

HEIMTÜCKISCHE VIREN AUF LEBENDEN ZELLEN

IVO F. SBALZARINI, HELGE EWERS, ALICIA SMITH, ARI HELENIUS UND PETROS KOUMOUTSAKOS

Die Kombination von moderner Lichtmikroskopie und automatisierter computer-gestützter Bildverarbeitung ermöglicht es, die Bewegungen von Viren auf lebenden Zellen zu beobachten. Die systematische Analyse der Virusbewegungen unmittelbar nach dem Binden an die Zelloberfläche wird helfen, die frühen Schritte von Virusinfektionen besser zu verstehen. Besonders interessant sind dabei die von den Viren benutzten Mechanismen, um ins Innere der Zelle einzudringen.

Viren werden von Organismus zu Organismus übertragen. Um sich zu vermehren, müssen sie ihr Erbgut sowie Hilfsproteine ins Innere der Wirtszelle bringen. Die zahlreichen Methoden, welche die Viren dazu entwickelt haben, beruhen darauf, bereits vorhandene Mechanismen der Zelle für die eigenen Zwecke zu missbrauchen. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Prozesse sind das Eindringen durch die Zellmembran ins Innere der Zelle, sowie der motorgetriebene Transport entlang des Eisenbahn-Netzwerks der Zelle, der Mikrotubuli. Das Ziel der Viren: der Zellkern, in dem sie sich replizieren können.

Wie entstehen Infektionen?

Der Infektionsprozess beginnt mit dem Binden der Viren an die Aussenseite der Zellmembran (siehe auch Schlumberger et al., S. 26). Anker-moleküle auf der Oberfläche des Virus binden dabei nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an bestimmte Proteine in der Zellmembran, die «Virus-Rezeptoren». Diese Rezeptoren haben im normalen Leben der Zelle eigentlich andere Aufgaben, werden aber vom Virus geschickt als Bindungsstellen missbraucht. Verschiedene Viren benutzen dabei verschiedene Rezeptoren. Art und Verteilung der Rezeptoren in den Zellen und Geweben eines Organismus bestimmen dadurch weitgehend, welche Zellen infiziert werden und wie die Viruserkrankung verläuft. Nach dem Binden an die Zellmembran müssen die Viren die Membran durchbrechen, um ihr Erbgut ins Innere der Zelle zu

bringen. Auch dazu sowie für den Transport im Zellinnern verlassen sich die Viren auf die bereits vorhandene Maschinerie der Zelle, die sie für ihre Zwecke «umprogrammieren».

Wie verhalten sich Viren auf der Zellmembran, bevor sie ins Innere der Zelle gelangen? Die Antwort auf diese Frage ist für kein Virus im Detail bekannt. Wir wissen jedoch, dass diese frühen Schritte im Infektionsprozess von grosser Wichtigkeit für die ganze Infektion sind. Die hierbei ablaufenden biochemischen Prozesse umfassen eine Vielzahl verschiedener Moleküle und lösen komplexe Abfolgen von Signalen aus, die dazu dienen, die Zellmechanismen für die Zwecke des Virus umzustellen.

Ursache von Darmkrebs

In unserem Projekt studieren wir die frühen Schritte der Bindung und Bewegung von Polyoma-Viren auf der Aussenseite der Membran lebender Zellen. Polyoma ist ein kleines (45 Nanometer Durchmesser) DNS-Virus, welches Tumore in der Ohrspeicheldrüse von Mäusen verursacht. Das menschliche Gegenstück des Virus ist verantwortlich für bestimmte Arten von Darmkrebs (siehe auch Norden/Barral, S. 29 und Rudin/Schubiger, S. 36). Die Abb. 1 zeigt einige dieser Viren unter dem Elektronenmikroskop. Die Viren gelangen über einen bestimmten Pfad ins Innere der Zelle. Dieser Pfad wurde erst kürzlich entdeckt, ist unabhängig von den bekannten klassischen Mechanismen und daher von grossem wissenschaftlichem Interesse. Poly-

oma-Viren sind Experten darin, den Pfad für ihre Zwecke zu missbrauchen. Die Beobachtung dieser Viren liefert fundamentale Informationen über die biochemischen Prozesse, welche für das Funktionieren des Pfades verantwortlich sind. Also: Wir benutzen das Virus als Beobachtungsinstrument für zelluläre Prozesse. So können wir nicht nur etwas über die Mechanismen von Virusinfektionen erfahren, sondern lernen gleichzeitig auch viel über die komplexen Prozesse, die innerhalb von Zellen ablaufen.

