Untersuchungen über die hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Teilchen der Influenza-Viren

II. Mitt.: Vergleichende Untersuchungen über die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften der Teilchen *

Von RUDOLF ROTT und WERNER SCHÄFER

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforsch. 16b, 310—321 [1961]; eingegangen am 3. März 1961)

Die *zellgebundenen Hämagglutinine* (ZGHA) der klassischen Geflügelpest und Influenza haben wesentliche Merkmale mit den Mikrosomen gemeinsam. Sie gleichen diesen morphologisch, besitzen Glucose-6-Phosphatase-Aktivität und enthalten ribosomenähnliche Partikel. Im Gegensatz zu den infektiösen Virus-Partikeln bzw. deren Hämagglutinin sind sie nicht in der Lage, eine Immunität zu erzeugen; sie besitzen auch nicht die Fähigkeit, homologe Interferenz auszulösen. Ihre spezifische Hämagglutinations- und Neuraminidase-Aktivität entspricht derjenigen infektiöser Viruspartikel. Für sie wird die Bezeichnung „*Viromikrosomen*“ vorgeschlagen.

Die *Inkompletten Formen* (v. MAGNUS) der klassischen Geflügelpest und Influenza sind zwar polymorpher als die infektiösen Partikel, haben aber trotzdem gewisse Oberflächeneigenschaften mit diesen gemeinsam. Sie enthalten ein Hämagglutinin, das dem der letzteren entspricht und können wie diese Immunität und Interferenz erzeugen; ihr g-Antigengehalt ist jedoch geringer. Es wird vermutet, daß sie ähnlich wie die infektiösen Viruspartikel an der Zellperipherie gebildet werden.

Wie schon in der ersten Mitteilung ausgeführt¹, lassen sich bei den Influenza-Viren — wenn man von ihren Spaltprodukten und den inaktivierten Virusteilchen absieht — mindestens zwei Arten von hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Partikeln unterscheiden.

Die eine Art von Teilchen soll als *Inkomplette Formen* bezeichnet werden. Sie treten vor allem dann auf, wenn man die Influenza-Viren nach v. MAGNUS² in unverdünnten Passagen weiterführt und werden von den Wirtszellen spontan in das umgebende Medium ausgeschieden³. Die andere Art von hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Partikeln ist in den infizierten Zellen enthalten und wird erst nach deren Zerstörung frei⁴⁻⁶. Sie wurden früher unter den verschiedensten Bezeichnungen, u. a. auch als Inkomplette Formen, beschrieben, später von uns als zellgebundene, hämagglutinierende-nichtinfektiöse Teilchen (zellgebundene Hämagglutinine = ZGHA) bezeichnet¹.

In der vorliegenden Arbeit werden ZGHA und Inkomplette Formen eines vom Menschen isolierten Influenza-A-Virus und des Virus der Klassischen Ge-

flügelpest (KP) eingehender miteinander verglichen. An Hand der gewonnenen Ergebnisse soll dann versucht werden, Klarheit über Ursprung und Bedeutung der beiden hämagglutinierenden Einheiten zu gewinnen.

Material und Methoden

1. Virus-Stämme

Die Versuche wurden mit dem Influenza-Stamm FM1, A₁/1954⁷, und dem KP-Stamm „Rostock“⁸ durchgeführt. Für die Passagen wurden 11 Tage lang bebrütete, befruchtete Hühnereier verwendet, die durch Injektion von etwa 10¹–10² ID₅₀ infiziert wurden.

2. Antiseren

Für die *Hämagglutinations(HA)-Hemmungsreaktion* wurden Frettchen- bzw. Hühnerseren verwendet. Das FM1-Frettchenserum wurde uns von Dr. DAVENPORT, Ann Arbor/USA, überlassen (l. c.⁷). Die Herstellung des von Hühnern gewonnenen KP-Antiserums wurde bereits früher ausführlicher beschrieben⁹.

Für die *Komplementbindungs(KB)-Reaktion* wurden ausschließlich Mäuse-Seren verwendet, die nach der von SCHÄFER¹⁰ beschriebenen Methode gewonnen wurden.

* In der 1. Mitteilung wurde versehentlich die Literaturstelle 3 falsch zitiert; es muß hier heißen: Literatur siehe A. ISAACS, in: *The Viruses*, Vol. III, p. 111, Academic Press, New York—London 1959.

¹ R. ROTT u. W. SCHÄFER, Z. Naturforsch. 15b, 691 [1960].

² P. VON MAGNUS, *Advances in Virus Research* 2, 59 [1954].

³ A. ISAACS, in: *The Viruses*, Vol. III, p. 111, Academic Press, New York—London 1959.

⁴ W. SCHÄFER, W. ZILLIG u. K. MUNK, Z. Naturforsch. 9b, 329 [1954].

⁵ W. SCHÄFER, Arch. exp. Vet. Med. 9, 218 [1955].

⁶ A. GRANOFF, *Virology* 1, 516 [1955].

⁷ F. M. DAVENPORT, R. ROTT u. W. SCHÄFER, J. exp. Medicine 112, 765 [1960].

⁸ W. SCHÄFER u. G. SCHRAMM, Z. Naturforsch. 4b, 123 [1949].

⁹ R. ROTT u. W. SCHÄFER, Zbl. Vet. Med. 7, 237 [1960].

Sämtliche Antiseren wurden 30 Min. lang bei 56 °C inaktiviert.

3. Lösungsmittel

Wenn nicht anders vermerkt, wurde als Lösungsmittel 0,15-m. NaCl verwendet, dessen p_H durch 0,02-m. Phosphatpuffer auf 7,2 eingestellt war.

4. Erzeugung Inkompletter Formen

Inkomplette Formen wurden aus embryonierten Hühnereiern und beim KP-Virus in einigen Fällen aus Gewebekulturen embryonaler Hühnerzellen gewonnen. Nähere Angaben darüber sind in der 1. Mitteilung enthalten¹.

5. Isolierung und Reinigung der hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Teilchen und der infektiösen Viruspartikel

Die ZGHA wurden aus Homogenaten infizierter Chorioallantois-Membranen durch Adsorption-Elution an bzw. von Hühnererythrozyten isoliert und anschließend durch fraktionierte Zentrifugierung (60 Min. π 11 18,5 und 30 Min. π 7,5) die infektiösen Partikel weitgehend von ihnen abgetrennt. Vor Zugabe der Hühnererythrocyten wurde das Gewebe-Homogenat mit ca. 5 Einheiten RDE/cm³ 1 Stde. bei 37 °C bebrütet.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der *Inkompletten Formen* diente Allantois- bzw. Gewebekultur-Flüssigkeit der dritten unverdünnten Passage. Die Reinigungsprozedur entsprach derjenigen, die bei den ZGHA angewendet wurde.

In prinzipiell ähnlicher Weise (nähere Angaben s. l. c.¹²) wurden auch die *infektiösen Viruspartikel* aus Allantois-Flüssigkeit embryonierter Hühnereier, die mit Standard-Passage infiziert worden waren, isoliert. Bei Standard-Passagen wurden die Hühnereier mit 10⁴ bis 10² ID₅₀ infiziert.

6. Darstellung von Mikrosomen aus normalen Chorioallantois-Membranen

Die Mikrosomen wurden im Prinzip nach HOGEBOOM und Mitarbb.¹³ bzw. PALADE und SIEKEVITZ^{13a} (nähere Angaben s. l. c.¹⁴) isoliert. Als Ausgangsmaterial wurden Chorioallantois-Membranen 13 Tage alter Hühnerembryonen verwendet. Die Membranen wurden in eiskalter 0,25-m. Saccharose-Lösung gewaschen, mit der Schere zerkleinert und 2 Min. in einem Glasmörser homogenisiert. Als Homogenisationsmedium diente eine Lösung, die 0,25-m. Saccharose, 0,025-m. KCl, 0,005-m. MgCl₂ und 0,05-m. Trispuffer (p_H 7,6) enthielt. Die

schwereren Zellbestandteile wurden durch 25 Min. langes Zentrifugieren bei π 4,6 abgetrennt, die Mikrosomen dann aus dem Überstand durch 30 Min. langes Zentrifugieren bei π 25 abgeschleudert und anschließend bei gleichem π nochmals gewaschen.

