Eigenschaften einer infektiösen Nucleinsäure-Fraktion aus Hühnerembryonen, die mit Encephalitis-Virus infiziert wurden

I. Mitt.: Physikalische und chemische Eigenschaften

Von EBERHARD WECKER

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Abteilung für tierpathogene Virusarten *

(Z. Naturforschg. 14 b, 370—378 [1959]; eingegangen am 12. Februar 1959)

Aus Homogenaten von Hühnerembryonen, die an einer Infektion mit EEE-Virus ** zugrunde gegangen sind, lassen sich durch Behandlung mit Phenol bei niederen Temperaturen Nucleinsäure-Fractionen gewinnen (NS-Fractionen), die infektiös sind. Ihr Nucleinsäureanteil setzt sich zu etwa 75% aus Ribonucleinsäure und zu etwa 25% aus Desoxyribonucleinsäure zusammen. Außer dem Zuckeranteil der beiden Nucleinsäure-Typen besitzen sie noch andere, hochmolekulare Zuckerkomponenten. Weitere Verunreinigungen der Präparate durch Peptide oder Aminosäuren lassen sich durch Alkohol-Präzipitation der Nucleinsäuren entfernen. Die Infektiosität der NS-Fractionen geht auf ihren Ribonucleinsäure (RNS)-Anteil zurück. Dieser ist aus Molekülen unterschiedlicher Größe zusammengesetzt, die infektiöse RNS ist jedoch nach ihrer Sedimentationskonstante hochmolekular. Ihr Mol.-Gew. beträgt wahrscheinlich $2 \cdot 10^6$.

Die von GIERER und SCHRAMM angegebene Methode, mit der sie aus Tabakmosaik-Virus (TMV) mittels Phenol eine infektiöse RNS isolieren konnten¹, wurde auch schon bei tier- und menschenpathogenen Virusarten von COLTER und Mitarb.^{2,3} und WECKER und SCHÄFER⁴ erfolgreich angewendet. Allerdings wurden hier die NS-Fractionen nicht aus dem Virus selbst, sondern aus virus-infizierten Zellen oder Geweben gewonnen. Neuerdings gelang auch die Herstellung von infektiösen RNS-Präparaten aus angereichertem Polio-Virus mit dieser Technik⁵.

Entsprechend dem komplexeren Ausgangsmaterial sind diese infektiösen NS-Fractionen auch weniger einheitlich als z. B. bei TMV und der Beweis, daß es sich bei dem infektiösen Agens um freie RNS-Moleküle handelt, wurde bisher noch nicht schlüssig erbracht. Auch fehlen noch detailliertere physikalische und chemische Untersuchungen.

Die Absicht der vorliegenden Arbeit ist es, Beweise dafür zu erbringen, daß es sich bei dem infektiösen Material in NS-Fractionen aus virus-infizierten Hühnerembryonen um freie RNS-Moleküle handelt. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der NS-Fractionen werden eingehender studiert.

Material und Methoden

1. Gewinnung der virus-infizierten Embryonen

10 bis 11 Tage lang bebrütete, befruchtete Hühnereier wurden mit je $0,2 \text{ cm}^3$ EEE-Virus-haltiger Lösung infiziert, die ca. 20 LD_{50} enthielten. Die Lösung wurde in die Allantoishöhle injiziert. Die innerhalb 24 bis 48 Stdn. abgestorbenen Embryonen wurden möglichst unmittelbar nach dem Tode entnommen und dann sofort bei -40°C eingefroren.

2. Gewinnung der NS-Fractionen

4 gefrorene Embryonen wurden mit 12 cm^3 $0,02\text{-}m$. Phosphatpuffer $\text{pH } 7,0$ und 20 cm^3 $80\text{-}proz.$ Phenol in einem eisgekühlten Homogenisator zerkleinert. Die Homogenate wurden anschließend 3 Min. bei $13\,000$ Umdrehungen pro Min. (U/Min.) und etwa $+14^\circ \text{C}$ zentrifugiert und die obere Wasserphase abgezogen. Diese wurde mit 20 cm^3 Phenol in der Kälte für 8 Min. möglichst hart und frequent in einer Maschine geschüttelt (ca. 250 bis 300 Hübe/Min.) und anschließend wieder 3 Min. wie oben zentrifugiert. Das Schütteln der Wasserphase mit Phenol wurde insgesamt 3-mal durchgeführt.

Die zuletzt gewonnene Wasserphase wurde 6-mal mit einem jeweils überschüssigen Volumen von peroxyd-freiem Äther mit der Hand durchgeschüttelt, um das

* Gegenwärtige Anschrift: The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania/USA.

** EEE-Virus = eastern equine encephalomyelitis virus = Virus der amerikanischen Pferde-Encephalomyelitis (Typ Ost).

¹ A. GIERER u. G. SCHRAMM, Nature [London] 177, 702 [1956]; Z. Naturforschg. 11 b, 138 [1956].

² J. S. COLTER, H. H. BIRS u. R. A. BROWN, Nature [London] 179, 859 [1957].

³ J. S. COLTER, H. H. BIRD, A. W. MOYER u. R. A. BROWN, Virology 4, 522 [1957].

⁴ E. WECKER u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. 12 b, 415 [1957].

