

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, virale Antigene mit Hilfe der Protein A-Gold-Technik unter Verwendung poly- und monoklonaler Antikörper immunelektronenmikroskopisch nachzuweisen.

Die Protein A-Gold-Technik wurde an in Lowicryl K4M eingebetteten Sindbisvirus-infizierten BHK 21-Zellen etabliert. Die Entwicklung der Methode erforderte zahlreiche Vorversuche. Zunächst mußte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an konventionell eingebetteten Zellen der optimale Zeitpunkt für die Zellernte ermittelt werden. Der Zeitraum zwischen sechs und neun Stunden post infectionem erwies sich aufgrund der in dieser Zeitspanne maximal von den Zellmembranen "buddenden" Virionen sowie der noch nicht erheblich ausgeprägten zytopathischen Effekte als für die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen geeignet. Die Lowicryl K4M-Einbettung, in Verbindung mit einer nur schwachen Fixierung der Zellen, wurde aufgrund ihrer antigenschonenden Eigenschaften gewählt. Nachdem mit dem Hyperimmunserum eine positive Markierung erreicht worden war, wurden fünf gegen das Kapsidprotein gerichtete und drei gegen das Hüllglykoprotein E1 des Sindbisvirus gerichtete monoklonale Antikörper hinsichtlich ihrer individuellen Verwendbarkeit für den Sindbisvirusnachweis ausgetestet. Dazu mußte die optimale Antikörperverdünnung, die eine spezifische Markierung bei wenig Hintergrundmarkierung ergibt, für jeden Antikörper empirisch ermittelt werden. Weiterhin war die günstigste Inkubationszeit sowohl für die Antikörper als auch für den Protein A-Gold-Komplex zu bestimmen. Gegenüber dem mit allen Strukturproteinen des Sindbisvirus reaktiven Hyperimmunserum erlauben die monoklonalen Antikörper eine sichere Aussage über die Natur der nachgewiesenen Antigene.

Nur mit den gegen das virale Kapsidprotein gerichteten monoklonalen Antikörpern C12 und C16 wurde neben dem Hyperimmunserum eine positive Reaktion am Lowicryl K4M-Ultradünn-

schnitt erzielt. Um festzustellen, ob die Art der Einbettung negative Auswirkungen auf die Antigene verübt hatte, wurde die Methode auch an Kryoultradünnschnitten desselben Materials angewendet.

Die viralen Antigene konnten hierbei außer mit den am Lowicryl K4M-Material positiv reagierenden Antikörpern mit zwei weiteren gegen das Kapsidprotein gerichteten monoklonalen Antikörpern sowie auch mit zwei Hüllprotein E1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Lediglich ein einziger Kapsidprotein-spezifischer monoklonaler Antikörper und ein gegen das virale Hüllprotein E1 gerichteter Antikörper reagierten nicht.

Im nativen Virion liegen die Glykoproteine E1 und E2 in komplexer Quartärstruktur vor. Je ein Molekül E1 und E2 bilden ein Heterodimer, je drei dieser Heterodimere wiederum bilden einen auf dem Virion exponierten Spikekomplex. Diese Quartärstruktur unterliegt bei der Lowicryl K4M-Einbettung scheinbar konformationellen Änderungen im Sinne einer Denaturierung oder wird maskiert, so daß sie für die Antikörper nicht erkennbar bzw. zugänglich ist.

Bei der Kryoultramikrotomie fallen Einbettungs-bedingte Effekte weg, weshalb mit zwei der drei zur Verfügung stehenden E1-spezifischen monoklonalen Antikörper eine Markierung der entsprechenden Antigene gelang. Der Antikörper C8 weist eine geringere Affinität zum Antigen auf als der Antikörper C3, was sich in der Intensität der erzielten Markierung widerspiegelt. Die Affinität des Antikörpers C65 scheint zu gering zu sein, um mit diesem einen immunelektronenmikroskopischen Antigen-Nachweis erbringen zu können. Eine zu geringe Affinität scheint auch im Falle des am Kryoultradünnschnitt nicht reaktiven gegen das Kapsidprotein gerichteten Antikörpers C63 verantwortlich zu sein.

Die Bedeutung der erzielten Ergebnisse wird ausführlich diskutiert.

Stehen Antikörper hoher Avidität zur Verfügung, stellt die Protein A-Gold-Technik ein wertvolles diagnostisches Verfahren zum immunelektronenmikroskopischen Nachweis viraler Antigene in Lowicryl K4M-eingebettetem und noch sensitiver in Kryomaterial dar.

Aufgrund der bestehenden Kreuzreaktivität innerhalb des Genus Alphavirus ist zu erwarten, daß mit den in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzten Antikörpern neben dem Sindbisvirus auch andere Alphaviren immunelektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können.

Anneli Booke: Immunoelectron microscopic detection of viral antigens by means of a polyclonal antiserum and monoclonal antibodies.

6. Summary

The objective of this thesis was to establish the gold-labelled protein A method for the immunoelectron microscopic detection of viral antigens using a polyclonal antiserum and monoclonal antibodies. The gold-labelled protein A method was established using low temperature embedded Sindbis Virus-infected BHK-21 cells.

Cells harvested between six and nine hours post infection proved to be optimal for the investigations since they produced a maximum amount of virions and did not show signs of severe cytopathic changes. Low temperature embedding in Lowicryl K4M combined with only mild fixation of the cells was chosen to retain a maximum of antigenicity. After the antiserum had given a positive labelling of viral antigens, five monoclonal antibodies directed against the viral capsid protein and three monoclonal antibodies reacting with the viral envelope glycoprotein E1, were tested.

The optimal dilution to produce a sensitive specific labelling with low background values had to be estimated for each of the antibody preparations as well as the optimal incubation period for antibodies and gold-protein A conjugates.

Since only the antiserum and the anti-capsid monoclonal antibodies C12 and C16 gave a positive labelling an attempt was made to rule out negative effects of the embedding process on antigenicity. For this purpose the gold-labelled protein A method was applied to ultrathin frozen sections. It has been suggested that the preparation of cryosections for immunolabelling yields optimum preservation of antigenic determinants since the initial aldehyde fixation is the only potential denaturing step.

Using frozen sections, the same antibodies reacted which had given a positive result on Lowicryl K4M embedded thin sections and furthermore two more of the anti-capsid antibodies and two of the E1-specific antibodies.

From these results it was concluded that the Lowicryl K4M low temperature embedding performed still had some negative effects on viral antigenicity. Regarding the negative results still achieved with two antibodies in cryoultramicrotomy, the avidity of the antibodies used seems to be the critical factor, since no labelling will result when an antibody's avidity for the target antigen is too low to permit an antigen-antibody reaction to take place.

Provided antibodies of high affinity are available, the gold-labelled protein A method is a valuable diagnostic tool for the immunoelectron microscopic detection of antigens in virus-infected cells either embedded in Lowicryl K4M or, even more sensitive, frozen and subsequently sectioned.

Since the antibodies used were previously shown to cross-react to variable degrees with most alphaviruses, it can be expected that the antibodies successfully used in this thesis may serve to immunoelectron microscopically detect alphaviruses other than Sindbis Virus.