7. Isolierung von Ribosomen

In den Fällen, in denen Ribosomen aus den ZGHA isoliert werden sollten, wurden diese aus Chorioallantois-Membranen infizierter, aber noch nicht abgestorbener Embryonen gewonnen und, wie vorher beschrieben, gereinigt. Aufgenommen wurden sie in einer Lösung, die 0,08-m. NaCl, 0,025-m. KCl, 0,005-m. MgCl₂ und 0,05-m. Trispuffer (p_H 7,6) enthielt. Zu den gereinigten ZGHA-Konzentraten wurde Trichlorfluoräthan („Arcton 63“, Imperial Chemical Industries Ltd., London) im Verhältnis 2 : 1 zugesetzt und die Mischung dann 3 Min. in der Kälte möglichst hart und frequent in einer Maschine geschüttelt (ca. 250 bis 300 Hübe pro Min.). Die wäßrige und organische Phase wurden darauf durch 10 Min. langes Zentrifugieren bei 3000 Upm getrennt und die organische Phase dann erneut mit Salzlösung (s. oben) ausgeschüttelt. Die danach vorhandenen wäßrigen Phasen wurden vereinigt und ein weiteres Mal mit „Arcton“ geschüttelt. Schließlich schleuderten wir die in der zuletzt erhaltenen wäßrigen Phase vorliegenden Partikel 2 Stdn. bei π 66 aus und nahmen sie in der MgCl₂-haltigen Salzlösung auf.

In analoger Weise wurden die Ribosomen aus normalen Mikrosomen gewonnen.

8. Behandlung mit Äther

Zur Spaltung der Inkompletten Formen und der ZGHA mit peroxydfreiem Äther wurde — sofern nichts anderes angegeben — das von LIEF und HENLE¹⁵ beschriebene Verfahren angewendet.

9. Biologische Virusteste

Die *Infektiosität* wurde zumeist im bebrüteten Hühnerei ausgetestet (nähere Angaben s. l. c.⁹); beim KP-Virus kam daneben der Plaque-Test zur Anwendung, für den wir embryonale Hühnerzellen benutzten¹⁶.

Die *HA-* und *HA-Hemmungs-Reaktion* wurden mit Hühner-Erythrozyten in der früher beschriebenen Standard-Methode durchgeführt⁷.

Für die *KB-Reaktion* wurde eine Modifikation⁷ der von FULTON und DUMBELL¹⁷ beschriebenen Mikromethode verwendet.

Um die *immunisierende Aktivität* der verschiedenen Präparate (ZGHA, Inkomplette Formen, infektiöses Virus) miteinander vergleichen zu können, wurden diese

¹⁰ W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. **10b**, 81 [1955].

¹¹ P. GIEBLER, Z. Naturforschg. **13b**, 238 [1958].

* Behring-Werke, Marburg/Lahn.

¹² W. ZILLIG, W. SCHÄFER u. S. ULLMANN, Z. Naturforschg. **10b**, 199 [1955].

¹³ G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER u. G. E. PALADE, J. biol. Chemistry **172**, 619 [1948].

^{13a} G. E. PALADE u. P. SIEKEVITZ, J. Biophys. Biochem. Cytol. **2**, 171 [1956].

¹⁴ P. K. VOGT, Z. Naturforschg. **15b**, 218 [1960].

¹⁵ F. S. LIEF u. W. HENLE, Virology **2**, 772 [1956].

¹⁶ E. WECKER u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. **11b**, 181 [1956].

¹⁷ F. FULTON u. K. R. DUMBELL, J. gen. Microbiol. **3**, 97 [1949].

zunächst auf gleiche HA-Titer eingestellt und darauf aus ihnen Formolvakzinen hergestellt. Zu diesem Zweck wurde den Präparaten Formaldehyd (Endkonzentration 0,04%) zugefügt und das Gemisch dann 2 Tage lang bei 4 °C unter gelegentlichem Umschütteln gehalten. Die Vakzinen wurden darauf durch Verimpfen auf embryonierte Hühnereier (5 Eier pro Vakzine; Dosis: 0,1 cm³) auf Unschädlichkeit geprüft. Der Sicherheit halber wurde die Eiflüssigkeit dieser Eier in einer Verdünnung von 10⁻³ noch über eine weitere Passage in Eiern geführt. Bei Präparaten des FM1-Virus wurde außerdem das Material intranasal auf Mäuse verimpft (5 Mäuse pro Vakzine; Dosis: 3 Tropfen). Irgendwelche Hinweise für das Vorliegen von aktivem Virus wurden in keinem Falle gefunden.

Die Wirksamkeit der Vakzinen testeten wir an Mäusen aus (4–6 Wochen alt), die aus einer hochingezüchteten, eigenen Kolonie stammten. Die Impfstoffe wurden dafür nach Potenzen von 4 verdünnt und mit jeder Verdünnungsstufe 8 Mäuse subcutan geimpft. Impfdosis: 0,1 cm³. Die Testinfektion erfolgte 11 Tage später intranasal (FM1) bzw. subcutan (KP) mit etwa 10⁵ ID₅₀ (ermittelt im Mäusetest). Zu diesem Zweck wurden bei FM1 und KP Stämme verwendet, die der Maus adaptiert waren. Der FM1-Stamm hatte 78 Mäuselungen-Passagen, der KP-Stamm 118 Mäusegehirn-Passagen durchlaufen (l. c.¹⁰). 10 Tage nach der Testinfektion wurden die Versuche abgeschlossen. Bei den Immunisierungsversuchen mit FM1-Material töteten wir die überlebenden Mäuse und registrierten deren Lungenbefund. Bei den Versuchen mit KP richtete sich die Beurteilung des Versuches ausschließlich nach der Zahl der gestorbenen Mäuse.

10. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die *Neuraminidase-Aktivität* wurde nach der von MOHR und SCHRAMM¹⁸ angegebenen Methode bestimmt.

Die *Glucose-6-Phosphatase-Aktivität* wurde nach ASHMORE und NESBETT¹⁹ ermittelt. Die Ansätze [0,1 cm³ 0,2-m. Glucose-6-Phosphat (Firma Boehringer, Mannheim), 0,2 cm³ Testmaterial in 0,1-m. Citratpuffer, pH 6,2, 0,2 cm³ Citrat-Puffer] wurden 60 Min. bei 30 °C gehalten und nach Zugabe einer gleichen Menge 20-proz. Trichloressigsäure 10 Min. bei 4000 Upm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,1 cm³ zur Bestimmung des anorganischen P benutzt. Der Phosphorgehalt wurde kolorimetrisch im Eppendorf-Photometer nach ERNSTER und Mitarbb.²⁰ ermittelt.

11. Chemische Analysen

Die *Ribonucleinsäure (RNS)* wurde mit dem Orzin-Reagenz bestimmt. Hierfür wurde 1 cm³ Probelösung mit 2 cm³ rauchender HCl, die 0,04% FeCl₃ und 8 mg Orzin enthielt, versetzt und 15 Min. lang bei 100 °C gehalten. Die Extinktion bei 660 mμ wurde im Spektralphotometer der Firma Zeiss gemessen.

Der *Stickstoff* wurde mit Hilfe der Mikromethode von Kjeldahl quantitativ bestimmt.

12. Bestimmung der Sedimentationskonstanten

s₂₀ wurde in der Spinco-Ultrazentrifuge Modell E gemessen. Die Darstellung der Sedimentationsgradienten erfolgte nach der Methode von Philpot und Svensson.

13. Elektronen-optische Untersuchungen

Bei den elektronen-optischen Untersuchungen wurde wie in der 1. Mitteilung beschrieben¹ verfahren.

