**Diagnose von HIV-Infektionen – PCR-basiert**

**Arbeitsauftrag:** Ihre nächste Station bei der AIDS-Hilfe ist im Labor, in dem HIV-Tests durchgeführt werden. Da Sie vom Biotechnologischen Gymnasium kommen, sollen Sie in einem Fließdiagramm darstellen, wie das HI-Virus-Erbgut mithilfe der PCR nachgewiesen werden kann.

1. Stellen Sie die prinzipiellen Schritte für einen Nachweis einer HIV-Infektion vom Patienten bis zum Ergebnis in einem Fließdiagramm dar.

2. Zeichnen Sie ein Elektropherogramm, in dem das Ergebnis einer HIV-positiven Person sowie eine Positiv- und Negativ-Kontrolle dargestellt sind. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 1200 bp.

3. Erklären Sie, welche Unterschiede in den PCR-Ansätzen der Positiv- und Negativ-Kontrolle im Vergleich zum Testansatz liegen.

**Lösung: Diagnose von HIV-Infektionen – PCR-basiert**

**Arbeitsauftrag:** Ihre nächste Station bei der AIDS-Hilfe ist im Labor, in dem HIV-Tests durchgeführt werden. Da Sie vom Biotechnologischen Gymnasium kommen sollen Sie in einem Fließdiagramm darstellen, wie das HI-Virus-Erbgut mithilfe der PCR nachgewiesen werden kann.

1. Stellen Sie die prinzipiellen Schritte für einen Nachweis einer HIV-Infektion vom Patienten bis zum Ergebnis in einem Fließdiagramm dar.

**2. Zeichnen Sie ein Elektropherogramm, in dem das Ergebnis einer HIV-positiven Person sowie eine Positiv- und Negativ-Kontrolle dargestellt sind. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 1200 bp.**

Längen-standard

1000 bp

Positiv-Kontrolle

Negativ-Kontrolle

HIV-positive Person

750 bp

500 bp

250 bp

2000 bp

**3. Erklären Sie, welche Unterschiede in den PCR-Ansätzen der Positiv- und Negativ-Kontrolle im Vergleich zum Testansatz liegen.**

Positiv-Kontrolle: Anstatt zu testende DNA wird virale DNA in den Ansatz pipettiert.

Negativ-Kontrolle: Anstatt zu testende DNA wird Wasser oder Puffer in den Ansatz pipettiert.

**Diagnose von HIV-Infektionen – ELISA-basiert**

**Blockade der Virus-Anheftung und Phagozytose** z. B. Ibalizumab ist ein Antikörper, der an die Rezeptoren bindet und somit den Eintritt des HI-Virus verhindert

Zellkern

**Hemmung der Integrase** z. B. Raltegravir verhindert die Integration ins Wirtsgenom

**Hemmung der enzymatischen Aktivität der Protease**

Peptid-ähnliche Struktur, die der Erkennungssequenz der Protease sehr ähnlich ist, kompetitive Hemmung z. B. Saquinavir.

**Aktuelles Forschungswissen:** Warum gibt es noch keinen HIV-Impfstoff?

**Aufgabe:** Recherchieren Sie im Internet nach dem aktuellen Stand der Forschung zu einem HIV-Impfstoff und erklären Sie, weshalb die Entwicklung so schwierig ist.

***WICHTIG für naturwissenschaftliche Erkenntnisgewinnung:*** Geben Sie Ihre naturwissenschaftlich vertrauenswürdigen Informationsquellen an.

**Blockade der Virus-Anheftung und Phagozytose** z. B. Ibalizumab ist ein Antikörper, der an die Rezeptoren bindet und somit den Eintritt des HI-Virus verhindert

Zellkern

**Hemmung der Integrase** z. B. Raltegravir verhindert die Integration ins Wirtsgenom

**Hemmung der enzymatischen Aktivität der Protease**

Peptid-ähnliche Struktur, die der Erkennungssequenz der Protease sehr ähnlich ist, kompetitive Hemmung z. B. Saquinavir.

**Hemmung der reversen Transkrition durch Nukleotid-Analoga**

Veränderte Nukleotide werden von der reversen Transkriptase eingebaut, dadurch die weitere Synthese gestoppt, da die Bindungstelle fehlt z. B. Abacavir.

**Aktuelles Forschungswissen:** Warum gibt es noch keinen HIV-Impfstoff?

**Aufgabe:** Recherchieren Sie im Internet nach dem aktuellen Stand der Forschung zu einem HIV-Impfstoff und erklären Sie, weshalb die Entwicklung so schwierig ist.

***WICHTIG für naturwissenschaftliche Erkenntnisgewinnung:*** Geben Sie Ihre naturwissenschaftlich vertrauenswürdigen Informationsquellen an.

