

# Studien mit $^{32}\text{P}$ -markiertem Virus der Klassischen Geflügelpest

I. Mitt.: Untersuchungen über das Verhalten des Virus beim Eindringen in die Wirtszelle

VON EBERHARD WECKER und WERNER SCHÄFER

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforschg. 12 b, 483—492 [1957]; eingegangen am 4. Mai 1957)

In Extrakten aus Zellen, die mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem Virus der Klassischen Geflügelpest infiziert wurden, lassen sich Radioaktivitäts-Träger nachweisen, die langsamer als die Virus-Elementarteilchen sedimentieren. Ein Teil davon wird durch spezifisches Antiserum gegen „gebundenes Antigen“ präzipitiert, der Rest besteht aus Phosphorlipoiden, in kalter Trichloressigsäure löslichen Substanzen und aus Nucleinsäure. Die letztere wird zu einem großen Teil durch Ribonuclease hydrolysiert. Es wird aus diesen Befunden geschlossen, daß in der infizierten Zelle aus dem Virus in Freiheit gesetztes „gebundenes Antigen“ vorliegt; außerdem ist hier aber auch noch freie Ribonucleinsäure vorhanden, die entweder aus dem „gebundenen Antigen“ durch Abspaltung der Proteinkomponente hervorgegangen ist, oder eine zweite davon unabhängige Virus-Ribonucleinsäure darstellt.

Beim Influenza-Virus sind kurz nach der Infektion nur noch 1—3% der an die Wirtszellen adsorbierten Virusteilchen als infektiöse Einheiten nachweisbar<sup>1,2</sup>. Ähnlich liegen die Verhältnisse auch bei dem zur Influenza-Gruppe gehörenden Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus)<sup>3</sup>. Diese Befunde deuteten darauf hin, daß das infizierende Virusteilchen „Veränderungen in der Zelle erfahren hat, die es nicht mehr nachweisbar machen“<sup>4</sup>. Die Veränderungen können darin bestehen, daß sich die Viren der Influenza-Gruppe — ähnlich wie die Phagen — beim Eindringen in die Wirtszellen zerlegen.

In vitro kann man eine Zerlegung dieser Viren dadurch erreichen, daß man sie mit Äther schüttelt. Dabei kommt es, ebenso wie beim Infektionsvorgang, zu einem Verlust der Infektiosität<sup>5,6</sup>. Man erhält auf diese Weise beim KP-Virus zwei Arten von Untereinheiten, von denen die eine als „gebundenes Antigen“, die andere als „Hämagglutinin“ bezeichnet wird. Das „gebundene Antigen“, das im Inneren der kugelförmigen Elementarteilchen seinen Platz hat, besteht aus Ribonucleinsäure (10—15%) und Protein; das „Hämagglutinin“ enthält — soweit bis jetzt bekannt — neben Eiweiß noch Kohlenhydrate und war ursprünglich ein Bestandteil der Elementarteilchen-Oberfläche<sup>7</sup>. Wenn es zutrifft, daß auch beim Infektionsvorgang eine Zerlegung der Elementarteilchen erfolgt, ist damit zu rechnen, daß hier ebenfalls diese beiden Untereinheiten frei werden.

Da eine Entscheidung hierüber mit Hilfe rein biologisch-serologischer Verfahren sowie durch ultrahistologische Untersuchungen nicht zu erzielen war, versuchten wir, diese Fragen jetzt unter Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -markiertem KP-Virus aufzuklären. Über ähnliche Versuche mit Influenza-A-Virus wurde vor kurzem schon von HOYLE<sup>8</sup> berichtet. Diesem Autor standen aber nur Virus-Präparate mit sehr geringer Radioaktivität zur Verfügung (1 Imp./Min. pro hämagglutinierende Einheit). Um meßbare Mengen von  $^{32}\text{P}$  in seinen Fraktionen wiederzufinden, war er deshalb gezwungen, sehr hohe Dosen von Virus (über  $10^4$  Virusteilchen pro Zelle) zur Infektion einzusetzen. Unter diesen Bedingungen ist aber wohl kaum ein klares Bild vom Ablauf des Infektionsvorganges zu gewinnen. Zur Charakterisierung des nach der Infektion vorliegenden  $^{32}\text{P}$ -haltigen Materials wurden von HOYLE<sup>8</sup> lediglich physikalische und chemische Methoden herangezogen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten dank der hohen spezifischen Aktivitäten der verwendeten Viruspräparate (etwa 200—300 Imp./Min. pro hämagglutinierende Einheit = IPM/HAE) und wegen der größeren Zahl der eingesetzten Zellen die Versuche mit Infektionsdosen durchgeführt werden, die etwa ein bis zwei Teilchen pro Zelle entsprechen. Die Charakterisierung des vorliegenden Materials wurde außer mit physikalischen und chemischen Methoden auch serologisch und enzymatisch zu erreichen versucht. Von den oben genannten Un-

<sup>1</sup> W. HENLE, J. exp. Med. 90, 1 [1949].

<sup>2</sup> A. ISAACS u. M. EDNEY, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. 28, 635 [1950].

<sup>3</sup> W. SCHÄFER u. K. MUNK, Z. Naturforschg. 7 b, 608 [1952].

<sup>4</sup> O. C. LIU, H. BLANK, J. SPIZZEN u. W. HENLE, J. Immunol. 73, 415 [1954].

<sup>5</sup> L. HOYLE, J. of Hyg. 50, 229 [1952].

<sup>6</sup> W. SCHÄFER u. W. ZILLIG, Z. Naturforschg. 9 b, 779 [1954].

<sup>7</sup> W. SCHÄFER, Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses, 1956, S. 91.

<sup>8</sup> L. HOYLE u. W. FRISCH-NIGGEMEYER, J. of Hyg. 53, 474 [1955].

tereinheiten des Elementarteilchens ließ sich auf diese Weise bisher jedoch nur das „gebundene Antigen“ erfassen, weil — wie schon frühere Untersuchungen zeigten — in das „Hämagglutinin“ kein oder nur sehr wenig  $^{32}\text{P}$  eingebaut wird<sup>9</sup>.

