Abb. 4. Die Mutarotation von α -Glucose.

die aus Messungen im Bereich einer Wasserstoffionen-konzentration von 0,001—0,1 val/l abgeleitet wurde, er-

gibt sich aus dem gemessenen k eine Wasserstoffionen-konzentration von 1,68 val/l, die in Anbetracht der bei höheren Konzentrationen zu erwartenden Abweichungen mit der tatsächlich verwendeten 2-n. Salzsäure vereinbar ist.

Diese wenigen Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß mit dem neuen Gerät Untersuchungen durchgeführt werden können, die bisher nicht oder nur mit Schwierigkeiten in Angriff genommen werden konnten. Weitere Arbeiten unter Verwendung der beschriebenen Methode sollen in späteren Veröffentlichungen mitgeteilt werden.

Herrn Chemotechniker Günther Franck danken wir für seine Mithilfe bei den Messungen, Herrn Mechanikermeister W. Schulz für seine Mitwirkung bei der Planung und für den Bau des Gerätes.

Eigenschaften tierischer Virusarten untersucht an den Geflügelpestviren als Modell

II. Mitteilung: Serologische Untersuchungen über die Geflügelpestviren und über ihre Beziehungen zu einem normalen Wirtsprotein

VON KLAUS MUNK und WERNER SCHÄFER

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforsch. **6b**, 372—379 [1951]; eingegangen am 25. Juli 1951)

Hochgradig gereinigte Viruskonzentrate der atypischen und klassischen Geflügelpest aus infektiöser Eiflüssigkeit wurden mit Antiseren von Kaninchen im quantitativen Präzipitationstest untersucht. Dabei waren mit virusspezifischen Antiseren keine serologischen Beziehungen zwischen den beiden Erregern festzustellen. Die Konzentrate beider Viren enthielten aber einen hohen Prozentsatz (atypische Geflügelpest $\sim 40\%$) eines Antigens, das auch in normaler Eiflüssigkeit gefunden wird. Diese „normale Komponente“ ließ sich mit physikochemischen und biologischen Methoden nicht von den Viruspartikeln abtrennen. Sie muß in irgendeiner Form an die Virusteilchen gebunden sein. Die Virusteilchen sind also Träger von virusspezifischem und Wirts-Antigen.

Das atypische (Newcastle disease) und klassische (fowl plague) Geflügelpestvirus lassen sich aus infektiöser Eiflüssigkeit (Amnion- + Allantoisflüssigkeit) durch fraktionierte Ultrazentrifugation in hochgradig gereinigter Form gewinnen^{1,2}. Die beiden Viren unterscheiden sich sowohl in ihrer Sedimentationskonstanten wie auch in ihrem elektronenoptischen und biologischen Verhalten.

Serologisch wurden sie bisher im qualitativen Präzipitations-Schichtenversuch und in der Komplement-

bindung geprüft¹⁻⁴. Durch keine der beiden Methoden konnten bei Verwendung von Seren, die frei von Antikörpern gegen normales Eiflüssigkeits-Protein waren, verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den beiden Viren festgestellt werden.

Aus dem physiko-chemischen, biologischen und serologischen Verhalten war geschlossen worden⁵, daß die beiden Erreger als zwei vollständig verschiedene Virusarten anzusehen sind. Da diesem Ergebnis eine besondere Bedeutung für die Epidemiologie und Bekämpfung der beiden Seuchen zukommt, suchten

¹ W. Schäfer, G. Schramm u. E. Traub, Z. Naturforsch. **4b**, 157 [1949].

² W. Schäfer u. G. Schramm, Z. Naturforsch. **5b**, 91 [1950].

³ Z. Dinter, Arch. Virusforsch. **3**, 207 [1944].

⁴ W. Schäfer, Z. Naturforsch. **6b**, 207 [1951].

⁵ W. Schäfer, Tierärztl. Umschau **1950**, 241.

wir es durch weitere serologische Untersuchungen mit dem quantitativen Präzipitationstest⁶ zu erhärten. Über diese Untersuchungen wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

Gleichzeitig wurden mit derselben immunchemischen Methode die gereinigten Viruskonzentrate auf ihren Gehalt an normalem, aus dem Wirtsorganismus stammenden Protein geprüft.

Ein normales Protein der Eiflüssigkeit, die sog. „normale Komponente“, konnte von Knight^{7,8} beim Influenzavirus auch in elektrophoretisch einheitlich erscheinenden Viruskonzentraten aus infektiöser Eiflüssigkeit nachgewiesen werden. Wurde das Virus aus infizierter Mäuselunge gewonnen, so war auch hier ein Protein festzustellen, das in normalem Lungengewebe vorhanden war. Eine Abtrennung dieser „normalen Komponenten“ von den eigentlichen Viruspartikeln gelang nicht. Bei Behandlung der Influenza-Viruskonzentrate mit Antiserum gegen „normale Komponente“ wurden vielmehr etwa 96% der Infektionsaktivität der Viruslösungen mit ausgefällt. Knight schloß aus diesen Befunden, daß der größte Teil der „normalen Komponente“ an das Virus gebunden ist. Sie macht etwa 20—30% der reinsten Viruspräparate aus. Cohen⁹ fand in seinen Influenza-Viruspräparaten 27—57% eines in der normalen Chorioallantois des Hühnerembryos enthaltenen Antigens. Normales Wirtsprotein konnten auch Engel und Randall¹⁰ in ihren Konzentraten des Pferdeenzephalitis-Virus aus infizierten Hühnerembryonen nachweisen. Ihre Präparate enthielten ungefähr 56—77% Normalprotein. Von Kabat und Furth¹¹ wurden antigene Bestandteile normalen Wirtsproteins in Konzentraten des Rous-Sarkom-Virus gefunden.