Ergebnisse

A. Zellgebundenes Hämagglutinin (ZGHA)

1. Physikalisches Verhalten und Aufbau

Wie schon früher nachgewiesen^{4,6}, sinken die ZGHA der Influenza-Viren im Schwerfeld langsamer ab als die infektiösen Viruspartikel. In der *analytischen Ultrazentrifuge* sedimentieren sie im allgemeinen mit einem relativ breiten, schnell verflachenden Gradienten. Nach unseren früheren Messungen liegt s₂₀ der ZGHA des KP-Virus aus Hühnerembryonen zwischen 60 und 400 S (l. c.⁴). Eine ähnlich große Streuung der Werte wurde nunmehr auch bei der analytischen Untersuchung der ZGHA aus infizierten Eihäuten gefunden. Untersucht wurden ZGHA aus Eihäuten, die mit Standard-Passage sowie zweiter unverdünnter Passage des Influenza-Virus bzw. mit Standard-Passage des KP-Virus beimpft wurden. Die Sedimentationskonstanten (siehe Tab. 1) liegen hier zwischen 85 und 250 S. Ein zweiter Gradient bildete sich in keinem Falle aus. Das war aber der Fall, sobald man den Präparaten von ZGHA ausreichende Mengen von gereinigtem Virus zusetzte. Es war dann regelmäßig ein weiterer, schneller absinkender Gradient zu beobachten, dessen s₂₀ zwischen 600 und 700 S lag (s. Abb. 1).

Die ersten *elektronen-mikroskopischen Aufnahmen* von ZGHA wurden etwa gleichzeitig von WERNER und SCHLESINGER²¹ bei Influenza-Stämmen und von SCHÄFER und Mitarbb.⁴ beim KP-Virus veröffentlicht. Sie zeigten schon, daß die ZGHA sich auch elektronenoptisch von den infektiösen Viruspartikeln

¹⁸ E. MOHR u. G. SCHRAMM, Z. Naturforschg. **15b**, 568 [1960].

¹⁹ J. ASHMORE u. F. B. NESBETT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **89**, 78 [1955].

²⁰ L. ERNSTER, R. ZETTERSTRÖM u. O. LINDBERG, Acta chem. scand. **4**, 942 [1950].

²¹ G. H. WERNER u. R. W. SCHLESINGER, J. exp. Medicine **100**, 203 [1954].

Bildunterschriften siehe Rückseite

Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen. a) ZGHA von KP; b) ZGHA von Influenza (FM/1) ; c) Mikrosomen aus nicht-infizierten Chorioallantois-Membranen; d) Ribosomen-ähnliche Partikel aus Mikrosomen nicht-infizierter Chorioallantois-Membranen; e) Ribosomen-ähnliche Partikel aus ZGHA von KP; f) Ribosomen-ähnliche Partikel aus ZGHA von Influenza; g) Ribosomen-ähnliche Partikel aus ZGHA von KP *nach* Behandeln mit 0,01-*m.* Versen; h) Ribosomen-ähnliche Partikel aus gleichem Präparat wie g) in analoger Konzentration *vor* Behandeln mit Versen; i) Hämagglutinin aus einem Präparat Inkompletter Formen der KP; k) Inkomplette Formen der KP (3. unverdünnte Ei-Passage) ; l) Inkomplette Formen der Influenza (3. unverdünnte Ei-Passage).

Abb. 1. Sedimentationsdiagramme der ZGHA von KP: a) ZGHA; b) ZGHA + Viruskonzentrat. Zentrifugationsdauer: 12 Min.; 7928 Upm.

Virus	Passagen	HA-Einheiten	ID ₅₀ /HA	S ₂₀ [S]
Influenza	Standard	20 800	3,2	150
		20 800	3,7	249
		10 400	2,5	98
		20 800	2,8	200
		20 800	3,6	185
	3. unverdünnte	10 400	2,1	93
		10 400	2,2	125
		20 800	2,9	148
KP	Standard	10 400	2,0	85
		20 800	3,2	190
		20 800	3,7	248
		41 600	3,5	189
		20 800	2,7	160

Tab. 1. Sedimentationskonstanten der ZGHA.

unterscheiden. Um die ZGHA des Influenza- und KP-Virus besser miteinander vergleichen zu können, wurden beide noch einmal parallel aus Eihäuten isoliert, die jeweils mit Standard-Passagen infiziert wa-

ren. In beiden Fällen waren im Elektronenmikroskop (s. Abb. 2 a* und b) flache, runde Gebilde von sehr unterschiedlicher Größe zu sehen, in oder an denen häufig feingranuläre Strukturen erkennbar sind. Die Durchmesser dieser Teilchen schwanken zwischen 50 und 550 mμ. Teilchen der gleichen Art wurden beim Influenza-Virus auch nach Infektion mit zweiter unverdünnter Passage gefunden.

Im Verhalten gegenüber Äther unterscheiden sich die ZGHA ebenfalls von den infektiösen Partikeln. Während bei den letzteren durch Schütteln mit Äther Hämagglutinin und g-Antigen in Freiheit gesetzt werden²², lassen sich nach der gleichen Behandlung bei den ZGHA nur Spuren der entsprechenden Aktivitäten in der wäßrigen Phase nachweisen (s. Tab. 2).

	Material	ID ₅₀ /HA	Äther-behandlung	HA-Einheiten	KB-Aktivität	
					V- und g-Antigen	g-Antigen
Influenza	Virus-partikel	6,8	vor nach	1024 1024	128 192	8 128
	Inkomplette Formen	3,2	vor nach	1024 500	128 128	12 32
	ZGHA	3,7	vor nach	1024 16	128 8	16 <8
KP	Virus-partikel	7,0	vor nach	1200 1200	512 512	8 256
	Inkomplette Formen	3,1	vor nach	1200 600	256 192	16 16
	ZGHA	4,0	vor nach	1200 32	256 16	16 8

Tab. 2. Einfluß der Ätherbehandlung auf HA- und KB-Aktivitäten infektiöser Viruspartikel sowie hämagglutinierender nichtinfektiöser Teilchen.

Auffallend ist die Ähnlichkeit, die morphologisch zwischen den ZGHA und den Mikrosomen normaler Chorioallantois-Membranen besteht (Abb. 2 c). Dies legte den Verdacht nahe, daß es sich bei den ZGHA um Strukturen der infizierten Zellen handelt, die den Mikrosomen normaler Zellen entsprechen, sich von ihnen aber dadurch unterscheiden, daß sie ein hämagglutinierendes Prinzip enthalten.

Die Mikrosomen sind nach der gegenwärtig vorherrschenden Ansicht Bruchstücke des Ergastoplasmas, die beim Homogenisieren der Zellen in Freiheit

* Abb. 2 s. Tafel S. 312 a.

²² W. SCHÄFER u. W. ZILLIG, Z. Naturforschg. 9b, 779 [1954].

gesetzt werden. Sie zeichnen sich gegenüber den anderen Zellfraktionen dadurch aus, daß sie die sogenannten Ribosomen enthalten. Dies sind kugelförmige Teilchen mit einem Durchmesser von 10 bis 15 μ , die bis zu 50% aus RNS bestehen. Abtrennen kann man die Ribosomen von den übrigen Bestandteilen der Mikrosomen nach eigenen Erfahrungen und nach denen anderer Autoren¹⁴ mit Hilfe von „Arcton“. Es wurde geprüft, ob sich mit diesem Verfahren Ribosomen auch in ZGHA-Präparaten nachweisen lassen.

ZGHA-Präparate des Influenza- und KP-Virus sowie eine Mikrosomen-Fraktion normaler Chorioallantois-Membranen wurden mit „Arcton“ behandelt und die danach in der wäßrigen Phase enthaltenen Strukturen elektronenoptisch untersucht.

Teilchen, die den ursprünglich vorhandenen Gebilden glichen, waren danach nicht mehr zu finden. Dafür wurden aber in sämtlichen drei Fällen kleine, kugelförmige Partikel nachgewiesen, die im bedampften Zustand einen Durchmesser von etwa 20 μ haben (Abb. 2 d, e, f). Wenn man die Dicke der Bedampfungsschicht berücksichtigt, dürfte ihr reeller Durchmesser in der Größenordnung von 15 μ liegen. Aus gereinigten, infektiösen Viruspartikeln ließen sich entsprechende Teilchen mit Hilfe von „Arcton“ nicht isolieren.