## Material und Methoden

### 1. Virus

Es wurde ausschließlich der Stamm „Rostock“ des KP-Virus verwendet, der während der Versuche die 98. bis 120. Ei-Passage durchlief. Die Markierung des Virus mit radioaktivem Phosphor und die Reinigung der markierten Viruspräparate erfolgten in der früher beschriebenen Weise<sup>9</sup>. Lediglich die Infektionsdosis für die mit  $^{32}\text{P}$ -haltigem Medium inkubierten Gewebekulturen wurde verringert, wodurch die Virus-Ausbeute auf ungefähr das Doppelte, die spezifische Aktivität um ca. 20% gesteigert werden konnten. An Stelle von 0,1 ml unverdünnter, virushaltiger Ei-Flüssigkeit verwendeten wir zur Infektion 0,1 ml einer 1:16 verdünnten Ei-Flüssigkeit/Petrischale, was einer Infektion mit etwa  $5 \cdot 10^6$  plaquebildenden Einheiten (PBE) entspricht.

### 2. Wirtszellen

Es wurden in der Gewebekultur gezüchtete embryonale Hühnerzellen<sup>9</sup> und Chorioallantois-Membranen von 13 Tage lang bebrüteten Hühnereiern verwendet. Die embryonalen Hühnerzellen von 1–3 Tage lang kultivierten Zellschichten wurden nach Behandlung mit Trypsin und 2-maligem Waschen in Suspension verwendet. Sie werden im folgenden als Fibroblasten bezeichnet, da dieser Zelltyp in der Kultur überwiegt. Die Chorioallantois-Membranen wurden zum Versuch mehrfach mit gepufferter NaCl-Lösung gewaschen und mit einer Schere grob zerschnitten.

### 3. Hämagglutinations- und Infektiositäts-Teste

Die Bestimmung der PBE und der hämagglutinierenden Einheiten (HAE) wurde in der früher beschriebenen Weise durchgeführt<sup>9</sup>.

### 4. Bestimmung der „infective centers“\*

Fibroblasten-Suspensionen wurden mit frischer KP-haltiger Ei-Flüssigkeit infiziert, 45 Min. bei 37° C gehalten, anschließend die Zellen sedimentiert (2 Min. bei 1750 U/Min.) und noch 3-mal in gepufferter NaCl-Lösung gewaschen. Im Zytometer wurde dann die Zellzahl bestimmt und danach die entsprechenden Verdünnungen nach Potenzen von 10 in gepufferter NaCl-Lösung angesetzt. Von jeder der verwendeten vier Ver-

dünnungen wurden dann 0,1 ml in 0,9 ml eines 0,8-proz. Agars suspendiert und davon je 0,5 ml auf je eine Kulturschale mit Fibroblasten (Petrischale von 50 mm Durchmesser) gegeben. Nach Festwerden der Agarschicht wurden die Platten 2 Stdn. bei 37° C im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank gehalten, anschließend mit 5 ml Agar überschichtet und weitere 3 Tage bebrütet. Das Anfärben der lebenden Zellen erfolgte dann in der früher beschriebenen Weise<sup>9</sup> (s. auch Bestimmung der PBE).

#### Agar für Zell-Suspensionen

0,4 ml 1,8% Difco Bacto-Agar in H<sub>2</sub>O,  
0,4 ml doppelte Earle'sche Lösung,  
0,1 ml Embryonal-Extrakt.

#### Agar zum Überschichten

Wie früher beschrieben<sup>9</sup>.

### 5. Antiseren

Zur Präzipitation des „gebundenen Antigens“ wurden zwei Kaninchenserum verwendet.

1. Kaninchenserum gegen „gebundenes Antigen“ des KP-Virus  
Hergestellt in der früher beschriebenen Weise<sup>7</sup>.
2. Kaninchenserum gegen „gebundenes Antigen“ von Influenza — FM/1

Das für die Immunisierung verwendete Antigen wurde aus Influenza-Virus nach der von SCHÄFER und ZILLIG<sup>6</sup> für KP beschriebenen Methode hergestellt. Das Kaninchen wurde durch mehrere intravenöse Injektionen von etwa 2,5 mg Antigen pro Injektion mit insgesamt 15 mg Antigen immunisiert. Das Antigen war an frisch gefälltes Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Das Serum wurde dann 8 Tage nach der letzten Injektion gewonnen.

Beide Seren wurden mit „Normaler Komponente“ (NK) aus Eiflüssigkeit abgesättigt<sup>10</sup>, durch 30 Min. langes Erhitzen bei 56° C inaktiviert und durch Zusatz von Carbol (0,5% Endkonzentration) konserviert. Vor den Versuchen wurden sie auf Spezifität geprüft. Beide Seren reagierten mit dem „gebundenen“ bzw. „löslichen Antigen“ von KP- und Influenza-FM/1-Virus, nicht aber mit den entsprechenden „Hämagglutininen“ oder intakten Virusteilchen<sup>7</sup>.

### 6. Präzipitation

Zur Präzipitation wurde dem radioaktiven Material noch Träger-Antigen in großer Menge zugefügt, um sichtbare und leichter zu handhabende Präzipitate zu erhalten.

Dazu verwendeten wir „lösliches Antigen“ aus Chorioallantois-Membranen von bebrüteten und mit KP-Virus infizierten Hühnereiern, hergestellt nach der von SCHÄFER<sup>10</sup> beschriebenen Methode. Zunächst wurde mit diesem Antigen-Material und dem entsprechenden Anti-

<sup>9</sup> E. WECKER u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. 11b, 181 [1956].

<sup>10</sup> W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. 6b, 207 [1951].

\* Für die Unterweisung in dieser Methode sind wir Fräulein Dr. M. VOGT und Herrn Professor Dr. R. DULBECCO, Pasadena, zu großem Dank verpflichtet.

serum in einer kleinen Vorprobe die Äquivalenz-Zone ermittelt, und darnach die Präzipitation mit sicherem Antikörper-Überschuß durchgeführt. Meistens wurden 6 ml des betreffenden radioaktiven Untersuchungsmaterials mit 1,5 ml Träger-Antigen und mit 1,0 ml Antiserum versetzt. Die Ansätze wurden dann 30 Min. bei 37° C inkubiert und für weitere 24 Stdn. im Eisschrank belassen.

## 7. Chemische Fraktionierung

Die Zerlegung des markierten KP-Virus sowie der einzelnen, bei den Versuchen anfallenden Fraktionen der infizierten Zellen in Lipid-, kalte Trichloressigsäure (TCE)-lösliche und Nucleinsäure (NS)-Fraktion erfolgte im Prinzip in der früher beschriebenen Weise<sup>9</sup>. Lediglich die Reihenfolge der Extraktionen wurde verändert:

Die Behandlung mit kalter 10-proz. TCE wurde vor der Extraktion der Lipide durchgeführt. Dadurch lassen sich Verklumpungen des Materials besser vermeiden, die die Extraktion zu stören vermögen. Der nach der Extraktion mit TCE und Lipid-Lösungsmitteln zurückgebliebene Rest von Radioaktivität wird der NS-Fraktion zugeschrieben. Wir haben uns durch Untersuchungen an isoliertem „gebundenen Antigen“ aus <sup>32</sup>P-markiertem Virus davon überzeugt, daß dieser Rest durch Behandlung mit Ribonuclease (RNase) praktisch vollständig in eine TCE-lösliche Form übergeführt wird. Zur chemischen Fraktionierung der reinen <sup>32</sup>P-Viruspräparate versetzten wir diese vor dem Lyophilisieren mit Pferdeserum in einer Endkonzentration von 30 Prozent. Durch Zugabe dieses Proteins bekommt man besser zu handhabende Präzipitate.

