Untersuchungen zur Charakterisierung des JHM-Virus

I. p_H -Resistenz und Reinigung

Von OSKAR DREES

Aus dem Laboratorium der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf (Prof. Dr. H. Pette)

(Z. Naturforschg. **10 b**, 332—339 [1955]; eingegangen am 5. April 1955)

Es wird über die Reinigung und p_H -Resistenz eines Virus (JHM) berichtet, das bei Nagern und Affen eine menschlichen Erkrankungen vergleichbare Hirnrückenmarks-Entzündung (disseminierte Encephalomyelitis) hervorruft.

Das Virus verfügt über eine verhältnismäßig hohe p_H -Stabilität. Nach 24-stdg. Einwirkung konnten im Bereich p_H 9—3 keine, bei p_H 2 nur geringfügige Aktivitätseinbußen festgestellt werden. Nach 7-tägiger Expositionszeit ergab sich ein Stabilitätsoptimum zwischen p_H 9—6. Mit einem weiteren Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration gingen zunehmende Inaktivierungserscheinungen parallel. Gegenwart von Phosphatpuffer führte im Bereich des Stabilitätsoptimums zu weitgehenden Verlusten der Infektiosität.

Für die Reinigung des Virus erwiesen sich präparative Ultrazentrifugation, Aussalzen mit Ammoniumsulfat und p_H -Fällungen geeignet. Durch Kombination dieser drei Verfahren gelang die Darstellung eines etwa 100-fach gereinigten Präparates. Äther- und Butanolbehandlung sind infolge dabei auftretender Aktivitätsverluste für Reinigungszwecke ungeeignet.

Im Jahre 1949 konnten Cheever, Daniels, Pappenheimer und Bailey aus den Gehirnen zweier spontan an Lähmungserscheinungen erkrankter Mäuse des sog. „Schwentker strain of Swiss white mice“ ein Virus (JHM) isolieren, das im Verlaufe weiterer Passagen eine disseminierte Encephalomyelitis mit ausgedehnter Markscheidendegeneration hervorrief^{1, 2}. Das Virus ließ sich auf Hamster, Ratten und Baumwollratten, nicht aber auf Kaninchen und Meerschweinchen übertragen. Züchtungsversuche im bebrüteten Hühnerei und auf Gewebekulturen blieben vorläufig erfolglos. Hinsichtlich des serologischen Verhaltens konnten keine Verwandtschaften zu verschiedenen anderen neurotrophen Virusarten (Theiler, Mengo, Columbia SK und Pseudorabies) festgestellt werden. Beziehungen zum Erreger der lymphocytären Choriomeningitis oder zum Herpesvirus halten die genannten Autoren auf Grund der biologischen Eigenschaften, insbesondere des Wirtsspektrums, für unwahrscheinlich.

Neuerdings gelang es Kersting und Pette³, auch beim Affen (Meerkatzen, Cynomolgen, Rhesusaffen) durch intracerebrale Verimpfung des JHM-Virus eine ausgedehnte Hirnrückenmarks-Entzündung zu erzeugen. Dem durch extrapyramidale Hyperkinesen, cerebrale Krampfanfälle und Sehstörungen

gen charakterisierten meist subakuten Verlauf der klinischen Erkrankung liegt das morphologische Substrat einer stammhirn-betonten Gliaknötchenencephalitis mit stellenweise erheblichen degenerativen Veränderungen des gesamten nervösen Gewebes zugrunde.

Da klinische Symptomatik sowie pathologisch-anatomisches Bild der Erkrankung gewisse Parallelen zu einigen entzündlichen Affektionen des menschlichen Zentralnervensystems aufweisen, gaben uns diese Befunde Anlaß zu der nicht minder wichtigen Charakterisierung des Erregers selbst. Die vorliegende Arbeit befaßt sich zunächst mit der Reinigung einschließlich Anreicherung und im Zusammenhang damit mit der p_H -Resistenz des Virus. In weiteren Mitteilungen soll über die physikalisch-chemischen Eigenschaften und über das biologische Verhalten des Virus berichtet werden.

Material und Methoden

a) Virusstamm

Die Untersuchungen wurden mit dem von Bailey, Pappenheimer und Mitarbb. isolierten Stamm durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten infektiöse Mäuse-

¹ F. S. Cheever, J. B. Daniels, A. M. Pappenheimer u. O. T. Bailey, J. exp. Medicine **90**, 181 [1949].

² O. T. Bailey, A. M. Pappenheimer, F. S. Cheever u. J. B. Daniels, J. exp. Medicine **90**, 195 [1949].