⁵ H. E. ALEXANDER, G. KOCH, J. M. MOUNTAIN, K. SPRUNT u. O. VAN DAMME, Virology 5, 172 [1958].

restliche Phenol zu entfernen. Zum Schluß wurde der restliche Äther im Stickstoffstrom ausgetrieben. Sämtliche Manipulationen wurden möglichst bei $+4^{\circ}\text{C}$ oder unter Kühlung im Eisbad durchgeführt. Die auf die beschriebene Weise gewonnenen Produkte sind im folgenden als „rohe NS-Fractionen“ bezeichnet.

3. Alkohol-Präzipitation der NS-Fractionen

1 Volumenteil rohe NS-Fraktion wurde mit 2 Volumenteilen 96-proz. Äthanol im Eisbad versetzt. Die sofort auftretenden Ausfällungen wurden in einer gekühlten Zentrifuge bei 3000 U/Min. kurz abgeschleudert und die Überstände dekantiert. Das Sediment wurde in einer eisgekühlten Mischung aus 1 Volumen 0,02-m. Phosphatpuffer p_{H} 7,0 und 2 Volumen Äthanol mit einer Pipette kräftig suspendiert und wieder abgeschleudert. Nach nochmaligem Waschen wurde dann das Sediment im ursprünglichen oder einem geringeren Volumen 0,02-m. Phosphatpuffer gelöst. Diese Produkte werden im Text als „alkoholpräzipitierte NS-Fractionen“ bezeichnet.

4. Messung der UV-Spektren

Die Messung der UV-Spektren wurde mit NS-Fractionen durchgeführt, die 1 : 50 oder 1 : 100 in 0,1-n. Phosphatpuffer p_{H} 7,5 verdünnt worden waren. Die Messungen erfolgten in einem UV-Spektrophotometer der Firma Zeiss.

5. Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge der Firma Phywe, Göttingen, bei etwa $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die NS-Fractionen waren dabei in 0,02-m. Phosphatpuffer p_{H} 7,0 gelöst.

6. Bestimmung der Viskosität

Die Viskositäten wurden in einem Ostwald-Viskosimeter bei $+4^{\circ}\text{C}$ gemessen. Die angegebenen Durchlaufzeiten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Ablesedifferenz beträgt dabei maximal $\pm 0,5$ Sekunden.

7. Protein-Nachweis

Der Protein-Nachweis erfolgte nach der von MARKHAM und SMITH⁶ beschriebenen modifizierten Biuret-Reaktion.

8. Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Bestimmung

Die DNS-Bestimmungen wurden in der von HERSHEY et al.⁷ beschriebenen Weise mit Disches Reagens auf Desoxyribose durchgeführt. 1 cm³ NS-Fraktion wurde mit 2 cm³ Disches Reagens für 20 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt, anschließend noch 30 Min. bei Raumtemperatur gehalten. Die Extinktion der auftretenden Blaufärbung wurde in einem Photometer „Eppendorf“ bei 578 m μ Wellenlänge gemessen. Der DNS-

Gehalt wurde dann von einer Eichkurve abgelesen, die unter Verwendung von eingewogenen Mengen DNS aufgenommen worden war.

9. Zucker-Reaktion

Die Gesamt-Zucker-Bestimmung wurde mit der Orcin-Reaktion nach TILMANS und PHILIPPI⁸ durchgeführt. Die Werte wurden nach Bestimmung der Extinktion ebenfalls von einer Eichkurve abgelesen und sind als Glucose-Äquivalente angegeben.

10. Stickstoff-Bestimmung

Die Stickstoff-Bestimmung erfolgte nach der Mikromethode von KJELDahl.

11. Enzyme

Als Enzyme wurden Präparate von kristallisierter Ribonuclease (RNase) bzw. Desoxyribonuclease (DNase) der Firma Worthington verwendet.

Ergebnisse

I. Physikalische Eigenschaften der NS-Fractionen

1. Die UV-Absorption

Die UV-Absorptions-Kurven der NS-Fractionen zeigten immer den für Nucleinsäure typischen Verlauf. Das Absorptions-Maximum lag bei 258 m μ , das Minimum bei 230 m μ (s. Abb. 1).

Abb. 1. UV-Absorptions-Spektrum einer alkohol-präzipitierten NS-Fraktion.

Das Verhältnis der Extinktionen $E_{258\text{ m}\mu}$ / $E_{280\text{ m}\mu}$ gibt einen Anhalt für Verunreinigungen der Nucleinsäuren z. B. mit Proteinen. Bei den nicht durch Alkohol-Präzipitation gereinigten rohen NS-Fractionen ergab sich der durchschnittliche Wert von 1,95 (2,01 bis 1,88), bei den alkohol-präzipitierten der Durchschnittswert von 2,06 (2,19 bis 1,95). Das Verhältnis wurde regelmäßig durch die Fällung mit Alkohol zu höheren Werten verschoben. Dies zeigt an, daß Verunreinigungen, die bei 280 $\text{m}\mu$ absorbieren, dadurch entfernt werden konnten. Wenn es sich dabei um Peptide handelte, so müßten diese relativ klein sein, da größere Peptidmoleküle durch Alkohol ebenfalls präzipitiert werden.