## 8. Messung der Radioaktivität

Die gemessenen Radioaktivitäten sind als Impulse pro Minute (IPM) angegeben, wobei der Nulleffekt des Instrumentes (20–23 IPM) immer abgezogen ist. Es wurden 0,5 bis 0,1 ml der Präparate in Messing-Schälchen vorsichtig eingedampft. Die gesamte Radioaktivität der Fraktionen wurde aus der gemessenen Aktivität den Volumina entsprechend errechnet. Durchschnittlich wurden 1500–2000 Impulse, mindestens aber 1000 Impulse von jedem Präparat gezählt. Der mögliche Meßfehler beträgt maximal etwa  $\pm 3$  Prozent.

Bei den Bilanz-Versuchen wurde ein Flüssigkeits-Zählrohr der 20<sup>th</sup>-Century Corporation, London, verwendet. Das Flüssigkeits-Zählrohr besitzt ein Meßvolumen von 10 ml.

## A. Prüfung der Versuchsbedingungen und des Versuchsmaterials

### a) Gewebekultur

Wenn man einen Eindruck von den Veränderungen gewinnen will, die mit den Virusteilchen beim Eindringen in die Wirtszelle vor sich gehen, dann müssen sich die Untersuchungen auf die Phase des

Infektionsablaufes beschränken, in welcher noch keine Neubildung von Virusmaterial erfolgt, weil andernfalls das Bild durch den Vermehrungsprozeß verwischt werden könnte.

Bei Verwendung von *Chorioallantois-Membranen* konnten bereits SCHÄFER und MUNK<sup>3</sup> zeigen, daß erst 3 Stdn. nach Infektion der Zelle mit KP-Virus eine Vermehrung des „gebundenen“ oder „löslichen Antigens“ festzustellen ist. In der 4. Stde. beobachteten sie eine Zunahme des hämagglutinierenden Prinzips, und erst in der 5. bis 6. Stde. nach der Infektion die Vermehrung von infektiösen Virusteilchen. Diese Versuche waren an entembryonierten Eiern durchgeführt worden.

Bei *Fibroblasten-Kulturen* konnten BREITENFELD und SCHÄFER<sup>11</sup> mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern zeigen, daß auch hier erst 3 Stdn. nach der Infektion eine Neubildung von virusspezifischem Material in der Zelle nachzuweisen ist. Es handelt sich dabei ebenfalls um das „gebundene“ bzw. „lösliche Antigen“. Eine Stde. später läßt sich dann auch eine Vermehrung des „Hämagglutinins“ feststellen. Diese Versuche wurden an Fibroblasten durchgeführt, die in einem für ihre Vermehrung günstigen Nährmedium und auf Glas gezüchtet wurden.

Für unsere Experimente mit <sup>32</sup>P-markiertem Virus wollten wir aber Zellen verwenden, die in Suspension vorlagen, weil sich unter diesen Bedingungen die Adsorptionsrate des Virus erhöht. Außerdem sollte an Stelle der üblichen Nährmedien lediglich gepufferte NaCl-Lösung (0,9-proz. NaCl-Lösung + m/100-Phosphatpuffer,  $p_H$  7,2) verwendet werden, um die Teilung der Zellen möglichst zu verhindern und eine weitgehende Konstanz der Versuchsbedingungen zu erreichen.

Es mußte aber zunächst nachgewiesen werden, daß Fibroblasten unter den gegebenen Versuchsbedingungen tatsächlich auch infiziert werden können.

Hierzu beimpften wir etwa  $4 \cdot 10^8$  trypsinierte Fibroblasten, welche in 1 ml gepufferter NaCl-Lösung suspendiert worden waren, mit 0,2 ml einer frischen virushaltigen KP-Eiflüssigkeit. Dies entspricht einer Infektion mit etwa  $2 \cdot 10^8$  PBE. Die infizierten Zellen wurden 45 Min. bei 37° C gehalten und dann abzentrifugiert. Anschließend wurde die eine Hälfte der Zellen mit 1 ml KP-Antiserum vom Huhn in der Verdünnung 1 : 100 15 Min. bei 37° C bebrütet, die andere Hälfte in einer gepufferten NaCl-Lösung ebenfalls 15 Min. bei 37° C gehalten. Die beiden Ansätze wurden danach 3-mal gewaschen und als „infective centers“ auf Fibroblasten-Kulturen ausgesät.

<sup>11</sup> P.-M. BREITENFELD u. W. SCHÄFER, in Vorbereitung.

Es ergab sich, daß in der mit Antiserum behandelten Hälfte  $1,6 \cdot 10^6$ , in der Hälfte ohne Antiserum  $1,08 \cdot 10^6$  „infective centers“ vorgelegen hatten. In einem weiteren Kontrollversuch wurde gezeigt, daß das bei diesen Experimenten verwendete Antiserum freies KP-Virus unter sonst gleichen Bedingungen weitgehend neutralisiert. Ein ursprünglicher Titer von  $1,4 \cdot 10^8$  PBE/ml wurde bis auf einen Titer von  $5,4 \cdot 10^4$  PBE/ml herabgesetzt.

Da das Antiserum die Zahl der „infective centers“ gegenüber der Kontrolle keineswegs herabgesetzt hatte, ist damit bewiesen, daß es sich dabei nicht nur um oberflächlich adsorbiertes Virus handelte. Das Virus muß vielmehr auch unter den von uns gewählten Bedingungen in die Zelle eingedrungen sein.

Um nun ausschließlich die Veränderung der Virusteilchen bei dem Vorgang der Penetration durch die Zellmembran zu erfassen, wurde auf Grund der Ergebnisse der vorher zitierten Arbeiten<sup>3, 11</sup> in den Experimenten mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem Virus nur solches Zellmaterial untersucht, das nach der Infektion höchstens 180 Min., zumeist aber nur 30 bis 120 Min. bebrütet worden war.