Künstliche Viren ohne Erbgut

Um die Probleme der Biosicherheit zu vermeiden, verwenden wir in unseren Untersuchungen nicht infektiöse Viren, sondern stellen die Proteine der Viruskapsel künstlich her und bauen daraus «leere» virusähnliche Partikel. Diese haben dieselbe Struktur wie das richtige Virus, enthalten aber kein Erbgut, was heisst, dass sie die Zelle nicht infizieren können. Das Verhalten solcher leeren «Viren» in den für uns interessanten frühen Bindungsschritten ist jedoch identisch mit jenem der richtigen Viren. Damit die Bewegungen der Viren unter dem Lichtmikroskop sichtbar werden, markieren wir die virusähnlichen Partikel mit fluoreszenten Farbstoffen.

Somit können die vielfältigen Wechselwirkungen der Viren auf der Zelloberfläche, unmittelbar nach dem Eindringen, beobachtet und analysiert werden. Um die Bewegungen der Teilchen in Echtzeit zu ver-

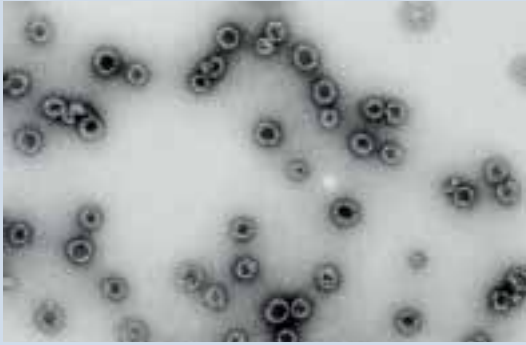


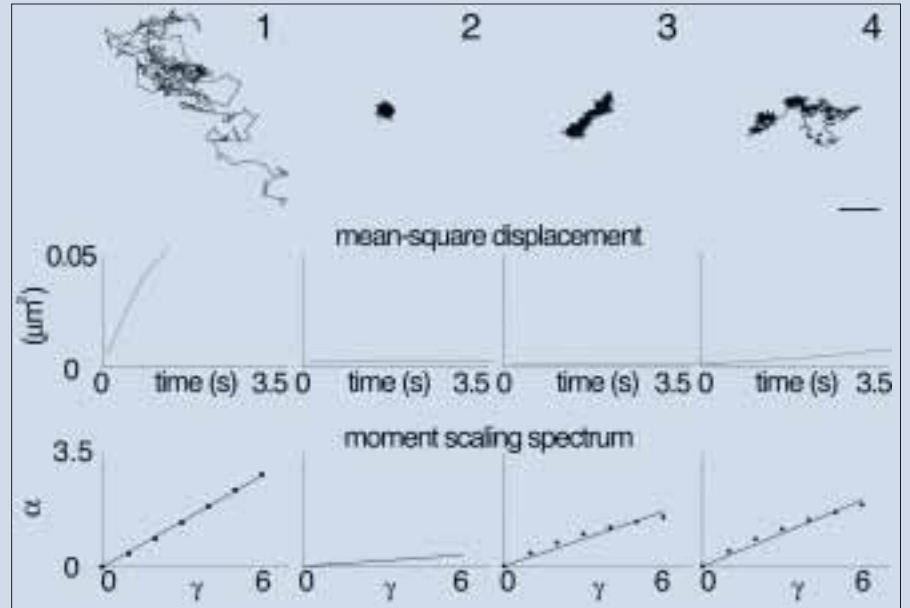
Abb. 1:
EINIGE POLYOMAVIRUS-ÄHNLICHE TEILCHEN unter dem Elektronenmikroskop bei 62000-facher Vergrößerung. Jedes Teilchen besteht aus einer Proteinkapsel von zirka 45 Nanometer Durchmesser und enthält alle Ankermoleküle, um an die Rezeptoren auf der Zelle binden zu können. Die Kapseln enthalten jedoch kein Erbgut und sind somit nicht infektiös.

