Cytoplasma zu den Chloroplasten kompensiert werden. Wie sich in ^{32}P -Experimenten aus der unterschiedlichen spezifischen Aktivität der plastidischen und der cytoplasmatischen Phosphat-Pools sowie aus der Verteilung der ^{32}P -markierten Verbindungen zwischen den Chloroplasten und dem Cytoplasma ergibt, muß allerdings diese Phosphateinwanderung in die Chloroplasten langsam und zögernd

erfolgen, so daß im Licht auf die Existenz eines Gradienten der Phosphatkonzentration vom Cytoplasma zu den Chloroplasten hin zu schließen ist.

Die Untersuchungen wurden dankenswerterweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Den Herren Prof. Dr. H. ULLRICH und Prof. Dr. W. SIMONIS sind wir für anregende Diskussionen zu Dank verbunden.

Lösliche und virusgebundene Adenovirus Hämagglutinine*

Von H. BAUER **, R. WIGAND und W. ADAM

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)
(Direktor: Prof. Dr. Dr., Dipl.chem. W. ZIMMERMANN)

(Z. Naturforsch. **19 b**, 587—593 [1964] ; eingegangen am 4. März 1964)

Prototype adenoviruses and their hemagglutinins of ROSEN's¹ group II were studied by adsorption to rat and human red blood cells and by straight and cesium chloride density gradient ultracentrifugation. Density gradient experiments showed the presence of a hemagglutinin separable from the infectious virus particles which agglutinates both rat and human cells for virus types 9, 10, 13, 19, 26, and 27. In addition, types 10, 19, and 27 have a second hemagglutinin associated with the infective particles which agglutinates rat blood cells only. Type 9 (and possibly type 8) virus has a virus-bound hemagglutinin which agglutinates both kinds of blood cells. The viruses types 15, 17, 22, and 24 with hemagglutinins for rat blood cells only have two hemagglutinins, one of them associated with the virus particles. The results with type 23 were variable. Straight ultracentrifugation experiments showed a surprisingly incomplete sedimentation of the infective particles for most of the virus types studied.

Differences in the resistance of various hemagglutinins to trypsin and/or heating are demonstrated.

Die Adenovirustypen 1, 2, 4, 5 und 6 agglutinieren Rattenerythrozyten mit unvollständigem Sedimentations-Pattern¹. Auf Grund biologischer und physikalischer Eigenschaften kann man die Hämagglutinine dieser Viren in drei Gruppen einteilen². Diese drei Arten von Hämagglutininen unterscheiden sich voneinander hinsichtlich ihrer Hitze- und Trypsinempfindlichkeit, Adsorbierbarkeit an Erythrozyten und Sedimentierbarkeit in der Ultrazentrifuge². Zwei von ihnen lassen sich auch chromatographisch voneinander trennen³.

In die früheren Untersuchungen hatten wir Typ 9 als einzigen Vertreter der Gruppe II nach ROSEN² miteinbezogen. Diese Gruppe umfaßt alle die Adenovirustypen, die Rattenblutzellen vollständig agglutinieren, nämlich die Typen 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26 und 27. Von ihnen agglutinieren

die Typen 8, 9, 10, 13, 19, 26 und 27 außerdem auch Menschenblutkörperchen. Weitere Untersuchungen über die Viren dieser Gruppe haben nunmehr gezeigt, daß auch bei ihnen die Hämagglutinine verschiedener Virustypen sich uneinheitlich verhalten, wenn man als Kriterien Abtrennbarkeit des Hämagglutinins vom infektiösen Virus, Hitze- und Trypsinempfindlichkeit zugrunde legt. Bei den meisten Viren dieser Gruppe ist die Abtrennung von zwei Hämagglutininen möglich. Unter den verwendeten Techniken ergab die Dichtegradienten-Zentrifugierung besonders klare Resultate.

Material und Methodik

Ein Teil der angewendeten Methoden wurde bereits früher beschrieben⁴.

* Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

** Jetzige Adresse: Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Speemannstr. 35/III.

¹ L. ROSEN, Amer. J. Hyg. **71**, 120 [1960].

² H. BAUER u. R. WIGAND, Arch. Virusforsch. **12**, 148 [1962].

³ H. G. PEREIRA u. M. V. T. DE FIGUEIREDO, Virology **18**, 1 [1962].

⁴ H. BAUER u. R. WIGAND, Z. Hyg. Infektionskrankh. **149**, 96 [1963].

Viren. Wir untersuchten die Prototypstämme der obengenannten Typen. Die Vermehrung der Viren erfolgte in HeLa-Zellen in der früher beschriebenen Weise. Die Endablesung bei Titrationen der Infektiosität nahmen wir am 8. Tag nach Inokulation vor.

Adsorption an Blutzellen. Im Gegensatz zu früher arbeiteten wir bei den hier untersuchten Viren meist mit größeren Blutzellmengen, um auf alle Fälle eine maximale Adsorption zu erzielen. Hierzu wurde 0,2 ml Virus mit 1,8 ml einer 8-proz. Erythrozyten-Suspension in 0,14-m. Kochsalzlösung, gepuffert mit 0,004-m. McIlvaine-Puffer von pH 7,2 als Endkonzentration, eine Stde. bei Zimmertemperatur unter wiederholtem Schütteln gehalten und zentrifugiert. Dem Überstand wurden frische gepackte Blutkörperchen zugegeben, die 8-proz. Suspension wurde wiederum eine Stde. bei Zimmertemperatur belassen, zentrifugiert und das gleiche nochmals wiederholt. Der Überstand nach dem dritten Zentrifugiergang wurde dann auf Hämagglutination (HA) und Infektiosität getestet.

Ultrazentrifugierung. Wir benutzten wie früher den Rotor 40/3 der Spinco L Zentrifuge mit Lusteroidröhrchen. Zur besseren Lokalisation des Sedimentes wurde ein Tropfen 5-proz. Gelatine zu ca. 6,5 ml Virus-suspension gegeben.

Dichtegradienten-Zentrifugierung. Es wurde der Rotor SW 39 benutzt. Cäsiumchlorid wurde in steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) gelöst. 3 ml einer 3-m. CsCl-Lösung ($\rho = 1,347$) wurden mit 0,5 ml unverdünnter virushaltiger Gewebekulturflüssigkeit überschichtet, die vorher zweimal im Homogenisator mit gleichen Teilen Freon 112 in Heptan ($\rho = 1,25$) behandelt worden war. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Paraffinöl aufgefüllt. Der einzelne Zentrifugiergang dauerte 24 Std. bei 35 000 rpm. Durch ein Loch in der Kuppe des Röhrchens wurde der Inhalt in 12 bis 15 Fraktionen zu je 5 Tropfen aufgefangen. Die den einzelnen Fraktionen entsprechende Dichte wurde nach Bestimmung des Brechungsindex in einem Zeiss-Abbé-Refraktometer einer Eichkurve entnommen. Eine in drei Zentrifugenläufen mitgeführte CsCl-Kontrolle ergab bei Refraktionsmessung jeder einzelnen Fraktion einen annähernd linearen Gradienten; auch stimmten nach allen Läufen die Refraktionswerte der ersten und letzten Fraktion der drei Röhrchen eines Laufes sehr gut überein. Wir verzichteten daher in der Folge auf eine Refraktionsbestimmung zwischenliegender Fraktionen und entnahmen die Werte für diese einer graphischen Darstellung der Brechungsindices der ersten und letzten Fraktion. Die übrigen Fraktionen wurden mit McIlvaine-gepufferter Kochsalzlösung etwa 1:5 verdünnt. Je 0,4 ml wurden für HA-Versuche mit Ratten- und Menschenblutkörperchen entnommen. Zur Bestimmung der Infektiosität wurden zwei Gewebekultur-röhrchen (HeLa- oder Schilddrüsenzellkulturen) mit je 0,1 ml der 1:5, 1:50 und 1:500 verdünnten Fraktion beimpft. Wegen der Toxizität von CsCl für die Zellen erfolgte nach 90 bis 120 min Adsorptionszeit bei 37 °C ein Mediumwechsel.