³ G. Kersting u. E. Pette, Erscheint demnächst in Dtsch. Z. Nervenhk.

gehirne, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. O. T. Bailey (Indianapolis, U.S.A.) überlassen wurden.

b) Materialgewinnung

Nach 6 fortlaufenden Passagen impften wir, ausgehend von den Gehirnen der bei der 5. und 6. Passage erkrankten Mäuse, 500 Tiere i.c. mit je 0,03 ccm einer 10-proz. Virussuspension. Die infizierten Tiere wurden von der 30. Stde. p.i. ab ständig kontrolliert und nach Auftreten der für die Infektion typischen Symptome (siehe weiter unten) getötet. Die steril entnommenen Gehirne wurden bis zu dem Zeitpunkt, da keine kranken Mäuse mehr zu erwarten waren, zunächst bei 4° C aufbewahrt, anschließend in einem elektrischen Homogenisator zerkleinert und als 10-proz. wässrige Suspension bei -60° C aufbewahrt.

c) Eigenschaften der Virussuspension

Titerbestimmungen ergaben bei Verimpfung auf etwa 3 Wochen alte Mäuse folgende Mittelwerte für die LD_{50} : i.c. = $10^{-4,2}$, i.p. = $10^{-3,1}$, s.c. = $10^{-2,0}$, i.m. = $10^{-1,5}$. Die Inkubationszeit schwankte bei i.c. Verimpfung einer 10-proz. Suspension auf 3 Wochen alte Tiere zwischen 48 und 70 Stdn., auf 6 Wochen alte Tiere zwischen 2 und 7 Tagen. Die LD_{50} blieb in beiden Fällen die gleiche.

Das Krankheitsbild begann meist mit Allgemeinerscheinungen: Die Tiere hockten mit struppigem Fell zusammengekrümmt im Käfig. Häufig folgte ein Stadium anhaltender kreisförmiger Lokomotionsbewegungen. In anderen Fällen konnten Gangabweichungen, Haltungsanomalien oder aber ein intensives Rollen des Körpers um seine Längsachse beobachtet werden. Akustische oder mechanische Reizung bewirkten vielfach ungewöhnliche Sprungbewegungen. Der Exitus erfolgte meist in einem Zustand allgemeiner Schwäche, gelegentlich auch im Verlaufe schwerer Konvulsionen oder Streckstarre der Extremitäten. Lähmungserscheinungen konnten bei über 3000 Versuchstieren nur selten beobachtet werden.

d) Titerbestimmungen

Hierzu dienten etwa 3 Wochen alte Mäuse aus der Zucht W. Krispien (Hamburg-Rahlstedt). Die Tiere wurden i.c. mit je 0,03 ccm geimpft. Zum Verdünnen der Virussuspension benutzten wir, sofern nicht ausdrücklich anders vermerkt, physiol. NaCl-Lsg., der pro ccm 100 I.E. Natrium-Penicillin-G zugesetzt waren. Die Berechnung der LD_{50} geschah nach Reed und Muench⁴.

e) p_H - und N-Bestimmungen

Die p_H -Messungen wurden mittels eines Cambridge p_H -Meters durchgeführt. Die N-Bestimmungen erfolgten nach Kjeldahl mit Veraschung und nachfolgender Destillation des Ammoniaks in der Apparatur nach Parnas und Wagner^{5,6}. Das dabei entstehende Ammoniak wurde durch *Nesslerisierung* unter Bildung eines gelben Farbkomplexes, dessen Extinktion im Photometer „Eppendorf“ bei 436 $m\mu$ gemessen wird, quantitativ erfaßt. Der Protein-N wurde aus der Differenz von Gesamt-N und Rest-N ermittelt. Als Eiweißfällungsmittel diente 20-proz. Trichloressigsäure.

⁴ L. J. Reed u. H. Muench, Amer. J. Hyg. 27, 493 [1938].

f) Präparative Ultrazentrifugation

Für hochtourige Zentrifugationen benutzten wir die präparative Ultrazentrifuge ZF 7-1, Nr. 5, nach Dr. Beyerle (Max-Planck-Institut f. Instrumentenkunde, Göttingen). Die Zentrifuge verfügt über eine maximale Umdrehungszahl von 30 000 U./Min. (etwa 100 000 g). Der Läufer ist mit zehn um 35° geneigten Stahlzellen ausgestattet, deren Fassungsvermögen nach Einsatz von Sedimentfallen aus Plexiglas etwa 24 cm³ pro Zelle beträgt. Während des Zentrifugierens konnte die Temperatur des Läufers mit Hilfe einer Sole-Umlaufkühlung zwischen 2 und 4° C konstant gehalten werden.

Versuche zur p_H -Resistenz

Geprüft wurde die p_H -Stabilität des ungereinigten Virus im Bereich p_H 2 bis 9 nach 1- und 7-tägiger Expositionszeit. Die Einstellung der jeweils gewünschten Wasserstoffionenkonzentration erfolgte teils mit $n/10$ -HCl bzw. NaOH, teils mit verschiedenen Pufferlösungen. Als Testmaterial dienten niedertourig (30 Min. bei 3000 U./Min.) zentrifugierte 10-1-Suspensionen. Die Präparationen fanden bei 4° C statt.