Abb. 3:
BEISPIEL VON KLASSISCHER UND «MOMENT SCALING SPECTRUM»-ANALYSE VON VIRUSBEWEGUNGEN.

Die erste Zeile zeigt vier Bahnkurven, wie sie vom Computer aus den Videoaufnahmen extrahiert wurden. Es können vier verschiedene Arten von Bewegungen unterschieden werden: (1) freie Diffusion, (2) Beschränkung auf ein stillstehendes Gebiet, (3) Beschränkung auf ein sich bewegendes Gebiet, und (4) eine Mischung von 1-3. Die klassische «Mean Square Displacement»-Analyse dieser vier Beispiele ist in der zweiten Zeile dargestellt. Erst wenn die «Moment Scaling Spectrum»-Analyse hinzugenommen wird (dritte Zeile), ist es jedoch möglich, die vier verschiedenen Bewegungstypen zu unterscheiden.



Abb. 2:
FLUORESZENT MARKIERTE POLYOMAVIRUS-ÄHNLICHE TEILCHEN (helle Punkte) nach dem Binden an die Aussenseite der Zellmembran. Die vier Bilder zeigen denselben Bildausschnitt zu verschiedenen Zeitpunkten. Sie wurden mittels eines TIRF-Mikroskops bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Positionen der einzelnen Punkte werden vom Computer vollautomatisch erfasst und ihre Bewegungen verfolgt.



folgen, benutzen wir moderne bildgebende Verfahren wie konfokale Mikroskopie und TIRF-Mikroskopie («Total Internal Reflection Fluorescence»). Die Abb. 2 zeigt eine kurze Zeitsequenz von typischen Bildern von Polyoma-ähnlichen Teilchen unter einem TIRF-Mikroskop. Die einzelnen fluoreszent markierten Viren erscheinen als helle Punkte vor dem dunklen Hintergrund der Aussenseite der Zellmembran. Auf diese Weise aufgenommene digitale Videos sind reich an Informationen über die Funktionsprinzipien und Strukturen der Pfade ins Innere von lebenden Zellen.

Schnelle Viren in langen Filmen...

Bevor die Informationen analysiert werden können, müssen die Bewegungen der Viren jedoch in Form von Bahnkurven aus den Videos extrahiert werden. Dieser Prozess heisst «Tracking» und spielt eine wichtige Rolle in Bewegungsanalysen in vielen Bereichen der Wissenschaft und Technik. Um

statistisch signifikante Analysen der Virusbewegungen durchführen zu können, müssen Tausende von Bahnkurven unter verschiedenen Bedingungen und chemischen Behandlungen der Zelle bestimmt werden. Die grosse Zahl von Beobachtungen ist nötig, um biochemische Modelle der Pfade ins Zellinnere aufstellen und testen zu können. Die schnellen Bewegungen der kleinen Virenteilchen erfordern zudem, die Videos mit mindestens 20 Bildern pro Sekunde aufzuzeichnen. Somit sind die resultierenden Filme mehrere Tausend Bilder lang.

...fordern «Tracking»-Programme heraus

Die riesigen Datenmengen müssen effizient und zuverlässig verarbeitet werden. Die Genauigkeit, mit welcher die Position eines Partikels in einem Bild bestimmt werden kann, muss dabei besser sein als die Grösse eines einzelnen Pixels des Bildes, und sie darf nur schwach vom Störrauschen im Bild abhängen.

Dies ist nur mittels vollautomatischer Verarbeitung im Computer zu bewältigen. Die Aufgabe des Computers besteht darin, die Positionen aller Viren in allen Bildern eines Videos zu bestimmen und diese Punkte über die einzelnen Bilder hinweg zu verbinden, d. h. zu bestimmen, welcher Punkt im nächsten Bild vom selben Virenteilchen stammt wie ein bestimmter Punkt im aktuellen Bild. Auf diese Weise können die Bewegungen aller Viren über die Zeit des Videos verfolgt werden.