Ergebnisse

Adsorbierbarkeit von Hämagglutinin und Virus an Erythrozyten

Alle Hämagglutinine der Gruppe II werden an die Blutzellen, die sie agglutinieren, adsorbiert (Tab. 1). Zur Klärung der Frage, ob die einzelnen Viren mehr als ein Hämagglutinin bilden, wurde Virus an die Blutzellen einer Species in der oben angegebenen Weise adsorbiert und dann der Über-

Adenovirus Typ	HA-Titer mit					
	Menschenblutk.			Rattenblutk.		
	Orig.- Virus	nach Ab- sorption an		Orig.- Virus	nach Ab- sorption an	
		M.- Blutk.	R.- Blutk.		M.- Blutk.	R.- Blutk.
26 (8, 9, 13) *	640	< 20	< 20	1280	< 20	< 20
19 (10, 27)	640	< 10	< 10	1280	320	< 10
17 (15, 22-24)				1280	640	< 10

Tab. 1. Adsorbierbarkeit der Hämagglutinine an Blutzellen.
* in Klammern: die Virustypen, deren Hämagglutinine sich gleich verhalten.

stand nach Abzentrifugieren der Blutkörperchen sowohl mit den zur Adsorption verwendeten wie mit der anderen Blutkörperchenart auf HA getestet. Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, werden alle Menschen-Hämagglutinine auch an Rattenblutzellen adsorbiert. Umgekehrt jedoch lassen sich nur die Ratten-Hämagglutinine von Typ 8, 9, 13 und 26 vollständig an Menschenblutkörperchen adsorbieren, während diejenigen von Typ 10, 19 und 27 nach Adsorption an Menschenerythrozyten zum großen Teil im Überstand bleiben. Dies läßt vermuten, daß alle diese Typen ein Hämagglutinin haben, das sowohl Ratten- wie Menschenblutkörperchen agglutiniert; die Typen 10, 19 und 27 scheinen darüber hinaus ein weiteres Hämagglutinin zu bilden, das nur Rattenblutzellen agglutiniert und nicht an Menschenblutzellen adsorbiert wird. Für diese Annahme spricht weiterhin die Beobachtung, daß die letztgenannten drei Typen im Durchschnitt mit Rattenblutkörperchen einen vierfach höheren HA-Titer zeigen als mit Menschenblutkörperchen, während die HA-Titer für Typ 8, 9, 13 und 26 bei beiden Zellarten etwa gleich hoch sind.

Weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Frage nach mehreren Hämagglutininen sollten Experimente

über die Abtrennbarkeit der Hämagglutinine von den infektiösen Viruspartikeln bringen. Zunächst wurde untersucht, ob die Viruspartikel mit dem Hämagglutinin an die Blutzellen adsorbiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Überstände nach Adsorption an die Erythrozyten gleichzeitig auf HA und Infektiosität getestet. Wie aus Tab. 2 zu ersehen

Virustyp	Infektiöse Viruspartikel adsorbierbar an	
	Rattenblutk.	Menschenblutk.
8, 9	+	+
10, 19, 27	+	⊖
13, 26	⊖	⊖
15, 17, 22, 24, 23 ?	+	⊖

Tab. 2. Adsorption der infektiösen Viruspartikel an die Blutzellen.