Das UV-Spektrum unserer Präparate zeigte ein ausgesprochenes Absorptionsmaximum bei 260 μ (vgl. Abb. 3), was dafür spricht, daß in ihnen

Abb. 3. UV-Absorptionsspektrum von ribosomen-ähnlichen Partikeln aus ZGHA der KP.

Nucleinsäure enthalten ist. Nach dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 μ beträgt ihr Gehalt an Nucleinsäure etwa 42 Prozent. Sie besteht nach der chemischen Untersuchung, die allerdings

lediglich bei Präparaten aus ZGHA der KP durchgeführt wurde, ausschließlich aus RNS. Läßt man auf diese Teilchen Versen ($m./100$) bei 20 °C einwirken, so zerfallen sie, wie es bei Ribosomen zu erwarten ist^{13a, 23}. Abb. 2 (g und h) zeigt diesen Effekt bei Teilchen, die aus ZGHA der KP isoliert wurden. Bei den feinen Fäden, die auf der elektronenoptischen Aufnahme zu erkennen sind, dürfte es sich um freie RNS handeln.

Ebenso wie die Ribosomen besteht auch das g-Antigen der Influenza-Viren aus RNS (10–15%) und Protein. Es bestand die Möglichkeit, daß u. a. auch dieses viruspezifische Material in den durch „Arcton“-Behandlung gewonnenen Präparaten enthalten war. Das ist jedoch wenig wahrscheinlich, weil fadenförmige Gebilde, die dem g-Antigen entsprechen könnten (l. c.²²), in unserem Material elektronenoptisch nicht zu finden waren. Darüber hinaus ließ sich durch serologische Untersuchungen mit g-Antigen-spezifischem Antiserum (s. Tab. 3) kein

ZGHA	ID ₅₀ /HA	Arcton-behandlung	HA-Einheiten	KB-Aktivität	
				g + V-Antigen	g-Antigen
Influenza	3,2	vor nach	1024 4	— —	16 <2
KP	3,5	vor nach	1024 2	128 2	16 <2

Tab. 3. Einfluß der „Arcton“-Behandlung auf HA- und KB-Aktivitäten von ZGHA. „Ribosomen“ nicht durch Ultrazentrifugieren angereichert (s. Material u. Methoden 7).

Endvolumen entsprach Ausgangsvolumen.

dem g-Antigen entsprechendes Antigen in unseren Präparaten nachweisen. Eine sehr schwach positive, serologische Reaktion lieferte ein solches Präparat jedoch bei Verwendung eines Antiserums, das Antikörper gegen V-Antigen des betreffenden Influenza-Virus (KP) enthielt. Die hämagglutinierende Aktivität der durch „Arcton“-Behandlung gewonnenen ZGHA-Fractionen war ebenfalls äußerst gering (Tab. 3).

2. Enzymatische Eigenschaften

Um die aufgestellte Hypothese von der Mikrosomen-Natur der ZGHA weiter abzusichern, wurde untersucht, ob die ZGHA *Glucose-6-Phosphatase* ent-

²³ P. O. P. Ts'o, J. BONNER u. J. VINOGRAD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 30, 570 [1958].

halten. Dieses Enzym ist nach Untersuchungen an Lebermaterial²⁴ ein charakteristischer Bestandteil der Mikrosomenfraktion. Es scheint nach LE CLERC²⁵ auch in den Mikrosomen aus Chorioallantois-Membranen von Hühnerembryonen enthalten zu sein.

Für die Prüfung auf Glucose-6-Phosphatase-Aktivität wurden die ZGHA möglichst schnell aufgearbeitet. Auf die Abtrennung der infektiösen Viruspartikel wurde verzichtet. Als Ausgangsmaterial dienten infizierte Eihäute, die wir vor dem Absterben der Embryonen den Eiern entnahmen. Sie wurden mit dem „Starmix“ in der Kälte homogenisiert und die Homogenate dann 30 Min. bei 37 °C mit RDE inkubiert. Nachdem die größeren Zellbestandteile durch kurzes, niedertouriges Zentrifugieren entfernt waren, wurden die hämagglutinierenden Einheiten an Hühnererythrozyten adsorbiert, diese dann dreimal in großen Mengen eisgekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und darauf unter Zusatz von RDE 30 Min. bei 37 °C bebrütet. Die Erythrozyten wurden dann durch 5 Minuten langes Zentrifugieren bei 2000 Upm abgetrennt und die von ihnen eluierten Teilchen durch hochtouriges Zentrifugieren (60 Min. pi 18,5) bei 5 °C konzentriert. Das Material von etwa 300 Eihäuten wurde in 1 cm³ Citratpuffer, pH 6,2, aufgenommen und dieses Konzentrat in der unter Material und Methoden beschriebenen Weise auf Glucose-6-Phosphatase untersucht. Als Kontrollen dienten Eiflüssigkeiten von Standardpassagen, die in analoger Weise aufgearbeitet wurden (Viruspartikel) sowie eine Mikrosomen-Fraktion aus nichtinfizierten Chorioallantois-Membranen, die durch fraktioniertes Zentrifugieren nach HOGEBOM und Mitarbb.¹³ gewonnen wurde (normale Mikrosomen). Außerdem wurde zur Kontrolle noch ein Homogenat von normalen Chorioallantois-Membranen verarbeitet, dem gereinigtes KP-Virus-Konzentrat zugesetzt war (nähere Angaben s. Tab. 4).

Wie aus den in Tab. 4 zusammengestellten Ergebnissen hervorgeht, besaßen die aus infizierten Membranen gewonnenen Fraktionen (ZGHA) regelmäßig eine beachtliche Glucose-6-Phosphatase-Aktivität. Bezogen auf Stickstoff entsprach sie etwa derjenigen, die in Mikrosomenfraktionen aus normalen Chorioallantois-Membranen nachzuweisen war. In den übrigen Kontrollen waren höchstens Spuren des Enzyms zu finden. Bei früheren Untersuchungen waren analoge Feststellungen von SCHÄFER und WECKER bei entsprechenden Fraktionen aus KP-infizierten Hühnerembryonen getroffen worden²⁶.

Demnach sind in den Homogenaten infizierter Embryonen und Eihäute Glucose-6-Phosphatase tra-

Material		ID ₅₀ /HA	N/ml [γ]	freigesetzter anorg. P [γ/ml]
Influenza	ZGHA (Stand. Pass.)	4,8 4,7	620 770	34,0 20,5
	ZGHA (3. Unverd. Pass.)	— 4,1	— —	28,5 44,0
	Inkomplette Formen	— 4,4	— 520	2,5 1,0
	Viruspartikel	6,8	—	1,5
KP	ZGHA (Stand. Pass.)	4,3 4,1	680 880	30,5 26,5
	Viruspartikel	7,0	—	0,5
Normale Mikrosomen		—	1250	33,0
Material aus Mischung von normalem Gewebe- homogenat u. KP-Virus*		7,2	—	2,5

Tab. 4. Glucose-6-Phosphatase-Aktivität von hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Teilchen.

* 350 cm³ 10-proz. Homogenat nicht-infizierter Chorioallantois-Membranen wurden mit einem KP-Viruskonzentrat versetzt (Endkonzentration entsprach 512 HA-Einheiten/cm³) und wie ZGHA aufgearbeitet.

gende Strukturen enthalten, welche an Erythrozyten adsorbiert und von ihnen eluiert werden können. Wegen technischer Schwierigkeiten war es nicht möglich, den eindeutigen Beweis dafür zu erbringen, daß diese Strukturen mit den beschriebenen ZGHA identisch sind. Das ist aber sehr wahrscheinlich, da die aus Eiflüssigkeit isolierten infektiösen Partikel das Enzym nicht besaßen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß dieses von infektiösen Partikeln, die Homogenaten normaler Chorioallantois-Membranen zugesetzt wurden, bei der Aufarbeitung nicht mitgerissen wird (vgl. Tab. 4).