a) Versuche mit HCl und NaOH

Unter ständigem Umrühren der Virussuspension wurden tropfenweise so viel $n/10$ -HCl bzw. NaOH zugegeben, bis die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration erreicht war. Kontrollmessungen ergaben, daß während der Einwirkungszeit keine nennenswerten p_H -Verschiebungen stattfanden. Nach Ablauf von 1 und 7 Tagen wurden aus den Virussuspensionen Verdünnungsreihen (log des Verdünnungsfaktors = 0,5) hergestellt und im Tierversuch die jeweilige LD_{50} ermittelt. Als Verdünnungsmittel diente phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, um die im Bereich p_H 3,5 bis 5,5 auftretenden Eiweißfällungen möglichst rückgängig zu machen. Es sollte dadurch die eventuelle Fehlerquelle ausgeschaltet werden, daß durch Einschluß von Viruspartikeln in die relativ grobdispersen Ausflockungen der Begleitproteide eine Inaktivierung vorgetäuscht wird. Diese Fehlerquelle würde sich vor allem beim Verimpfen der höheren Verdünnungsstufen auswirken und gegebenenfalls eine niedrigere LD_{50} liefern, als dem tatsächlichen Gehalt an aktivem Virus entspricht.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, verfügt das Virus über eine beachtliche p_H -Stabilität. Nach 24-stdg. Einwirkungszeit fanden im Bereich p_H 9—3 keine, bei p_H 2 geringe Aktivitätseinbußen statt. Die Befunde nach 7-tägiger Exposition lassen auf ein ziemlich weites Stabilitätsoptimum im Bereich p_H 9—6 schließen. Einem weiteren Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration ging eine zunehmende Virusinaktivierung

⁵ J. K. Parnas u. R. Wagner, Biochem. Z. 125, 253 [1921].

⁶ E. Geiger, Helv. chim. Acta 25, 1453 [1942].

parallel. Bei p_H 3 war das Infektionsvermögen auf weniger als 10%, bei p_H 2 auf weniger als 0,1% gegenüber jenem der Viruskontrolle vermindert.

b) Versuche mit Pufferlösungen

Da die für zahlreiche virologische Präparationstechniken notwendige Einstellung der Virussuspensionen auf einen bestimmten p_H -Wert oft zweckmäßiger durch Zusatz geeigneter Puffergemische statt durch direktes Ansäuern bzw. Alkalisieren vorgenommen wird, andererseits aber, wie Schatz und Pla-

Abb. 1. p_H -Stabilität des JHM-Virus bei 4° C.

ger⁷ z. B. für das MM-Virus nachweisen konnten, die p_H -Resistenz von der spezifischen Zusammensetzung der jeweils benutzten Pufferlösung beeinflusst werden kann, hielten wir ergänzende Untersuchungen mit häufig benutzten Puffern für wünschenswert.

Die Versuchsansätze erfolgten durch Mischen gleicher Mengen Virussuspension und Puffer. Da die Suspension (p_H 6,6) gleichfalls über eine gewisse Pufferkapazität verfügt, verschob sich der p_H -Wert der Pufferlösungen nach dem Mischen mit dem Testmaterial im sauren Bereich um einen gewissen Betrag nach oben und im alkalischen Bereich nach unten. Diese von der Zusammensetzung der Puffer abhängigen Differenzen wurden in Vorversuchen ermittelt und bei den Testansätzen insofern berücksichtigt, als die einzelnen Puffergemische von vornherein so eingestellt wurden, daß nach dem Zusammenbringen mit der Virussuspension die jeweils gewünschten p_H -Werte annähernd vorlagen. Nach Ablauf der Einwirkungszeit verdünnten wir die Virus-Puffergemische mit phosphatgепufferter Kochsalzlösung (log des Verdünnungsfaktors = 1,0). Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 4 Mäuse mit 0,03 ccm i.c. geimpft.

Ein Vergleich zwischen Tab. 1 und Abb. 1 lehrt, daß die mit den Puffergemischen erzielten Befunde denjenigen parallel gehen, die mit HCl und NaOH gewonnen wurden. Eine Ausnahme zeigte sich bei

⁷ A. Schatz u. H. Plager, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67, 452 [1948].

Pufferlösung	p_H	-log LD_{50} nach einer Expositionszeit von	
		1 Tag	7 Tagen
Glykokoll-HCl n. Sörensen	2,1	4,1	< 2
	3,2	4,4	2,9
Zitrat-HCl n. Sörensen	2,2	3,9	< 2
	3,1	4,3	3,0
	4,0	4,1	3,7
Zitrat Phosphat n. McIlvaine	3,2	4,1	3,3
	4,1	4,4	3,7
	5,0	4,1	4,0
	6,0	4,4	4,1
	7,0	4,3	4,2
Phosphat n. Sörensen	6,0	4,2	< 2
	7,0	4,3	3,2
	7,8	4,2	4,0
Veronal-HCl n. Michaelis	7,0	4,4	4,3
	8,0	4,3	4,3
Glykokoll-NaOH n. Sörensen	8,9	4,3	4,1
Viruskontrollen	6,6	4,3	4,4

Tab. 1. p_H -Stabilität des JHM-Virus.

den Versuchen mit Phosphatpuffer. Im Bereich p_H 8—6, der in allen anderen Versuchen dem Stabilitätsoptimum des Virus entsprach, resultierten nach 7-tägiger Einwirkung auffallende Inaktivierungserscheinungen, die innerhalb dieses relativ engen p_H -Bereiches wiederum in hohem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration abhängen. Verglichen mit den entsprechenden HCl- bzw. NaOH-Versuchen gingen bei p_H 7 über 90%, bei p_H 6 über 99% der Infektiosität verloren. Das Phänomen ist um so bemerkenswerter, als die Aktivitätseinbußen bei Pufferung mit Zitrat-Phosphatpuffer im gleichen Bereich viel geringer sind, obgleich die Phosphatkonzentrationen hier annähernd gleich groß (p_H 6) bzw. noch größer (p_H 7) sind.