Die Bedeutung der normalen Wirtsproteine für die Viren ist noch nicht geklärt. Sie können entweder Verunreinigungen sein, die an die Oberfläche der Erreger adsorbiert sind, oder obligate Bestandteile der biologisch aktiven Einheiten, die in die Virussynthese mit einbezogen werden. Gegen die letztgenannte Annahme sprechen allerdings die Befunde bei Bakteriophagen¹² und Pflanzenviren¹³. Hier wurden biologisch aktive Viruslösungen gewonnen, die frei von normalem Wirtsprotein waren.

⁶ M. Heidelberger, Bacteriol. Rev. 3, 49 [1939].

⁷ C. A. Knight, J. exp. Med. 80, 83 [1944].

⁸ C. A. Knight, J. exp. Med. 83, 281 [1946].

⁹ S. S. Cohen, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 358 [1944].

¹⁰ L. L. Engel u. R. Randall, J. Immunology 55, 331 [1947].

In den gereinigten Konzentraten der Geflügelpestviren konnte bislang keine „normale Komponente“ mit dem Präzipitations-Schichtenversuch nachgewiesen werden^{1,2}. Wahrscheinlich waren die negativen Ergebnisse auf einen zu geringen Antikörpergehalt der verwandten Seren zurückzuführen. Die Antiseren waren durch Immunisierung von Kaninchen mit normaler Eiflüssigkeit gewonnen worden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden dagegen Seren von Kaninchen benutzt, die mit hochgradig konzentrierten Präparaten der „normalen Komponente“ aus Eiflüssigkeit geimpft wurden. Mit Hilfe dieser höherwertigen Antiseren gelang auch bei den Geflügelpest-Viruskonzentraten der Nachweis des normalen Proteins, das nach unseren Untersuchungsergebnissen ähnlich wie bei Influenza in irgendeiner Form an die Viruspartikel gebunden sein muß.

Material und Methoden

A. Virusstämme

Unsere Untersuchungen wurden mit dem atypischen Geflügelpeststamm „Italien“ (19. bis 29. Hühnerembryo-Passage) und dem klassischen Geflügelpeststamm „Rostock“ (17. bis 27. Hühnerembryo-Passage) durchgeführt. Die atypische Geflügelpest wird im folgenden kurz als A.P., die klassische als K.P. bezeichnet.

B. Viruskonzentrate

Die Viruskonzentrate gewannen wir in der früher beschriebenen Weise^{1,2} aus infektiöser Eiflüssigkeit; die A.P.-Präparate wurden jedoch statt bisher 1- jetzt 2-mal durch Ausschleudern in der präparativen Ultrazentrifuge gewaschen. Die elektrophoretischen Untersuchungen der Konzentrate führten wir in 0,5-proz. Kochsalzlösung, die durch Zusatz von $m/100$ -Phosphat gepuffert wurde, bei pH 7,2 in der Elektrophoreseapparatur nach Tiselius durch. Über die elektrophoretischen Versuche wird in einer anderen Arbeit eingehend berichtet.

C. Konzentrate von „normaler Komponente“ aus Eiflüssigkeit

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Konzentrate der „normalen Komponente“ (N.K.) benutzten wir die Eiflüssigkeit von 14 Tage lang bebrüteten Hühnereiern. Die N.K. wurde durch 1-stdg. Zentrifugieren bei 40000 g ausgeschleudert, in gepufferter 0,9-proz. NaCl-Lösung aufgenommen und danach durch 10 Min. langes Zentrifugieren bei 3000 U/Min. von nichtlöslichen Bestandteilen gereinigt. Derselbe Vorgang wurde anschließend wiederholt.

¹¹ E. A. Kabat u. J. Furth, J. exp. Med. 71, 55 [1940].

¹² S. S. Cohen u. R. Arbogast, J. exp. Med. 91, 607 [1950].

¹³ F. C. Bawden u. N. W. Pirie, Brit. J. exp. Pathol. 18, 275 [1937].

D. Präzipitierende Seren

Die Antiseren gegen die beiden Viren und die N.K. wurden von Kaninchen gewonnen. Das Immunisierungsmaterial (Virus- bzw. N.K.-Konzentrat) adsorbierten wir an frisch gefälltes Aluminiumhydroxyd. Von derartig behandelten Antigenen injizierten wir den Kaninchen an 16 bis 18 aufeinanderfolgenden Tagen insgesamt etwa 30 bis 40 mg Protein. Das Immunisierungsmaterial wurde nach einer subcutanen und einer intraperitonealen Injektion ausschließlich intravenös verimpft. 7 Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut aus der Ohrvene entnommen und das gewonnene Serum durch Filtration durch Berkefeld-N-Kerzen keimfrei gemacht. Einen Teil der Seren konservierten wir durch Zusatz von 0,5% Phenol. Sämtliche Seren wurden unmittelbar vor der Verwendung im Präzipitationstest durch $\frac{1}{2}$ -stdg. Zentrifugation bei 20 000 g gereinigt.