Aus der Extinktion einer NS-Fraktion bei der Wellenlänge 258 $\text{m}\mu$ läßt sich die Konzentration an NS errechnen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm wird pro γ NS-Stickstoff eine Extinktion von $E_{258\text{ m}\mu}^{1\text{ cm}} = 0,150$ angenommen, ein Wert, der z. B. bei der RNS aus TMV experimentell ermittelt wurde (vgl. l. c.⁹). Dies entspricht einem Extinktions-Koeffizienten $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 250$, wenn für die NS ein Stickstoff-Gehalt von $16,7\% = 1/6$ berechnet wird, was bei einer RNS mit äquimolarem Basenverhältnis der Fall ist.

Von COLTER und BROWN¹⁰ wurde für die RNS aus Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen ein Koeffizient $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 210$ angegeben. Dieser Wert ist deshalb so niedrig, weil die Autoren bei ihrer Rechnung nur 14% Stickstoff-Gehalt der RNS, also weniger als $1/7$ annahmen. Rechnet man dagegen auch hier 16,7% Stickstoff/RNS-Molekül, so ergibt sich genau der Wert $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 250$, was bedeutet, daß auch COLTER und BROWN pro γ RNS-Stickstoff einen Wert von 0,150 einsetzten.

Vergleicht man die gemäß der Extinktion bei 258 $\text{m}\mu$ berechneten Stickstoff-Werte mit denjenigen, die durch direkte Stickstoff-Bestimmung ermittelt wurden, so muß sich ein Maß für die Verunreinigung des Nucleinsäure-Präparates mit stickstoffhaltigen anderen Substanzen ergeben.

Der Vergleich wurde bei einigen NS-Fractionen vor und nach der Alkohol-Präzipitation durchgeführt (s. Tab. 1). Die Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, daß durch die Fällung mit Alkohol, stickstoffhaltige Begleitsubstanzen, die vorwiegend bei 280 $\text{m}\mu$ ab-

Präparat	N berechnet [γ/cm^3]	N bestimmt [γ/cm^3]	Verunreinigung [%]
Vor	310	506	39
Präzipitation	323	578	44
	417	815	49
Nach	195	196	0
Präzipitation	359	358	0
	480	488	1,6
	405	380	0
	407	425	4

Tab. 1. Berechnete und bestimmte N_2 -Menge in NS-Fractionen vor und nach der Alkohol-Präzipitation.

sorbieren, nahezu vollständig aus der NS-Fraktion entfernt werden können.

2. Die Viskosität

Für eine Mol.-Gew.-Bestimmung sind bei bekannter Dichte mindestens zwei weitere Parameter erforderlich, z. B. die Viskositätszahl und die Sedimentationskonstante. Unter Verwendung dieser beiden Parameter hat GIERER das Mol.-Gew. der infektiösen RNS aus TMV bestimmt⁹.

Es war von Interesse, entsprechende Untersuchungen auch mit den hier vorliegenden infektiösen NS-Fractionen durchzuführen.

Die Viskositätszahl $[\eta]$ wurde auf das Volumen der gelösten Nucleinsäure bezogen; sie ist nach der folgenden Gleichung in dimensionslosen Einheiten definiert:

$$[\eta] = \frac{\eta}{c} \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right)$$

(η = Dichte; c = Konzentration der NS; η = Viskosität bei der Konzentration c in $\text{g}/1\text{ cm}^3$, η_0 = Viskosität des reinen Lösungsmittels).

Eine alkohol-präzipitierte NS-Fraktion mit einer Konzentration von 0,86 mg/cm^3 hatte eine für diese NS-Konzentration berechnete Viskositätszahl $[\eta] = 1120$, d. h. die etwa 10-fache Viskosität einer RNS aus TMV gleicher Konzentration⁹. Es war also damit zu rechnen, daß neben der RNS in den NS-Fractionen noch andere, höher visköse Substanzen vorliegen.

Der Beitrag des RNS-Anteiles zu der gesamten Viskosität einer NS-Fraktion wurde auf die folgende

⁶ R. MARKHAM u. J. D. SMITH, J. Biochemistry [Tokyo] **46**, 509 [1950].

⁷ A. D. HERSHEY, J. DIXON u. M. CHASE, J. gen. Physiol. **36**, 777 [1953].

⁸ J. TILLMANN u. K. PHILIPPI, Z. Biochem. **215**, 36 [1929].

⁹ A. GIERER, Z. Naturforschg. **13b**, 477 [1958].

¹⁰ J. S. COLTER u. R. A. BROWN, Science [Washington] **124**, 1077 [1956].

Weise ermittelt: Nach Bestimmung der Durchlaufzeit einer frisch alkohol-präzipitierten NS-Fraktion im Viskosimeter wurde das Präparat mit RNase ($1 \gamma/\text{cm}^3$) 30 Min. bei 37°C inkubiert und erneut gemessen. Die Durchlaufzeit hatte sich von ursprünglich 498 Sek. auf 481,7 Sek. verringert, und das Verhältnis V der entsprechenden Viskositäten war $V=0,967$. Anschließend wurde das Präparat mit DNase ($1 \gamma/\text{cm}^3$) nochmals für 30 Min. bei 37°C inkubiert, was einen weiteren Abfall der Durchlaufzeit zur Folge hatte ($V=0,822$).

