Die elektrokinetische Aktivität einiger Enteroviren*

W. A. K. SCHMIDT** und P. SACHTLEBEN***

Institut für Hygiene und Mikrobiologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. ZIMMERMANN)
Kinderklinik (Direktor: Prof. Dr. J. B. MAYER) der Universität des Saarlandes

(Z. Naturforschg. **23 b**, 1080—1081 [1968]; eingegangen am 25. Januar 1968)

Eine neue Methode zur Typenbestimmung von Viren wird beschrieben. Ihre Brauchbarkeit wird an mehreren Enteroviren demonstriert. Sie basiert auf der Eigenschaft adsorbierter Viren, die Wanderungsgeschwindigkeit suspendierter Zellen im elektrischen Feld herabzusetzen. Dieser Effekt ist durch typspezifische Hyperimmunseren hemmbar.

In den ersten Phasen einer Virusinfektion, der Adsorption und Penetration, kann das elektrokinetische Potential der Wirtszelle verändert werden^{1,2}. Dieses Phänomen leitet sich ab vom Aufbau des elektrokinetischen Potentials durch in der Zellaußenfläche fixierte Ladungsträger, die vom Virus abgespalten oder überlagert und damit elektrokinetisch inaktiviert werden. Am eingehendsten ist dies bei Myxoviren untersucht worden. Sie besitzen Enzymaktivität, die gegen einen solchen auf der Zellmembran lokalisierten Ladungsträger — die Neuraminsäure — gerichtet ist. Aktives Myxovirus oder das Ferment Neuraminidase allein reduziert die elektrokinetischen Potentiale geeigneter Zellen, was an einer verminderten Wanderungsgeschwindigkeit der betroffenen Zellen im elektrischen Feld nachgewiesen wird³.

Vor einigen Jahren ist über die elektrokinetische Wirksamkeit eines anderen Virus, des Poliomyelitisvirus⁴, und kürzlich über Coxsackie-B3-Virus⁵ berichtet worden. Auch hier wurden an den Wirtszellen elektrokinetische Effekte beobachtet, die aber anderer Natur sein müssen als bei den Myxoviren, da wir bei den beiden zu den Enteroviren gehörigen Erregern keine Fermentaktivität kennen und die Virusrezeptoren an der Zellwand wahrscheinlich keine Neuraminsäure besitzen. Eine Untersuchung

dieser Phänomene könnte zusätzlichen Aufschluß über Rezeptor, Adsorption und Penetration des Virus bringen. Außerdem wäre sie möglicherweise von Bedeutung für einen praktischen Virusnachweis. Aus diesem Grunde haben wir zunächst einige weitere Enteroviren, nämlich Coxsackievirus A9, B4 und B5, Echovirus 9 sowie nochmals Poliovirus I, II und III daraufhin untersucht, ob sie elektrokinetisch wirksam sind und ob beim Auftreten von elektrophoretischen Veränderungen diese als spezifisch für das eingesetzte Virus angesehen werden können.

Material und Methode

Zur Untersuchung wurden folgende Virustypen benutzt: Coxsackievirus Typ A9 (Stamm Woods)⁶, Typ B4 (Stamm Burrier)⁶, Typ B5 (Stamm Faulkner), Echovirus Typ 9 (Stamm Hill), Poliovirus Typ I (Stamm Mahoney), Typ II (Stamm MEF₁) und Typ III (Stamm Saukett). Die Vermehrung erfolgte nach bereits beschriebener Methode^{5,7}. Über die Gewinnung von Hyperimmunseren und die Durchführung des Neutralisations-Testes ist ebenfalls berichtet worden^{8,9}. Die verwendeten Seren besaßen folgende Titer im Neutralisations-Test: Anti-Coxsackie A9 3200, Anti-Coxsackie B4 6400, Anti-Coxsackie B5 3200, Anti-Echo 9 3200, Anti-Polio I 6400, Anti-Polio II 6400, Anti-Polio III 6400.

* Mit Unterstützung der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Kinderlähmung e.V., Düsseldorf, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

Vorgetragen auf der 1. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Mainz, 5. 11. 1966.

** Gegenwärtige Anschrift: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf, 4 Düsseldorf, Witzelstr. 111.

*** Herrn Prof. Dr. J. B. MAYER, Homburg/Saar, zum 60. Geburtstag.

¹ M. HANIG, Proc. exp. Biol. [N. Y.] **68**, 385 [1948].

² A. BUZZELL and M. HANIG, Advances Virus Res. **5**, 289 [1958].

³ G. M. W. COOK, D. H. HEARD, and G. V. F. SEAMAN, Nature [London] **191**, 44 [1966].

⁴ P. SACHTLEBEN u. R. LUYKEN, Arch. ges. Virusforsch. **9**, 732 [1962].

⁵ P. SACHTLEBEN, W. A. K. SCHMIDT u. G. KLEIN, Arch. ges. Virusforsch. **20**, 99 [1967].

⁶ R. WIGAND and A. SABIN, Arch. ges. Virusforsch. **12**, 29 [1962].

⁷ G. KLEIN, Dissertation, Universität Saarbrücken 1967.

⁸ W. A. K. SCHMIDT, W. HÖPKEN u. R. WOHLRAB, Arch. ges. Virusforsch. **10**, 617 [1960].

⁹ W. A. K. SCHMIDT, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **189**, 538 [1963].