#### b) $^{32}\text{P}$ -markiertes Virus

Neben den Zell-Systemen waren auch die verwendeten  $^{32}\text{P}$ -markierten Viruspräparate auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen.

An sie war vor allen Dingen die Forderung zu stellen, daß sie noch ausreichend infektiös waren. Frühere Untersuchungen hatten aber gezeigt, daß gerade  $^{32}\text{P}$ -haltige KP-Elementarteilchen diese biologische Eigenschaft verhältnismäßig schnell verlieren<sup>9</sup>. Um den Verlust möglichst gering zu halten, wurden für die Versuche grundsätzlich nur frisch hergestellte Präparate von  $^{32}\text{P}$ -markiertem Virus verwendet. Ihr Anteil an nicht-infektiösen Teilchen ließ sich annähernd aus dem PBE/HA-Verhältnis ermitteln, das bei hochinfektiösem, nicht-markiertem Virusmaterial nach unseren Feststellungen etwa 6,7 beträgt, bei den verwendeten  $^{32}\text{P}$ -markierten Viruspräparaten durchschnittlich etwa bei 6,0 lag. Demnach kann man damit rechnen, daß unsere markierten Viruspräparate etwa 80% weniger infektiöse Teilchen besitzen als frisches, nicht-markiertes Virusmaterial.

Im Hinblick auf den radioaktiven Phosphor war zu fordern, daß dieser möglichst nur als Bestandteil

der Virus-Elementarteilchen, nicht aber als virusfremder  $^{32}\text{P}$  vorlag.

Wenn auch auf Grund früherer Untersuchungen nur mit einem sehr geringen Gehalt an virusfremdem radioaktivem Phosphor zu rechnen war, so wurden doch sämtliche Präparate vor ihrer Verwendung noch einmal in dieser Richtung geprüft. Dazu bestimmten wir die Menge des nicht mit den Virus-Elementarteilchen an Hühnererythrozyten adsorbierbaren  $^{32}\text{P}$ .

0,5 ml des zu prüfenden radioaktiven Viruspräparates wurden im Verhältnis 1 : 4 mit gepufferter NaCl-Lösung verdünnt und hierzu 0,5 ml gepackter, gewaschener Hühnererythrozyten hinzugefügt. Der Ansatz blieb 20 Min. bei Zimmer-Temperatur stehen. Anschließend wurden die Erythrozyten abzentrifugiert (3 Min. bei 2500 U/Min.) und aus dem Verhältnis der Radioaktivität des gewonnenen Überstandes zur Radioaktivität des Ausgangsmaterials der prozentuale Anteil an nicht-adsorbierbarem  $^{32}\text{P}$  im Präparat bestimmt.

Danach ließen sich nur etwa 4,7 bis 7,5% des in den Präparaten enthaltenen  $^{32}\text{P}$  nicht mit den Erythrozyten entfernen. Da erfahrungsgemäß auch eine ähnliche Menge von Virusteilchen zumeist noch in Lösung bleibt, darf man wohl folgern, daß virusfremder  $^{32}\text{P}$  in unseren Präparaten zu einem noch kleineren Prozentsatz vorlag.

#### c) Menge der an die Wirtszellen adsorbierten Virusteilchen

Die Menge des an die Zellen adsorbierten Virus kann bei  $^{32}\text{P}$ -haltigen Elementarteilchen mit Hilfe von Radioaktivitäts-Messungen ohne größere Schwierigkeiten bestimmt werden.

Die Fibroblasten oder zerschnittenen Chorioallantois-Membranen wurden im 2- bis 3-fachen Volumen gepufferter NaCl-Lösung suspendiert und mit einer Dosis von  $^{32}\text{P}$ -Virus infiziert, die etwa 1 bis 2 Virusteilchen pro Zelle entsprach. Die Zahl der in einer Chorioallantois-Membran enthaltenen infizierbaren Zellen wurde dabei mit etwa  $2 \cdot 10^8$  angenommen. Nach der Infektion wurden die Ansätze verschieden lange Zeiten (30 bis 180 Min.) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und darauf die Zellen abzentrifugiert. Aus der Höhe der Radioaktivität des Überstandes gegenüber der Radioaktivität des Ausgangsmaterials ergab sich die Menge des adsorbierten  $^{32}\text{P}$  und damit des adsorbierten Virus. Die abgeschleuderten, mit Virus beladenen Zellen wurden anschließend noch 4-mal im jeweils 20-fachen Volumen kalter gepufferter NaCl-Lösung gewaschen und darauf 5 Min. hochtourig in Kochsalz-Lösung homogenisiert. Aus der Radioaktivität der Homogenate ließ sich dann feststellen, wieviel des primär adsorbierten Virus so fest an die Zellen gebunden war, daß es durch Waschen nicht mehr entfernt werden konnte.



Zellart	Inkubations- Zeit [Min.]	Ausgangs- Aktivität		Adsorbiert an Gewebezellen		Nach Waschen noch an Zellen		Nicht adsorbierbar an Erythrocyten [%]
		[IPM]*	[%]	[IPM]	[%]	[IPM]	[%]	
Membranen	30	92180	100	64959	64,2	38952	42,3	5,8
„	60	92180	100	66668	66,5	26676	29	5,8
„	180	92180	100	65639	65,2	37436	40,5	5,8
„	30	73167	100	52174	65	24928	34	6,0
„	90	73167	100	54862	69	28896	39,5	6,0
Fibroblasten	30	55968	100	27408	41,5	19880	36	7,5
„	90	55968	100	29348	45	15505	28	7,5
„	90	66854	100	32674	44,3	19326	29	4,7
„	120	66854	100	36427	50,3	15750	24	4,7

\* = Aktivität des gesamten Materials.

Tab. 1. Adsorptionsraten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß von den Chorioallantois-Zellen durchschnittlich etwa 65%, von den Fibroblasten etwa 45% des eingesetzten Virus adsorbiert wurden. In beiden Fällen ließen sich bis zu 50% der adsorbierten Teilchen durch das Waschen wieder entfernen; sie können demnach nur locker mit der Zell-Membran verbunden gewesen sein. Danach bleiben aber bei den Chorioallantois-Membranen immerhin noch 29–42% und bei den Fibroblasten noch 24–36% der zugefügten Virusteilchen übrig, die eine festere Bindung mit den Zellen eingegangen sein müssen.

Das Optimum der Adsorption war offenbar schon 30 Min. nach Zusatz des Virus zu den Zellen erreicht. Durch eine weitere Bebrütung bis zu 180 Min. läßt sich nicht einmal die Menge der von den Zellen abwaschbaren <sup>32</sup>P-haltigen Virusteilchen verändern.