Das in den infektiösen Partikeln der Influenza-Viren enthaltene rezeptorzerstörende Enzym hat — wie die Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben²⁷ — den Charakter einer *Neuraminidase*. Da auch die ZGHA bei 37 °C spontan von Erythrozyten eluieren, war zu erwarten, daß auch sie dieses Enzym enthalten. Der durchgeführte Test zeigte, daß das tatsächlich zutrifft.

Mit Standard-Passagen des Influenza- bzw. KP-Virus infizierte Eihäute wurden in der üblichen Weise auf-

²⁴ J. BRACHET, in: *Biochemical Cytology*, p. 42, Academic Press, New York—London 1957.

²⁵ J. LE CLERC, *Experientia* [Basel] **10**, 251 [1954].

²⁶ W. SCHÄFER, in: *Virus Growth and Variation*, pp. 61, pub-

lished for the Society f. Gen. Microbiol. at the University Press, Cambridge 1959.

²⁷ A. GOTTSCHALK, *Ergebn. Mikrobiol. Immun.-Forsch. u. exp. Therap.* **32**, 1 [1959].

gearbeitet und in den dadurch gewonnenen ZGHA-Präparaten die Enzymaktivität nach MOHR und SCHRAMM¹⁸ bestimmt.

Wie ein Vergleich der ermittelten Werte mit den bei infektiösen Virus-Partikeln gewonnenen Ergebnissen zeigt (Tab. 5), ist die spezifische Enzymakti-

Material	Virus	ID ₅₀ /HA	HA-Einheiten (HAE)	Enzym-Einheiten (EE)	EE/HAE · 10 ⁻²
Viruspartikel	Influenza	6,8	32 000	640	2,0
	KP	6,9	32 000	590	1,8
Inkomplette Formen	Influenza	3,2	16 000	230	1,4
	KP	3,5	32 000	530	1,6
ZGHA	Influenza	3,7	4 100	80	1,9
	KP	3,5	4 100	100	2,4

Tab. 5. Neuraminidase-Aktivitäten infektiöser Viruspartikel und hämagglutinierender-nichtinfektiöser Formen.

vität (bezogen auf HA) der ZGHA praktisch gleich hoch wie die der infektiösen Partikel.

3. Virusspezifische Eigenschaften

Die mit dem verwendeten Verfahren gewonnenen ZGHA-Präparate besaßen regelmäßig eine relativ geringe *Infektiosität*. Die LD₅₀/HA-Verhältnisse lagen zwischen 1,9 und 4,3. Bezogen auf die HA-Aktivität war also ihre Infektiosität 10³–10⁵-mal geringer als diejenige gereinigter Viruskonzentrate. Wahrscheinlich ist die geringe, in den Präparaten nachweisbare Infektiosität auf restliche Viruspartikel zurückzuführen.

Die spezifische *HA-Aktivität* der ZGHA aus Chorioallantois-Membranen lag im Durchschnitt beim Influenza-Virus bei 1,12 · 10⁻⁸ g N/HA, beim KP-Virus bei 1,46 · 10⁻⁸ g N/HA. Die Werte entsprechen denen, die bei ZGHA der KP aus infizierten Embryonen früher ermittelt wurden²⁸. Wie bei den infektiösen Viruspartikeln läßt sich auch bei den Präparaten von ZGHA die hämagglutinierende Aktivität durch Antiseren spezifisch hemmen (siehe Tab. 6).

In der *Komplementbindungs-Reaktion* reagieren sie, wie aus den in Tab. 2 wiedergegebenen Ergebnissen hervorgeht, zwar eindeutig mit einem Serum, das Antikörper sowohl gegen V- wie g-Antigen enthält (KP- bzw. FM1-Rekonvaleszenten-Serum), jedoch nur in sehr geringem Grade mit g-Antigen-spezifischem Antiserum [FM1- (bei KP) bzw. KP- (bei FM1) Rekonvaleszenten-Serum]. Bezogen auf die HA-Aktivität korrespondieren die betreffenden Werte mit denen der Viruspartikel.

Antigen Anti- serum	Influenza			KP		
	Virus	Inkompl.	ZGHA	Virus	Inkompl.	ZGHA
Influenza	2048	2048	1024	< 8	< 8	< 8
KP	< 8	< 8	< 8	8194	4096	4096

Tab. 6. Ergebnisse der HA-Hemmungsreaktionen. Angegeben sind die reziproken Werte der Hemmungstitern.

Auf Grund der Ergebnisse der KB-Reaktion mußte man annehmen, daß die ZGHA zumindest gewisse antigene Komponenten mit den infektiösen Viruspartikeln gemeinsam haben. Bei dem *Immunisierungs-Versuch* an Mäusen ergaben sich jedoch in antigener Beziehung zwischen beiden Teilchenarten auffallende Unterschiede, auf die schon in einer früheren Veröffentlichung über die aus infizierten Hühnerembryonen gewonnenen ZGHA der KP hingewiesen wurde⁵.

Für die neuerdings durchgeführten Immunisierungs-Versuche wurden ZGHA aus Chorioallantois-Membranen verwendet, die mit Standard-Passagen des Influenza- bzw. des KP-Virus infiziert waren. Aus den Präparaten wurden Formol-Vakzinen hergestellt und diese an Mäusen ausgetestet. Als Kontrollen dienten Formol-Vakzinen aus gereinigten Virus-Konzentraten.

Abb. 4. Ergebnisse der Immunisierungs-Versuche mit Viruspartikeln, ZGHA und Inkompletten Formen. ■ Maus verendet; ■, ■, ■ verschiedene Grade der Lungenveränderung bei überlebenden Mäusen; □ keine Lungenveränderungen.

Die Ergebnisse dieser Versuche bringt Abb. 4. Sie zeigen, daß die ZGHA-Vakzinen verglichen mit den Vakzinen aus Viruspartikeln praktisch keine immunisierende Aktivität besaßen.

²⁸ W. SCHÄFER, in: The Nature of Viruses, pp. 91, published for the Ciba Foundation, J. & A. Churchill Ltd., London 1957.

Eine weitere biologische Eigenschaft der Viruspartikel ist ihre Fähigkeit, *Interferenz* zu erzeugen. Diese Eigenschaft lassen die ZGHA ebenfalls vermissen. Für die ZGHA des Influenza-Virus (PR8) wurde dies bereits früher von PAUCKER und HENLE²⁹ nachgewiesen. Das Ergebnis eines Interferenz-Versuches mit ZGHA der KP bringt Tab. 7.

Interferieren des Agens	ID ₅₀ /HA	Ausbeute nach Superinfektion			
		HA-Ein- heiten	gegenüber Kontrolle [%]	PBE [·10 ⁶]	gegenüber Kontrolle [%]
Virus- partikel	7,1	24	9	33	11
Inkomplette Formen	2,9	32	12	41	13
ZGHA	4,3	256	100	290	94
NaCl- Kontrolle	—	256	100	310	100

Tab. 7. Prüfung der hämagglutinierenden nichtinfektiösen Teilchen auf interferierende Fähigkeit.

Der Versuch wurde mit der von TOKUMARU und SCHÄFER³⁰ eingehaltenen Technik in Gewebekulturen embryonaler Hühnerzellen durchgeführt. Das aus infizierten (Standard-Passage) Eihäuten hergestellte ZGHA-Präparat sowie das als Kontrolle benutzte Konzentrat infektiöser Viruspartikel wurden auf gleichen HA-Titer eingestellt (256 HA-Einheiten/cm³) und durch 2 Min. langes Bestrahlen mit UV-Licht inaktiviert³⁰. 6 cm³ dieses Materials wurden jeweils auf die Zellrasen gegeben und verblieben hier 14 Stdn. bei 37 °C. Danach erfolgte die Superinfektion mit etwa 100 bis 200 PBE*/Zelle. 30 Min. nach der Zugabe des infektiösen Virus wurden die Zellrasen 2-mal gewaschen und mit neuem Medium überschichtet. Es wurde dann die Menge der innerhalb 8 Stdn. gebildeten infektiösen und hämagglutinierenden Einheiten bestimmt. In analoger Weise wurde mit einer Kontrolle verfahren, bei der an Stelle von uv-inaktiviertem Virus-Material gepufferte Kochsalzlösung benutzt wurde.

