den „rate limiting“-Schritt Vorgänge anschließen, die wir vorläufig noch nicht kennen. Es läßt sich nur vermuten, daß Actidion Vorgänge an den Membran-Systemen der Zelle hemmt, da es die Penetration der Viria erheblich verzögert und zusätzlich die Energielieferung stört²².

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung einer Sachbeihilfe, Frl. H. TEUFFERT für ihre wertvolle Mitarbeit.

²² H. E. LATUASAN u. W. BERENDS, Recueil Trav. clin. Pays-Bas 77, 416 [1958].

Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A)

II. Isolierung und Charakterisierung der im Virus enthaltenen Nucleinsäure

HEINZ BAUER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Biologisch-Medizinische Abteilung, Tübingen

(Z. Naturforsch. 21 b, 453—460 [1966]; eingegangen am 17. Februar 1966)

AMV yields four species of RNA when treated with Sodium-dodecylsulfate. In sucrose gradient centrifugation, they sediment with 62, ~45, 30 and 4—10 S respectively. The 62 S fraction contains the viral RNA proper in a relatively pure state. In the other fractions — containing some protein — host cell RNA is detected by isotopic labelling. These findings are discussed in particular with respect to results on chicken-leucosis-viruses by other authors.

In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, daß sich durch Behandeln von gereinigtem Myeloblastose-Virus (AMV) mit Natriumlaurylsulfat (NLS) mindestens fünf Spaltprodukte gewinnen lassen, die im elektrischen Feld mit verschiedener Geschwindigkeit wandern¹. Das am langsamsten wandernde Material wurde in reiner Form isoliert. Es ist ein Eiweißkörper, der nach serologischen Untersuchungen allen Viren der Hühnerleukosegruppe gemeinsam zu sein scheint (gruppenspezifisches Antigen). Die Komponente mit der schnellsten Wanderungsgeschwindigkeit zeigte ein Absorptionsverhalten im UV-Bereich, das dem von Nucleinsäure entspricht. Bemühungen, die Virus-Nucleinsäure zu isolieren, führten, wie bereits in einer früheren Arbeit kurz mitgeteilt¹, zu einem hochmolekularen Produkt mit einer Sedimentationskonstanten von etwa 60 S.

Es wurde nunmehr der Versuch unternommen, die im Virus enthaltene Nucleinsäure näher zu charakterisieren. Über die entsprechenden Experimente wurde bereits ausführlicher auf einer Tagung der „European Tumour Virus Group“ in Israel berichtet². Über ähnliche Studien trugen dort auch HUPPERT et al.³ vor.

Material und Methodik

Virus

Der BAI-Stamm A des Myeloblastose-Virus wurde in Küken („Myeloblasten-Virus“) sowie in sekundären Hühnerfibroblasten-Kulturen („Fibroblasten-Virus“) vermehrt. Die Fibroblasten wurden vor Gebrauch auf latente Infektion mit Hühner-Leukose-Viren geprüft⁴. Wegen methodischer Einzelheiten über Gewebekultur, Virusvermehrung und Virusnachweis mittels Komplexbindungs-Reaktion (KBR) wird auf eine frühere Mitteilung verwiesen⁴.

Reinigung des Virus

Virushaltiges Material wurde dreimal bei einem Pi^5 von 10 in der präparativen Ultrazentrifuge durch Sedimentation und Wiederaufnahme in NaCl-Phosphatpuffer (0,12-m. NaCl in 0,2-m. Phosphat, pH 7,2) gewaschen und dann in einem Zucker-Gradienten von 20 bis 50% Saccharose in Tris(hydroxymethyl)-aminoethan-gepufferter (pH 7,3) 0,1-m. NaCl-Lösung gebandet. Nach 60 Min. Zentrifugieren bei 21 000 UpM im Spinco SW 39-Rotor war bei ausreichender Viruskonzentration eine Bande in der Mitte des Röhrchens sichtbar, die das in der analytischen Ultrazentrifuge mit 670 S sedimentierende Virus enthielt. Die betreffenden Fraktionen wurden isoliert und vor Weiterverarbeitung zur Entfernung der Saccharose gegen NaCl-Phosphatpuffer dialysiert.

¹ H. BAUER u. W. SCHÄFER, Z. Naturforsch. 20 b, 815 [1965].

² H. BAUER, III. Meeting of the European Tumour Virus Group, Rehovoth, Israel (1965).

³ J. HUPPERT, J. HAREL, L. HAREL, F. LACOUR u. M. ROSENBERGOWA, III. Meeting of the European Tumour Virus Group, Rehovoth, Israel (1965).