**Arbeitsauftrag: Gruppenarbeit**

Für den HIV-Schnelltest soll ein immunologisches Nachweisverfahren entwickelt werden, Sie dürfen Mitglied des Forscherteams sein.

Sie beginnen Ihre Forschungen jedoch nicht völlig unwissend. Einige fleißige Kolleg/innen haben bereits Vorarbeit geleistet und stellen Ihnen folgende Erkenntnisse zur Verfügung:

* Eine HIV-Infektion kann am besten über die im Blutserum vorhandenen Antikörper gegen das HI-Virus nachgewiesen werden. Das Virus selbst dringt in die T-Helferzellen ein und ist daher im Blut fast nicht nachweisbar.
* Es gibt die Möglichkeit, HIV-typische Antigenteile irreversibel an einer Kunststoffmembran zu fixieren (= Immobilisation).
* Man kann Antikörper herstellen, die sich mit ihren Antigen-Bindungsstellen an die konstante Region anderer Antikörper binden.
* An die konstante Region eines Antikörpers kann man verschiedene andere Proteine z. B. Enzyme chemisch anbinden.

Sie sollen anschließend Ihr Entwicklungsergebnis auf einem Kongress vorstellen. Folgende Anforderungen werden dabei an Sie gestellt:

* Stellen Sie Ihr Verfahren Schritt für Schritt vor, formulieren Sie dazu ein Fließdiagramm mit allen Durchführungsschritten und den dabei ablaufenden Vorgängen.
* Verdeutlichen Sie dabei für jeden Durchführungsschritt die in dem Probengefäß ablaufenden Vorgänge mittels Modellelementen.
* Es stehen eine Reihe von Modellelementen für Sie bereit. Wählen Sie nur Modellelemente aus, die Sie für Ihr Verfahren benötigen.

**Beachten Sie bei der Entwicklung Ihres Verfahrens:**

Das Ergebnis muss eindeutig sein. Falsch-positive Testergebnisse (der Test zeigt eine HIV-Infektion an, obwohl keine vorhanden ist) sowie falsch-negative Testergebnisse (die Testreagenzien sind nicht funktionsfähig) sollen mit Ihrem Verfahren ausgeschlossen sein.

Das Testergebnis muss eindeutig sichtbar sein.

Zeit: 30 min

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Boden eines Testgefäßes**  **(Trägermaterial)** |
|  | **Krankheitserreger (Virus)** |
|  | **Antigen des Krankheitserregers** |
|  | **Antikörper** |
|  | **Antikörper** |
|  | **Enzym** |
|  | **RNA** |
|  | **Substrat** |
|  | **Blauer Farbstoff** |

**Hilfe 1:**

**Sie finden keinen Ansatzpunkt für Ihren immunologischen Test bzw. Sie wissen nicht genau, was Sie überhaupt nachweisen sollen?**

Überlegen Sie zunächst, was genau Sie bei dem von Ihnen zu entwickelnden Test nachweisen möchten:

* Ist es ein Krankheitserreger (z. B. ein Virus) der aus dem infizierten Organismus (Mensch) isoliert wurde?
* Ist es ein Antikörper, den eine infizierte Person im Blutserum hat?

Wenn Sie diese Frage geklärt haben, suchen Sie erst das passende Modell für das Agens, das Sie mit Ihrem Test nachweisen möchten.

**Hilfe 2:**

**Sie wissen zwar was Sie nachweisen möchten, haben aber keine Idee, wie Sie Ihr nachzuweisendes Antigen oder Antikörper erfassen können?**

Überlegen Sie dazu in folgender Reihenfolge:

* In welcher Flüssigkeit befindet sich Ihr nachzuweisendes Agens? Was befindet sich noch in dieser Flüssigkeit?
* An welchen Modellbestandteil könnte Ihr nachzuweisendes Agens binden und warum?
* Könnte diese Bindung Ihres Agens an den ausgewählten Modellbestandteil dazu führen, dass Ihr Agens von den anderen Bestandteilen der Ursprungsflüssigkeit getrennt werden kann?

**Hilfe 3:**

**Sie haben Ihr nachzuweisendes Antigen oder Antikörper bereits aus der Körperflüssigkeit gewonnen und fixiert, haben aber nun keine Idee, wie Sie das Vorhandensein nachweisen können?**

Überlegen Sie dazu:

* Ist Ihr gebundenes Agens (Antikörper oder Antigen) bereits von anderen Bestandteilen der Ursprungsflüssigkeit befreit?
* An was könnte Ihr gebundenes Agens in einem weiteren Schritt gebunden werden und was müssten Sie dazu in das Probengefäß geben?
* Welcher Modellbestandteil würde sich dazu eignen?
* Auf welchem Weg können Sie eine Bindung Ihres Agens an den von Ihnen ausgewählten Modellbestandteilen sichtbar machen?