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß ein erheblicher Anteil der gesamten inneren Viskosität der NS-Fraktion auf DNS zurückgeht.

Nach erschöpfender RNase- und DNase-Behandlung des Präparates war jedoch die Durchlaufzeit immer noch 80 Sek. länger als diejenige des reinen Lösungsmittels.

Da die innere Viskosität degradiert Nucleinsäure-Moleküle vernachlässigt werden kann, mußte neben RNS und DNS eine weitere Substanz in der NS-Fraktion vorhanden sein (vgl. Chemische Eigenschaften, Abschnitt II).

Der durch enzymatische Spaltung der hochmolekularen NS-Moleküle erzielte prozentuale Abfall der Viskosität gibt ein direktes Maß für den Viskositätsbeitrag beider hochmolekularer Nucleinsäure-Typen.

Aus den chemisch bestimmten tatsächlichen DNS- bzw. RNS-Konzentrationen des Präparates ließ sich dann die Viskositätszahl $[\eta]$ der RNS bzw. DNS nach der angegebenen Formel errechnen.

Diejenige des RNS-Anteils ist mit $[\eta] = 95$ von derselben Größe wie diejenige ($[\eta] = 100$), die von GIERER z. B. bei RNS aus Mikrosomen von Rattenlebern, ermittelt wurde¹¹. Die Viskositätszahl $[\eta]$ für DNS liegt mit 1130 erwartungsgemäß wesentlich höher (s. Tab. 2).

	Viskositätszahl $[\eta]$
Gesamt-NS ($0,86 \text{ mg}/\text{cm}^3$)	1120
RNS ($0,54 \text{ mg}/\text{cm}^3$)	95
DNS ($0,32 \text{ mg}/\text{cm}^3$)	1130

Tab. 2. Die Viskositäten.

3. Die Sedimentations-Konstanten

Bei der Untersuchung von NS-Fractionen in der analytischen Ultrazentrifuge findet man verschiedene Gradienten.

Das Verhältnis von rohen und alkohol-präzipitierten NS-Fractionen soll gesondert betrachtet werden, da durch die Alkohol-Präzipitation das Verhältnis RNS/DNS und damit die gesamte innere Viskosität der Lösung verändert wird. Bei den *rohen NS-Fractionen* waren folgende Gradienten zu beobachten: Ein schneller wandernder Gradient A mit $s_{20} \sim 32 \text{ S}$, ein langsamer wandernder Gradient mit $s_{20} \sim 12 \text{ S}$. s_{20} des in einem Falle festgestellten Gradienten B liegt zwischen der von A und C.

Bei den alkohol-präzipitierten NS-Fractionen wurden folgende Werte ermittelt:

Gradient A	$s_{20} \sim 30 \text{ S}$,
Gradient B	$s_{20} \sim 19 \text{ S}$,
Gradient C	$s_{20} \sim 10 \text{ S}$.

Die gemessenen Sedimentationswerte sind konzentrationsabhängig (s. Tab. 3). Die oben aufgeführten

Präparat	Gesamt-NS mg NS/cm ³	Gradient A	s_{20} Gradient B	Gradient C
Rohe	1,86	25,5	15,3	7,8
NS-	1,94	25,0		4,9
Fraktion	2,84	21,8		6,0
alkohol-	0,95	23,7		8,2
präzipi-	1,54	21,4		8,4
tierte	1,64	21,4	14,2	7,95
NS-	2,88	13,5	9,5	1,25
Fraktion	2,90	14,5	10,9	4,85

Tab. 3. Die Sedimentations-Konstanten der Gradienten von rohen und alkohol-präzipitierten NS-Fractionen.

Werte wurden graphisch auf unendlich kleine NS-Konzentrationen extrapoliert.

Die im einzelnen gemessenen Sedimentations-Konstanten in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration bei rohen und alkohol-präzipitierten NS-Fractionen sind in Tab. 3 aufgeführt.

Die für die Gradienten A und B ermittelten Werte stimmen mit denjenigen überein, die GIERER für RNS aus Mikrosomen gemessen hat¹¹. Außerdem stimmt die Sedimentations-Konstante des Gradienten A mit der von GIERER für RNS aus TMV gefundenen überein⁹.

Über die chemische Natur der in den drei sichtbaren Gradienten absinkenden Substanzen gab folgendes Experiment Aufschluß:

Eine alkohol-präzipitierte NS-Fraktion mit $2,1 \text{ mg NS}/\text{cm}^3$ wurde in der analytischen Ultrazentrifuge

¹¹ A. GIERER, Z. Naturforschg. **13b**, 788 [1958].

untersucht. Sie zeigte die drei typischen Gradienten mit den Sedimentations-Konstanten $s_{20} A = 19,4 S$; $s_{20} B = 12,6 S$; $s_{20} C = 6,4 S$ (s. Abb. 2).

Abb. 2.

Abb. 2–4: Sedimentationsdiagramme einer alkohol-präzipitierten NS-Fraktion. Abb. 2: Nicht mit Enzym behandelt.

Abb. 3: nach Behandlung mit RNase, Abb. 4: nach Behandlung mit DNase.