⁴ H. BAUER, H. BAHNEMANN u. W. SCHÄFER, Z. Naturforsch. 20 b, 959 [1965].

⁵ P. GIEBLER, Z. Naturforsch. 13 b, 238 [1958].

Nucleinsäure-Extraktion

In Fibroblasten oder Myeloblasten produziertes und anschließend gereinigtes Virus wurde mit 0,5–1% NLS gespalten⁶ und dann auf einem Zucker-Gradienten von 15–30% Saccharose, enthaltend 0,1-m. NaCl, 0,01-m. Trispuffer (p_H 7,3) und 0,001-m. EDTA, aufgelegt. Nach 15 Std. langem Zentrifugieren im Spinco SW 25-Rotor, in der Regel bei 17 500 UpM und bei 15 °C, wurde der Becher von unten angestochen und gleiche Fraktionen zu je 1 ml abgenommen. Diese wurden im Zeiss-Spektralphotometer auf ihre Absorption im UV-Licht (Myeloblasten-Virus) untersucht oder zur Bestimmung der Radioaktivität (Fibroblasten-Virus) weiterverarbeitet.

Messung der Radioaktivität

Das radioaktiv markierte Material wurde mit 4% Trichloressigsäure (TCE) unter Zugabe von 500 µg Hefe-RNS (Träger-RNS) gefällt, auf Membranfilter (Membranfiltergesellschaft Göttingen, Filter Nr. 1) gegeben und noch dreimal auf dem Filter mit TCE gewaschen. Die Filter wurden bei 80 °C getrocknet, in 5 ml Toluol-Scintillator aufgenommen und die Radioaktivität in einem Tri-Carb Flüssigkeits-Scintillations-Zähler (Packard) bestimmt.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry et al.⁷ mit Rinder-Serum-Albumin als Standard durchgeführt.

Isotope und Enzyme

¹⁴C- und ³H-markiertes Uridin, ¹⁴C-Leucin und ³H-Thymidin stammten von New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts.

Kristalline DNase und 5-mal umkristallisierte RNase erhielten wir von Sigma Chemical Corporation, St. Louis, Missouri/USA. Pronase wurde von Calbiochem, Luzern, Schweiz, bezogen.

Ergebnisse

Für die Untersuchungen wurde, wie bereits unter Material und Methoden erwähnt, Virus verschiedener Herkunft benutzt. Ein Teil des Virusmaterials wurde mit Hilfe von Hühnerfibroblasten-Kulturen produziert („Fibroblasten-Virus“). Die Ausbeute ist hier zwar relativ gering, das System gestattet es aber, das AMV ohne größere Schwierigkeiten radioaktiv zu markieren. Wesentlich größere Mengen von AMV können aus dem Plasma erkrankter Küken gewon-

nen werden; es stammt in erster Linie aus Myeloblasten und wird deshalb als „Myeloblasten-Virus“ bezeichnet. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen zeigten, daß „Fibroblasten-“ und „Myeloblasten-Virus“ sich im Aufbau ihrer Hülle, die größtenteils aus Wirtsmaterial besteht, unterscheiden⁸.

Nucleinsäure des Fibroblasten-Virus

Beim Fibroblasten-Virus wurde die Nucleinsäure mittels radioaktiver Markierung erfaßt.

Zwei Sekundär-Kulturen von Fibroblasten (10 cm ϕ Petrischalen), die 5 Tage mit AMV infiziert waren, wurden je 0,5 µC ¹⁴C-Uridin zugesetzt. Nach 2-tägiger Bebrütung bei 37 °C wurde das im Kulturmedium enthaltene Virus angereichert und gereinigt (s. Material und Methodik) und nach Behandeln mit NLS die markierte Nucleinsäure durch Zentrifugieren in einem Saccharose-Gradienten fraktioniert.

Die Hauptmenge des ¹⁴C-markierten Materials sedimentierte relativ schnell (s. Abb. 1). Sie war in einem zwischen Fraktion 4 und 11 ausgebildeten Gipfel enthalten (a). Kleinere, jedoch regelmäßig reproduzierbare Gipfel waren bei Fraktion 15 (b)

Abb. 1. Fraktionieren der Nucleinsäure aus ¹⁴C-Uridin-markiertem Fibroblasten-AMV durch Zentrifugieren im Saccharose-Gradienten.

und 18 (c), ein deutlicherer Gipfel im Bereich von Fraktion 23 vorhanden (d). Gelegentlich wurde ein weiterer Gipfel zwischen c und d beobachtet. Bei allen Versuchen wurden mindestens 50% der Radioaktivität in Gipfel a, etwa 30% in Gipfel d gefunden.