Nichtspezifische Antikörper des Forssmann-Typs haben nach den Untersuchungen von Knight⁷ keinen besonderen Einfluß auf die Präzipitationsreaktionen mit NK-Antiserum. Wir verzichteten deshalb darauf, diese Antikörper aus unseren Seren zu entfernen.

E. Präzipitationsreaktion

Die Präzipitationsreaktion wurde nach dem von Heidelberger⁶ angegebenen Verfahren durchgeführt. Die auszutestenden Antigenmengen wurden in 1 ccm gepufferter, 0,9-proz. NaCl-Lösung (p_H 7,2) aufgenommen und je 0,5 ccm Antiserum zugefügt. Nach kräftigem Schütteln blieben die mit diesen Gemischen gefüllten Präzipitationsröhrchen 48 Std. im Kühlschrank bei $+4^\circ C$. Darauf zentrifugierten wir das entstandene Präzipitat 5 Min. bei 2500 U/Min. ab und wuschen es 2—3-mal in je 2 ccm gekühlter, gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung. Die gewaschenen Präzipitate wurden in 1 ccm n -NaOH gelöst und der Stickstoffgehalt durch die Mikro-Kjeldahlmethode ermittelt.

Bei den Präzipitationsversuchen mit K.P. stellten wir fest, daß das Virus in den Ansätzen mit sämtlichen Seren ein geringes feinflockiges Sediment ergibt, das im Gegensatz zu den spezifischen Präzipitaten bei der Waschung mit Kochsalzlösung wieder in Lösung geht. Ähnliche Beobachtungen wurden von uns auch bei früheren serologischen Versuchen mit K.P.² und von anderen Autoren^{8,14} beim Influenzavirus gemacht. Es handelt sich um eine unspezifische Reaktion, die wahrscheinlich durch eine im Kaninchen Serum enthaltene Hämagglutinations-Inhibitor-Substanz hervorgerufen wird. Der Präzipitationstest wird durch diesen Effekt bei ordnungsgemäßer Durchführung der Präzipitatzuschwemmungen nicht wesentlich beeinflusst.

F. Hämagglutinations- und Infektiositätstest

Die Technik des Hämagglutinations-(H.A.) und Infektiositätstestes wurde in früheren Arbeiten angegeben^{1,2}. Bei den vorliegenden Untersuchungen verdünnten wir das Virusmaterial für die Infektiositätsteste nach Potenzen von 10 und setzten je Verdünnung 7—8 Eier ein. Die

¹⁴ F. Lanni u. J. W. Beard, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 68, 312 [1948].

50 % Endpunkte berechneten wir nach Reed und Muench¹⁵.

Ergebnisse

1. Serologische Differenzierung der A.P. und K.P.

Die für die Antiserum-Herstellung und die Präzipitationsversuche benutzten Viruskonzentrate der A.P. und K.P. wurden — wie unter „Material und Methoden“ angegeben — aus infektiöser Eiflüssigkeit gewonnen. Um bei der serologischen Differenzierung der beiden Viren virus-unspezifische Überkreuzreaktionen, die durch die N.K. der Eiflüssigkeit verursacht werden, auszuschließen, arbeiteten wir bei unseren

Abb. 1. Präzipitation des A.P.- und K.P.-Virus mit virus-spezifischen Antiseren. Antigene: $\circ$ = K.P.-Konzentrat, $\bullet$ = A.P.-Konzentrat, $\times$ = N.K.-Konzentrat. Seren: — = K.P.-Antiserum, ---- = A.P.-Antiserum.

Präzipitationsversuchen mit virusspezifischen Antiseren, die mit Konzentraten der N.K. abgesättigt waren.

In Abb. 1 ist das Ergebnis eines Präzipitationsversuches wiedergegeben, in dem wir die durch Ultrazentrifugation gereinigten Viruskonzentrate sowie als Kontrolle ein Konzentrat der N.K. als Antigene benutzten. Diese Antigene wurden mit den virus-spezifischen Antiseren und mit Kaninchen-Normalserum geprüft. Dabei stellten wir fest, daß die abgesättigten A.P.- und K.P.-spezifischen Seren keinerlei Antikörper gegen N.K. mehr enthalten. Sie präzipitieren in eindeutiger Weise nur die homologen Virusantigene. Da A.P.-Virus und K.P.-Antiserum keine Präzipitate ergeben, kann der geringe Anstieg des Präzipitat-N bei Verwendung von K.P.-Virus und A.P.-Antiserum vernachlässigt werden. Er ist wahrscheinlich auf die unspezifische Flockung des K.P.-

¹⁵ L. J. Reed u. H. Muench, Amer. J. Hyg. 27, 493 [1938].

Virus durch die Inhibitor-Substanz (s. oben) zurückzuführen.

