

# Immunofluoreszenz von onkogenen Viren

Autor(en): **Löffler, Hans**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **20 (1964)**

PDF erstellt am: **15.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307556>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Hygiene-Institut der Universität Basel, Direktor: Prof. J. Tomcsik

## **Immunofluoreszenz von onkogenen Viren**

*Von Hans Löffler*

Die Coonssche Methode der fluoreszierenden Antikörper ermöglicht die intracelluläre Lokalisation von Virusantigenen. Es spielt dabei keine Rolle, ob der Vermehrungszyklus des Virus in der Bildung infektiöser Partikel endet oder nicht; auch sogenanntes inkomplettes Virus läßt sich mit fluoreszierenden Antikörpern nachweisen (*Löffler, Henle und Henle; Löffler*). Die Grenze der Methode ist vielmehr dadurch bestimmt, daß Virusbausteine, welche keinen Proteinanteil besitzen und somit nicht als Antigen wirken, nicht erfaßt werden; dies gilt für Nucleinsäuren, und zwar auch dann, wenn sie infektiös sind.

In der *Zellkultur* ließ sich die Entwicklung mehrerer onkogener Virusarten mittels fluoreszierender Antikörper verfolgen. Eingehend untersucht ist das Verhalten von *Rous-Sarkomvirus*. In den Beobachtungen an infizierten Hühnerfibroblastenkulturen wurde von *Noyes* das Virus vom 2. Tag post infectionem an bemerkt, und zwar in Form von im Cytoplasma verteilten leuchtenden Punkten, die etwa vom 4. Tag an konfluieren. *Vogt* und *Rubin* (1961) beschrieben die kurz nach der Infektion auftretende Anhäufung von Virusantigen im Bereich der Zellperipherie, wobei es noch weiterer Abklärung bedarf, wie der auffallende zeitliche Ablauf der Erscheinungen zu deuten ist, d. h. das Auftreten der Fluoreszenz zuerst an der Peripherie und erst nachher in den tiefer gelegenen Teilen des Cytoplasmas. Die Autoren vermuten, daß beim Austritt von Virusmaterial die Zellmembran derart verändert wird, daß die Zelle nicht mehr auf die Berührung mit anderen Zellen und eine dadurch ausgelöste Hemmung ihrer Vermehrungstendenz ansprechen kann, mit anderen Worten, daß die infizierte Zelle ihre Sensibilität gegen Kontaktinhibition verliert (*Abercrombie* und *Ambrose*). Dies ist vielleicht die Vorbedingung der ungeordneten Vermehrung bzw. der malignen Transformation von Zellen, wie sie zum erstenmal von *Halberstaedter* u. a. beschrieben wurde. Das bemerkenswerteste Charakteristikum dieser in

in vitro umgewandelten Zellen besteht in ihrer Fähigkeit, bei Transplantation auf homologe Tiere Tumoren zu erzeugen (*Vogt* und *Dulbecco*).

Ähnliche Bilder wie das Rous-Sarkomvirus (RSV) ergeben das mit ihm häufig zusammen vorkommende Rous-assoziierte Virus (RAV) von *Rubin* und *Vogt* (1961), ein aviäres Leukosevirus, dessen nähere Beziehung zum Rous-Sarkom noch weiterer Abklärung bedarf (*Rubin* und *Hanafusa*), sowie das ebenfalls von *Vogt* und *Rubin* (1963) untersuchte aviäre Myeloblastosevirus (AMV) und schließlich das von *Ichakawa* und *Notake* untersuchte SL-Leukämievirus der Maus.

Im Gegensatz zu den erwähnten RNS-Viren (RSV, RAV, AMV, SL) steht das erstmals von *Henle*, *Deinhardt* und *Rodriguez*, später auch von *Sachs*, u. a. und von *Williams* u. a. mit fluoreszierenden Antikörpern dargestellte, DNS enthaltende Polyomavirus. Dieses leuchtet in Mäusefibroblasten zuerst in den scharf begrenzten Zellkernen auf; später wird es auch im Cytoplasma sichtbar, während gleichzeitig an den Zellen Degenerationserscheinungen auftreten.

Das ebenfalls onkogene, zu den DNS-Viren zu zählende SV 40 (*Eddy* u. a.) zeigt in Nierenzellkulturen von Rhesusaffen eine auf die Zellkerne beschränkte Fluoreszenz (*Shein* und *Levinthal*). Die seit langem bekannte und hinsichtlich ihrer Pathogenität für den Menschen als relativ harmlos angesehene Gruppe der DNS-haltigen Adenoviren kann unter bestimmten Versuchsbedingungen auch bösartige Tumoren erzeugen. *Trentin* u. a. (1962) haben durch intrapulmonale Injektion des Typus 12 in neugeborenen Hamstern Sarkome hervorgerufen, an welchen die Tiere innert 1 bis 3 Monaten starben; *Hilleman* fügte der Liste noch den Typus 18 des Adenovirus hinzu. Die Immunfluoreszenz von Adenovirus wurde 1959 von *Pereira* und von *Boyer* u. a. studiert. Die in den Kernen der HeLa-Zellen aufleuchtenden Massen entsprechen den mit anderen mikroskopischen Methoden erkennbaren kristallartigen, aus Virusteilchen bestehenden Strukturen.