⁶ E. A. ECKERT, R. ROTT u. W. SCHÄFER, *Virology* **24**, 426 [1964].

⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951]

⁸ H. BAUER, unveröffentlicht.

Um die Sedimentationskonstanten der einzelnen Fraktionen zu ermitteln, wurde das radioaktiv markierte Material zusammen mit einer nichtmarkierten Tabak-Mosaik-Virus (TMV)-RNS im Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die TMV-RNS sedimentierte in der analytischen Ultrazentrifuge in Tris gepufferter 0,1-m. NaCl-Lösung mit einer S_{20} von 29 S. In den einzelnen Fraktionen wurde zum Nachweis der TMV-RNS die optische Dichte (260 m μ) und zur Erfassung der AMV-Nucleinsäure die Radioaktivität bestimmt. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb. 2 wiedergegeben. Aus dem Vergleich des Sedimentationsverhaltens des markierten Materials mit dem der optisch erfaßten TMV-RNS ergibt sich für Fraktion a eine Sedimentationskonstante von etwa 62 S, für Fraktion b von etwa 45 S, für Fraktion c von 30 S und für Fraktion d von 4–10 S. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte ein Vergleichsversuch mit 28 S Ribosomen-RNS aus Hühnerfibroblasten. Bei der Berechnung der Werte wurde die unterschiedliche Saccharose-Konzentration im Gradienten nicht berücksichtigt.

Abb. 2. Vergleich des Sedimentations-Verhaltens von TMV-RNS und Fibroblasten-AMV-RNS im Saccharose-Gradienten. AMV-RNS ^{14}C -Uridin markiert. TMV-RNS nicht markiert, erfaßt durch Messung von OD_{260} .

Nucleinsäure aus Myeloblasten-Virus

Um optisch erfaßbare Mengen von Nucleinsäure aus AMV zu erhalten, wurden hochkonzentrierte Präparate von Myeloblasten-Virus verwendet; sie enthielten 2 bis $3 \cdot 10^{13}$ Viruspartikel. Dieses Material wurde ohne besondere Vorbehandlung nach der üblichen Methode mit NLS gespalten und die Spalt-

produkte, wie vorher beschrieben, durch Zentrifugieren im Saccharose-Gradienten analysiert. Optisch erfaßbare Mengen der Fraktionen mit 62, 45 und 30 S wurden unter diesen Umständen nicht gefunden (s. Abb. 3, ohne Pronase), obwohl dies nach der eingesetzten Virusmenge zu erwarten war.

Abb. 3. Isolierung der Nucleinsäure aus Myeloblasten-AMV nach und ohne Behandlung mit Pronase.

Da das Myeloblasten-Virus, wie schon einleitend erwähnt⁸, sich im wirtseigenen Material von dem Fibroblasten-Virus unterscheidet, lag die Vermutung nahe, daß es im Gegensatz zu diesem größere Mengen von RNase enthält und daß diese die durch NLS freigesetzte Nucleinsäure hydrolysiert.

Um dies zu prüfen, wurden fallende Mengen von gereinigtem Myeloblasten-AMV mit gleichen Mengen ^{14}C -Uridin-markierter säurefällbarer AMV-RNS unter Zugabe von NLS (1%) inkubiert. Als Kontrollen dienten ein analoger Ansatz, der kein Myeloblasten-Virus enthielt, und außerdem eine Probe, der anstelle von Myeloblasten-AMV 10 μg RNase zugefügt wurden. Nach 30 Min. langer Bebrütung bei 20 °C wurde Träger-RNS zugegeben und die Radio-

aktivität im säurefällbaren Material bestimmt. Es zeigte sich, daß in der Tat bei Gegenwart von Myeloblasten-AMV ein erheblicher Teil der radioaktiven Nucleinsäure säurelöslich wird (s. Tab. 1). Der Effekt war abhängig von der Menge des zugefügten Virus.

Nach HUPPERT⁹ kann durch Behandeln von AMV mit Pronase dessen RNase-Wirksamkeit ausgeschaltet werden. Es wurde deshalb geprüft, ob sich bei Gegenwart dieses Enzymgemisches aus Myeloblasten-AMV die Nucleinsäure in hochmolekularer Form isolieren läßt.