**Lösung: Hilfe 1:**

**Sie finden keinen Ansatzpunkt für Ihren immunologischen Test bzw. Sie wissen nicht genau, was Sie überhaupt nachweisen sollen?**

Überlegen Sie zunächst, was genau Sie bei dem von Ihnen zu entwickelnden Test nachweisen möchten:

* Ist es ein Krankheitserreger (z. B. ein Virus) der aus dem infizierten Organismus (Mensch) isoliert wurde? Nein
* Ist es ein Antikörper, den eine infizierte Person im Blutserum hat? Ja, Antikörper gegen HIV

Wenn Sie diese Frage geklärt haben, suchen Sie erst das passende Modell für das Agens, das Sie mit Ihrem Test nachweisen möchten.

**Hilfe 2:**

**Sie wissen zwar was Sie nachweisen möchten, haben aber keine Idee, wie Sie Ihr nachzuweisendes Antigen oder Antikörper erfassen können?**

Überlegen Sie dazu in folgender Reihenfolge:

* In welcher Flüssigkeit befindet sich Ihr nachzuweisendes Agens? Was befindet sich noch in dieser Flüssigkeit? Im Blutserum. Es befinden sich zahlreiche andere Antikörper ebenfalls im Blutserum.
* An welchen Modellbestandteil könnte Ihr nachzuweisendes Agens binden und warum? HIV-Antikörper binden spezifisch an das HIV-Antigen. Außerdem kann man Antikörper herstellen, die sich mit ihren Antigen-Bindungsstellen an die konstante Region anderer Antikörper binden.
* Könnte diese Bindung Ihres Agens an den ausgewählten Modellbestandteil dazu führen, dass Ihr Agens von den anderen Bestandteilen der Ursprungsflüssigkeit getrennt werden kann? Nur HIV-Antikörper binden spezifisch an das HIV-Antigen, andere Antikörper binden nicht und können abgewaschen werden.

**Hilfe 3:**

**Sie haben Ihr nachzuweisendes Antigen oder Antikörper bereits aus der Körperflüssigkeit gewonnen und fixiert, haben aber nun keine Idee, wie Sie das Vorhandensein nachweisen können?**

Überlegen Sie dazu:

* Ist Ihr gebundenes Agens (Antikörper oder Antigen) bereits von anderen Bestandteilen der Ursprungsflüssigkeit befreit? Man muss andere Antikörper mit Waschpuffer abwaschen, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.
* An was könnte Ihr gebundenes Agens in einem weiteren Schritt gebunden werden und was müssten Sie dazu in das Probengefäß geben? An Antikörper, die sich mit ihren Antigen-Bindungsstellen an die konstante Region anderer Antikörper binden. Antikörper, die an die konstante Region des HIV-Antikörpers binden.
* Welcher Modellbestandteil würde sich dazu eignen? Antikörper, die an konstante Region des HIV-Antikörpers binden.
* Auf welchem Weg können Sie eine Bindung Ihres Agens an den von Ihnen ausgewählten Modellbestandteilen sichtbar machen? Mit einem Enzym-gebundenem Antikörper, der ein Substrat in einen z. B. blauen Farbstoff umsetzt.

**Diagnose von HIV-Infektionen – ELISA-basiert ELISA: Enzyme linked immunoabsorbent Assay**

**Tafelbild:**

|  |
| --- |
| Farbloses Substrat wird zu blauem Produkt umgesetzt |
| Enzym-gebundener Antikörper (2. AK) |
| HIV-Antikörper (1. AK) |
| HI-Virus-Antigen |
| Trägermaterial |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Positiv-Kontrolle:** | **Negativ-Kontrolle:** |
| Blut mit HIV-Antikörpern wird dazupipettiert | Blut ohne HIV-Antikörper wird dazupipettiert |
| * Blaufärbung | ohne HIV-Antikörper bindet kein Enzym-gebundener Antikörper   * Keine Blaufärbung |
| Ausschluss falsch-negativer  Ergebnisse | Ausschluss falsch-positiver  Ergebnisse |