Wie Tab. 7 zeigt, wurden in den mit ZGHA behandelten Kulturen gegenüber der NaCl-Kontrolle 100% an hämagglutinierenden und 94% an plaquebildenden Einheiten gefunden, während die Vergleichswerte für Viruspartikel bei 9 bzw. 11% lagen.

B. Inkomplette Formen

1. Physikalische Eigenschaften und Aufbau

Bis auf wenige Ausnahmen wurden für unsere Untersuchungen Inkomplette Formen der dritten unverdünnten Ei-Passage (Allantoisflüssigkeit) ver-

Abb. 5. Sedimentations-Diagramme von Inkompletten Formen (3. unverdünnte Passage) der KP. a) Inkomplette Formen; b) Inkomplette Formen + Viruskonzentrat. Zentrifugationsdauer: 16 Min.; 7928 Upm.

Virus	HA-Einheiten	ID ₅₀ /HA	s ₂₀ [S]
Influenza	20 800	2,7	451
	10 400	2,2	370
	20 800	2,5	413
	20 800	3,2	483
	20 800	3,5	545
KP	20 800	3,1	437
	20 800	2,7	485
	20 800	3,5	505
	20 800	2,5	358

Tab. 8. Sedimentationskonstanten von Inkompletten Formen.

wendet. Wie die ZGHA sedimentierten auch diese im Schwerfeld der *Ultrazentrifuge* langsamer als die infektiösen Virusteilchen. In Abb. 5 sind die Sedi-

²⁹ K. PAUCKER u. W. HENLE, *Virology* **6**, 198 [1958].

³⁰ T. TOKUMARU u. W. SCHÄFER, *Z. Naturforsch.* **13b**, 704 [1958].

* PBE=Plaque-bildende Einheit.

mentations-Diagramme entsprechender Präparate vor und nach Zugabe von gereinigtem Viruskonzentrat wiedergegeben. s_{20} der Inkompletten Formen war im Durchschnitt höher als s_{20} der ZGHA. Werte unter 350 S wurden niemals gefunden. Sie bewegten sich vielmehr zwischen 358 und 545 S (vgl. Tab. 8).

Im *elektronenoptischen Bild* lassen sich die Inkompletten Formen – im Gegensatz zu den ZGHA – nicht eindeutig von den infektiösen Viruspartikeln unterscheiden. In der Regel fanden wir aber eine relativ große Menge von filamentösen Teilchen. Die vorhandenen runden Teilchen variieren stärker in der Größe als die entsprechenden infektiösen Viruspartikel; außerdem sind sie im allgemeinen flacher. Dies trifft sowohl für die Inkompletten Formen der KP wie für die der Influenza zu (s. Abb. 2 k und l). Inkomplette Formen der KP aus Gewebekulturen embryonaler Hühnerzellen (3. unverdünnte Virus-Passage) entsprechen morphologisch denen aus Allantoisflüssigkeiten.

Schüttelt man derartige Präparate Inkompletter Formen *mit Äther*, so erhält man wie bei den Präparaten infektiöser Virusteilchen in der wäßrigen Phase eine hämagglutinierende Fraktion, deren Aktivität in der Regel nur gering unter der des Ausgangsmaterials liegt (s. Tab. 2). Die freigesetzten Hämagglutinin-Partikel lassen sich, wenn man bei der Ätherbehandlung das Verfahren von SCHÄFER und ZILLIG²² anwendet, nicht von denen infektiöser Viruspartikel unterscheiden. Wie Abb. 2 i zeigt, findet man auch hier wieder die etwa 30 m μ großen Teilchen.

Anders liegen die Verhältnisse beim g-Antigen (s. Tab. 2). Werden infektiöse Viruspartikel mit Äther geschüttelt, so steigt der entsprechende serologische Titer in der wäßrigen Phase 16- bis 32-fach an; führt man die gleiche Behandlung bei Präparaten Inkompletter Formen durch, so wird, wenn überhaupt, ein wesentlich geringerer Anstieg beobachtet. Diese Feststellungen decken sich mit denen, die LIEF und HENLE³¹ bzw. PAUCKER und Mitarbb.³² beim Influenza-Virus machten. Elektronenoptisch wurden in unseren Aufarbeitungen (Methode s. l. c.²²) praktisch keine Strukturen gefunden, die dem g-Antigen entsprachen.

Von den ZGHA unterscheiden sich die Inkompletten Formen auch durch ihr *Verhalten gegenüber „Arcton“*. Während bei den ZGHA durch Behandeln

mit „Arcton“ ribosomen-ähnliche Partikel in Freiheit gesetzt werden, sind Strukturen ähnlicher Art nach einer entsprechenden Behandlung der Inkompletten Formen nicht zu finden; wohl aber ließen sich hier größere Mengen der schon ursprünglich vorhandenen Gebilde feststellen, die morphologisch an die Viruspartikel erinnern.

2. Enzymatische Eigenschaften

Da durch die bisher beschriebenen Untersuchungen keine Hinweise dafür gewonnen wurden, daß die Inkompletten Formen mikrosomenähnliche Eigenschaften haben, war auch nicht zu erwarten, daß sie das für die Mikrosomen charakteristische Enzym, die *Glucose-6-Phosphatase*, enthalten.

Die in dieser Richtung laufenden Prüfungen wurden mit Materialien der dritten, unverdünnten Passage durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils etwa 3 l Allantoisflüssigkeit, die – wie vorher beschrieben (s. S. 315) – aufgearbeitet wurden.

Die Ergebnisse sind mit denen der übrigen Glucose-6-Phosphatase-Bestimmungen in Tab. 4 aufgeführt. Sie lassen erkennen, daß in den untersuchten Präparaten höchstens Spuren von Glucose-6-Phosphatase enthalten waren, wobei man noch berücksichtigen muß, daß der anorganische Phosphor bestimmt wurde und dieser in geringen Mengen auch aus anderen Quellen herkommen kann.

Die spezifische *Neuraminidase-Aktivität* der Inkompletten Formen stimmt, wenn man die Fehlerbreite des Testes berücksichtigt, mit der der infektiösen Virusteilchen und der ZGHA überein (siehe Tab. 5).

3. Virusspezifische Eigenschaften

Das ID₅₀/HA-Verhältnis unserer Präparate Inkompletter Formen von Influenza und KP schwankte zwischen 2,0 und 3,9. Auch hier muß vorerst die Frage noch offen bleiben, ob die Inkompletten Formen noch eine gewisse *Infektiosität* besitzen oder ob die bei unseren Präparaten stets nachweisbare, relativ geringe Infektions-Aktivität auf Verunreinigungen mit reifen Viruspartikeln zurückzuführen ist.

Die spezifische *HA-Aktivität* (bezogen auf N) Inkompletter Formen der Influenza und KP unterscheidet sich kaum von derjenigen der ZGHA und Viruspartikel (s. Tab. 9).

³¹ F. S. LIEF u. W. HENLE, *Virology* **2**, 782 [1956].

³² K. PAUCKER, A. BIRCH-ANDERSEN u. P. VON MAGNUS, *Virology* **8**, 1 [1959].

Material	Virus	ZGHA	Inkomplette Formen
Influenza	$1,93 \cdot 10^{-8}$	$1,12 \cdot 10^{-8}$	$1,86 \cdot 10^{-8}$
KP	$1,58 \pm 0,98 \cdot 10^{-8}$	$1,46 \cdot 10^{-8}$	$2,12 \cdot 10^{-8}$

Tab. 9. Spezifische HA-Aktivitäten infektiöser Viruspartikel und hämagglutinierender-nichtinfektiöser Formen g/HAE.
* Entnommen aus l. c.²⁸.

Auch in der *HA-Hemmungs-* und *Komplement-bindungs-Reaktion* ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Teilchenarten bei beiden Viren (vgl. Tab. 6 und 2).