Zu 1 ml gereinigtem und hochkonzentriertem Myeloblasten-Virus (etwa $3 \cdot 10^{13}$ Viruspartikel) wurden 10 mg Pronase zugefügt. Nachdem das Gemisch 30 Min. bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde das Virus mit NLS gespalten, das Material dann im Saccharose-Gradienten zentrifugiert und die in den einzelnen Fraktionen enthaltene Nucleinsäure durch Messung der UV-Absorption bei 260 m μ erfaßt.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3 mit-dargestellt (+Pronase). Deutlich zu erkennen ist der 62 und 30 S-Gipfel. Wesentlich schwächer ausgeprägt ist der 45 S-Gipfel, der aber in allen Versuchen dieser Art (3) deutlich zu erkennen war. Nicht faßbar ist der in den Versuchen mit radioaktiv-markiertem Material hervortretende 4 – 10 S-Gipfel. Hier ist zu bedenken, daß in dem entsprechenden Bereich auch das aus dem Virus isolierte gruppenspezifische Antigen sedimentiert¹. Sehr wahrscheinlich überdeckt dieses den Nucleinsäuregipfel.

Identifizierung der isolierten Nucleinsäure

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß nach Vormarkierung der noch nicht infizierten Zellen mit ¹⁴C-Uridin und späterem Chase mit der 100-fachen Menge ¹²C-Uridin (zur Zeit der Infektion) Virus produziert wurde, das radioaktiv war¹⁰. Auf Grund dieses Ergebnisses mußte angenommen werden, daß im AMV auch wirtsspezifische RNS vorliegt. In analogen Versuchen wurde nunmehr geprüft, in welcher unserer Fraktionen derartig markierte Nucleinsäure erscheint.

Normale sekundäre Fibroblastenkulturen (6 Platten) wurden 2 Tage lang mit je 50 μ C ³H-Uridin (insgesamt 17 μ g) bebrütet. Danach wurden die Kulturen gewaschen, mit AMV infiziert (10 infek-

tiöse Einheiten/Zelle) und gleichzeitig Medium zugegeben, das anstelle von ³H-Uridin die 100-fache Menge von ¹²C-Uridin enthielt. 3 Tage später wurde das Virus geerntet, auf die übliche Weise konzentriert und gereinigt, die Nucleinsäure durch Behandeln mit NLS freigesetzt und durch Zentrifugieren im Saccharose-Gradienten fraktioniert.

Abb. 4 gibt das Ergebnis des Versuches wieder. Signifikante Mengen von Radioaktivität wurden danach nur in den Bereichen gefunden, die etwa den 30 und 4 – 10 S-Fractionen entsprechen.

Abb. 4. Differentielle Markierung der im AMV enthaltenen RNS; Nachweis zellspezifischer RNS. Markierung des Wirtssystems vor Infektion mit ³H-Uridin; „Chase“ zur Zeit der Infektion mit „kaltem“ Uridin. Verteilung der Radioaktivität auf die Nucleinsäure-Fractionen des geernteten Virus.

In einem zweiten Versuch wurde der Chase nicht mit „kaltem“ Uridin, sondern mit ¹⁴C-Uridin durchgeführt. Durch die Doppelmarkierung mit ³H und ¹⁴C sollte es möglich werden, auch die übrige, im ersten Versuch nicht erfaßte Nucleinsäure nachzuweisen (vor allem 62 S-Komponente).

Vier normale Fibroblastenkulturen wurden mit je 10 μ C ³H-Uridin (0,057 μ g/ μ C) 2 Tage lang inkubiert. Die Kulturen wurden dann gewaschen, mit AMV infiziert und zum Medium 5 μ C ¹⁴C-Uridin/Platte (9,68 μ g/ μ C) zugegeben. 3 Tage später wurde das Virus auf die übliche Weise aufgearbeitet und das Spaltmaterial im Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die ³H- und ¹⁴C-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurden im Scintillationszähler bestimmt.

Das Ergebnis des Versuches ist in Abb. 5 dargestellt. Wie daraus hervorgeht, war das zu dem Chase verwendete, während der Virusvermehrung zugegebene ¹⁴C-Uridin in sämtlichen bisher beobachteten Gipfeln vorhanden. Das zur Vormarkierung

⁹ J. HUPPERT, persönliche Mitteilung.

¹⁰ H. BAUER, unveröffentlicht.

	Konzentration des Myeloblasten-Virus				10 μ g RNase
	unverdünn	1/5	1/20	0	
% säurelösliche RNS	53	32	5	0	32

Tab. 1. Konzentrationsabhängigkeit der im Myeloblasten-AMV enthaltenen RNase-Aktivität. Angegeben sind % der 14 C-Uridin-markierten (AMV) RNS, die nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Myeloblasten-AMV säurelöslich werden, bezogen auf die Kontrolle, die kein Myeloblasten-AMV enthält.