Reinigungsversuche

Für die Reinigung und Anreicherung des Virus widmeten wir unsere besondere Aufmerksamkeit der Äther- und Butanolbehandlung, der Ammoniumsulfat- und p_H -Fällung und der präparativen Ultrazentrifugation. Die einzelnen Verfahren wurden zunächst gesondert auf den durch sie zu erzielenden Reinigungseffekt geprüft. Anschließend versuchten wir, die geeigneten Methoden in verschiedener Weise zu kombinieren.

Als Maßstab für den Reinheitsgrad eines Präparates diene die sog. spezifische LD_{50} ⁸, d. h. die g Protein/ccm jener Verdünnung, die der LD_{50} entspricht. Der ein bestimmtes Präparationsverfahren auszeichnende Reinigungsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis

$$\frac{\text{spez. } LD_{50} \text{ des ungereinigten Präparates}}{\text{spez. } LD_{50} \text{ des gereinigten Präparates}}.$$

Da die spez. LD_{50} und damit auch der Reinigungsfaktor von etwaigen während der Aufarbeitung vorgenommenen Verdünnungs- oder Konzentrierungsmaßnahmen nicht beeinflusst wird, gelangen wir zu unmittelbar vergleichbaren Zahlenwerten, die ein anschauliches Bild von den jeweils erzielten Reinigungseffekten vermitteln. Was die Beurteilung der Präparate selbst betrifft, so gibt die spez. LD_{50} lediglich den Reinheitsgrad, d. h. das Verhältnis von Protein zur Virusaktivität an, besagt aber nichts über die Konzentrationen und damit über die absoluten Eigenschaften. Zur vollständigen Charakterisierung eines Viruspräparates ist es daher notwendig, außer der spez. LD_{50} entweder die LD_{50} oder den Proteingehalt anzugeben. Bei der Berechnung der LD_{50} ist dem jeweils vorliegenden Präparat die Verdünnung 10° zu geben.

1. Äther- und Butanolbehandlung

Eine Äther- oder Butanolbehandlung schien wünschenswert, um die im weiteren Verlauf der Aufarbeitung u. U. störend wirkenden Lipide zu entfernen.

10-, 5- und 1-proz. Virussuspensionen wurden jeweils mit dem gleichen Volumen peroxyd-freien Äther bzw. n-Butanol versetzt, einige Minuten kräftig geschüttelt und 15 Min. bei 5000 U./Min. zentrifugiert. Von den sich dabei bildenden drei Schichten verwarfen wir die alkoholische bzw. Ätherphase und die gelblich-braun gefärbte Mittelschicht. Die wäßrige Phase wurde bei der Ätherbehandlung von dem gelösten Äther durch Vakuumdestillation befreit. Im Falle der Butanolbehandlung entfernten wir den restlichen Alkohol durch zweimaliges Ausschütteln mit Äther und nachfolgender Vakuumdestillation. Die so behandelten wäßrigen Phasen wurden dann auf ihren Infektionstiter hin geprüft. Alle Präparationen fanden bei -4°C statt.

Beide Verfahren führten zu Aktivitätsverlusten von über 99% und sind deshalb für Reinigungszwecke nicht geeignet*.

2. p_H -Fällungen

Die beachtliche p_H -Stabilität des JHM-Virus liefert die Voraussetzung für eine partielle Reinigung auf dem Wege der sog. „iso-elektrischen“ Fällung, die z. B. von Bachrach und Schwerdt⁸, Gard⁹

⁸ H. L. Bachrach u. C. E. Schwerdt, J. Immunology **67**, 151 [1954].

⁹ S. Gard, Purification of Poliomyelitis Viruses, Uppsala 1943.

¹⁰ A. Polson u. G. Selzer, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **14**, 67 [1954].

und Polson und Selzer¹⁰ bei der Reinigung des Poliomyelitisvirus, von Bourdillon und Moore¹¹ bei der Reinigung des Columbia SK-Virus und von Schäfer und Armbruster¹² zur Darstellung des löslichen Antigens der Maul- und Klauenseuche angewandt wurde.

a) Verhalten des Virus bei Fällungen durch verschiedene p_H -Einstellung

10-proz. Gehirnsuspensionen wurden mit der gleichen Menge Zitrat-Phosphatpuffer nach McIlvaine von verschiedenem p_H vermischt und 30 Min. bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden die Virus-Puffergemische

Abb. 2. p_H -Fällung des JHM-Virus aus 10-proz. Mäusegehirn-Suspensionen.