(vgl. Tab. 2). Die Beschaffenheit der Träger dieser Aktivität wurde dadurch aufzuklären versucht, daß wir die einzelnen „Extrakte“ zuerst physikalisch, dann serologisch und schließlich noch enzym-chemisch und chemisch untersuchten.

Zellart	Inkubations- Zeit [Min.]	„Extrakt“- Aktivität [%]
Membranen	30	36
„	60	50
„	180	37
„	30	33
„	90	38,5
Fibroblasten	30	35
„	90	57
„	60	35
„	120	35

Tab. 2. Betrag der beim Homogenisieren der infizierten Zellen in die „Extrakte“ übergegangenen Radioaktivität.

## B. Verhalten des Virus beim Eindringen in die Zelle

Nach Ermittlung der Adsorptionsrate wurden die Homogenate, damit möglichst viel virusspezifisches Material in die wäßrige Phase übertreten konnte, noch 30 Min. bei +4°C aufbewahrt und schließlich durch 10 Min. langes Zentrifugieren bei 3000 U/Min. die hierbei sedimentierbaren Bestandteile abgeschleudert. Das gewonnene Sediment wird im folgenden als „Zelltrümmer“, der Überstand als „Extrakt“ bezeichnet.

Für die weitere Untersuchung eigneten sich am besten die „Extrakte“. Sie enthielten unabhängig von der Dauer der Inkubation der infizierten Zellen und unabhängig von der Art derselben etwa 35% der in den Homogenaten enthaltenen Radioaktivität

Als Kontrolle diente bei sämtlichen Experimenten der folgende Ansatz:

Ein gleicher „Extrakt“ wurde aus den Homogenaten nicht-infizierter Fibroblasten oder Membranen hergestellt. Durch Zugabe von frischem, markiertem <sup>32</sup>P-Virus wurden dann die Kontroll-„Extrakte“, im folgenden als „Kontrollen“ bezeichnet, auf jeweils diejenige Radioaktivität eingestellt, die für die korrespondierenden „Extrakte“ aus infizierten Zellen ermittelt worden war. In den folgenden Versuchsschritten wurden die „Kontrollen“ dann ganz wie die „Extrakte“ behandelt.

### a) Physikalische Untersuchung der „Extrakte“

Wenn das Virus – wie vermutet – beim Eindringen in die Wirtszelle in Untereinheiten zerfällt, dann müssen in den „Extrakten“ <sup>32</sup>P-Träger vorliegen, die kleiner als die Elementarteilchen sind

und deshalb auch langsamer als diese im Zentrifugalfeld sedimentieren.

Um dies nachzuprüfen, wurden „Extrakte“ und „Kontrollen“ 60 Min. lang bei 13500 U/Min. in der Pirouette-Zentrifuge ausgeschleudert und der Abfall der Aktivität des Überstandes gegenüber der Aktivität des Ausgangsmaterials bestimmt.

Aus den „Kontrollen“ wurden, wie Tab. 3 ausweist, unter der Einwirkung der angewendeten Zentrifugalkraft im allgemeinen etwa 92–94% der Radioaktivität entfernt. Aus den „Extrakten“ von infizierten Zellen ließen sich dagegen unter den gleichen Bedingungen nur 63–75% (Chorioallantois-Membranen) bzw. 39–60% (Fibroblasten) des  $^{32}\text{P}$  ausschleudern. Ein Einfluß der Inkubationsdauer auf das Sedimentations-Verhalten der „Extrakte“ war nicht zu erkennen.

Nach den Ergebnissen dieser Versuche liegt also in den „Extrakten“ tatsächlich ein erheblicher Prozentsatz von  $^{32}\text{P}$ -Trägern vor, die kleiner als die zur Infektion verwendeten Virus-Elementarteilchen sind.

Zellart	Inkubations-Zeit [Min.]	„Extrakt“- Aktivität nach der Zentrifugation [%]	„Kontrollen“- Aktivität nach der Zentrifugation [%]	Nicht adsorbier- barer Anteil des $^{32}\text{P}$ -Virus [%]
Membranen	30	25	8,2	5,8
„	60	32	8,2	5,8
„	180	47	8,2	5,8
„	60	31	7,2	4,7
„	120	31	7,2	4,7
Fibroblasten	30	61	16,5	7,5
„	90	48,8	16,5	7,5
„	60	40	6,7	4,7
„	120	44	6,7	4,7

Tab. 3. Verlust der Radioaktivität der „Extrakte“ durch Sedimentation der ganzen Virusteilchen.

#### b) Serologische Untersuchung der „Extrakte“

Von den  $^{32}\text{P}$ -haltigen Untereinheiten des Virus-Elementarteilchens kann man das „gebundene Antigen“ auf Grund seines serologischen Verhaltens erkennen. Es wird sowohl von dem Antiserum gegen „gebundenes Antigen“ des KP-Virus wie auch vom Serum gegen das entsprechende Antigen des Influenza-Virus, Stamm FM/1, präzipitiert. Das intakte KP-Elementarteilchen vermögen diese Antiseren dagegen nicht auszuflocken, weil dieses sein „gebunde-

nes Antigen“ im Inneren enthält, wo es von den Antikörpern nicht erreicht werden kann<sup>7</sup>.

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, ließen sich durch Präzipitation aus den „Extrakten“ von Chorioallantois-Membranen 18–32%, aus denjenigen von Fibroblasten 12–25% des in ihnen nach dem Zentrifugieren noch enthaltenen  $^{32}\text{P}$  entfernen. Die Ergebnisse der Kontrollversuche zeigen jedoch, daß es sich bei den entfernten Aktivitäts-Trägern nicht ausschließlich um „gebundenes Antigen“ handeln kann. Obwohl nämlich die „Kontrollen“ an Radioaktivitäts-Trägern neben Spuren von anorganischem Phosphat nur Elementarteilchen enthielten – die,

Zellart	Inkubations-Zeit [Min.]	„Extrakte“		„Kontrollen“	
		Präzipitat [%]	Nach Waschen der Präzipitate [%]	Präzipitat [%]	Nach Waschen der Präzipitate [%]
Membranen	30	18	7,2	13*	0,4
„	30	27	6	12	2,2
„	60	31	22,6	12	
„	180	32		12	
Fibroblasten	30	12		8	
„	60	20		8	
„	60	25	11,8	0	∅
„	90	20	4,4	8	2,7
„	120	21	8,8	0	∅
Durchschnitt		22,9	10,9	8,1	1,0

\* Dieser „Kontrolle“ wurde vor der Präzipitation die 800-fache Radioaktivität des entsprechenden „Extraktes“ in Form von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat zugesetzt, um den Wascheffekt zu prüfen.