Nach diesem Versuch sind auch durch den quantitativen Präzipitationstest keine charakteristischen Überkreuzreaktionen und damit keine serologischen Beziehungen zwischen A.P.- und K.P.-Virus zu ermitteln.

2. Virus und normale Komponente

a) Nachweis von N.K. in A.P.- und K.P.-Viruskonzentraten

Die durch fraktionierte Ultrazentrifugation gewonnenen Virusantigene der A.P. und K.P. sedimentier-

Abb. 2. Präzipitation der Virus- und N.K.-Konzentrate mit N.K.-Antiserum. Antigene: $\circ$ = K.P.-Konzentrat, $\bullet$ = A.P.-Konzentrat, $\times$ = N.K.-Konzentrat.

ten in der analytischen Ultrazentrifuge mit einem einzigen, allerdings schnell verflachenden Gradienten. In den Viruskonzentraten der A.P. war unter unseren Arbeitsbedingungen auch elektrophoretisch nur eine Komponente zu finden. Bei den K.P.-Viruspräparaten dagegen konnte elektrophoretisch — ähnlich wie bei dem Influenzavirus¹⁶ — neben dem eigentlichen Virusprotein ein schneller wanderndes Material festgestellt werden. Die beiden Substanzen wurden präparativ abgetrennt. Das elektrophoretisch gereinigte Virusprotein bezeichnen wir als K.P.-elektrophoretisch, das schneller wandernde Material als A/1.

In unserem ersten Versuch (Abb. 2) prüften wir Konzentrate des A.P.- und K.P.-Virus, die *nur durch*

¹⁶ G. L. Miller, M. A. Lauffer u. W. M. Stanley, J. exp. Med. 80, 553 [1944].

Virusfraktion	Präzipitation mit N.K.-Antiserum		Komplementb. γ N/+++++ Reakt.*	Hämagglutinat. γ N/posit. Reakt.
	mg Antigen-N	mg Präzipitat-N		
K.P. (Ausgangsmaterial)	0,02 0,045 0,07	0,026 0,054 0,078	0,8	0,015
K.P. (elektrophoretisch)	0,02 0,045 0,07	0,015 0,042 0,07	0,4	0,0045
A/1	0,02 0,045	0,034 0,066	> 0,8	0,036

*+++++; vollständige Hemmung der Hämolyse

Tab. 1. Präzipitation, Komplementbindung und Hämagglutination mit elektrophoretisch gereinigtem K.P.-Virus.

Ultrazentrifugation gereinigt waren, mit N.K.-Antiserum. Daneben wurde als Kontrolle auch ein Konzentrat der N.K. als Antigen verwandt. Es ergab sich, daß aus den Konzentraten beider Viren größere Präzipitaten durch das N.K.-Antiserum ausgefällt werden. Bei gleicher Antigen-N-Menge wurde jedoch mit N.K.-Antigen mehr Präzipitat-N gewonnen als mit den Virusantigenen. Ähnliche Verhältnisse fanden wir bei der Wiederholung des Präzipitationsversuches mit anderen Antigenaufarbeitungen und einem anderen N.K.-Antiserum.

In einem weiteren Versuch untersuchten wir das elektrophoretisch abgetrennte K.P.-Virus (K.P.-elektrophoretisch) und verglichen es mit dem nur durch fraktionierte Ultrazentrifugation gereinigten Ausgangsmaterial sowie mit der elektrophoretisch isolierten Fraktion A/1. Dabei wurden diese Präparate sowohl im Präzipitationstest wie auch in der Komplementbindung⁴ und H.A. geprüft. Die Ergebnisse zeigt Tab. 1.

Danach zeigte K.P.-elektrophoretisch, bezogen auf den Stickstoffgehalt, die höchste Wirksamkeit im H.A. (0,0045 γ N) und Komplementbindungstest (0,4 γ N). Von den beiden anderen Präparaten benötigt man für die Komplementbindung die doppelte (Ausgang) bzw. mehr als die doppelte (A/1) Antigen-N-Menge. Für die H.A. war die 3- bzw. 8-fache Menge erforderlich. Nach unseren früheren Versuchen benötigten wir im Durchschnitt 0,010 γ Virus-N für eine positive H.A.; K.P.-elektrophoretisch ist also gegenüber diesem Durchschnittswert 2-fach wirksamer. Es gehört nach seiner Hämagglutinationsaktivität zu unseren bisher reinsten K.P.-Viruskonzentraten. Elektronenoptisch besteht es aus den schon früher beschriebenen² kugeligen und ovoiden Virus-Teilchen.

Durch den Präzipitationstest konnten wir feststellen, daß auch dieses reinste Viruspräparat einen beachtlichen Prozentsatz eines N.K.-Antigens enthält. Denselben Befund erhoben wir bei einem in gleicher Weise aufgearbeiteten zweiten Präparat. Der Gehalt an N.K.-Antigen ist allerdings in dem elektrophoretisch gereinigten Viruspräparat geringer als in dem Ausgangsmaterial und der Fraktion A/1.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß ein N.K.-Antigen selbst in Viruspräparaten der A.P. und K.P. nachzuweisen ist, die in der analytischen Ultrazentrifuge sowie in der Elektrophorese einheitlich erscheinen.

b) Beziehungen zwischen Virus und N.K.