Abb. 5. Wie Abb. 4. Versuch aber mit Doppelmarkierung durchgeführt. 3 H-Uridin vor Infektion, 100-fache Menge 14 C-Uridin zur Zeit der Infektion.

verwendete 3 H-Uridin dagegen war vor allem in den Gipfeln zu finden, die den 45, 30 und 4–10 S-Fractionen entsprechen. Im Bereiche der 62 S-Fraktion war nur eine relativ geringe Radioaktivität vorhanden. Der hier zu beobachtende kleine Gipfel scheint von einem radioaktiven Material herzurühren, das eine etwas höhere Sedimentationskonstante als 62 S hat. Auf Grund des beschriebenen Chase-Experiments ist es sehr wahrscheinlich, daß die 62 S-RNS die eigentliche Virus-RNS repräsentiert. In den Fraktionen mit 45, 30 und 4–10 S scheinen dagegen erhebliche Mengen von wirtsspezifischer RNS enthalten zu sein.

Obwohl hochgereinigtes Virus für die Versuche verwendet wurde, bestand doch die Möglichkeit, daß dieses bei der Konzentrierung radioaktives Material aus dem Kulturmedium mitriß. Dagegen spricht ein Versuch, bei dem nichtmarkiertes Fibroblasten-Virus mit dem Medium radioaktiv markierter (14 C-Uridin), normaler Fibroblastenkulturen gemischt und danach durch Ultrazentrifugieren konzentriert wurde. Das Konzentrat wurde anschließend im CsCl-Gradienten zentrifugiert. Als Kontrollen dienten radioaktiv markiertes Fibroblastenvirus und außerdem Kultur-Medium radioaktiv markierter nicht-infizierter Zellen. Sie wurden analog behandelt.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, bandete das radioaktiv markierte Virus bei der üblichen Dichte⁶. Die übrigen Proben zeigten keine Radioaktivität in diesem Bereich. Daraus folgert, daß radioaktiv markiertes Material aus dem Gewebekulturmedium nicht fester an das Fibroblasten-Virus gebunden wurde.

Abb. 6. Prüfung, ob sich 14 C-Uridin-markiertes Material aus dem Medium normaler Kulturen an nicht markiertes AMV anlagert. Isolierung des Virus im CsCl-Dichtegradienten. a) Kontrolle: 14 C-Uridin-markiertes AMV (x-x). b) Kontrolle: Medium von 14 C-Uridin-markierten normalen Fibroblasten (o-o). c) Nichtmarkiertes Virus zusammen mit Medium von 14 C-Uridin-markierten Fibroblasten. nD der einzelnen Fraktionen wurde im Zeiss-Abbé-Refraktometer bei Zimmertemperatur bestimmt (●-●).

Eine weitere Möglichkeit war die, daß sich bei der Produktion der Viruspartikel wirtsspezifische RNS an die Oberfläche der Teilchen anlagerte. Es wurde deshalb geprüft, ob sich ein Teil der mit dem Viruspartikel verbundenen RNS durch RNase-Behandlung abbauen läßt.

Fibroblasten-Virus, das in der üblichen Weise mit 14 C-Uridin radioaktiv markiert worden war, wurde sofort nach der Reinigung mit 10 μ g/ml RNase 30 Min. bei Zimmertemperatur gehalten und danach die Radioaktivität des säurefällbaren Materials bestimmt. Diese wurde mit derjenigen einer nicht mit RNase-behandelten Kontrolle verglichen.

In 3 Versuchen dieser Art zeigte sich, daß durch RNase-Behandlung das 14 C-Uridin-markierte Ma-

terial des Fibroblasten-Virus nicht in säurelösliches Material überführt werden kann.

Prüfung der Nucleinsäure auf Reinheit

Zunächst wurde untersucht, ob in den isolierten Fraktionen noch Proteine enthalten sind.

Da das Virus-Protein antigene Eigenschaften besitzt, wurden die einzelnen Fraktionen serologisch mit spezifischem Antiserum in der Komplementbindungs-Reaktion geprüft. Verwendet wurde dafür Material, das in Gegenwart von Pronase aus Myeloblasten-Virus gewonnen wurde [Material von den Fraktionen des in Abb. 3 (+ Pronase) dargestellten Versuchs]. Eine komplementbindende Aktivität ließ sich weder in der 62 noch in der 45 und 30 S-Fraktion nachweisen. Die 4–10 S-Fraktion wurde nicht geprüft, da, wie schon erwähnt, bekannt ist, daß im entsprechenden Bereich das gruppenspezifische Antigen des Virus sedimentiert¹. Ein Kontrollversuch zeigte, daß zumindest das gruppenspezifische Antigen durch Pronase nicht zerstört wird.

Da die Komplementbindungs-Reaktion relativ unempfindlich ist, wurde die Prüfung auf das Vorhandensein von Protein auch noch mit Hilfe von radioaktiver Markierung durchgeführt.