Tab. 4. Verlust der Radioaktivität durch Präzipitation mit Antiserum gegen „gebundenes Antigen“ und wiedergefundene Radioaktivität nach Waschen der Präzipitate.

wie schon oben erwähnt, mit den Antikörpern keine Bindung eingehen –, wurden doch auch hier bis zu 12% der Radioaktivität entfernt. Das ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß die Präzipitate radioaktive Elementarteilchen adsorbierten oder einschlossen. Auf diese Weise ausgefällte Aktivitäts-Träger müßten sich aber leicht durch Waschen aus den Präzipitaten entfernen und so in ihrer Menge annähernd bestimmen lassen.

Die entsprechenden Prüfungen wurden an einigen Präzipitaten von „Extrakten“ und „Kontrollen“ durchgeführt. Die Niederschläge wurden je 4-mal im 10-fachen Volumen eiskalter gepufferter NaCl-Lösung gewaschen und darauf wieder ihre Radioaktivität bestimmt. Beim Waschen wurde das Material jeweils 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

Es ließen sich durch die angegebene Behandlung bei den „Kontrollen“ durchschnittlich 88%, bei den „Extrakten“ aber nur durchschnittlich 50% des in den Präzipitaten enthaltenen <sup>32</sup>P entfernen. Der Effekt des Waschens wurde dadurch geprüft, daß wir einer „Kontrolle“ vor der Präzipitation die 800-fache Menge derjenigen Radioaktivität in Form von <sup>32</sup>P-Phosphat einsetzten, die für den korrespondierenden „Extrakt“ vorher ermittelt worden war. Trotzdem waren durch Präzipitation nur 13% entfernt worden und davon wieder 97% auswaschbar (s. Tab. 4).

Nach den bisher beschriebenen Versuchen liegen in den „Extrakten“ Aktivitäts-Träger vor, die langsamer als die Elementarteilchen sedimentieren und vom Antiserum gegen „gebundenes Antigen“ präzipitiert werden.

### c) Chemische und enzym-chemische Untersuchung der „Extrakte“

Nachdem aus den „Extrakten“ die intakten Virus-Elementarpartikel durch Zentrifugieren und die freigelegten „gebundenen Antigen“-Partikel durch Präzipitieren mit spezifischem Antiserum weitgehend entfernt worden waren, blieb noch eine restliche Radioaktivität, die durchschnittlich etwa 35% der ursprünglichen „Extrakt“-Aktivität ausmachte, in ihnen zurück.

Es wurde zunächst einmal festzustellen versucht, wieviel Prozent dieser Aktivität auf die NS und wieviel auf Lipide entfiel und daraus dann das Verhältnis NS : Lipid-Aktivität ermittelt. Da dieses Verhältnis von den zur Infektion verwendeten radioaktiven Virus-Elementarteilchen bekannt war (vgl. „Kontrollen“), mußten sich daraus schon gewisse Hinweise auf die Beschaffenheit der nunmehr noch vorhandenen <sup>32</sup>P-Träger ergeben.

Weiterhin wurde dann noch die vorhandene NS durch ihr Verhalten gegenüber RN-ase zu charakterisieren versucht. Wenn es sich bei ihr um NS aus KP-Elementarteilchen handelte, mußte sie, da diese dem Ribosotyp angehört, durch RN-ase hydrolysiert werden. Als Folge hiervon war, da die <sup>32</sup>P-haltigen Hydrolyse-Produkte TCE-löslich werden, eine Verschiebung des NS : Lipid-Aktivitäts-Verhältnisses in Richtung auf die Lipide zu erwarten. Außerdem mußte sich bei diesem Versuchsschritt noch ergeben, in welcher Form die NS vorlag. War sie noch im Elementarteilchen enthalten oder von Eiweiß um-

schlossen, so konnte das Enzym nicht zur Wirkung kommen.

Technisch wurden die Experimente so durchgeführt, daß wir die „Extrakte“ nach dem Zentrifugieren und dem Behandeln mit Antiserum jeweils in zwei gleichgroße Proben aufteilten. Die eine Hälfte wurde ohne, die andere mit RN-ase bebrütet. Anschließend wurden alle Ansätze lyophilisiert, danach sofort der chemischen Fraktionierung unterworfen und ihr NS : Lipid-Aktivitäts-Verhältnis bestimmt.

Tab. 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Danach ist im Vergleich zu den „Kontrollen“ das Aktivitäts-Verhältnis NS : Lipid schon in den „Extrakten“ im allgemeinen stark zugunsten der Lipide verschoben. Der Quotient der „Kontrollen“ entspricht aber dem der intakten Elementarteilchen, für die auch früher ähnliche Werte (1 : 3,2) gefunden wurden<sup>9</sup>. Es ergibt sich also auch hier wieder, daß zumindest ein gewisser Teil derjenigen Viruspartikel, die Gelegenheit hatten, in empfängliche Zellen einzudringen, ihre ursprüngliche Zusammensetzung nicht mehr besitzen.

Zellart	Inkubations-Zeit [Min.]	Radioaktivitäts-Verhältnis NS : Lipid			
		„Extrakte“		„Kontrollen“	
		mit RN-ase	ohne RN-ase	mit RN-ase	ohne RN-ase
Membranen	30	1:13,6	1: 9,0	1:2,7	1:2,7
„	60	1:14,8	1: 9,8	1:2,7	1:2,7
„	180	1:14,2	1:10,2	1:2,7	1:2,7
Fibroblasten	30	1: 4,5	1: 3,5	1:3,5	1:3,6
„	60	1: 5,1	1: 3,5	1:3,5	1:3,6
„	60	1:17,3	1:11,7	1:3,0	1:2,7
„	120	1:19,4	1:11,4	1:3,0	1:2,7

Tab. 5. Radioaktivitäts-Verhältnisse NS : Lipid der „Extrakte“ mit und ohne RN-ase-Bebrütung.

Nur in zwei Ansätzen (Fibroblasten 30 und 60 Min. inkubiert) wurde eine Verschiebung des NS : Lipid-Verhältnisses nicht nachgewiesen. Die Behandlung mit RN-ase ergab aber, daß auch in diesen Fällen das <sup>32</sup>P-haltige Material von dem zur Infektion verwendeten (s. „Kontrolle“) verschieden war; während nämlich der NS : Lipid-Quotient der „Kontrollen“ sich unter der Einwirkung des Enzyms nicht änderte, verkleinerte er sich bei den „Extrakt“-Proben von 1 : 3,5 auf 1 : 4,5 bzw. 1 : 5,1. Eine ähnliche oder sogar stärkere Wirkung zeigte die Enzymbehandlung bei allen übrigen „Extrakten“. Ein

Vergleich der absoluten Meßwerte läßt erkennen, daß die Verkleinerung des Quotienten tatsächlich auf einer Abnahme der NS-Aktivität beruht; die Lipid-Aktivität dagegen war nach der Enzym-Einwirkung nicht verändert (s. Tab. 6).