**Lösung: Fließdiagramm zum ELISA-Test (HIV-Nachweis)**

|  |  |
| --- | --- |
| Das nachzuweisende Antigen (HIV-Antigen) wird an einer Oberfläche immobilisiert. |  |
| Patientenblut wird zugegeben. | 🡪 Ist der Patient HIV-infiziert, enthält das Blut nach einer gewissen Zeit Antikörper gegen HIV: diese binden an das immobilisierte Antigen. |
| 1. Waschschritt | 🡪 Nichtgebundene Blutbestandteile wie z. B. andere Antikörper, die nicht an das HIV-Antigen binden können, werden abgewaschen 🡪 Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse. |
| Monoklonale Antikörper, die spezifisch an die konstante Region eines anderen Antikörpers binden können, werden zugegeben.  Diese Antikörper haben in ihrer eigenen konstanten Region ein Enzym gebunden. | 🡪 Enzym-gebundener Antikörper bindet an HIV- Antikörper, falls dieser im Patientenblut vorhanden war und daher fest an das HIV-Antigen gebunden hat. |
| 1. Waschschritt | 🡪 Besonders wichtig!  Wäscht nichtgebundene monoklonale Antikörper mit Enzym ab, verhindert damit falsch-positive Ergebnisse. |
| Zugabe von farblosem Substrat, passend zum Antikörper-gebundenen Enzym. | 🡪 Antikörper-gebundenes Enzym setzt farbloses Substrat in farbiges Produkt um. Farbe zeigt also das Vorhandensein von HIV-Antikörpern im Blut an.  🡪 Das Enzym verstärkt die Empfindlichkeit des Tests, da schon wenig gebundene Antikörper viel farbiges Produkt liefern. |

**Therapieansätze bei HIV-Infektionen**

Zellkern

**Aktuelles Forschungswissen:** Warum gibt es noch keinen HIV-Impfstoff?

**Aufgabe:** Recherchieren Sie im Internet nach dem aktuellen Stand der Forschung zu einem HIV-Impfstoff und erklären Sie, weshalb die Entwicklung so schwierig ist.

***WICHTIG für naturwissenschaftliche Erkenntnisgewinnung:*** Geben Sie Ihre naturwissenschaftlich vertrauenswürdigen Informationsquellen an.

AIDS ist nicht heilbar, aber kein Todesurteil mehr.

**Arbeitsauftrag:** Stellen Sie Hypothesen auf, wodurch eine Virenvermehrung unterbrochen werden kann, und zeichnen Sie die Ansatzstellen in der Abbildung ein.

**Lösung: Therapieansätze bei HIV-Infektionen**

**Blockade der Virus-Anheftung und Phagozytose** z. B. Ibalizumab ist ein Antikörper, der an die Rezeptoren bindet und somit den Eintritt des HI-Virus verhindert

Zellkern

**Hemmung der Integrase** z. B. Raltegravir verhindert die Integration ins Wirtsgenom

**Hemmung der enzymatischen Aktivität der Protease**

Peptid-ähnliche Struktur, die der Erkennungssequenz der Protease sehr ähnlich ist, kompetitive Hemmung z. B. Saquinavir.

**Hemmung der reversen Transkrition durch Nukleotid-Analoga**

Veränderte Nukleotide werden von der reversen Transkriptase eingebaut, dadurch die weitere Synthese gestoppt, da die Bindungstelle fehlt z. B. Abacavir.

**Aktuelles Forschungswissen:** Warum gibt es noch keinen HIV-Impfstoff?

**Aufgabe:** Recherchieren Sie im Internet nach dem aktuellen Stand der Forschung zu einem HIV-Impfstoff und erklären Sie, weshalb die Entwicklung so schwierig ist.

***WICHTIG für naturwissenschaftliche Erkenntnisgewinnung:*** Geben Sie Ihre naturwissenschaftlich vertrauenswürdigen Informationsquellen an.

AIDS ist nicht heilbar aber kein Todesurteil mehr.

**Arbeitsauftrag:** Stellen Sie Hypothesen auf, wodurch eine Virenvermehrung unterbrochen werden kann, und zeichnen Sie die Ansatzstellen in der Abbildung ein.

**Lösung:**

**Aktuelles Forschungswissen:** Warum gibt es noch keinen HIV-Impfstoff?

**Aufgabe:** Recherchieren Sie im Internet nach dem aktuellen Stand der Forschung zu einem HIV-Impfstoff und erklären Sie, weshalb die Entwicklung so schwierig ist.

***WICHTIG für naturwissenschaftliche Erkenntnisgewinnung:*** Geben Sie Ihre naturwissenschaftlich vertrauenswürdigen Informationsquellen an.

„Die Suche nach einem HIV-Impfstoff hat einen schweren Rückschlag erlitten. Die groß angelegte Studie HVTN 702 wurde abgebrochen, da kein Erfolg zu verzeichnen war. 129 HIV-Infektionen in der Impfgruppe, 120 bei den Placebo-Empfänger\_innen“

„Die Entwicklung einer HIV-Vakzine ist aus zwei Gründen so schwierig: Erstens ist das Virus hoch variabel, und zweitens merzt die natürliche Immunantwort das HI-Virus nicht aus, wie bei den meisten akuten viralen Infektionen.“

HIV zeigt eine extrem hohe Mutationsrate, sodass bei jeder Virusvermehrung im Patienten neue Virusvarianten entstehen, die unterschiedliche Epitope auf der Oberfläche tragen. Es gibt also nicht nur den einen Virustyp, der für einen Impfstoff verwendet werden könnte, sondern es gibt weltweit unzählige Virusvarianten.