10 Min. bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Die klaren Überstände und die unter intensivem Schütteln mit Glasperlen in $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendierten Sedimente prüften wir nach 2-stdg. Dialyse gegen $m/50\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ auf ihre Infektionstiter hin. Die Dialyse war notwendig, um die bei i.c. Verimpfung der unteren Verdünnungsstufen toxisch wirkenden Salzkonzentrationen zu vermindern.

Die für das Ausfällen des Virus optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt zwischen p_H 4 und 4,5 (s. Abb. 2). Ergänzende Untersuchungen bei dieser p_H -Einstellung mit 20-, 5- und 1-proz. Suspensionen führten zu prinzipiell gleichen Ergebnissen.

b) Reinigungseffekt durch Fällung bei p_H 4,2

Als Ausgangsmaterial dienten 5-proz. Virussuspensionen. Nach Fällung unter den soeben beschriebenen Bedingungen wurden die resuspendierten Sedimente durch

¹¹ J. Bourdillon, Arch. Biochemistry **3**, 285 [1943].
Ders. u. D. H. Moore, Science [New York] **94**, 541 [1942].

¹² W. Schäfer u. O. Armbruster, Z. Naturforsch. **9b**, 42 [1954].

* Bailey, Pappenheimer u. Mitarbb. berichten gleichfalls von einer geringen Ätherresistenz des JHM-Virus, führten ihre Untersuchungen aber mit längeren Einwirkungszeiten durch.

Vers.-Nr.	-log LD ₅₀		Aktivitätsverlust [%]	-log spez. LD ₅₀		Reinigungsfaktor
	Ausgangsmaterial	gereinigt. Präparat		Ausgangsmaterial	gereinigt. Präparat	
1	2,9	2,8	20	5,2	5,7	~ 3
2	3,0	2,9	20	5,3	5,9	~ 5
3	3,0	2,7	50	5,3	5,8	~ 3
4	2,9	2,7	40	5,2	5,8	~ 4
5	3,0	2,8	40	5,3	5,8	~ 3
6	2,9	2,8	20	5,2	5,8	~ 4

Tab. 2. Reinigung des JHM-Virus durch Fällung bei p_H 4,2.

10 Min. langes Zentrifugieren bei 10 000 U./Min. von unlöslichen Bestandteilen befreit.

Es resultierten wasserklare Präparate, die gegenüber dem Ausgangsmaterial 3- bis 5-fach gereinigt waren (s. Tab. 2). Weitere Versuche, die p_H -Fällung durch Resuspendieren des Sedimentes in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen mit einer Anreicherung zu verbinden, führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Die Präparate waren trüb, der Reinigungsfaktor entsprechend gering. Längeres oder höhertouriges Zentrifugieren des resuspendierten Sedimentes zog erhebliche Aktivitätsverluste nach sich, so daß trotz eines geringeren Proteingehaltes der Reinigungseffekt nicht erhöht werden konnte.

3. Ammoniumsulfatfällungen

Ammoniumsulfatfällungen wurden vor allem bei der Darstellung pflanzen-pathogener, daneben aber auch bei der Reinigung tierischer Virusarten angewandt, u. a. von Gard⁹, Schäfer und Armbruster¹², Clark und Mitarb.¹³, Janssen¹⁴, Schramm¹⁵, Hobohm¹⁶, Gard und Pedersen¹⁷, Pyl¹⁸ und Kausche und Bender¹⁹. Nachdem in Vorversuchen die Resistenz des JHM-Virus gegenüber Ammoniumsulfat bis zur 50-proz. Sättigung nachgewiesen werden konnte, erschien die Anwendung dieser Methode für Reinigungszwecke erfolgversprechend.

¹³ P. F. Clark, J. Schindler u. D. J. Roberts, J. Bacteriol. **20**, 213 [1930].

¹⁴ L. W. Janssen, Z. Hyg. Infektionskrankh. **119**, 558 [1937].

¹⁵ G. Schramm, Naturwissenschaften **27**, 149 [1939].

¹⁶ K. O. Hobohm, Zbl. Bakteriell. Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. I, Orig. **146**, 139 [1940].

Abb. 3. Ammoniumsulfatfällung des JHM-Virus aus 10-proz. Mäusegehirn-Suspensionen.

a) Verhalten des Virus bei Fällung durch verschiedene Ammoniumsulfatkonzentrationen

10-proz. Gehirnsuspensionen wurden bis zu verschiedenen Sättigungen (10–50%) mit den entsprechenden Mengen einer gesättigten, durch Zugabe von NH_3 auf p_H 7 eingestellten Ammoniumsulfatlösung versetzt, 2 Stdn. bei 4° C aufbewahrt und 10 Min. bei 5000 U./Min. zentrifugiert. Die klaren, rötlich-gelb gefärbten Überstände wurden vorsichtig dekantiert. Die weißen, mit der Ammoniumsulfatkonzentration an Menge zunehmenden Niederschläge resuspendierten wir in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge $m/15-Na_2HPO_4$. Überstände und Sedimente wurden dann 2 Stdn. gegen eine $m/50-Na_2HPO_4$ -Lösung dialysiert, um den relativ hohen, bei i.c. Verimpfung toxisch wirkenden Salzgehalt auf ein erträgliches Maß herabzusetzen, und nach der Dialyse auf ihre Infektionstiter geprüft.