Eine Probe derselben NS-Fraktion wurde mit 1γ RNase/cm³ für 10 Min. bei Raumtemperatur behandelt. Bei der anschließenden Zentrifugation zeigte sich, daß die Gradienten A und B vollständig verschwunden waren. Der unverändert große Gradient C hatte eine Sedimentations-Konstante $s_{20} = 7,9 S$ (s. Abb. 3).

Abb. 3.

Wurde das Material dagegen mit 1γ DNase/cm³ für 60 Min. bei Raumtemperatur vorbehandelt, so blieben die Gradienten A und B optisch unverändert und sedimentierten mit $s_{20} A = 21,5 S$ bzw. $s_{20} B = 11,4 S$. Der Gradient C aber wurde dadurch wesentlich abgeflacht und verbreitert, wenn er auch nicht ganz verschwunden war (s. Abb. 4).

Abb. 4.

Die Gradienten A und B gehen also auf RNS, der Gradient C auf DNS zurück. Letzterer unterliegt auf Grund der hohen Viskosität des Materials einem starken Selbstschärfungs-Effekt. Berechnet man aus dem Flächeninhalt der drei Gradienten die relative Konzentration der betreffenden Substanzen, so ergibt sich für A ca. 70%, für B ca. 5% und für C ca. 25 Prozent.

In einem weiteren Versuch wurden eine alkohol-präzipitierte NS-Fraktion mit $1,9 \text{ mg NS/cm}^3$ und eine RNS aus TMV mit $1,3 \text{ mg RNS/cm}^3$ zu gleichen Teilen gemischt.

Bei der Untersuchung dieses Mischpräparates in der analytischen Ultrazentrifuge war neben den Gradienten A, B und C auch bei längerem Zentrifugieren kein weiterer Gradient festzustellen. Wohl aber war der Flächeninhalt des Gradienten A vergrößert. Auch diese Feststellung spricht dafür, daß die RNS A der NS-Fractionen und die RNS aus TMV die gleichen Sedimentations-Eigenschaften haben.

Nachdem das Verhalten der NS-Fractionen in der analytischen Ultrazentrifuge bekannt war, blieb die Frage zu klären, ob man das infektiöse Prinzip einem der drei beobachteten Gradienten zuordnen kann.

Präparat	Abfall [%]				Abweichungen [%]		
	analytische UZ*		Soll Infektiositäts- Verlust				Ist Infektiositäts- Verlust
	s ₂₀ A	s ₂₀ B	A	B	zu A	zu B	
4 cm ³ 40705 U/Min. 55 Min. + 5°C 2,9 mg NS/cm ³	13,5	9,5	38	19	30	— 8	+ 11
4 cm ³ 39500 U/Min. 60 Min. + 5°C 2,1 mg NS/cm ³	19,4	12,6	63	35	92	+ 29	+ 57
4 cm ³ 40800 U/Min. 60 Min. + 5°C 0 86 mg NS/cm ³	26	16,4	83	48	96	+ 13	+ 48
1,5 cm ³ 39000 U/Min. 130 Min. 18°C 2,1 mg NS/cm ³ Schwingrotor	19,4	12,6	100	86	96	— 4	+ 10
Durchschnitt						+ 7,5	+ 31,5

* UZ = Ultrazentrifugation.

Tab. 4. Verhalten der Gradienten A und B und der Infektiosität von NS-Fractionen beim Zentrifugieren.

Es wurde deshalb versucht, aus dem Abfall der Infektiosität nach hochtouriger Zentrifugation des Materials die Sedimentations-Konstante des infektiösen Prinzips der NS-Fraktion zu ermitteln.

Hierzu wurden verschiedene Experimente durchgeführt: In einer Versuchsserie wurden zunächst die Sedimentations-Konstanten für die drei verschiedenen Gradienten einer bestimmten NS-Fraktion optisch gemessen. Gleichzeitig damit wurden jeweils 4 cm³ desselben Materials im Rotor 40 der Spinco-Zentrifuge bei + 5 °C 55 oder 60 Min. mit 40 000 U/Min. zentrifugiert und der Abfall der Infektiosität der Überstände gegenüber derjenigen des Ausgangsmaterials im Eitest bestimmt (Verdünnungen nach Potenzen von 5, 10 Eier/Verdünnung). Aus den bekannten Sedimentations-Konstanten der drei Gradienten und den bei der präparativen Zentrifugation angewendeten Zentrifugations-Daten ließ sich mit ausreichender Genauigkeit errechnen, wieviel Prozent der einzelnen Substanzen aus dem Überstand sedimentiert sein mußten¹². Der Vergleich dieser Werte mit den durch Infektionstest ermittelten Werten ergibt, wie Tab. 4 zeigt, eine relativ gute Übereinstimmung der biologisch ermittelten Sedimentations-Eigenschaften mit denjenigen des Gradienten A.

In einem ähnlichen Versuch wurden 1,5 cm³ einer NS-Fraktion im Schwingrotor der Spinco-Zen-

trifuge 130 Min. mit 39 000 U/Min. zentrifugiert. Die Temperatur am Ende der Zentrifugation betrug + 18 °C. Die oberen 2/3 wurden dann vorsichtig abgesaugt und im Infektionstest geprüft.

