virus concentrations and single dye labeling



Conventional Fluorescence Microscopy

- **bulk** distribution of AA-Viruses in living HeLa-Cell (10^5 - 10^6 viruses/cell)
- location of accumulations of viruses with low spatial resolution > 500 nm
- pictures taken every 1 – 10 minutes
- problems with high virus concentrations and/or high degree of labeling

Bartlett, J. S., *J. Virol.*, **74** (2000) 2777.

Abbildung 4 Vorteile von Single Virus Tracing.

Mit der SVT-Technik können Virus Infektionsschritte in Echtzeit und in lebenden Zellen beobachtet werden. Abb. 4 zeigt eine Gegenüberstellung der neuen Single Virus Tracing Technik und der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. In Abb. 4a sind die einzelnen Virentrajektorien innerhalb und außerhalb der Zelle sichtbar (Diffusion in Lösung (1), Berührung der Zellmembran (1,2), Durchdringung der Zellmembran (3), Diffusion im Zytoplasma (3,4), Eindringen in den Zellkern (4) und Diffusion im Nucleoplasma). Aus der hochgenauen Information, die jede einzelne Trajektorie enthält, kann der mechanistische und zeitliche Ablauf der Virusinfektion im Detail nachvollzogen werden.

Weitere Informationen und Movies erhalten sie gerne auch unter www.single-virus-tracing.de

Kontaktadresse:

Prof. Dr. C. Bräuchle

Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstrasse 11, 81377 München (Germany)
E-mail: christoph.brauechle@cup.uni-muenchen.de
Internet: <http://www.phys.chemie.uni-muenchen.de/Braeuchle/BraeuchleMain.htm>