Das nachgewiesene normale Protein kann in den Viruskonzentraten entweder in freier Form oder aber in einem Komplex mit den Virusteilchen vorliegen.

Gegen die erste Annahme spricht das Verhalten der N.K.-haltigen Viruspräparate in der analytischen Ultrazentrifuge und in der Elektrophorese. Man könnte dabei jedoch einwenden, daß das Auflösungsvermögen und die Genauigkeit dieser Untersuchungsmethoden für eine derartige Entscheidung nicht ausreichen. Wir versuchten deshalb, den Nachweis für die Bindung der N.K. an die Virusteilchen auch auf anderem Wege zu erbringen.

Der N.K. aus Eiflüssigkeit kommt nach den Untersuchungen von Knight eine s_{20} von 85 und 170 S zu, während das A.P.-Virus mit einer Konstanten von 1340 S und das K.P.-Virus mit einer solchen von 685 S sedimentieren. Auf Grund dieser Unterschiede in der Sedimentationsgeschwindigkeit müßte es möglich sein, aus einem Gemisch von freier N.K. und freiem Virus das Virus durch mehrfach wiederholte Zentrifugation bei geeigneter Tourenzahl in reiner Form zu gewinnen. Wir versuchten dies durch 5-maliges Ausschleudern des A.P.-Virus bei 13000 g und des K.P.-Virus bei 16000 g zu erreichen. Die erhaltenen Präparate enthielten aber immer noch einen beachtlichen Prozentsatz eines durch N.K.-Serum präzipitierbaren Antigens (s. Tab. 2).

A.P.- und K.P.-Virus werden ebenso wie das Influenzavirus von Erythrozyten verschiedener Tierarten adsorbiert. Dem Adsorptionsvorgang folgt eine wahrscheinlich auf Virus-Fermentwirkung zurückzuführende Elution der Erreger, die beim K.P.-Virus allerdings verhältnismäßig langsam verläuft. Diese Eigenschaften ermöglichen es, die beiden Geflügelpestviren aus Gemischen von Virus und nicht adsorbierbaren Eiweißstoffen, zu denen auch die N.K.

Virusmaterial	HA γ N/HA	Präzipitation mit N.K.-Antiserum			
		Zugefügter Antigen-N (mg)			
		0,045	0,067	0,08	0,15
		Präzipitat-N (mg)			
A.P. 5 × ultrazentrifugiert adsorbiert u. anschl. 2 × ultrazentrifugiert	0,03	0,102		0,152	
	0,044	0,058		0,092	0,150
K.P. 5 × ultrazentrifugiert adsorbiert u. anschl. 2 × ultrazentrifugiert	0,004	0,144			
	0,004	0,084	0,116		

Tab. 2. Präzipitation und Hämagglutination mit Virus, das durch 5-malige Ultrazentrifugation bzw. durch Adsorption an Erythrozyten und anschließende Ultrazentrifugation gereinigt wurde.

gehört, anzureichern. Dabei läßt es sich jedoch nicht vermeiden, daß eine gewisse Menge Hämoglobin in die Eluate hineingeht. Da Hühnerhämoglobin mit unseren N.K.-Antisera reagieren könnte, benutzten wir für unsere Adsorptionsversuche an Stelle von Hühnererythrozyten gewaschene rote Blutkörperchen von Meerschweinchen.

Wir adsorbierten die beiden Viren aus vorgereinigten Konzentraten, die durch Ausschleudern aus infektiöser Eiflüssigkeit erhalten waren, an die Meerschweinchenerythrozyten. Zu 10 ccm Viruskonzentrat setzten wir 2-mal 1,5 ccm (A.P.) bzw. 1-mal 2 ccm (K.P.) gepackte Erythrozyten hinzu, die wir bei A.P. nach 10 Min. und bei K.P. nach 20 Min. abschleuderten. Die überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert und die Erythrozytensedimente jeweils in 10 ccm gepufferter 0,9-proz. NaCl-Lösung aufgenommen. Nach 12- (A.P.) bzw. 18-stdg. (K.P.) Aufenthalt im Kühlschrank und 1-stdg. Halten in Zimmertemperatur wurden die Erythrozyten wiederum abzentrifugiert, das eluierte Virus anschließend durch Ultrazentrifugation aus dem Überstand angereichert und darauf ein weiteres Mal ultrazentrifugiert. Die so gewonnenen Viruspräparate zeigten, bezogen auf Virus-N, eine hohe Hämagglutinationsaktivität.

Im Präzipitationstest konnte auch in ihnen N.K. in größeren Mengen nachgewiesen werden (s. Tab. 2). Die erhaltenen Präzipitatenmengen sind allerdings geringer als bei den durch 5-malige Ultrazentrifugation gereinigten Viruspräparaten. Dieser Unterschied kann durch eine Verunreinigung des Virusantigens mit Meerschweinchen-Hämoglobin bedingt sein.