Das Ergebnis ist ebenfalls in Tab. 4 gezeigt. Es ergibt sich auch hier eine gute Übereinstimmung der gemessenen mit den für Gradient A errechneten Werten.

Schließlich wurde in zwei Versuchen eine NS-Fraktion in der analytischen Ultrazentrifuge solange zentrifugiert, bis der Gradient A gerade vollständig sedimentiert war. Dann wurden 80% des Gesamtüberstandes vorsichtig abgeschichtet und, wegen des geringen Volumens, nur qualitativ auf Infektiosität geprüft. Dasselbe wurde mit dem Überstand nach 70-proz. Sedimentation des Gradienten A durchgeführt. Die dabei ermittelten Werte sind folgende:

sedimentiert [%]			Infektiosität der oberen 80% des Überstandes
	A	B	
1.	100	70	negativ positiv
2.	70	40	

Aus allen diesen Versuchen zur biologischen Bestimmung der Sedimentations-Konstanten des infektiösen Prinzips der NS-Fractionen ergibt sich ein Wert, der innerhalb der für den RNS-Gradienten A

¹² P. GIEBLER, Z. Naturforschg. 13 b, 238 [1958].

ermittelten Größenordnung liegt. Daraus ergibt sich dann weiter unter Berücksichtigung der Viskositätszahl des RNS-Anteils der NS-Fractionen ein wahrscheinliches Mol.-Gew. für die infektiöse Komponente von ca. $2 \cdot 10^6$, innerhalb der Grenzen ca. $1 \cdot 10^6$ bis $3 \cdot 10^6$.

II. Chemische Eigenschaften der NS-Fractionen

1. Das Verhalten gegenüber RNase und DNase

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die physikalischen Daten ergaben, daß sowohl RNS wie DNS in den NS-Fractionen enthalten waren, und daß das infektiöse Prinzip sehr ähnliche Sedimentations-Eigenschaften besaß, wie sie von GIERER für die RNS aus TMV beschrieben wurden, war es notwendig, die Empfindlichkeit des infektiösen Prinzips von NS-Fractionen gegenüber RNase und DNase eingehend zu prüfen. Aus den Ergebnissen mußte sich dann im Zusammenhang mit den physikalischen Eigenschaften des infektiösen Agens der NS-Fractionen ergeben, ob es sich hierbei um RNS- oder DNS-Moleküle handelt.

Einzelne Verdünnungen einer NS-Fraktion wurden mit jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen von DNase und einer Konzentration von RNase für 15 Min. bei $+10^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend im Infektionstest geprüft. Dieser wurde mit je 10 Eiern/NS-Fraktions-Verdünnung und pro Enzym-Konzentration durchgeführt. Beide Verdünnungsreihen waren nach Potenzen von 10 angesetzt.

Behandlung	$\log LD_{50}/\text{cm}^3$
Kontrolle	2,86
RNase 0,01 γ/cm^3	0
DNase 1,0 γ/cm^3	3,45
DNase 0,1 γ/cm^3	3,13
DNase 0,01 γ/cm^3	3,39

Tab. 5. Der Einfluß von RNase und DNase auf die Infektiosität einer NS-Fraktion.

Das Ergebnis ist in Tab. 5 gezeigt. Die Behandlung mit RNase hatte den völligen Verlust der Infektiosität zur Folge, während sämtliche geprüften DNase-Konzentrationen die Infektiosität gegenüber der Kontrolle sogar noch etwas zu steigern schienen. In einem weiteren Versuch wurde festgestellt, daß bei gleicher Inkubations-Temperatur und -Dauer

0,001 γ RNase/ cm^3 die Infektiosität einer NS-Fraktion zwar nicht mehr vollständig, aber immer noch um 60% zu zerstören vermögen.

RNase besitzt also eine um wenigstens 1000-mal größere Wirkung auf die Infektiosität als DNase, woraus sich ergibt, daß das infektiöse Material in den NS-Fractionen aus RNS besteht, die zumindest in einer außerordentlich RNase-empfindlichen Anordnung vorliegen muß.

2. Die chemische Zusammensetzung der NS-Fractionen

a) Die Reaktion auf Desoxyribose

Auf Grund der Viskositäts- und Sedimentations-Messungen war schon das Vorhandensein von DNS in den NS-Fractionen ermittelt worden. Durch die Ausmessung der relativen Anteile der drei Gradienten, die in der analytischen Ultrazentrifuge beobachtet werden können, war für die Bande C, die auf DNS zurückgeht, eine Konzentration von etwa 25% der Gesamt-NS vermutet worden.

Genauere Daten über den DNS-Gehalt von NS-Fractionen wurden durch die Reaktion mit Disches Reagens gewonnen, bei der die Desoxyribose bestimmt wird (s. Material und Methoden). Sämtliche damit geprüften NS-Fractionen hatten einen DNS-Gehalt, der bei rohen Präparaten um 25%, bei alkohol-präzipitierten NS-Fractionen durchschnittlich bei 37% lag. Diese Zahlen beziehen sich auf den Gewichtsanteil der DNS an der gesamten Nucleinsäure-Menge, die auf Grund der Extinktion der NS-Fractionen bei 258 $m\mu$ errechnet wurde.