Anders liegen dagegen die Verhältnisse im Hinblick auf die *immunisierende Fähigkeit* der Inkompletten Formen. Um die Bedingungen möglichst gleichartig zu gestalten, wurde der betreffende Versuch zusammen mit der Prüfung der ZGHA und der Viruspartikel und in gleicher Weise durchgeführt. Wie die in Abb. 4 enthaltenen Ergebnisse erkennen lassen, besaßen die Vakzinen aus Inkompletten Formen im Gegensatz zu denen aus ZGHA die gleiche immunisierende Aktivität, wie die aus gereinigtem Virus. Der Versuch bestätigte also die schon früher von anderer Seite erhaltenen Ergebnisse³³, die sich allerdings nur auf die Inkompletten Formen des menschlichen Influenza-Virus bezogen.

Außer den immunisierenden hatten unsere Präparate Inkompletter Formen auch die *interferierenden Eigenschaften* mit den infektiösen Viruspartikeln gemeinsam. Geprüft wurden von uns lediglich Konzentrate Inkompletter Formen der KP. Entsprechende Untersuchungen bei Inkompletten Formen der Influenza wurden bereits von v. MAGNUS² sowie von PAUCKER und HENLE²⁹ durchgeführt. Die technischen Einzelheiten unserer Versuche sind schon früher (s. S. 317) beschrieben worden. Nach den in Tab. 7 enthaltenen Ergebnissen wurde durch die Vorbehandlung der Gewebekulturen mit uv-bestrahlten Inkompletten Formen die Ausbeute an hämagglutinierenden und infektiösen Einheiten um etwa 90% gegenüber der Kontrolle heruntergedrückt. Der Interferenz-Effekt war hier etwa gleich groß wie bei der Verwendung von uv-bestrahlten Viruspartikeln. Inwieweit er von dem g-Antigen bzw. RNS-Gehalt der Inkompletten Formen abhängt²⁹, wurde von uns nicht untersucht.

³³ P. von MAGNUS, Acta pathol. microbiol. scand. **29**, 157 [1951].

³⁴ W. SCHÄFER, Nova Acta Leopoldina **19**, 38 [1957].

Besprechung der Ergebnisse

Auf Grund der beschriebenen Ergebnisse kann kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß bei den Influenza-Viren mindestens zwei verschiedene Arten von hämagglutinierenden-nichtinfektiösen Partikeln auftreten.

Die *zellgebundenen Hämagglutinine (ZGHA)* gleichen — worauf von einem von uns schon früher aufmerksam gemacht wurde³⁴ — morphologisch den Mikrosomen und besitzen wie diese Ribosomen und Glucose-6-Phosphatase. Sie sind also aller Wahrscheinlichkeit nach Elemente des Ergastoplasmas der Wirtszellen, die bei deren Zerstörung in Freiheit gesetzt werden. Von den entsprechenden Bestandteilen normaler Zellen unterscheiden sie sich dadurch, daß sie gewisse virusspezifische Anteile enthalten, nämlich Neuraminidase, eine hämagglutinierende Komponente und eine offenbar mit dieser verbundene, virusspezifische antigene Struktur.

Bei den reifen Virusteilchen ist die das Hämagglutinin tragende Untereinheit derjenige Anteil, der für die Ausbildung der Immunität verantwortlich ist^{7, 28}. Versuche mit ZGHA eine Immunität zu erzeugen, schlugen fehl. Es bleibt zu klären, worauf dieser Unterschied zwischen den beiden hämagglutinierenden Einheiten beruht. Es könnte sein, daß das Hämagglutinin, wenn es in den Mikrosomen eingeschlossen ist, seine immunogene Fähigkeit nicht entfalten kann. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß das Hämagglutinin der ZGHA sich in seiner antigenen Struktur von dem Hämagglutinin reifer Teilchen unterscheidet. Eine Entscheidung hierüber läßt sich erst fällen, wenn es gelingt, es aus den ZGHA zu isolieren; entsprechende Versuche sind z. Zt. im Gange.

Das Fehlen der interferierenden Aktivität bei den ZGHA läßt sich am einfachsten auf die Weise erklären, daß diese Teilchen die nukleinsäurehaltige Innenkomponente des reifen Viruspartikels, das g-Antigen, nicht besitzen. Wie PAUCKER und HENLE²⁹ in anderem Zusammenhange zeigen konnten, scheint eine gewisse Menge desselben zur Erzeugung des Interferenz-Effektes erforderlich zu sein.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die in Form der ZGHA vorliegenden Cytoplasma-Komponenten diejenigen Strukturen der Wirtszelle sind, die wesentliche Bestandteile des Hämagglutinins der Viruspartikel synthetisierten und nach ihrer Freisetzung noch mit diesen beladen sind. Versuche mit fluores-

zierendem Antikörper³⁵ stützen diese Hypothese. Bei ihnen ergab sich, daß ein dem Hämagglutinin entsprechendes Antigen nur im Cytoplasma nachzuweisen ist.

Auf Grund der geschilderten Feststellungen und Überlegungen schlagen wir nunmehr für die ZGHA der Influenza-Viren die Bezeichnung „*Viromikrosomen*“ vor.

Die *Inkompletten Formen* der Influenza-Viren stehen den infektiösen Viruspartikeln wesentlich näher als die „*Viromikrosomen*“. Sämtliche bisher über sie vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen sich mit der Vorstellung vereinbaren, daß es sich bei ihnen um Virusteilchen handelt, die nicht die volle Ausstattung von g-Antigen-Ribonucleoprotein (siehe auch l. c.^{31, 36}) besitzen.

Wenn ein Teil dieser Innenkomponente fehlt, muß der relative Gehalt an Lipid ansteigen³⁷ und das Teilchen im Schwerfeld langsamer absinken als das vollausgestattete Viruspartikel. Weiterhin ist leicht einzusehen, daß solche Teilchen im elektronenmikroskopischen Bild im allgemeinen flacher erscheinen als das komplette Virus (s. auch l. c.^{2, 32}) und im Vergleich zum letzteren in Dünnschnitten ein weniger dichtes Zentrum besitzen³⁸; der durch das Fehlen von g-Antigen entstehende Hohlraum wird beim Behandeln mit Phosphorwolframsäure leicht von dieser ausgefüllt³⁹. Womöglich ist das Fehlen von g-Antigen auch dafür verantwortlich, daß die Inkompletten Formen polymorpher erscheinen als die infektiösen Viruspartikel. Wir gehen dabei von der Vorstellung aus, daß die Innenkomponente des Virus dessen Form und Größe determiniert. Da das g-Antigen bzw. die in ihm enthaltene RNS das genetische Material des Virus repräsentiert, kann man nicht erwarten, daß die Inkompletten Formen die gleiche Vermehrungsfähigkeit wie das komplett ausgestattete Virus besitzen. Für die interferierende Wirksamkeit kann aber offenbar eine geringere Menge dieser Viruskomponente noch ausreichen; nach den Versuchen von PAUCKER und HENLE²⁹ darf aber ein gewisser Mindestgehalt nicht unterschritten werden.

Die Oberflächen-Eigenschaften der infektiösen Virusteilchen werden in erster Linie durch deren Hämagglutinin-Komponente^{7, 28} bestimmt. Sie scheint

bei den Inkompletten Formen in Menge und Art derjenigen der kompletten Virusteilchen zu entsprechen (vgl. auch l. c.²). Die Ergebnisse von PAUCKER und Mitarbb.³² deuteten zwar darauf hin, daß ihre Menge bei den Inkompletten Formen geringer ist. Entsprechende Hinweise ergaben sich aber bei unseren Versuchen nicht. Nach ihnen besitzen vielmehr die Inkompletten Formen die gleiche Neuraminidase-Aktivität wie die reifen Viruspartikel und damit wohl auch die gleiche Menge von Hämagglutinin. Außerdem zeigten die Versuche mit Phosphorwolframsäure³⁹, daß die Inkompletten Formen an ihrer Oberfläche die gleiche, dem Hämagglutinin entsprechende Feinstruktur besitzen wie die reifen Viruspartikel. Auch im isolierten Zustand war das Hämagglutinin Inkompletter Formen nicht von dem infektiösen Viruspartikel zu unterscheiden. Daß es auch in seiner antigenen Feinstruktur mit ihm übereinstimmt, ergaben die serologischen und immunologischen Untersuchungen; im Gegensatz zu den „*Viromikrosomen*“ sind die Inkompletten Formen wie die reifen Viruspartikel in der Lage, eine Immunität gegen eine nachfolgende Infektion zu erzeugen (s. auch l. c.³³).