Inkubations-Zeit [Min.]	„Extrakt“ ohne RN-ase			„Extrakt“ mit RN-ase		
	NS-Aktivität [IPM]	Lipid-Aktivität [IPM]	NS:Lipid	NS-Aktivität [IPM]	Lipid-Aktivität [IPM]	NS:Lipid
30	163	522	1: 3,2	78	540	1: 6,9
90	58	584	1:10,0	29	594	1:20,6

Tab. 6. Veränderung der Radioaktivitäts-Verhältnisse NS : Lipid durch Verlust von NS-Aktivität nach RN-ase-Inkubation.

Es muß demnach in den „Extrakten“ Ribonucleinsäure (RNS) vorliegen, die im Gegensatz zu der RNS der Elementarteilchen dem Zugriff von RN-ase zugänglich ist.

Daß der NS : Lipid-Quotient in den „Extrakten“ auch schon vor dem Einwirken der RN-ase kleiner ist als in den „Kontrollen“, kann verschiedene Gründe haben. Einmal wird das Verhältnis sicher dadurch beeinflußt, daß mit dem „gebundenen Antigen“ auch RNS, die ja ein Bestandteil dieser Untereinheit des Elementarteilchens ist, aus dem „Extrakt“ ausgefällt wird. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß beim Homogenisieren der Zellen von dem zerlegten Virus relativ mehr Lipid als NS in den „Extrakt“ übergeht.

#### d) Vergleichende chemische Untersuchung von „Extrakt“ und „Zelltrümmern“

Wenn die letztgenannte Annahme zutrifft, müßte in den „Zelltrümmern“ das NS : Lipid-Aktivitäts-Verhältnis zugunsten der NS verschoben sein.

Bei dem Versuch, in dem dies nachgeprüft werden sollte, wurden Fibroblasten mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem Virus — wie vorher beschrieben — infiziert und 90 Min. inkubiert. „Extrakt“ und „Zelltrümmer“ wurden in der üblichen Weise gewonnen und dann ohne jede weitere Vorbehandlung der chemischen Fraktionierung unterworfen.

Tab. 7 faßt das Ergebnis dieses Versuches zusammen. Danach sind in den „Zelltrümmern“ relativ mehr NS und weniger Lipid enthalten als in dem zur Infektion verwendeten Virus, während in den „Extrakten“ wesentlich mehr Lipid als NS vorliegt.

Dies ist der Fall, obwohl hier kein RNS-haltiges „gebundenes Antigen“ ausgefällt wurde. Von der eingesetzten NS-Aktivität wurden in diesem Versuch nur etwa 4%, von der Lipid-Aktivität dagegen etwa 14% in den „Extrakten“ wiedergefunden.

	90 Min. Inkubations-Zeit		
	NS-Aktivität IPM	Lipid-Aktivität IPM	NS:Lipid
„Extrakte“	117	1168	1:10
„Zelltrümmer“	2689	7120	1:2,65
Gesamt	2806	8288	1:2,95

Tab. 7. Unterschiedliche Verteilung der Radioaktivität auf NS- und Lipid-Fraktion in „Zelltrümmern“ und „Extrakt“.

Es ist also in der Tat so, daß von vornherein relativ mehr radioaktives Lipid als radioaktive NS in die „Extrakte“ übergeht. Möglicherweise liegt das darin begründet, daß ein Teil der Virus-NS fester an die Zellstrukturen gebunden ist als die Lipide.

#### C. Verhalten des $^{32}\text{P}$ -haltigen Virusmaterials gegenüber dem Stoffwechsel der Wirtszellen

Von entscheidender Wichtigkeit für die Deutung der beschriebenen Versuchsergebnisse war die Frage, ob das  $^{32}\text{P}$ -haltige Virusmaterial während der Bebrütung mit den Wirtszellen in seiner chemischen Zusammensetzung wesentlich verändert wird.

Es wurde versucht, dies auf folgende Weise nachzuprüfen. In zwei Experimenten, bei denen die Zellen (Fibroblasten) im einen Falle 30 Min., im anderen 90 Min. nach Zugabe des Virus bebrütet wurden, gliederten wir sämtliche, bei den einzelnen Untersuchungsschritten anfallenden Proben in die drei chemischen Fraktionen (NS-, TCE- und Lipid-Fraktion) auf. Es wurden dann die Summen der in den Lipid-, TCE- und NS-Fractionen enthaltenen Radioaktivitäten ermittelt und ihr prozentualer Anteil an der gesamten, in den Proben wiedergefundenen Aktivität errechnet („Aktivität-Aufarbeitung“). Diese Werte wurden mit solchen aus „Kontrollen“ verglichen, welche in der üblichen Weise angesetzt waren („Aktivität-Virus“).

Wenn sich das zur Infektion verwendete Virusmaterial in der Wirtszelle oder während des Aufarbeitungsganges in seiner chemischen Zusammensetzung verändert hatte, war auch eine Änderung der Verteilung des  $^{32}\text{P}$  auf die drei chemischen Fraktionen zu erwarten.

Die Ergebnisse dieser Bilanz-Versuche gibt Tab. 8 wieder. Wie daraus hervorgeht, wurden im Vergleich zu den „Kontrollen“ in Versuch 1 88%, in Versuch 2 93% der Aktivität wiedergefunden. Die prozentualen Anteile der einzelnen chemischen Fraktionen sind nur gering gegenüber denjenigen der „Kontrollen“ verschoben und zwar steht in beiden Versuchen einer schwachen Abnahme der Aktivität in den Lipiden eine geringe Zunahme der Radioaktivität von TCE- und NS-Fraktion gegenüber.

Nach diesem Versuchsergebnis kann das <sup>32</sup>P-haltige Virusmaterial unter den von uns angewendeten Bedingungen keine wesentlichen Veränderungen in seiner chemischen Zusammensetzung erfahren haben.