Neben der cytologischen Lokalisation ist mit der *Coonsschen* Methode auch die *histologische* Lokalisation von Virusantigen im Versuchstier möglich. Die Untersuchung von Rous-Sarkomschnitten (*Malmgren* u. a., *Mellors* u. a.) zeigte, daß die Zahl der mit fluoreszierenden Einschlüssen versehenen Zellen in direkter Abhängigkeit von der Menge des injizierten Virus stand, daß sich aber fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Tumorzellen morphologisch anderweitig nicht unterschieden.

Überraschende Resultate ergaben sich jedoch mit einem DNS-Virus dem *Shope*-Papillomvirus des wilden Kaninchens. *Noyes* und *Mellors* fanden bei der Untersuchung von Schnitten durch Papillome eine virus-

spezifische Fluoreszenz in den Zellkernen der Keratohyalinschichten, seltener in den oberflächlich gelegenen, vollständig verhornten Schichten, keine aber in den tiefer gelegenen proliferierenden Zellschichten. Im Bereich dieser letzteren – so nehmen die Autoren an – befinde sich das Virus erst in Form der Nucleinsäure, welche dann in den mehr peripher gelegenen Schichten durch die Proteinkomponente ergänzt würde. Im gleichen Sinn kann die relativ hohe Ausbeute an onkogener DNS interpretiert werden, die *Ito* aus virusarmen Tumoren extrahieren konnte.

Noch merkwürdigere Diskrepanzen zwischen der Lokalisation des Virusantigens und des neoplastischen Gewebes ergaben sich mit Polyomavirus. *Levinthal*, *Jakobovits* und *Eaton* untersuchten Vorkommen und Verteilung des Virus in der Maus *in situ*. Bei verschiedenen Drüsentumoren erschien das fluoreszierende Virus in den deutlich geschädigten Epithelien der Ausführungsgänge, nicht aber in den soliden, stark wuchernden Geschwulstpartien. Dies ist eine eindruckliche Bestätigung von Befunden, die früher von *McCulloch* u. a. und von *Leuchtenberger* u. a. mit anderen Mitteln, so der klassischen Histologie und der Infektiositätsprüfung, bzw. der quantitativen DNS-Bestimmung, erhoben worden waren.

Wenn auch die von einem Zelluntergang begleitete Virusvermehrung im allgemeinen früher auftritt als die ohne Virusvermehrung fortschreitende überbordende Zellvermehrung, ist nicht geklärt, ob die erste Erscheinung Vorbedingung der zweiten ist, oder ob es sich um zwei voneinander unabhängige Folgen einer Virusinfektion handelt. Die beiden, sich offensichtlich ausschließenden Phänomene stehen nach *Leuchtenberger* und *Leuchtenberger* in einem Kausalzusammenhang, weil das primär infizierende Polyomavirus anders aussehende Zelleinschlüsse erzeugen soll als die sekundär zelltransformierende Virusgeneration.

Diese Deutung gilt allerdings nur für die primär im Kern sichtbaren DNS-Viren, nicht aber für die extranucleär lokalisierten RNS-Viren, wo die «malignen» und die virusproduzierenden Zellen mindestens teilweise identisch sind (*Iwakata*; *Vogt* und *Rubin* 1963). Daß man aber auch in Frühstadien der Polyomainfektion im gleichen Tier beide Phänomene beobachten kann – allerdings in verschiedenen Zellen – weist darauf hin, daß kein prinzipieller Unterschied zwischen «infektiös-nekrotisierenden» und «onkogenen» Viren zu bestehen scheint. In diesem Sinne muß wohl auch die Beobachtung interpretiert werden, daß sich Polyomavirus in Kulturen von Mäusefibroblasten stark vermehrt und vorwiegend einen cytopathischen Effekt ergibt (*Stewart*, *Eddy* u. a.), in Kulturen von Hamsterfibroblasten dagegen eine geringe Vermehrung und keine Zell-

zerstörung, in einigen Zellen jedoch eine sogenannte maligne Transformation (*Vogt und Dulbecco*) bewirkt.