ist, werden die infektiösen Viruseinheiten z. T. an beide Blutkörperchen, z. T. nur an Rattenblutkörperchen, z. T. überhaupt nicht adsorbiert. Aus dem Vergleich von Tab. 1 und 2 ergibt sich folgendes: Bei Typ 8 und 9 verhalten sich Hämagglutinin und infektiöses Virus bezüglich beider Blutkörperchenarten gleich, ebenfalls bei den Typen 15, 17, 22 und 24 bezüglich Rattenblutzellen. Demgegenüber ist bei Typ 13 und 26 eine Abtrennung des Hämagglutinins vom infektiösen Virus möglich, da dieses nicht an die Blutkörperchen adsorbiert wird. Die Typen 10, 19 und 27 dürften ein an das infektiöse Virus gebundenes Hämagglutinin haben, das nur Rattenblutkörperchen agglutiniert, und ein zweites abtrennbares Hämagglutinin für Ratten- und Menschenblutkörperchen. Typ 23 verhielt sich in mehreren Versuchen ungleichmäßig.

Einfache Ultrazentrifugierung

Versuche, durch Ultrazentrifugieren Hämagglutinin und Virus zu trennen, erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Entgegen unseren Erfahrungen mit anderen Adenovirustypen^{5,4} gelang es nicht, durch 2-stdg. Zentrifugieren bei 20 000 g im Rotor 40/3 (entsprechend einem performance index von 5,0) die infektiösen Einheiten von Typ 10, 19, 26 und 27 auch nur annähernd vollständig zu sedimentieren.

Auch ein zweiter Zentrifugengang bei derselben Tourenzahl verbesserte die Abtrennung der beiden Aktivitäten nicht. Versuche mit einem P_i von 9,9 (35 000 g) waren ebenso erfolglos, und selbst bei einem P_i von 27,5 (100 000 g) war die Sedimentierung des infektiösen Virus unbefriedigend. Es ließen sich aus diesen Versuchen keine sicheren Rückschlüsse auf das Verhältnis von sedimentierten infektiösen Viruspartikeln zu sedimentiertem Hämagglutinin ziehen. Die schlechte Sedimentierbarkeit dieser Viren läßt sich bei dem hohen performance index nicht dadurch erklären, daß die Viruspartikel dieser Typen etwa kleiner seien als die der niederen Typen. Es ist aber möglich, daß die Sedimentierbarkeit eines Teils der Viruspartikel durch Anlagerung von Zellbestandteilen, z. B. Lipiden, mit geringerer Dichte als der des Virus verringert wird. Damit würde im Einklang stehen, daß freonbehandeltes Virus bei den Dichtegradienten-Versuchen mit allen untersuchten Typen in der gleichen Fraktion erhalten wurde (s. unten).

Die Typen 15, 17 und 23 sedimentierten etwas besser als die obigen Typen nach 2-stdg. Zentrifugieren mit 20 000 g. Die im Sediment nachweisbare Infektiosität war größer als die des Überstandes, während die HA-Titer in beiden Fraktionen gleich hoch waren.

Als Beispiel sei das Ergebnis eines Versuches wiedergegeben (Tab. 3), bei welchem Typ 1 und 10 (ohne vorherige Reinigung) gleichzeitig zentrifugiert wurden. Dabei verhielt sich Typ 1 wie früher⁴, von Typ 10 war dagegen unter völlig gleichen Bedingungen nur wenig Virus sedimentiert. Eine Aussage über die Sedimentierbarkeit des Hämagglutinins ist nur bei Typ 1 möglich.

Virus-typ	Material	Hämagglutinationstiter mit		Infektiositätstiter [log ID_{50}/ml]
		Rattenblutk.	Menschenblutk.	
10	Original	4000+	1000	3,5
	Sediment	500	16	2,5
	Überstand	4000	500	3,5
1	Original	2000**	—	4,5
	Sediment	32	—	4,5
	Überstand	1000	—	3,5

Tab. 3. Verhalten von Hämagglutinin und infektiösem Virus bei hochtourigem Zentrifugieren [2 Stdn. bei 20 000 g im Rotor 40/3 der Spinco L-Zentrifuge ($P_i=5,0$)] von Adenovirus Typ 10 und Typ 1 im gleichen Zentrifugenlauf. ** getestet mit heterologem Adenovirus-Immuns serum (4).