Die riesigen Datenmengen und die benötigte Genauigkeit der Resultate sind eine Herausforderung für alle «Tracking»-Computerprogramme. Die Zusammenarbeit zwischen dem Computational Laboratory (CoLab) und dem Institut für Biochemie der ETH Zürich wurde teilweise dadurch motiviert, dass die bestehenden Programme den Bedürfnissen dieses Projekts nicht gerecht wurden. Die meisten dieser Programme benutzen Annahmen über die

Art der Bewegung, um ein effizientes Tracking-Verfahren zu konstruieren. Manche sind zwar sehr genau, aber zu rechenintensiv um sie auf grosse Datenmengen anzuwenden.

Die für dieses Projekt neu entwickelte Software benötigt keinerlei Annahmen über die Art der Bewegung, ist speziell schnell und robust gegen Bildrauschen. Das Computerprogramm ist effizient genug, um die Tausende von Bildern eines Videos innert weniger Sekunde auf einem normalen Bürocomputer zu verarbeiten. Die dabei erreichte Genauigkeit der Resultate ist vergleichbar mit sehr viel rechenintensiveren Methoden.

Vier Bewegungsarten

Die vollautomatische Bestimmung der Virusbewegungen aus den Videoaufnahmen stellt uns eine Fülle von Informationen zur Beschreibung und Analyse der Abläufe unter verschiedenen Bedingungen zur Verfügung. Die klassische Analyseverfahren für zweidimensionale Bewegungen basiert auf der Bestimmung von Transportgeschwindigkeiten und Diffusionskonstanten. In biologischen Systemen entsprechen die Bewegungen jedoch selten idealer Diffusion oder gerichteter Bewegung, sodass die klassischen Analyseverfahren erweitert werden müssen. Nach dem Binden an den

Rezeptor können vier verschiedene Arten von Bewegungen beobachtet werden: freie Diffusion, Beschränkung auf ein stillstehendes Gebiet, Beschränkung auf ein sich bewegendes Gebiet oder eine beliebige Mischung dieser drei. Die klassische Analyse kann nicht zwischen freier Diffusion und Beschränkung auf ein sich rasch bewegendes Gebiet unterscheiden. Ebenso sind stillstehende Teilchen nicht von solchen unterscheidbar, die auf ein sich sehr langsam bewegendes Gebiet beschränkt sind.

Um dieses Problem zu beheben, benutzen wir zur Beschreibung der Bewegungsprozesse eine Analyseverfahren aus der statistischen Mechanik. Diese «Moment Scaling Spectrum»-Methode betrachtet das ganze Spektrum der Dispersionskonstanten und nicht nur die Diffusionskonstante alleine. Sie liefert somit viel mehr Information über die Art der Bewegung. In Kombination mit der klassischen Analyseverfahren ist es nun möglich, alle Bewegungstypen eindeutig zu unterscheiden, wie in Abb. 3 anhand eines Beispiels dargestellt ist.

Biologen und Informatiker forschen zusammen

Die Fähigkeit, Virenbewegungen vollautomatisch klassifizieren zu können, ist ein wichtiger Bestandteil unserer Untersuchungen. Einerseits verunmöglicht die grosse Anzahl der Beobachtungen eine manuelle Auswertung, andererseits möchten wir jede Verzerrung der Resultate durch manuelle Auswahl und Klassifikation vermeiden. Dies ermöglicht es, mittels statistischer Verfahren auch kleinste Unterschiede festzustellen. In Kombination mit systematischen Manipulationen der Zellen mittels chemischer Behandlungen wird es nun möglich, die Bestandteile der molekularen Maschinerie des Eindringens in die Zelle zu identifizieren und ihr Zusammenspiel zu verstehen. Dieses Projekt hat Wissenschaftler aus Biologie und Computational Science in einer engen Kooperation zusammengeführt. Es steht beispielhaft dafür, wie die Entwicklung spezialisierter computerbasierter Verfahren mithelfen kann, herausfordernde Problemstellungen in der Biologie anzugehen, und die Grenzen der Forschung in beiden Disziplinen neu zu definieren.

Ivo F. Sbalzarini¹, Helge Ewers, Alicia Smith, Ari Helenius² und Petros Koumoutsakos¹

¹Computational Laboratory (CoLab) und

²Institut für Biochemie, ETHZ