In derart transformierten Zellen ließ sich tatsächlich bis jetzt kein Virus nachweisen, weder direkt als antigenes, fluoreszierendes Vollvirus (*Fraser und Charpure*), noch indirekt durch den Nachweis einer Resistenz gegen Superinfektionen mit Polyomavirus, ein Phänomen, das von den lysogenen Bakterien her bekannt ist. In den durch SV 40 bzw. Adenovirus hervorgerufenen Hamstertumoren ist die Lokalisation von allfällig vorhandenem Virus bis heute nicht ermittelt worden (*Gerber; Trentin 1963*).

### *Zusammenfassung*

Zusammenfassend können wir sagen, daß sich die Methode der fluoreszierenden Antikörper für den Virusnachweis eignet, ganz unabhängig davon, ob die betreffende Virusart onkogene Fähigkeiten besitzt oder nicht. Zum Gelingen der Methode bedarf es aber des Vorhandenseins von proteinhaltigem Virusmaterial – eine Voraussetzung, die in vitro, d. h. in der virusinfizierten Zellkultur häufig vorhanden, in vivo, d. h. in ausgebildeten Tumoren in der Regel aber nicht erfüllt sein dürfte. Im Gegensatz zu Infektionen mit RNS-Viren, wo infizierte Zellen durch den Virusaustritt möglicherweise enthemmt werden, scheint bei den DNS-Viren ein weitgehender gegenseitiger Ausschluß von Virusproduktion und maligner Zellwucherung zu bestehen. Dies ist vielleicht die Erklärung für die vielen erfolglosen Versuche, Viren in den kaum im Frühstadium erfaßbaren menschlichen Tumoren nachzuweisen.

### *Résumé*

La localisation intracellulaire de virus peut se faire par la méthode d'immunofluorescence, pourvu que la matière virale soit antigénique, c'est-à-dire de nature protéinique. Cette condition est souvent remplie dans des cultures cellulaires infectées par des virus oncogéniques, mais beaucoup moins souvent dans les tumeurs observées in vivo.

Dans les tumeurs provoquées par des virus contenant l'acide désoxyribonucléique (polyoma, SV 40, adénovirus), il existe apparemment une exclusion mutuelle de multiplication du virus et de prolifération des cellules tumorales. Les virus, contenant l'acide ribonucléique, se multiplient dans les cellules formant les néoplasies (sarcome de Rous, leucoses aviaires).

### *Riassunto*

La localizzazione intracellulare di virus può'essere ottenuta col metodo di immunofluorescenza, ammesso che la materia virale sia anti-

genica, vale a dire di natura proteica. Questa condizione è realizzata sovente nelle colture cellulari infettate da virus oncogenici, raramente invece nei tumori cresciuti in vivo. Nei tumori provocati da virus contenenti l'acido desossiribonucleico (polyoma, SV 40, adenovirus) sembra esistere una mutua esclusione tra la moltiplicazione del virus e la proliferazione delle cellule tumorali, mentre che i virus contenenti l'acido ribonucleico, si moltiplicano nelle cellule formanti i neoplasmi (sarcoma di Rous, leucosi aviarie).

### Summary

Oncogenic and non-oncogenic viruses can be traced in infected cells by the fluorescent antibody technique. The method works, as long as the virus material is antigenic, i.e. of protein nature. This condition is often fulfilled in virus infected cell culture systems, but rather seldom in vivo. In tumors due to DNA-viruses (polyoma, SV 40, adenovirus) there seems to be a mutual exclusion of virus producing and of proliferating cells. In RNA-virus tumors (Rous sarcoma, Leucosis group of birds) this difference of cell behaviour can not be seen.

*Abercrombie M. und Ambrose J. E.:* Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Exp. Cell Res.* **15**, 333-345 (1958).

*Boyer G. S., Denny F. W. jr. und Ginsberg H. S.:* Intracellular localization of type 4 adenovirus. II. Cytological and fluorescein-labelled antibody studies. *J. exp. Med.* **109**, 85-95 (1959).

*Eddy B. E., Borman G. S., Grubbs G. E. und Young R. D.:* Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40. *Virology* **17**, 65-75 (1962).

*Fraser K. B. und Gharpure M.:* Immunofluorescent tracing of polyoma virus in transformation experiments with BHK 21 cells. *Virology* **18**, 505-507 (1962).

*Gerber P.:* Studies on a persistently «masked» viral infection in cells of SV 40-induced ependymomas. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **4**, 22 (1963)

*Halberstaedter L., Doljansky L. und Tenenbaum E.:* Experiments of the cancerization of cells in vitro by means of Rous sarcoma agent. *Brit. J. exp. Pathol.* **22**, 179-187 (1941).

*Henle G., Deinhardt F. und Rodriguez J.:* The development of polyoma virus in mouse embryo cells as revealed by fluorescent antibody staining. *Virology* **8**, 388-391 (1959).

*Hilleman M. R.:* 17th annual symposium on fundamental cancer research; Houston, Texas, Febr. 1963: Viruses, nucleic acids and cancer: «Never» and «older» viruses in mammalian malignancy.