Virus	Serum	Präzipitat mg N	Überstand			
			H.A.-Aktivität		Infektiosität	
			Titer	‰	Titer MLD 50 ‰	‰
A.P.	Normal-Serum	0,020	$10^{-3,01}$	100	$10^{-8,75}$	100
	Anti-A.P.-Serum	0,122	$10^{-0,301}$	0,2	10^{-6}	0,2
	Anti-N.K.-Serum	0,066	$10^{-1,806}$	6	$10^{-7,45}$	5
K.P.	Normal-Serum	0,004	$10^{-3,01}$	100	$10^{-8,12}$	100
	Anti-K.P.-Serum	0,076	$> 10^{-0,301}$	$< 0,2$	10^{-3}	$< 0,001$
	Anti-N.K.-Serum	0,066	$10^{-2,107}$	12	10^{-6}	0,8

Tab. 3. Hämagglutinations- und Infektionsaktivität des Überstandes nach Behandlung der Viruskonzentrate mit Kaninchen-Normalserum, virusspezifischem und N.K.-spezifischem Antiserum.

Wenn eine Bindung der N.K. an die Virusteilchen besteht, muß man fordern, daß durch Präzipitation mit N.K.-Antiserum auch die Viruspartikel und damit ihre biologisch wirksamen Prinzipien ausgefällt werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß ein Teil des Virus an den Komplex aus etwa vorhandener freier N.K. und N.K.-spezifischem Antikörper unspezifisch adsorbiert werden kann. Nach den Untersuchungen von Heidelberger und Landsteiner, Marak und Smith, Haurowitz und Breinl¹⁷ werden aber nur derartig geringe Mengen eines freien zweiten Antigens in einen heterologen, spezifischen Präzipitationsvorgang mit einbezogen, daß wir diesen Fehler vernachlässigen können. In unseren Untersuchungen behandelten wir A.P.- und K.P.-Konzentrate mit Antiserum gegen N.K., schleuderten die Präzipitate ab und bestimmten die danach im Überstand zurückgebliebenen biologischen Aktivitäten. Als Kontrollen wurden gleichzeitig Viruslösungen mit virusspezifischem Antiserum und Kaninchen-Normalserum geprüft.

Wir arbeiteten dabei mit Antikörperüberschuß. Von beiden Virusarten setzten wir je drei Präzipitationsröhrchen an. Jedes Röhrchen wurde mit 0,09 mg Virus-N, gelöst in 1,0 ccm gepufferter Kochsalzlösung, beschickt. Zum 1. Röhrchen setzten wir 0,5 ccm Kaninchen-Normalserum, zum 2. 0,5 ccm virusspezifisches Kaninchen-Serum und zum 3. die gleiche Menge N.K.-Antiserum hinzu. Die Virus-Serumgemische wurden in der üblichen Weise behandelt. Die Präzipitate wuschen wir 3-mal mit je 2 ccm Kochsalzlösung und bestimmten ihren N-Gehalt. Sämtliche Überstände wurden getrennt nach den einzelnen Ansatzröhrchen gesammelt und diese Sammelüberstände im H.A.- und Infektiositätstest geprüft.

Die Versuchsergebnisse zeigt Tab. 3.

Die mit Normalserum behandelten Kontrollen geben uns die biologischen Aktivitäten an, die vorhanden

sind, wenn keine Präzipitation stattfand. Nach Präzipitation mit virusspezifischem Antiserum sinkt demgegenüber bei A.P. und K.P. das H.A.- und Infektionsvermögen des Überstandes um über 99,8% ab. Setzt man Antiserum gegen N.K. zu, so werden bei dem A.P.-Virus etwa 95% beider biologischen Eigenschaften präzipitiert. In zwei weiteren Versuchen mit A.P.-Virus und N.K.-Antiserum ging die H.A.-Aktivität des Überstandes ebenfalls auf etwa 5% zurück. Bei dem K.P.-Virus dagegen nimmt die Infektiosität um mehr als 99%, das H.A.-Vermögen aber nur um etwa 88% ab. Der Unterschied ist zu groß, um ihn allein durch die Ungenauigkeit der Testmethoden erklären zu können. Wir müssen vielmehr annehmen, daß er durch ein unterschiedliches serologisches Verhalten der infektiösen und hämagglutinierenden Prinzipien des K.P.-Virus bedingt wird.

Zusammenfassend kann man — wenn man von dem letztgenannten ungeklärten Phänomen beim K.P.-Virus absieht — auf Grund unserer Versuche aussagen, daß bei den Geflügelpestviren etwa 95% (A.P.) bzw. 99% (K.P.) der infektiösen Viruspartikel eine Verbindung mit N.K.-Antikörper eingehen. Diese Virusteilchen müssen Träger von antigenen Bestandteilen der N.K. sein.

c) Mengenverhältnis zwischen virusspezifischem und N.K.-Antigen

Sind zwei Antigene in einem Komplex enthalten, so läßt sich durch die Präzipitation mit monovalenten Seren, d. h. Seren, die gegen eine der beiden Komponenten gerichtet sind, das Mengenverhältnis der beiden Bestandteile ermitteln. Dabei wird dieses Verhältnis aus der Menge des gebundenen spezifischen Antikörpers errechnet. Der gebundene Antikörper-N entspricht der Differenz aus Präzipitat-N und zu-

¹⁷ Zit. nach H. Schmidt, Fortschritte der Serologie, Steinkopff, Darmstadt 1951.