Die Auswirkung der Alkohol-Präzipitation auf die DNS-Konzentration der NS-Fractionen ist in Tab. 4 gezeigt. Durch die Alkohol-Präzipitation tritt praktisch kein Verlust an DNS auf, dagegen nimmt die restliche Nucleinsäure, die als RNS angenommen werden darf, um durchschnittlich etwa 40–50% ab.

b) Die Eiweiß-Reaktion

Die Messung der UV-Absorption von NS-Fractionen, die Bestimmung des Extinktions-Verhältnisses E_{258}/E_{280} sowie der Vergleich zwischen berechnetem und gefundenem Stickstoff-Gehalt hatten angezeigt, daß in den rohen NS-Fractionen ein stickstoff-haltiges Material vorkommt, das nicht Nucleotid-Charakter besitzt. Durch die Fällung der NS-Fractionen mit Alkohol konnte dieses Material weitgehend entfernt werden.

Die modifizierte Biuret-Reaktion (s. Material und

Methoden) gibt nach SCHUSTER bei einer Mindestmenge von 50 γ Protein/cm³ noch einen positiven Ausfall¹³.

Sämtliche geprüften rohen NS-Fractionen zeigten einen positiven Ausfall der Reaktion, während bei sämtlichen geprüften alkohol-präzipitierten NS-Fraction die Reaktion negativ verlief. Legt man die gesamte NS-Menge einer Fraction als Bezugswert zugrunde, so ergibt sich in jedem Fall, daß die alkohol-präzipitierten Fractionen weniger als 2% Protein besitzen. Die höchste hierbei untersuchte NS-Konzentration einer alkohol-präzipitierten Fraction war 2,98 mg NS/cm³, was also bei negativem Ausfall der Biuret-Reaktion einer maximalen Protein-Verunreinigung von weniger als 1,7% entspricht.

Durch diese Daten wird die Vermutung gestützt, daß es sich bei den stickstoff-haltigen Verunreinigungen roher NS-Fractionen um Aminosäuren oder kleine Peptide handelt, die durch Alkohol nicht präzipitiert und deshalb von den fällbaren Nucleinsäure-Molekülen getrennt werden können.

c) Die Zucker-Reaktion

Bei der Viskositäts-Messung hatte es sich gezeigt, daß selbst nach mehrstdg. Inkubation einer NS-Fraction mit DNase und RNase eine Rest-Viskosität zurückblieb, die auf andere visköse Substanzen als NS zurückgehen mußte. Protein war weitgehend auszuschließen, da es sich um eine durch Alkohol-Präzipitation gereinigte Fraction gehandelt hatte.

Andererseits gehen aber bei der Behandlung mit Phenol auch hochpolymere Zucker z. T. in die wäßrige Phase über¹⁴. Es war also durchaus wahrscheinlich, daß neben RNS und DNS auch noch hochmolekulare Polysaccharide vorhanden waren.

	Gesamt-NS [γ /cm ³]	DNS [γ /cm ³]	DNS-Gehalt [%]	RNS [γ /cm ³]	Verlust RNS [%]
Vor Alkohol-Präzipitation	2588	615	24	1973	
Nach tation	1822	606	33	1216	38
Vor Alkohol-Präzipitation	4180	1150	27,5	3030	
Nach tation	2510	1000	40	1510	50

Tab. 6. Gesamt-NS, DNS- und RNS-Anteil von NS-Fractionen und der Einfluß der Alkohol-Präzipitation.

Zu ihrem Naweis beschränkten wir uns auf eine grob quantitative Bestimmung des Gesamt-Zucker-Gehaltes einer NS-Fraction nach der Methode von TILLMANN und PHILIPPI (s. Material und Methoden).

Bei einer alkohol-präzipitierten NS-Fraction mit einer gesamten NS-Konzentration von 2,5 mg/cm³ wurden 1,9 mg Glucose-Äquivalente/cm³ gefunden. Durch die Ribose und Desoxyribose der Nucleinsäuren waren aber nur 60% davon, nämlich 1,16 mg Glucose-Äquivalente/cm³ gedeckt, wenn für beide Nucleinsäure-Typen ein Gewichtsanteil des Zuckers von 46% angenommen wird. Der gesamte Zucker-gehalt der NS-Fraction überstieg also den auf Nucleinsäure-Zucker zurückgehenden Wert um 40 Prozent. Diese Polysaccharide müssen hochmolekular sein, da sie erstens eine relativ hohe Viskosität besitzen und zweitens durch Alkohol-Präzipitation nicht entfernt werden.

Diskussion

In einer früheren Mitteilung hatten wir über ein Verfahren berichtet, aus Gehirnen von Mäusen, die an einer Infektion mit EEE-Virus zugrunde gegangen waren, mittels Phenol in der Kälte eine nucleinsäure-haltige Fraction zu gewinnen, die infektiös ist, aber sehr wahrscheinlich keine intakten Virusteilchen mehr enthält⁴.

Es wurde nun festgestellt, daß solche nucleinsäure-haltigen Fractionen sich auch aus virus-infizierten Hühnerembryonen extrahieren lassen. Die leichte Gewinnung beliebiger Mengen dieses Ausgangsmaterials ermöglichte detailliertere Untersuchungen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften solcher NS-Fractionen.