⁵ R. WIGAND u. H. BAUER, Zbl. Bakteriöl., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt. Orig. **184**, 60 [1962].

jedoch einmal nur ein einziges, vom Virus abtrennbares Hämagglutinin. Für diese unregelmäßigen Ergebnisse mit Typ 23, die denen bei den Adsorptionsversuchen parallel gehen (s. oben), haben wir vorerst keine Erklärung.

Bei einigen Versuchen mit verschiedenen Viren wurde zusätzlich ein weiterer niedriger Gipfel der HA-Aktivität in der letzten Fraktion, also in der obersten Schicht ($q = 1,24$ bis $1,27$; $n_D = 1,357$ bis $1,360$) nachgewiesen (Abb. 3, 4). Diese Fraktion ist uns wohl in anderen Versuchen entgangen, in denen die letzten Tropfen zur Bestimmung der Refraktion benutzt wurden. Man muß annehmen, daß dieses Material entweder infolge geringer Dichte flotierte oder sich aus anderen Ursachen in der Grenzschicht von CsCl-Lösung und Paraffinöl anreichert. Eine HA durch das Öl selbst wurde im Experiment nicht beobachtet. Die Bedeutung dieses Befundes ist vorerst unklar; infektiöses Virus fand sich in der entsprechenden Fraktion nicht.

Sonstige physikalisch-chemische Eigenschaften der Hämagglutinine

Keines der untersuchten Hämagglutinine wird durch 10 min langes Erhitzen bei 56°C zerstört, wobei die virushaltige Gewebekulturflüssigkeit vorher in gepufferter Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 5 verdünnt wurde. Gleich langes Erhitzen bei 65°C überstehen jedoch nur die Rattenhämagglutinine der Virustypen 8 und 19 sowie 15, 22 und 24. Die gleichen Hämagglutinine werden durch 1-stdg. Trypsinbehandlung wenig oder gar nicht zerstört, während bei allen übrigen Hämagglutininen (außer von Typ 9) nach Trypsinbehandlung keine oder nur noch minimale Aktivität nachweisbar ist (Tab. 4).

Virustypen	10, 13, 26, 27, 17, 23	10, 13, 26, 27, 8, 19	15, 22, 24	8, 19	9
Blutzellen von	Ratte	Mensch	Ratte	Ratte	Mensch, Ratte
Behandlung					
10' 56°C	+	+	+	+	+
10' 65°C	⊖*	⊖	+	+	⊖
Trypsin	⊖	⊖	+	+	+
Trypsin + 10' 56°C	—	—	⊖	+	⊖

Tab. 4. Hitze- und Trypsinresistenz der Adenovirus-Hämagglutinine. * +: HA-Titer wenig oder nicht vermindert. ⊖: Kein oder nur noch sehr wenig HA nachweisbar.

Die Ausnahme von dieser Regel — entweder Zerstörbarkeit des Hämagglutinins durch 65° und durch Trypsin oder Resistenz gegen beides — bilden die Hämagglutinine von Typ 9, die beide bei 65° zerstört werden, gegen Trypsin jedoch resistent sind. Tab. 5 zeigt einige Beispiele über die HA-Titerveränderung nach Trypsin- und Hitzebehandlung. Eine sukzessive Behandlung mit Trypsin und

Virus-typ	Blut-zellen	Un-beh. Virus	56°	65°	Trypsin	Trypsin 56°
26*	Ratte	640	640	< 10	< 10	—
10	Mensch	160	160	< 10	< 10	—
15	Ratte	640	640	160	320	< 10
19	Ratte	640	640	160	640	640
9	Ratte, Mensch	80	40	< 10	40	< 10

Tab. 5. Beispiele für die Titerveränderungen nach Hitze- bzw. Trypsinbehandlung. * In der gleichen Reihenfolge wie in Tab. 4 ist von jeder Gruppe ein Vertreter aufgeführt.

anschließender 10 min langer Erhitzung auf 56° , welche die Hämagglutinine von Typ 9 und 11 zerstörte⁴, inaktivierte auch die gegen beide Einzelbehandlungen resistenten Hämagglutinine der Typen 15, 22 und 24, während sich die Rattenhämagglutinine der Typen 8 und 19 resistent verhielten (Tab. 4).