Die für die Viruspräzipitation optimale Ammoniumsulfatkonzentration liegt zwischen der 40- und 50-proz. Sättigung (Abb. 3). Die gleichen Ergebnisse lieferten Kontrollversuche mit 20-, 5- und 1-proz. Ausgangssuspensionen.

b) Reinigungseffekt durch Fällung bei 50-proz. Ammoniumsulfatsättigung

Als Material dienten 5-proz. Gehirnsuspensionen. Nach Fällung durch 50-proz. Ammoniumsulfatsättigung wurde das Sediment in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge $m/15-Na_2HPO_4$ resuspendiert, 2 Stdn. bei 4° stehengelassen und zur Entfernung der unlös-

¹⁷ S. Gard u. K. O. Pedersen, Science [New York] **94**, 493 [1941].

¹⁸ G. Pyl, Exp. Vet.-Med. **83**, 9 [1951].

¹⁹ G. A. Kausche u. A. Bender, Arch. ges. Virusforsch. **4**, 217 [1952].

lichen Bestandteile 10 Min. bei 10 000 U./Min. zentrifugiert. Es folgte eine 12-stdg. Dialyse, davon die ersten 4 Std. gegen dest. Wasser, die restliche Zeit gegen $m/50\text{-Na}_2\text{HPO}_4$.

Wir erhielten wasserklare Präparate, die gegenüber dem Ausgangsmaterial 3- bis 5-fach gereinigt waren (Tab. 3). Anreicherungsversuche führten aus den gleichen Gründen wie bei der p_H -Fällung zu unbefriedigenden Ergebnissen.

4. Präparative Ultrazentrifugation

5-proz., teils ungereinigte, teils durch Ammoniumsulfat- oder p_H -Fällung vorgereinigte Gehirnsuspensionen wurden jeweils 60 Min. bei 20 000 U./Min. ($= 44 \times 10^3$ g), 25 000 U./Min. ($= 69 \times 10^3$ g) und 30 000 U./Min. ($= 10^4$ g) zentrifugiert. Die klaren Überstände trennten wir durch vorsichtiges Pipettieren ab. Die Sedimente wurden in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendiert und durch 10 Min. langes Zentrifugieren bei 10 000 U./Min. geklärt.

Es zeigte sich, daß bei 1-stdg. Zentrifugierdauer Schwerefelder von 44×10^3 g ausreichen, um über 99% des pathogenen Prinzips niederzuschlagen. Die Titer der resuspendierten Sedimente schwankten im Falle ungereinigter Ausgangssuspensionen erheblich, erreichten aber niemals mehr als 10% des ursprünglichen Titers. Daß diese Aktivitätsverluste auf Schwierigkeiten beim Resuspendieren des Virus aus den kompakten Niederschlägen zurückzuführen sind, geht daraus hervor, daß nach Zentrifugation partiell vorgereinigter Präparate 40 bis 80% der Infektiosität wiedergewonnen werden konnte.

5. Kombinierte Reinigungsverfahren

a) Reinigungseffekt bei wiederholten Fällungen.

Den Versuchen lag folgendes Schema zugrunde:

Es zeigte sich, daß der Reinigungseffekt günstigstenfalls verdoppelt werden konnte und bei Aufeinanderfolge zweier verschiedener Methoden im allgemeinen höher ausfiel als bei zweimaliger Fällung durch ein und dasselbe Verfahren. Was die Reinheit der Präparate betrifft, so ergab die Reihenfolge Ammoniumsulfat $\rightarrow$ p_H -Fällung die besten Resultate, obgleich dabei während der zweiten Fällung verhältnismäßig hohe Aktivitätsverluste in Kauf genommen werden

Vers.-Nr.	—log LD_{50}		Aktivitätsverlust [%]	—log spez. LD_{50}		Reinigungsfaktor
	Ausgangsmaterial	gereinigt. Präparat		Ausgangsmaterial	gereinigt. Präparat	
1	2,8	2,8	0	5,1	5,8	~ 5
2	3,0	2,9	20	5,3	5,8	~ 3
3	3,0	3,0	0	5,3	6,0	~ 5
4	2,8	2,6	40	5,1	5,7	~ 4
5	2,9	2,7	40	5,2	5,8	~ 4
6	2,8	2,4	60	5,1	5,5	$\sim 2,5$

Tab. 3. Reinigung des JHM-Virus durch 50-proz. Ammoniumsulfatsättigung.

mußten. Bei der umgekehrten Reihenfolge waren die Reinigungseffekte zwar nicht ganz so groß, dafür aber die absolute Virusausbeute höher.

b) Reinigungseffekt bei Kombination zweier Fällungen mit präparativer Ultrazentrifugation.