In der analytischen Ultrazentrifuge waren drei Gradienten zu beobachten, die im Text mit A, B und C bezeichnet sind. A und B gehen auf RNS, C auf DNS zurück. Bei Extrapolation der Sedimentations-Konstanten $c \rightarrow 0$ ergaben sich folgende Werte für die drei Gradienten:

$$A \sim 30 - 32 \text{ S}; \quad B \sim 19 \text{ S}; \quad C \sim 12 \text{ S}.$$

Die Ribonucleinsäuren A und B stimmen nach ihrem Verhalten im Schwerefeld mit denjenigen überein, die GIERER¹¹ neuerdings aus Mikrosomen von Rattenlebern und normalen Tabakblättern isoliert hat. Auch die Viskositätszahl seiner Präparate ist mit

¹³ H. SCHUSTER, W. ZILLIG u. G. SCHRAMM, Z. Naturforschg. **11 b**, 339 [1956].

¹⁴ O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ u. F. BISTER, Z. Naturforschg. **7 b**, 148 [1952].

$[\eta] = 100$ sehr ähnlich mit dem Wert von $[\eta] = 95$, der für die Gesamt-RNS unserer NS-Fractionen ermittelt wurde. Außer den beiden Ribonucleinsäuren A und B fanden sich noch kleinemolekulare Ribonucleotide in den Fractionen. Diese repräsentieren etwa 40–50% der gesamten RNS.

Im Gegensatz zum RNS-Anteil scheint die DNS in den Fractionen von einheitlich hohem Mol.-Gew. zu sein.

Neben RNS- und DNS-Fractionen konnten noch folgende Komponenten nachgewiesen werden:

1. Ein stickstoff-haltiges, biuretpositives, kleinemolekulares Material, das im UV-Licht von 280 m μ Wellenlänge absorbiert und als aus Aminosäuren oder kleinen Peptiden bestehend angesehen wird. Es enthält etwa 40–50% des Gesamt-Stickstoffes einer NS-Fraction.

2. Eine hochmolekulare, visköse Zuckerkomponente, die 40% der gesamten Glucose-Äquivalente einer NS-Fraction darstellt.

Versetzt man NS-Fractionen mit 2 Volumenteilen Äthanol, so werden die Ribonucleinsäuren A und B, die gesamte DNS sowie die Zuckerkomponente präzipitiert, während die kleinemolekularen Ribonucleotide und das biuretpositive Material im Überstand bleiben. Die Präzipitate lösten sich leicht in 0,02-m. Phosphatpuffer und ergaben die sogenannten „alkohol-präzipitierten NS-Fractionen“, in denen keine Verunreinigungen mit Protein nachgewiesen werden konnten. Ihr chemisch ermittelter Stickstoff stimmte praktisch vollkommen mit dem überein, der sich aus der Extinktion im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 258 m μ errechnen läßt.

Das Hauptinteresse der Untersuchungen konzentrierte sich auf den RNS-Anteil A der NS-Fractionen,

da sein physikalisches Verhalten außerordentlich ähnlich mit demjenigen infektiöser RNS aus TMV ist^{9, 16}. Tatsächlich zeigte die Mischung einer NS-Fraction und einer infektiösen RNS aus TMV zu gleichen Teilen keinen zusätzlichen Gradienten in der analytischen Ultrazentrifuge und der etwas ausgeprägtere Gradient A blieb einheitlich. Durch Verfolgen der Sedimentation des infektiösen Prinzips konnte nun wahrscheinlich gemacht werden, daß dieses im Gradienten A enthalten ist. Da das infektiöse Prinzip außerordentlich empfindlich gegenüber RNase ist, darf es wohl als RNS der entsprechenden Größe bezeichnet werden. Diese ergab sich aus der Sedimentations-Konstante für A = 30–32 S und der Viskositätszahl für die Gesamt-RNS der NS-Fractionen $[\eta] = 95$. Danach besitzt die RNS A und damit wahrscheinlich auch die infektiöse RNS ein Mol.-Gew. von etwa $2 \cdot 10^6$, die RNS B ein solches von etwa $0,6 \cdot 10^6$.

Die Übereinstimmung mit den Mol.-Gew., die von GIERER für die infektiöse RNS aus Tabakmosaik-Virus (TMV)^{9, 16} und die RNS aus Mikrosomen und normalen Tabakblättern¹¹ nach derselben Methode ermittelt wurden, ist auffällig. Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß die infektiöse RNS des tierpathogenen EEE-Virus ein sehr ähnliches Mol.-Gew. zu besitzen scheint, wie die infektiöse RNS aus dem pflanzenpathogenen TMV.

Herrn Professor Dr. W. SCHÄFER danke ich für sein stetes Interesse und die von ihm erfahrene Förderung der Arbeit, Herrn Dr. A. GIERER für seine wertvollen Hinweise, Diskussionen und Ratschläge, Herrn P. GIEBLER für die Durchführung und Berechnung der Experimente zur Bestimmung der Sedimentations-Konstanten. Meiner langjährigen Assistentin Frau I. MUSSGAY bin ich für ihre unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet. Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

¹⁵ E. CHARGAFF u. J. N. DAVIDSON, in: *The Nucleic Acids*, Volume II, New York 1955.

¹⁶ A. GIERER, *Z. Naturforsch.* **13b**, 485 [1958].