*Ichakawa Y. und Notake K.:* Studies on the intracellular location of SL leukemia virus antigen by fluorescent antibody. *Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ.* **5**, 103-117 (1962).

*Ito Y.:* Relationship of components of papilloma virus to papilloma and carcinoma cells. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **27**, 387-394 (1962).

*Iwakata S.:* Demonstration of intracellular localization of chicken erythroblastosis virus antigen using fluorescent antibody method. *Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ.* **4**, 24-36 (1961).

- Leuchtenberger C. und Leuchtenberger R.*: Internat. Rev. of Cytology **14**, 281–326 (1963).  
Cytological and cytochemical effects of agents implicated in various pathological conditions: The effect of viruses and cigarette smoke on the cell and its nucleic acids.
- Leuchtenberger R., Leuchtenberger C., Stewart S. E. und Eddy B. E.*: Cancer **14**, 567–576 (1961).
- Levinthal J. D., Jakobovits M. und Eaton M. D.*: Polyoma disease and tumors in mice: The distribution of viral antigen detected by immunofluorescence. Virology **16**, 314–319 (1962).
- Löffler H.*: Die Gruppe der Myxoviren. Ihre Untersuchung mittels fluoreszierender Antikörper. Ergebn. Mikrobiol., Immunitätsforsch. und exp. Therapie **35**, 240–264 (1962).
- Löffler H., Henle G. und Henle W.*: Attempts to influence the incomplete reproductive cycle of influenza virus in HeLa cells by antibodies. J. Immunol. **88**, 763–776 (1962).
- Malmgren R. A., Fink M. A. und Mills W.*: Demonstration of the intracellular location of Rous sarcoma virus antigen by fluorescein-labeled antisera. J. nat. Cancer Inst. **24**, 995–999 (1960).
- Malmgren R. A., Rabotte G. und Robson A. S.*: Intracellular localization of polyoma virus antigen demonstrated with fluorescein-labeled antiserum. J. nat. Cancer Inst. **24**, 581–587 (1960).
- McCulloch E. A., Siminovitch L., Ham A. W., Axelrad A. A. und Howatson A. F.*: Carcinogenesis in vivo by polyoma virus. Canad. Cancer Conf. **4**, 253–270 (1961).
- Mellors R. C. und Munroe J. A.*: Cellular localization of Rous sarcoma virus as studied with fluorescent antibody. J. exp. Med. **112**, 963–974 (1960).
- Noyes W. F.*: Development of Rous sarcoma virus antigens in cultured chick embryo cells. Virology **12**, 488–492 (1960).
- Noyes W. F. und Mellors R. C.*: Fluorescent antibody detection of the Shope papilloma virus in papillomas of the wild and domestic rabbit. J. exp. Med. **106**, 555–562 (1957).
- Pereira H. G., Allison A. L. und Balfour B.*: Multiplication of adenovirus Type 5 studied by infectivity titrations and the fluorescent antibody technique. Virology **7**, 300–314 (1959).
- Rubin H. und Hanafusa H.*: 17th annual Symposium on fundamental cancer research; Houston, Texas, Febr. 1963: Viruses, nucleic acids and cancer: The failure to isolate virus from virus-induced tumors.
- Rubin H. und Vogt P. K.*: An avian leukosis virus with stocks of Rous sarcoma virus. Virology **17**, 184–194 (1962).
- Sachs L. und Fogel M.*: Polyoma virus synthesis in tumor cells as measured by the fluorescent antibody technique. Virology **11**, 722–736 (1960).
- Shein H. M. und Levinthal J. D.*: Fluorescent antibody and complement fixation tests for detection of SV 40 virus in cell cultures. Virology **17**, 595–597 (1962).
- Stewart S. E., Eddy B. E., Gochenour A. U., Borgese N. G. und Grubbs G. E.*: The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. Virology **3**, 380–400 (1957).
- Trentin J. J., Yabe Y. und Taylor H. G.*: The quest for human cancer viruses. Science **137**, 835–841 (1962).
- Trentin J. J., Yabe Y. und Taylor H. G.*: Failure to detect virus in hamster tumors induced by human adenovirus type 12. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **4**, 68 (1963).
- Vogt M. und Dulbecco R.*: Virus-cell interaction with a tumor-producing virus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **46**, 365–370 (1960).
- Vogt P. K. und Rubin H.*: Localization of infectious virus and viral antigen in chick fibroblasts during successive stages of infections with Rous sarcoma virus. Virology **13**, 528–544 (1961).
- Vogt P. K. und Rubin H.*: Studies on the assay and multiplication of avian myeloblastosis virus. Virology **19**, 92–104 (1963).
- Williams M. G. und Sheinin R.*: Cytological studies of mouse embryo cells infected with polyoma virus, using acridine orange and fluorescent antibody. Virology **13**, 368–370 (1961).