Die Aufarbeitung geschah in der Reihenfolge: p_H -Fällung $\rightarrow$ Ammoniumsulfatfällung $\rightarrow$ präparative Ultrazentrifugation. Die Ultrazentrifugation wurde dabei mit einer Virusanreicherung verknüpft, indem die Sedimente in einer kleineren als dem jeweiligen Ausgangsvolumen entsprechenden Flüssigkeitsmenge aufgenommen wurden. Ausgehend von 500 ccm einer 5-proz. Gehirnsuspension, erhielten wir durch zweimaliges Ausschleudern des Virus mit jeweils 10-facher volumetrischer Anreicherung 5 ccm des gereinigten Präparates. Nach Abschluß der Ammoniumsulfatfällung lag ein etwa 8-fach gereinigtes Präparat vor, das 80% des ursprünglichen Infektionsvermögens enthielt (s. Tab. 4). Durch die zweifache Ultrazentrifugation erhöhten sich die Aktivitätsverluste auf 75%, so daß der theoretisch 100-fachen Anreicherung eine praktisch nur 25-fache gegenüberstand. Verglichen mit dem nach der Ammoniumsulfatfällung vorliegenden Material konnte ein mehr als 12-facher, insgesamt also ein etwa 100-facher Reinigungseffekt erzielt werden.

Besprechung der Ergebnisse

Das JHM-Virus zeichnet sich durch eine verhältnismäßig hohe p_H -Stabilität aus. Während einer 24-stdg. Exposition findet im Bereich p_H 9—3 keine, bei p_H 2 eine geringfügige Inaktivierung statt. Nach 7-tägiger Einwirkungszeit ist das Virus gegenüber p_H -Werten von 9—6 resistent. Einem weiteren Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration gehen zunehmende Aktivitätsverluste parallel.

In Phosphatpufferlösungen wird das Infektionsvermögen nach 7-tägiger Einwirkungszeit mehr oder weniger zerstört, eine Erscheinung, die für Präpa-

Behandlung des Materials	—log LD_{50}	Aktivitäts- verlust** [%]	Protein [g/ccm]	—log spez. LD_{50} *	Reini- gung**	Anreicherung**	
						theor.	prakt.
Ausgangsmaterial (5-proz. Mäusegehirn-Suspension)	2,9		0,0049	5,2			
↓ mit Zitrat-Phosphatpuffer auf pH 4,2 eingestellt 10 Min. bei 3000 U./Min. Sediment in $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendiert 10 Min. bei 10 000 U./Min. Überstand	2,8	20	0,0008	5,9	~ 5		
↓ 40-proz. Ammoniumsulfatsättigung 15 Min. bei 5000 U./Min. Sediment in $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendiert 10 Min. bei 10 000 U./Min. Überstand (dialysiert)	2,8	20	0,00045	6,1	~ 8		
↓ 60 Min. bei 25 000 U./Min. Sediment in $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendiert 10 Min. bei 10 000 U./Min. Überstand	3,6	50				10	~ 5
↓ 60 Min. bei 25 000 U./Min. Sediment in $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ resuspendiert 10 Min. bei 10 000 U./Min. Überstand	4,3	75	0,0013	7,2	~ 100	100	~ 25

* Vgl. Text S. 7 — 8.

** Verglichen mit dem Ausgangsmaterial.

Tab. 4. Reinigung des JHM-Virus durch Kombination von p_H -Fällung, Ammoniumsulfat-Fällung und präparativer Ultrazentrifugation.

rationen über längere Zeiträume von Bedeutung ist. Das Ausmaß dieser im p_H -Optimum sich abspielenden Inaktivierung ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Bei p_H 7 wird die ursprüngliche Infektiösität um etwa 90%, bei p_H 6 um über 99% reduziert. Anwesenheit von Zitrat vermindert die Inaktivierung durch Phosphat. Eine genauere Analyse dieses Phänomens wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ausschütteln mit Äther und Butanol führt zu erheblichen Aktivitätsverlusten, so daß eine Reinigung, speziell die Entfernung von Lipoiden, auf diesem Wege nicht möglich ist. Der Verzicht auf die Äther- oder Butanolbehandlung erschwerte unsere Versuche, Viruspräparate in Form von Affengehirnsuspensionen zu reinigen.

Für eine partielle Reinigung sind Ammoniumsulfat- und p_H -Fällungen geeignet. Die maximale Virusausbeute liegt bei 40—50-proz. Sättigung bzw. bei

p_H 4,2. Beide Verfahren liefern wasserklare, 3- bis 5-fach gereinigte Präparate. Eine gleichzeitige Anreicherung gelingt nur auf Kosten der ohnehin nicht großen Reinigungseffekte, da die Präparate dann trübe und somit eiweißreicher werden. Längeres oder höherentouriges Zentrifugieren der resuspendierten Sedimente ist infolge der dabei auftretenden Aktivitätsverluste nutzlos.