Die in Tab. 4 dargestellte HA mit Rattenblutzellen ist, wie oben gezeigt, bei einigen Viren durch das Zusammenwirken von zwei Hämagglutininen bedingt. Bei den Typen 15, 22 und 24 ist es nicht ausgeschlossen, daß neben dem stabilen Hämagglutinin eine labile Komponente existiert. Bei Typ 19 ist das an die Viruspartikel gebundene Hämagglutinin, das nur Rattenblutkörperchen agglutiniert, stabiler als das Ratten- und Menschenblutzellen agglutinierende lösliche Hämagglutinin. Mit Menschenblutzellen absorbiertes Hämagglutinin von Typ 19 zeigte erwartungsgemäß die gleiche Stabilität bei HA mit Rattenblutkörperchen wie unabsorbiertes Virus.

Besprechung der Ergebnisse

Die Adsorptions- und Dichtegradienten-Versuche zeigen übereinstimmend für die Menschen- und Rattenblutzellen agglutinierenden Adenoviren, d. h. für Typ 9, 10, 13, 19, 26 und 27, ein Hämagglutinin, das vom infektiösen Viruspartikel abtrennbar ist und sowohl Menschen- wie Rattenblutzellen

agglutiniert. Daneben findet man bei Typ 10, 19 und 27 ein an das Virion gebundenes Hämagglutinin für Rattenblutkörperchen. Von den fünf Virustypen, die nur Rattenblutzellen agglutinieren, zeigen mindestens vier ein vom Virion abtrennbares und ein gebundenes Hämagglutinin. Das Vorhandensein von löslichem und virusgebundenem Hämagglutinin erklärt — neben der unvollständigen Sedimentation der Viruspartikel — die unbefriedigenden Ergebnisse bei den einfachen Zentrifugerversuchen.

Der Unterschied in den CsCl-Dichtebereichen, in denen Virion und Hämagglutinin erscheinen, könnte darauf beruhen, daß es sich bei den abtrennbaren Hämagglutininen um unvollständige Viruspartikel handelt, die von der Zelle im Überschuß gebildet werden und denen vielleicht nur die infektiöse Innenkomponente (Nucleinsäure?) fehlt. Solche inkompletten Viruspartikel sind bei verschiedenen Viren bekannt und wurden auch bei Adenoviren beschrieben. So fand KÖHLER⁶ bei Typ 2 „leere Hüllen“ in einem geringeren Dichtebereich als die kompletten Virusteilchen und spricht sie mit Vorbehalt als Nucleinsäure-freie Viruscapside an. Strukturuntersuchungen an den höheren Adenovirustypen sind uns nicht bekannt. Wenn man die löslichen Hämagglutinine also hypothetisch als inkomplette Viruspartikel auffaßt, so wird nicht recht verständlich, warum das Virion von Typ 10, 19 und 27 nur Rattenblutzellen agglutiniert. Hierzu könnte man sich vorstellen, daß beim kompletten Virion die Hämagglutinin-Komponente für Menschenblutzellen maskiert ist und das infektiöse Virus daher auch nicht an Menschenblutkörperchen adsorbiert wird.

Neben dieser Deutung der freien Hämagglutinine als inkomplette Viruspartikel muß jedoch als weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß virusgebundenes und lösliches Hämagglutinin Substanzen von verschiedener Struktur und biologisch-serologischer Spezifität sind. Dies ist besonders bei Typ 19 wahrscheinlich, bei welchem sich beide Hämagglutinine hinsichtlich ihrer Trypsin- und Hitzestabilität wesentlich unterscheiden (Tab. 4). Es spricht nichts gegen die Annahme, daß es sich bei den abtrennbaren Hämagglutininen um Untereinheiten des Virus handeln könnte, wie sie etwa von WILCOX u. a.⁷ bei Typ 5 beschrieben werden.