Benutzte Antigene	Zu- gefügt. An- tigen-N in mg	Präzipitierter NK-Antikörper in mg N durch		% N.K. in A.P.	Benutzt. Serum
		N.K.	A.P.		
N.K./1 und A.P./1	0,02	0,056	0,024	43 %	N.K./A
	0,05	0,106	0,056	53 %	
	0,08	0,150	0,062	41 %	
N.K./2 und A.P./3	0,02	0,074	0,026	35 %	N.K./C
	0,045	0,096	0,035	37 %	
Mittel: 42 % ± 3,1 %					

Tab. 4. Bindung von N.K.-Antikörper durch N.K.- und A.P.-Konzentrat bei Antikörperüberschuß.

gesetztem Antigen-N. Hierfür ist jedoch Voraussetzung, daß im Antikörperüberschuß gearbeitet und das gesamte zugefügte Antigen präzipitiert wird. Um die erstgenannte Forderung zu erfüllen, berücksichtigten wir bei unserer Berechnung nur Ergebnisse, die von Präzipitationen mit Antikörperüberschuß gewonnen wurden. Der zweiten Voraussetzung wurde nur bei der A.P. in erster Näherung genügt, während wir bei der K.P. nach dem auf S. 377 beschriebenen Versuch annehmen müssen, daß ein größerer Teil der Antigen-Antikörper-Komplexe nicht im Sediment gefunden wird.

Die aus unseren Präzipitationsversuchen mit A.P. ermittelten Werte zeigt Tab. 4.

Es ergibt sich, daß die untersuchten A.P.-Konzentrate im Mittel $42\% \pm 3,1\%$ (mittlerer Fehler des Mittelwertes) N.K.-Antigen enthalten. Die Schwankungen zwischen den einzelnen ermittelten Werten können, worauf auch Knight hinweist, verschiedene Ursachen haben. Durch die Größe der Antigene wird das Antikörper-Antigenverhältnis in den Präzipitaten derartig klein, daß die Genauigkeit der Antikörper-Bestimmung darunter leidet. Weiterhin werden auch bei Antikörperüberschuß nicht sämtliche Virusteilchen präzipitiert, und schließlich kann die größenmäßige und antigene Ungleichmäßigkeit des normalen Proteins⁷ Differenzen in der serologischen Bestimmung ergeben. Da außerdem die Möglichkeit besteht, daß serologisch aktive Gruppen der N.K. bei der Verbindung mit dem Viruspartikel maskiert werden, kann die gefundene Prozentzahl nur als grober Näherungswert angesehen werden.

Diskussion

Durch Untersuchungen mit dem quantitativen Präzipitationstest, in denen wir durch mehrfache Ultrazentrifugation gereinigte Viruskonzentrate der A.P.

und K.P. als Antigene und hochwirksame virusspezifische Kaninchen-Antiseren benutzten, wurde nachgewiesen, daß keine serologischen Beziehungen zwischen den beiden genannten Viren bestehen. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Befunde, die mit einem qualitativen Präzipitationstest^{1,2} und mit der Komplementbindung^{3,4} erhoben wurden. Da die beiden Viren auch morphologisch, physiko-chemisch und biologisch charakteristische Unterschiede aufweisen, können sie keinesfalls mehr als verschiedene Typen desselben Virus — wie man sie z. B. bei Influenza und amerikanischer Pferdeenzephalitis kennt — bezeichnet werden.

Trotz dieser eindeutigen Verschiedenheit wurde aber in Konzentraten beider Viren ein gemeinsamer antigenen Bestandteil festgestellt, der dem Ausgangsmaterial, der infektiösen Eiflüssigkeit, entstammt.

Das gleiche Antigen ist auch in den aus Eiflüssigkeit angereicherten Konzentraten des Influenzavirus enthalten und steht deshalb mit der Virusspezifität der Antigene in keinem Zusammenhang. Knight⁷ konnte feststellen, daß das als nicht virusspezifisches Antigen wirksame Protein auch in der Eiflüssigkeit nichtinfizierter Eier vorhanden ist. Es tritt hier in größerer Menge am 13.—14. Bebrütungstag auf. Beim Influenzavirus wurde nachgewiesen, daß das normale Protein an die biologisch aktiven Viruspartikel gebunden ist.

Ähnliche Verhältnisse fanden wir bei den untersuchten Geflügelpestviren, bei denen das normale Protein nicht von den Virusteilchen abzutrennen war. Die Abtrennung wurde durch Elektrophorese, fünfmalige Ultrazentrifugation, Adsorption der Erreger an Meerschweinchenerythrocyten mit anschließender Elution und Ultrazentrifugation sowie durch Behandlung der Viruspräparate mit N.K.-Antiserum zu erreichen versucht. Die Viruspräparate der A.P. enthielten durchschnittlich $42\% \pm 3,1\%$ N.K.; für K.P. ließ sich der Gehalt an N.K. nicht berechnen. Er dürfte aber die gleiche Größenordnung wie bei A.P. erreichen.