Für die elektrophoretischen Untersuchungen wurden HeLa-Zellen benutzt. Die Ablösung erfolgte mechanisch, da Trypsin wegen seiner elektrokinetischen Wirkungen nicht verwendet wird⁵. Die Pufferlösung bestand aus 100 Tln. 0,145-m. NaCl-Lösung, der 5 Tle. 0,066-m. Phosphatpuffer zugesetzt waren⁵. Der pH-Wert betrug 7,3, der spezifische elektrische Widerstand 73–74 Ω cm. Zur Zellelektrophorese wurde ein Gerät mit dem geringen Füllungsvolumen von 0,3 ml¹⁰ verwendet. Die Standardabweichung lag bei $\pm 2,5$ Prozent. Das elektrokinetische Oberflächenpotential ist der elektrokinetischen Wanderungsgeschwindigkeit $\frac{V}{X} \left[\frac{\mu/\text{sec.}}{\text{V/cm.}} \right]$ direkt proportional, weshalb nur der letztere, auf unmittelbarer Messung beruhende Wert angegeben wird.

Ergebnisse

1. Die elektrophoretische Beweglichkeit normaler HeLa-Zellen

Die Beweglichkeitswerte von 300 HeLa-Zellen fanden wir wieder normal verteilt mit einem Mittelwert von 0,983, der unseren früheren Ergebnissen mit Werten von 0,987⁴ und 0,985⁵ entspricht. Die Standardabweichung betrug 0,029 oder knapp 3 Prozent.

2. Die elektrophoretische Beweglichkeit von HeLa-Zellen nach Virusinfektion

Die Versuche wurden wie mit Coxsackie-B3-Virus beschrieben⁵ ausgeführt. Da die Ergebnisse sehr ähnlich waren, werden hier nur die maximalen, durch die höchste verfügbare Viruskonzentration verursachten Veränderungen der Zellbeweglichkeit angegeben (s. Tab. 1). Diese Veränderungen begannen sofort nach dem Zusatz von Virus zur Zellsuspension und waren meist schon 10 Min. später

	Elektro- kinetischer Effekt des Virus	Infektiosität [ID ₅₀ Einh./ 0,5 ml]	Verminde- rung der Beweglich- keit [%]
Polio I	+	107,8	15
Polio II	+	107,8	25
Polio III	+	107,5	25
Coxsackie A9	+	106,8	20
Coxsackie B4	+	105,8	12
Coxsackie B5	+	107,8	12
Echo 9	+	107,0	20

Tab. 1. Die elektrokinetische Aktivität einiger Enterovirustypen, Verminderung der normalen elektrophoretischen Beweglichkeit von HeLa-Zellen.

maximal ausgeprägt. Eine Latenzzeit von mehreren Min. bis zum Einsetzen der Veränderungen, wie wir sie früher bei Polio- und Coxsackie-B3-Virus beobachtet hatten^{4, 5}, trat nicht auf.

3. Die Wirkung spezifischer Antiseren

Die Antiseren wurden in verschiedenen Verdünnungen den Viruspräparaten zugefügt, und nach 60 Min. Inkubation bei 37 °C erfolgte Zusatz der HeLa-Zellen. Über die technischen Einzelheiten ist bereits berichtet worden⁵. Die Viren besaßen aus Tab. 1 zu entnehmende Infektiositätstitern. Sämtliche Antiseren wurden gegen alle Virustypen eingesetzt. Wie Tab. 2 zeigt, erfolgte eine Hemmung der elektrokinetischen Wirkung eines Virus nur durch sein spezifisches Antiserum. Sämtliche anderen Seren blieben ohne Einfluß.

	Antiseren						
	P.I	P.II	P.III	C.A9	C.B4	C.B5	E.9
Polio I	+	0	0	0	0	0	0
Polio II	0	+	0	0	0	0	0
Polio III	0	0	+	0	0	0	0
Coxsackie A9	0	0	0	+	0	0	0
Coxsackie B4	0	0	0	0	+	0	0
Coxsackie B5	0	0	0	0	0	+	0
Echo 9	0	0	0	0	0	0	+

Tab. 2. Die Neutralisierung der elektrokinetischen Aktivität einiger Enterovirustypen durch virus-spezifische Antiseren.

Diskussion und Zusammenfassung

Sämtliche untersuchten Enteroviren, Coxsackievirus Typ A9, B4 und B5, Echovirus Typ 9 und Poliovirus Typ I, II, III, waren elektrokinetisch wirksam. Wie früher schon für Coxsackievirus B3⁵ beschrieben, traten nach Viruszusatz zur Zellsuspension frühzeitig elektrokinetische Veränderungen der Zelloberflächen auf; nach längstens 30 Min. waren sie beendet. Regelmäßig kam es dabei zu einer Verminderung der Oberflächenladung der infizierten Zellen. Sie betrug bei maximaler Viruskonzentration 12–25% und lag damit sicher außerhalb der Fehlermöglichkeit. Nach Zusatz von homologem Antiserum zur Virussuspension kam es bei sämtlichen untersuchten Typen nicht zur Änderung des elektrokinetischen Potentials der Zelloberfläche, was auf ihre virusspezifische Natur schließen läßt. Heterologe Seren blieben ohne Einfluß. Damit wird eine Möglichkeit aufgezeigt, Viren durch Zellelektrophorese nachweisen zu können.

¹⁰ P. SACHTLEBEN, D. KRÄMER, W. SCHWARTZ u. G. V. F. SEAMAN, Klin. Wschr. 45, 425 [1967].