Wie sich aus den Dichtegradienten-Versuchen ergab, agglutiniert das Virion von Typ 9 als einziges sowohl Ratten- wie Menschenblutzellen (Abb. 3). Typ 8, der wegen seines niedrigen Virustiters nicht vollständig untersucht werden konnte, verhielt sich in den Adsorptionsversuchen wie Typ 9. Da jedoch von jedem Virustyp nur der Prototypstamm untersucht wurde, wäre es verfrüht, die dargestellten Unterschiede als charakteristisch für die betreffenden Virustypen hinzustellen. Bemerkenswert erscheint in dieser Hinsicht, daß Hämagglutinine mit serologischen Kreuzreaktionen in der HA-Hemmung, nämlich diejenigen von Typ 10 und 19 sowie von Typ 15 und 22⁸, sich in unseren Untersuchungen gleich verhielten, wenn man von der verschiedenen Stabilität von Typ 10 und 19 absieht.

Im Unterschied zu den früher untersuchten Adenovirus-Hämagglutininen bereitet es bei den hier beschriebenen keine Schwierigkeiten, sich den Wirkungsmechanismus bei der HA vorzustellen. Da alle Hämagglutinine an die durch sie agglutinierten Erythrozyten adsorbiert und unter unseren Versuchsbedingungen nicht mehr eluiert werden, ist anzunehmen, daß sie entweder durch chemische Bindung oder auf Grund von Oberflächenladungen als Bindeglied zwischen den Erythrozyten fungieren. Dieser Mechanismus scheint jedoch nicht für alle gleich zu sein. KASEL u. a.⁹ fanden einerseits, daß Menschenerythrozyten nach Behandlung mit RDE gegenüber den Typen 8, 9, 10, 13 und 26 in gleicher Weise inagglutinabel werden. Auf der anderen Seite ergaben sich Unterschiede, wenn Menschenblutzellen mit einem „Rezeptor-modifizierenden Faktor“ behandelt wurden, der aus Gewebekulturen nach Infektion mit Adenovirus Typ 1 oder 15 stammte. Derart behandelte Blutkörperchen wurden durch Typ 8 und 9 fast in gleicher Weise wie unbehandelte agglutiniert, während sie durch Typ 10, 13 und 26 sowie (nach eigenen unveröffentlichten Beobachtungen) durch Typ 19 und 27 nur mit stark verminderter Titer agglutiniert wurden. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß Typ 9 (und wahrscheinlich auch Typ 8) zwei Hämagglutinine für Menschenblutkörperchen aufweist, die übrigen Typen dagegen nur eines.

⁶ K. KÖHLER, Z. Naturforsch. **17b**, 544 [1962].

⁷ W. C. WILCOX, H. J. GINSBERG u. T. F. ANDERSON, J. exp. Medicine **118**, 307 [1963].

⁸ L. ROSEN, J. F. HOVIS u. J. A. BELL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **110**, 710 [1962].

⁹ J. A. KASEL, W. P. ROWE u. J. L. NEMES, Virology **10**, 388 [1960].

Die Inaktivierung der Hämagglutinine durch Trypsin deutet auf eine strukturell wichtige Proteinkomponente hin. Sie ist auch bei den Hämagglutininen anzunehmen, bei denen der Trypsineinfluß erst durch anschließende Erhitzung auf 56° manifest wird.

Über weitere Versuche betreffs löslicher Komponenten an den Viren dieser Gruppe mittels DEAE-Säulenchromatographie wird an anderer Stelle berichtet¹⁰.

Wir danken Frau H. GELDERBLOM und Frau H. KAISER für ihre Hilfe bei den Versuchen.

¹⁰ H. GELDERBLOM u. a. (noch unveröffentlicht).