Durch wiederholte Fällungen läßt sich der Reinigungseffekt günstigstenfalls verdoppeln. Bei Aufeinanderfolge zweier verschiedener Methoden fallen die Ergebnisse im Durchschnitt besser aus als bei zweimaliger Fällung durch ein und dasselbe Verfahren. Für den Präparationsgang Ammoniumsulfat — p_H -Fällung sind verhältnismäßig hohe Aktivitätsverluste charakteristisch, was darauf zurückzuführen ist, daß nach der zweiten Fällung ein ungewöhnlich hoher Prozentsatz (über 10%) des Virus in dem Überstand verbleibt. Es liegt die Vermutung nahe, daß

es sich bei der pH 4,2-Einstellung nicht um eine isoelektrische, sondern um eine unspezifische Fällung des Virus handelt und daß nach vorangegangener Aussalzen durch Ammoniumsulfat die für die Adsorption des Virus an den Niederschlag verantwortlichen Substanzen entfernt werden. Für die Unspezifität der pH -Fällung spricht weiterhin die Tatsache, daß die Präzipitation des Virus mit zunehmender Verdünnung des Ausgangsmaterials, und zwar von 10^{-3} ab, unvollständiger wird. Ähnliche Verhältnisse konnte Pyl¹⁸ bei der Reinigung des Maul- und Klauenseuche-Virus durch Acetonfällung beobachten.

Für die Sedimentation des Virus genügen Schwerfelder von $44 \times 10^3 g$ bei 60 Min. Zentrifugierdauer. Um das Virus aus dem Sediment unter vertretbaren

Aktivitätsverlusten resuspendieren zu können, ist eine partielle Vorreinigung der zu zentrifugierenden Präparate notwendig.

Erst die Kombination mehrerer Verfahren gestattet die Darstellung weitgehend gereinigter Viruspräparate. Durch den Aufarbeitungsgang pH -Fällung $\rightarrow$ Aussalzen mit Ammoniumsulfat $\rightarrow$ präparative Ultrazentrifugation gelang uns bei 25-facher Anreicherung eine etwa 100-fache Reinigung. Das Endprodukt enthielt 0,13% Eiweiß, die spez. LD_{50} betrug $10^{-7,2}$.

Für die Überlassung des Virusstammes möchten wir Herrn Prof. O. T. Bailey auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge und des pH -Meters.

Vergleich der serologischen Spezifität des Tabakmosaikvirus mit nucleinsäure-freien und -haltigen Abbauprodukten des Virus

Von PETER STARLINGER

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforsch. 10 b, 339–343 [1955]; eingegangen am 18. März 1955)

Die serologischen Unterschiede von Tabakmosaikvirus (TMV) und nucleinsäure-freien und -haltigen Spaltprodukten des Virus wurden untersucht. Die reine Nucleinsäure gibt keine serologischen Reaktionen mit einem Anti-TMV-Serum. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Nucleinsäure durch ihre Bindung an das Virusprotein dessen Struktur verändert. Diese Veränderung zeigt sich nicht nur in dem serologischen Verhalten, sondern auch in der Unlöslichkeit des nucleinsäure-freien Proteins bei 37°.

Wenn man ein Antiserum gegen Tabakmosaikvirus (TMV) mit dem nucleinsäure-freien Protein aus diesem Virus, wie man es nach der Alkalispaltung nach Schramm¹ erhält, zur Reaktion bringt, so erfolgt eine Präzipitation. Wiederholt man diese Reaktion mit dem gleichen Serum so lange, bis keine erneute Präzipitation mehr auftritt, so zeigt es sich, daß das Serum noch einen Restantikörper enthält. Es reagiert zwar nicht mehr mit dem nucleinsäure-freien Protein (A-Protein), wohl aber mit intaktem TMV (Friedrich-Freksa²).

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Spezifität dieses Restantikörpers aufzuklären. Insbesondere sollte untersucht werden, ob das Fehlen der Nucleinsäure für das Auftreten des Restantikörpers verantwortlich zu machen ist und ob dieser

selbst antigene Fähigkeiten zukommen. Zu diesem Zweck wurden die serologischen Eigenschaften des intakten Virus mit denen verschiedener seiner Spaltprodukte verglichen. Als solche Spaltprodukte diente einmal die reine Nucleinsäure des Virus, zum andern verschiedene Proteinaufarbeitungen, deren Darstellung und Eigenschaften im methodischen Teil beschrieben werden.

Material und Methodik

Tabakmosaikvirus. Es wurde der von Friedrich-Freksa, Melchers und Schramm² benutzte vulgare-Stamm verwendet.

Darstellung der Nucleinsäure

a) Methode nach Cohen und Stanley³. TMV-Lösung wird in 0,1-n. NaCl-Lösung 1 min lang gekocht, ausgefallenes Eiweiß abzentrifugiert und der Überstand so

¹ G. Schramm, Z. Naturforsch. 2 b, 112 [1947].

² H. Friedrich-Freksa, G. Melchers u. G. Schramm, Biol. Zbl. 65, 187 [1946].

³ W. M. Stanley u. S. S. Cohen, J. biol. Chemistry 144, 539 [1942].