Je zwei Fibroblastenkulturen, die 5 Tage lang mit AMV infiziert waren, wurden insgesamt $20 \mu\text{C}$ ^3H -Uridin bzw. $2 \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin zugesetzt. 26 Std. später wurde das Virus nach der üblichen Methode aufgearbeitet.

Abb. 7. Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen des AMV nach Markierung mit ^3H -Uridin bzw. ^{14}C -Leucin. AMV mit NLS gespalten. Spaltprodukte im Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Es ergab sich das in Abb. 7 wiedergegebene Verteilungsschema der Radioaktivität. Daraus ist ersichtlich, daß zumindest die 62 S-Fraktion frei von ^{14}C -Leucin-markiertem Material ist.

Durch Proteinbestimmung nach LOWRY⁷ konnte ausgeschlossen werden, daß die 62, 45 und 30 S-Fraktionen (Material des in Abb. 3 dargestellten Versuchs) mehr als $5 \mu\text{g}$ Protein enthalten.

Dafür, daß es sich bei dem 62 S-Material um weitgehend reine Nucleinsäure handelt, spricht auch das UV-Absorptionsspektrum dieser Fraktion (s. Abb. 8) mit einem Minimum bei $227 \text{ m}\mu$, einem Maximum bei $258 \text{ m}\mu$ und einem Verhältnis $OD_{260/280} = 2$. Das Verhältnis $OD_{260/280}$ der 45 S und 30 S-Fraktionen lag bei 1,3 bis 1,4.

Abb. 8. UV-Absorptionsspektrum der Fraktion 8+9 ($\sim 62 \text{ S}$) aus dem in Abb. 3 dargestellten Versuch (+ Pronase).

Durch die bisherigen Versuche wurde das Vorhandensein von DNS im Virus noch nicht ausgeschlossen. Um geringere Mengen von DNS nachweisen zu können, wurde ein Markierungsversuch mit ^3H -Thymidin durchgeführt.

Drei Fibroblastenkulturen, die 8 Tage lang mit AMV infiziert waren, wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je $30 \mu\text{C}$ ^3H -Thymidin ($0,0194 \text{ mg/mC}$) zugefügt. Drei Parallelkulturen wurde statt dessen jeweils $1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Uridin ($8,14 \text{ mg/mC}$) zugesetzt. Zwei Tage nach der letzten Isotopen-Zugabe wurde das Virus aus beiden Ansätzen, wie unter Material und Methodik beschrieben, konzentriert und gereinigt und danach im Saccharose-Gradienten gebandet ($20 - 50\%$ Saccharose).

In den Fraktionen, in denen das Virus enthalten war (erkennbar am Tyndall-Effekt), ließen sich zwar größere Mengen von ^{14}C -Uridin, aber praktisch kein ^3H nachweisen (Abb. 9). Danach scheint im AMV, in Übereinstimmung mit Untersuchungen von BONAR und BEARD¹¹, DNS nicht oder höchstens nur in Spuren enthalten zu sein.

¹¹ R. A. BONAR u. J. W. BEARD, J. nat. Cancer Inst. **23**, 183 [1959].

Abb. 9. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation von intaktem AMV aus ^{14}C -Uridin- bzw. ^3H -Thymidin-markierten Fibroblastenkulturen.

Wenn es sich bei der aus dem AMV isolierten Nucleinsäure um freie, nicht von Hüllsubstanzen umgebene, einsträngige RNS handelt, sollte sie durch RNase abbaubar sein. Geprüft wurde in dieser Hinsicht nur die am schnellsten sedimentierende Hauptkomponente.

Eine 62 S-Fraktion aus Fibroblasten-Virus, die mit ^{14}C -Uridin markiert war, wurde in drei gleich große Proben aufgeteilt. Der ersten wurden 10 μg RNase, der zweiten eine gleiche Menge DNase und der dritten ein entsprechendes Volumen Pufferlösung zugefügt. Nach 20 Min. langer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde nach Zugabe von Träger-RNS das säurefällbare Material isoliert und die Radioaktivität bestimmt. In Tab. 2 ist einer von 3 derartigen Versuchen dargestellt. Danach ist die ^{14}C -Uridin markierte 62 S-Fraktion durch RNase hydrolysierbar.

	Behandlung mit (20 Min. Zimmertemp.)		
	0 (Kontrolle)	10 μg DNase (Kontrolle)	10 μg RNase
Imp./Min. im säurefällbaren Material	226	217	32

Tab. 2. RNase-Sensitivität der 62 S-RNS. Nucleinsäure mit ^{14}C -Uridin markiert.