Nach Behandlung mit N.K.-Antiserum und Entfernung der entstehenden Präzipitate ging bei A.P. die Infektionsaktivität des Viruspräparates um 95%, bei K.P. um 99% zurück. Auffallend war jedoch beim K.P.-Virus, daß hier im Gegensatz zum A.P.-Virus das H.A.-Vermögen des Überstandes nicht in gleichem Maße wie die Infektiosität abnahm. Es ist möglich, daß in diesem Falle kleinere, bei der benutzten Tourenzahl nicht ausschleuderbare Virus-Antikörper-Aggregate entstanden sind, bei denen die

Infektiosität stärker reduziert wurde als die H.A.-Aktivität. Das Vorkommen von Virusaggregaten mit ähnlichen Eigenschaften wurde bei K.P. in anderem Zusammenhang schon früher vermutet².

Die Verbindung der infektiösen Einheiten mit normalem Wirtspotein scheint nach den nunmehr vorliegenden Untersuchungen bei tierischen Virusarten häufig vorzukommen. Von prinzipieller Bedeutung ist nun, ob es sich bei den normalen Proteinen um notwendige Bestandteile der biologisch aktiven Einheiten handelt, oder ob sie nur als Verunreinigungen anzusehen sind. Bei den Geflügelpestviren soll hier-

zu in einer späteren Veröffentlichung Stellung genommen werden.

Solange diese Frage bei den bisher näher untersuchten tierischen Virusarten noch nicht entschieden ist, können die analytischen Untersuchungsergebnisse nicht als endgültig anerkannt werden.

Herrn O. Armbruster danken wir für die Durchführung der elektrophoretischen Trennungen.

Ein Teil der für die Untersuchungen erforderlichen Mittel wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten zur Verfügung gestellt.

Größenverteilung des Tabakmosaikvirus in der Ultrazentrifuge und im Elektronenmikroskop¹

Von GERHARD SCHRAMM und MALENE WIEDEMANN

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Virusforschung

(Z. Naturforschg. **6b**, 379—383 [1951]; eingegangen am 9. August 1951)

Die Größenverteilung des Tabakmosaikvirus in der Ultrazentrifuge wird mit der Längenverteilung im Elektronenmikroskop verglichen. Bei p_H 8,6 erhält man homogene Viruslösungen, die auch im Elektronenmikroskop eine relativ einheitliche Länge von 280 $m\mu$ zeigen, wenn die Puffersalze vor dem Eintrocknen ausgewaschen werden. Ultrazentrifugen-Messungen hatten gezeigt, daß das Virus in alkalischer Lösung quer zur Längsachse gespalten wird. Die Querspaltung wurde elektronenmikroskopisch bestätigt, jedoch sind die Bruchstücke durchweg kürzer als in der Ultrazentrifuge. Dies wird auf einen Zerfall bei der Präparation für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zurückgeführt. Werden salzhaltige Viruslösungen eingetrocknet, so führt dies zu einem starken Abbau des Virusmoleküls, es ergibt sich keine Übereinstimmung zwischen den Ultrazentrifugen- und den elektronenmikroskopischen Messungen. Dieser Einfluß der Präparationstechnik erklärt ältere Versuche, bei denen eine mittlere Länge des Tabakmosaikvirus von 190 $m\mu$ gefunden wurde.

Die Bestimmung der molaren Dimensionen von Eiweiß-Stoffen ist dadurch erschwert, daß die Molekülgröße vielfach vom p_H der Lösung oder von der Salzkonzentration abhängt. Es werden sowohl Dissoziationen als auch Aggregationen beobachtet. Im Elektronenmikroskop können Eiweiß-Stoffe nur in trockenem Zustand untersucht werden. Bei dem Trocknungsprozeß sind p_H -Verschiebungen und Veränderungen der Salzkonzentration unvermeidlich. Es ist daher zu prüfen, wie die Präparationstechnik gewählt werden muß, damit diese Einflüsse möglichst gering werden.

Zur Untersuchung dieser Frage ist das Tabakmosaikvirus besonders geeignet. Es besitzt eine charakteristische stäbchenförmige Gestalt, die sich elek-

tronenoptisch gut ausmessen läßt. Die Einflüsse des p_H auf die Molekülgröße sind besonders ausgeprägt.

Wie schon früher betont wurde², ist die Darstellung homogener Viruslösungen sehr schwierig. In alkalischer Lösung zerfällt das Virus unter Aktivitätsverlust in kleinere Bruchstücke. Die Geschwindigkeit des Zerfalls nimmt mit fallendem p_H ab. Bei p_H 10,5 treten die ersten Spaltstücke bereits nach 1 Stde. auf, bei p_H 9 erst nach 72 Stunden. Bei noch niedrigeren p_H -Werten verläuft die Reaktion entsprechend langsamer, ist aber unter geeigneten Versuchsbedingungen deutlich nachweisbar. Bei niedrigem p_H wird der Zerfall überdeckt durch die Tendenz der Virusteilchen zur Aggregation, die im sauren Gebiet besonders ausgeprägt ist. Die Aggregation wird begünstigt durch gleichzeitig anwesende Zerfallsproteine, da diese als Kittsubstanzen wirken können. Frische Viruslösungen zeigen in 0,1-m. Phosphat bei p_H 8 keine Aggregation,

¹ Vortrag auf der 3. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Hamburg.

² G. Schramm u. G. Bergold, Z. Naturforschg. **2b**, 108 [1947].