Die Bildung von RNS-Doppelstrang zur Vermehrung eines RNS enthaltenden Bakteriophagen¹

Von HANS CHRISTIAN KAERNER * und HARTMUT HOFFMANN-BERLING

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Physiologie, Heidelberg

(Z. Naturforsch. **19b**, 593—604 [1964]; eingegangen am 14. April 1964)

The RNA phage fr induces in *Escherichia coli* cells the production of double stranded RNA, which is identified by its thermal denaturation profile (T_m 101 °C in 0,2-m. Na⁺), by its non-reactivity with formaldehyde and by its buoyant density in Cs₂SO₄ (1,609 g cm⁻³, compared to that of fr-RNA = 1,634 g cm⁻³). Unless denatured the double strand is resistant to RNase. In its high molecular weight form the double stranded RNA has twice the weight of fr-RNA, as estimated from the sedimentation coefficient ($s_{20} = 14,5$). The base ratios are those expected for a double stranded replicative form of fr-RNA. By melting and annealing one of the strands of the non-radioactive material can be exchanged for ³²P-fr-RNA from phage particles. Infectiousity of the double stranded RNA has not yet been shown.

Extracts from infected cells contain double strand bound to the 30—50 s fraction; there is also double strand in the supernatant, apparently in the form of relatively low molecular weight fragments. The double stranded RNA, isolated at the height of infection, accounts for 3—8% of the cellular RNA.

Cells infected with ³²P-fr show a surprisingly large part of the infecting RNA bound to ribosomes quite late in the latent phase. The meaning of this result is discussed.

Die Vermehrung RNS enthaltender Bakteriophagen scheint unmittelbar weder die Synthese^{2,3} noch die Funktion von DNS zu erfordern⁴; Zwischenprodukte der infektiösen RNS-Synthese sollten demnach die chemische Natur von RNS, nicht die von DNS haben. Nach der einfachsten Vorstellung vollzieht sich die identische Reproduktion der Phagen-RNS durch einen doppelten Akt der Replikation, wobei in einem ersten Schritt ein Polynucleotidstrang mit komplementärer Basenfolge entsteht, der in einem zweiten Schritt einen Strang der ursprünglichen Zusammensetzung zurückbildet. Komplementäre Stränge könnten noch im Zuge ihres Wachstums

voneinander getrennt werden oder aber zu einem RNS-Doppelstrang vereinigt bleiben, um gemeinsam reproduziert zu werden. Im zweiten Falle hätte das Intermediat der infektiösen RNS-Synthese eine Zusammensetzung analog der Doppelstrang-DNS, die als „replikative Form“ zur Vermehrung der einzelsträngigen DNS des Phagen ϕ X 174 gebildet wird⁵.

Ein Anhalt, daß die replikative Form einer einzelsträngigen Virus-RNS ein RNS-Doppelstrang ist, hat sich aus der Untersuchung tierischer Zellen ergeben⁶. Ein Versuch, die doppelsträngige Form einer Phagen-RNS zu identifizieren, ist dagegen erfolglos geblieben⁷. Die folgende Arbeit berichtet über die Iso-

* Die Ergebnisse sind Teil einer Dissertation von H. C. KAERNER zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg.

¹ Ein Teil der Ergebnisse ist als kurze Mitteilung erschienen: H. C. KAERNER u. H. HOFFMANN-BERLING, Nature [London] **202**, 1012 [1964].

² S. COOPER u. N. D. ZINDER, Virology **18**, 405 [1962].

³ P. H. HOFSCHEIDER, Z. Naturforsch. **18b**, 205 [1963].

⁴ A. M. HAYWOOD u. R. L. SINSHEIMER, J. molecular. Biol. **6**, 247 [1963].

⁵ R. L. SINSHEIMER, B. STARMAN, C. NAGLER u. S. GUTHRIE, J. molecular Biol. **4**, 142 [1962].

⁶ L. MONTAGNIER u. F. K. SANDERS, Nature [London] **199**, 664 [1963].

⁷ R. H. DOI u. S. SPIEGELMAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **49**, 353 [1963].