Besprechung der Ergebnisse

Wie die beschriebenen Versuche zeigen, läßt sich sowohl aus AMV, das aus Fibroblasten, wie aus sol-

chem, das aus Myeloblasten gewonnen wurde, hochmolekulare Ribonucleinsäure mit Hilfe von Natriumlaurylsulfat extrahieren. Bei dem „Myeloblasten-Virus“ war das allerdings erst möglich, nachdem die mit diesem assoziierte RNase durch Pronase zerstört worden war.

In beiden Fällen wurden mindestens vier Fraktionen isoliert, deren Sedimentationsverhalten jeweils annähernd gleich war. Neben einer 62 S-Komponente, die in relativ großer Menge vorlag, wurden noch 45, 30 und 4–10 S-Material sowohl durch Markierung mit ^{14}C -Uridin (Fibroblasten-Virus), wie durch UV-Absorptionsmessung bei 260 $\text{m}\mu$ (Myeloblasten-Virus) festgestellt. Bei den drei langsamer sedimentierenden Fraktionen handelt es sich nach dem UV-Absorptionsverhalten nicht um reine Nucleinsäure. Das Verhältnis $OD_{260/280}$ liegt bei ihnen jeweils bei 1,4. Elektronenoptisch wurden bei der 30 S-Fraktion kleine runde Partikel mit einem Durchmesser von etwa 15 $\text{m}\mu$ gefunden¹². Bei der 62 S-Komponente handelt es sich nach ihrem UV-Absorptionsverhalten und nach Markierungsversuchen mit Isotopen um weitgehend reine Ribonucleinsäure. Ihr Verhalten gegenüber RNase und die vorläufigen Ergebnisse von Basenbestimmungen sprechen dafür, daß sie in Form eines einfachen Stranges vorliegt. Die Sedimentationskonstante von 62 S entspricht etwa einem Mol.-Gew. von $9 \cdot 10^6$.

Nucleinsäure-haltige Fraktionen mit ähnlichem Sedimentationsverhalten wurden mit einer anderen Methode gleichzeitig auch von HUPPERT und Mitarb. aus AMV isoliert³. Bei einem Gemisch von zwei Viren der Leukose-Gruppe (Rous-Virus + RAV)¹³, wiesen ROBINSON et al. eine 64 S und 4 S-RNS nach¹⁴. Es besteht die Möglichkeit, daß diesen Autoren der Nachweis von 45 und 30 S-Komponenten entging, weil sie die Zentrifugation im Zucker-Gradienten nicht lange genug durchführten. Vom Standpunkt der Virus-Systematik aus gesehen ist es interessant, daß von der gleichen Arbeitsgruppe auch aus einem Vertreter der Myxogruppe, dem Newcastle disease Virus, Nucleinsäure von 57 S isoliert wurde¹⁵. Elektronenoptische Untersuchungen hatten gezeigt, daß zwischen den Hühnerleukose-Viren und den Myxoviren morphologisch gewisse Ähnlichkeiten bestehen^{16–18}.

¹² H. BAUER u. H. FRANK, unveröffentlicht.

¹³ H. HANAFUSA, T. HANAFUSA u. H. RUBIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 572 [1963].

¹⁴ W. S. ROBINSON, A. PITKANEN u. H. RUBIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 137 [1965].

¹⁵ P. H. DUESBERG u. W. S. ROBINSON, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 794 [1965].

Von entscheidender Bedeutung ist die Frage, welche der aus dem AMV und den übrigen genannten Viren herausgelösten Nucleinsäuren jeweils der eigentlichen Virusnucleinsäure entspricht. Die Arbeitsgruppe in Berkeley^{14, 15} vertritt die Ansicht, daß die Nucleinsäure mit etwa 60 S intakte Virus-RNS, die langsamer sedimentierenden Materialien Abbauprodukte derselben darstellen. Dem stehen aber die Ergebnisse unserer Chase-Experimente entgegen. Aus ihnen geht hervor, daß die 45, 30 und auch die 4–10 S-Fractionen zumindest teilweise wirtsspezifische RNS darstellen. Betrachtet man daraufhin noch einmal die von den genannten Autoren bei den einzelnen Nucleinsäure-Fractionen durchgeführten Basenbestimmungen^{14, 15}, so ergibt sich, daß sich bei den hochmolekularen Fractionen von Rous-Virus + RAV (64 S) und Newcastle disease Virus (57 S), die beide für die Versuche aus Hühnerfibroblasten-Kulturen gewonnen wurden, die Basenverhältnisse klar unterscheiden (vor allem G und U); die Basenverhältnisse der niedermolekularen RNS dagegen (4 bzw. 3 S) stimmen bei beiden Virusarten recht gut überein. Sie entsprechen nahezu denjenigen der normalen RNS aus Hühnerfibroblasten, was auf Grund des von uns durchgeführten Chase-Versuches zumindest für Rous-Virus + RAV, die serologisch mit AMV verwandt sind^{19, 1}, zu erwarten ist. Man kann demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit folgern, daß nur die RNS mit einer s_{20} um 60 S das eigentliche genetische Material von AMV, Rous-Virus + RAV und Newcastle disease Virus darstellt.