Es erhebt sich nunmehr die Frage, wo und wie die Inkompletten Formen in der Wirtszelle gebildet werden. Da sie spontan von dieser ausgeschieden werden, in ihrer Oberflächenstruktur den infektiösen Viruspartikeln gleichen und außerdem unter ihnen häufig Partikel zu finden sind, die den an der Membran infizierten Zellen auftretenden, filamentösen Gebilden ähnlich sehen⁴⁰, darf man wohl annehmen, daß sie in analoger Weise wie die infektiösen Viruspartikel an der Peripherie der Wirtszellen entstehen. Bei der Bildung der infektiösen Teilchen wird hier nach unseren Vorstellungen (s. l. c.²⁶) die RNS-haltige Innenkomponente des Virus in dessen vorgebildete Oberflächenstruktur eingeschleust. Wir vermuten, daß dieser Prozeß bei der Produktion Inkompletter Formen gestört ist. Durch einige — bisher noch nicht veröffentlichte — Versuche wurden bereits Hinweise dafür gewonnen, daß bei einem „inkompletten Vermehrungszyklus“ das g-Antigen zwar im Kern gebildet wird, diesen aber nicht in größerer Menge verläßt. Ähnlich liegen die Verhältnisse auch bei der Infektion von L-Zellen mit KP-Virus, wo

³⁵ P. M. BREITENFELD u. W. SCHÄFER, *Virology* **4**, 328 [1957].

³⁶ G. L. ADA u. B. T. PERRY, *Nature* [London] **175**, 209 [1955].

³⁷ M. UHLER u. S. GARD, *Nature* [London] **173**, 1041 [1954].

³⁸ A. BIRCH-ANDERSEN u. K. PAUCKER, *Virology* **8**, 21 [1959].

³⁹ A. P. WATSON, R. ROTT u. W. SCHÄFER, *Z. Naturforschg.*, **16b**, 154 [1961].

⁴⁰ F. B. BANG, in: *The Nature of Viruses*, pp. 249, published for the Ciba Foundation, J. & A. Churchill Ltd., London 1957.

die Bildung infektiöser Teilchen ebenfalls unterbleibt⁴¹.

Unter den geschilderten Umständen scheint die Bezeichnung „Inkomplette Form“ oder „Inkomplet-

tes Virus“ für die in Frage stehende Art von Teilchen richtig gewählt zu sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Mitteln, Fräulein L. PISTER, Fräulein D. KUNERT, Herrn G. BERGER und Herrn P. GIEBLER für ihre Mitarbeit.

⁴¹ R. M. FRANKLIN u. P. M. BREITENFELD, *Virology* **8**, 293 [1959].

Das cytolytische Prinzip von Serumkomplement

Von H. FISCHER und I. HAUPT

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M. (Dir.: Prof. Dr. F. HOFF)

(Z. Naturforschg. **16 b**, 321–328 [1961]; eingegangen am 18. Februar 1961)

Serumkomplement (C'), welches nach dem heutigen Stand der Forschung aus mindestens vier Komponenten besteht, ist an zahlreichen immunologischen und nicht-immunologischen Vorgängen beteiligt. Am besten erforscht ist die Sequenz der C'-Reaktionsstufen bei der Hämolyse sensibilisierter Hammelerythrocyten, jedoch ist noch ungeklärt, welcher Mechanismus letztlich die Zellveränderung, die zum Austritt von Hämoglobin führt, bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit wird über das Endprodukt der C'-Reaktion — eine cytolytisch wirkende Substanz — berichtet. Es wird gezeigt, daß sowohl beim Altern von Komplement, wie auch bei C' fixierenden Antigen/Antikörperreaktionen im Serum eine Substanz entsteht, die zellschädigend und auflösend wirkt.

Seren, in denen durch mehr oder weniger spezifische Vorbehandlung C' oder einzelne seiner Komponenten ausgeschaltet wurden, sind nicht mehr zur Cytolysinbildung befähigt.

Das cytolytische Prinzip konnte gereinigt und papierchromatographisch als Lysolecithin charakterisiert werden.

Die Serumfaktoren, welche seit den klassischen Untersuchungen BORDETS¹ und EHRLICHs^{2,3} als Komplement bezeichnet werden, erfüllen im höheren Organismus Aufgaben, die sowohl bei Abwehr-, wie auch bei Regulationsvorgängen von Bedeutung sind. Serumkomplement (C') besteht aus mindestens 4 verschiedenen Komponenten, die man heute allgemein mit C'_{1,2,3} und C'₄ bezeichnet.

Am bekanntesten und bisher am besten untersucht ist die Fähigkeit von C', an Antigen-Antikörperreaktionen teilzunehmen und durch diese Teilnahme die schwere Schädigung sensibilisierter Zellen und Bakterien herbeizuführen, die als „Cytolyse“ oder „Bakteriolyse“ bezeichnet wird.

Die Bedeutung dieses Vorganges für immunologische Reaktionen ist seit langem erkannt; trotz

intensiver Forschung ist jedoch der biochemische Mechanismus der C'-induzierten Cytolyse bis heute unklar. Die Schwierigkeit ihn aufzudecken liegt darin, daß C' nicht eine einheitliche Substanz, etwa ein Proenzym, ist, sondern aus mehreren z. T. labilen und nur ungenau definierten Serumkomponenten besteht, deren Zusammenwirken erst in den letzten 15 Jahren mit kinetischen Methoden analysierbar geworden ist.

So haben die Arbeiten PILLEMERS^{4–6}, LEPOWS⁷ und ihrer Schüler^{6,8} sowie die Studien von MAYER^{9,10}, LEVINE^{11–14}, RAPP^{13,15}, LEON⁵ u. a. gezeigt, daß die C'-Reaktion in mehrere Stufen zerlegbar ist:

Mit Antikörpern sensibilisierte Erythrocyten (EA-Zellen) fixieren bei 0 °C in Anwesenheit von Ca²⁺ die Komponenten C'₁ und C'₄ (Stufe I).

Bei Zusatz von Mg²⁺ wird anschließend auch die

¹ J. BORDET u. O. GENGOU, *Ann. Inst. Pasteur* **15**, 289 [1901].

² P. EHRLICH u. J. MORGENROTH, *Berliner klin. Wschr.* **36**, 1, 6, 481 [1889].

³ P. EHRLICH u. J. MORGENROTH, *Berliner klin. Wschr.* **36**, 69 [1899].

⁴ L. PILLEMER, *Chem. Reviews* **33**, 1 [1943].

⁵ M. LEON, *J. Immunology* **79**, 480 [1957].

⁶ I. H. LEPOW, O. D. RATNOFF, F. S. ROSEN u. L. PILLEMER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **92**, 111 [1956].

⁷ I. LEPOW, *Mechanisms of Hypersensitivity*, Intern. Symposium, Henry Ford Hospital 267 [1959].

⁸ U. BEISS u. O. ARMBRUSTER, *Z. Naturforschg.* **13 b**, 79 [1958].

⁹ M. HEIDELBERGER u. M. M. MAYER, *Advances in Enzymol.* **8**, 71 [1948].

¹⁰ M. M. MAYER, *Progr. in Allergy* **V**, 215 [1958].

¹¹ L. LEVINE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **18**, 283 [1955].

¹² L. LEVINE u. M. M. MAYER, *J. Immunology* **73**, 426 [1954].

¹³ L. LEVINE, M. M. MAYER u. H. J. RAPP, *J. Immunology* **73**, 435 [1954].

¹⁴ L. LEVINE, K. M. COWAN, A. G. OSLER u. M. M. MAYER, *J. Immunology* **71**, 359, 367 [1953].

¹⁵ H. J. RAPP, *Nature* [London] **127**, 235 [1958].