Die Tatsache, daß neben dieser Fraction noch zellspezifische Ribonucleinsäuren im Viruspartikel enthalten sind und zwar in einer Anordnung, in der sie nicht durch RNase angegriffen werden können, ist aus verschiedenen Gründen von Bedeutung. BADER²⁰ und TEMIN²¹ konnten zeigen, daß durch DNS-Inhibitoren die Infektion von Fibroblasten mit Rous-Virus gehemmt werden kann. TEMIN stellte daraufhin die Hypothese auf, daß bei der Vermehrung des Rous-Virus die Bildung der Virus-RNS über eine als „Primer“ verwendete spezifische DNS läuft²². Zur Stützung dieser Hypothese führte er Hybridisierungs-Experimente mit DNS-Fractionen aus Rous-infizier-

ten Zellen einerseits und der Gesamt-RNS aus gereinigtem Rous-Virus andererseits durch. Er beobachtete dabei eine gewisse Hybridisierung. Nach unseren Ergebnissen dürfte daran zu einem erheblichen Teil die in den Viren der Hühner-Leukose-Gruppe enthaltene, normale Zell-RNS beteiligt sein. Es sollte nunmehr geprüft werden, wie sich in dieser Hinsicht die 64 S-Fraction des Rous-Virus verhält. — SVERAK et al. folgerten aus ihren Untersuchungen, daß die virusspezifische RNS des Myeloblastose-Virus unter Verwendung von Material aus Zell-RNS gebildet wird²³. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß dies durch das Vorhandensein von Zell-RNS im Viruspartikel vorgetäuscht wurde. — Schließlich kann beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen noch nicht ausgeschlossen werden, daß neben der eigentlichen Virus-RNS auch die in den Hühner-Leukoseviren enthaltene zellspezifische RNS in den infizierten Zellen biologisch aktiv wird. Bei der Prüfung der onkogenen Eigenschaften dieser Viren sollte man dies berücksichtigen.

Der zwingende Beweis dafür, daß die 62 S-Komponente des AMV das eigentliche genetische Material des Virus repräsentiert, kann erst erbracht werden, wenn es gelingt, mit dieser Komponente die Bildung neuer Viruspartikel in Wirtszellen zu induzieren. Bisher konnte zwar in einem Versuch ein RNase-sensitives, infektiöses Prinzip in der 62 S-Fraction nachgewiesen werden; dieses Ergebnis ließ sich jedoch bisher nicht reproduzieren.

Anm. b. d. Korr.: Inzwischen berichteten W. S. ROBINSON und M. BALUDA (Proc. nat. Acad. Sci. USA **54**, 1686 [1965]) ebenfalls über die Isolierung einer hochmolekularen und niedermolekularen RNS aus AMV. J. RIMAN isolierte aus dem gleichen Virus drei RNS-haltige Komponenten (Acta Virologica, im Druck).

Herrn Professor Dr. W. SCHÄFER bin ich für seine Förderung und kritische Diskussion der Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Fr. Dr. E.-M. SANDER danke ich für die Überlassung der TMV-RNS, Herrn P. GIEBLER für die Durchführung der Versuche in der analytischen Ultrazentrifuge, Frau P. BECKER, Fr. B. LOHMANN und Fr. E. SEIFERT für technische Assistenz.

Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

¹⁴ R. R. DOURMASHKIN u. P. J. SIMONS, J. Ultrastructural Res. **5**, 505 [1961].

¹⁷ E. A. ECKERT, R. ROTT u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. **18b**, 339 [1963].

¹⁸ R. A. BONAR, U. HEINE, D. BEARD u. J. W. BEARD, J. nat. Cancer Inst. **30**, 949 [1963].

¹⁹ R. J. HUEBNER, W. P. ROWE, H. C. TURNER u. W. T. LANE, Proc. nat. Acad. Sci. USA **50**, 379 [1963].

²⁰ J. P. BADER, Virology **22**, 462 [1964].

²¹ H. M. TEMIN, Virology **23**, 486 [1964].

²² H. M. TEMIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **52**, 323 [1964].

²³ L. SVERAK, G. S. BEAUDREAU u. J. W. BEARD, J. nat. Cancer Inst. **29**, 355 [1962].