Gesamt-Aktivität:	Versuch 1 30 Min. inkubiert		Versuch 2 90 Min. inkubiert	
	Aktivität		Aktivität	
	der Auf- arbeitung	des Virus	der Auf- arbeitung	des Virus
	17470 IPM = 88%	19873 IPM = 100%	14457 IPM = 93%	15544 IPM = 100%
	[%]	[%]	[%]	[%]
Lipid	55,8	63,8	57,2	63,8
TCE-löslich	24,3	19,7	23,3	19,7
NS	19,3	16,4	20,5	16,4

Tab. 8. Bilanz-Versuche. Veränderung der gesamten Radioaktivitäten aller Lipid-, TCE- und NS-Fractionen durch den Zellstoffwechsel.

### Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zu klären versucht, welche Radioaktivitäts-Träger in Zellen vorliegen, die (30 – 180 Min.) vorher mit <sup>32</sup>P-markiertem KP-Virus infiziert wurden. Dabei konnten aber nur die radioaktiven Substanzen eingehender charakterisiert werden, die sich – nach der Zerkleinerung der Zellen – in einen wäßrigen „Extrakt“ überführen ließen. Sie repräsentieren etwa 35% des gesamten in den gewaschenen, infizierten Zellen vorhandenen <sup>32</sup>P.

Von diesem in den „Extrakt“ überführten radioaktiven Phosphor sind auf Grund der Sedimentations-Eigenschaften etwa 40% an Partikel gebunden, die kleiner als die zur Infektion verwendeten Virus-teilchen sind. Wie die serologischen Untersuchungen zeigen, befinden sich darunter Einheiten, die dem

„gebundenen Antigen“ entsprechen. Sie enthalten etwa 1,3 bis 5,4% des ursprünglich in den „Extrakten“ vorhandenen radioaktiven Phosphors. Außerdem ließ sich dann noch auf enzym-chemischem Wege RNS als Aktivitäts-Träger identifizieren. Beide scheinen durch einen Abbau der Elementarpartikel freigelegt worden zu sein. Auf einen Abbau von Virus-Teilchen wies auch die Untersuchung der verschiedenen chemischen Fraktionen hin. Dabei kam zum Ausdruck, daß ein Teil der NS und der Phosphor-Lipoide nach dem Kontakt mit der Zelle nicht mehr als Bestandteil der Elementarteilchen vorgelegen haben können; es gingen nämlich relativ mehr <sup>32</sup>P-Lipoide in den wäßrigen „Extrakt“ über als beim Vorliegen intakter Teilchen nach der gefundenen NS-Menge zu erwarten war. Ein deutlicher Einfluß der Infektionsdauer auf die beschriebenen Verhältnisse war in dem hier untersuchten Zeitraum (30 bis 180 Min.) nicht festzustellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die physikalischen wie auch die serologischen, enzym-chemischen und chemischen Untersuchungen dafür sprechen, daß zumindest ein Teil der zur Infektion verwendeten <sup>32</sup>P-haltigen Virus-Elementarteilchen zerlegt wurde. Neben dem als „gebundenes Antigen“ bezeichneten Ribonucleoprotein wird dabei offenbar eine RNS frei, die über die entsprechende antigene Komponente nicht verfügt. Sie könnte vom „gebundenen Antigen“ abgelöst worden sein oder aber eine zweite, davon unabhängige RNS der Virus-Elementarteilchen darstellen. Das letztere ist nach früher durchgeführten Untersuchungen jedoch weniger wahrscheinlich<sup>13</sup>.

Gegen diese Deutung läßt sich einwenden, daß neben den Teilchen, die die beschriebenen Veränderungen erfuhren, noch große Mengen anderer Partikel vorhanden waren, welche sich wie intakte Elementarteilchen verhielten. Allein in den „Extrakten“ zeigten ja noch etwa 60% der hier vorhandenen <sup>32</sup>P-Träger das Sedimentations-Verhalten der Elementarpartikel. Alles in allem waren in den durchgeführten Versuchen schätzungsweise höchstens 20% des zur Infektion verwendeten <sup>32</sup>P-Virus auf Grund der geprüften Kriterien strukturell verändert worden.

Dieser Anteil entspricht aber gerade dem Prozentsatz in den <sup>32</sup>P-Präparaten, der gemäß dem PBE/HA-Verhältnis in Form infektiöser Teilchen vorlag.

<sup>12</sup> A. GIERER u. G. SCHRAMM, Z. Naturforschg. **11b**, 138 [1956].

<sup>13</sup> W. ZILLIG, W. SCHÄFER u. S. ULLMANN, Z. Naturforschg. **10b**, 199 [1955].



Als weitere Möglichkeit ist bei der Deutung unserer Ergebnisse noch in Betracht zu ziehen, daß die gefundenen <sup>32</sup>P-haltigen Stoffe nicht — wie angenommen — Zerlegungsprodukte der infizierenden Virusteilchen sind, sondern ihren radioaktiven Phosphor erst im Laufe eines Umbauprozesses von diesem übernehmen und einlagerten. Dagegen spricht jedoch die Feststellung, daß sich die Verteilung des <sup>32</sup>P in der Zelle auf NS, TCE-lösliche Substanzen und Lipide zumindest in den ersten 90 Min. nach der Infektion nicht wesentlich im Vergleich zu derjenigen im eingesetzten Elementarteilchen ändert. Außerdem ist beim „gebundenen Antigen“ eindeutig bewiesen, daß es sich um einen <sup>32</sup>P-haltigen Virusbestandteil handelt.

Unsere Ergebnisse decken sich z. T. mit den Folgerungen, die HOYLE<sup>8</sup> aus seinen Messungen zog. Inwieweit aber die Auslegungen HOYLES auf Grund seiner eigenen Befunde berechtigt sind, muß dahingestellt bleiben. Seiner Ansicht vom Verhalten der Lipide können wir auf Grund unserer Versuchsergebnisse keineswegs folgen. HOYLE konnte nämlich nur noch Spuren der Virus-Lipide in den infizierten Zellen oder deren „Extrakten“ wiederfinden. Wir nehmen aber auf Grund unserer Erfahrungen an, daß eine einfache Äthanol-Extraktion, wie HOYLE sie durchführte, nicht ausreicht, um sämtliche Phosphorlipide in Lösung zu bringen.

Auch der von HOYLE angeführte Nachweis des Nucleoproteids, welches bei der Infektion aus den Virus-Elementarteilchen freigelegt werden soll, scheint uns nicht zwingend. Er beruht nämlich auf einer unspezifischen Eiweißfällung und läßt deshalb keinen Rückschluß auf die Art des gefällten Produk-

tes zu, zumal der Fehler, der durch unspezifische Adsorption von anderen <sup>32</sup>P-Trägern an derartige Eiweiß-Präzipitate entstehen kann, nicht berücksichtigt wurde. Ein solcher Fehler trat in unseren Versuchen sogar bei der spezifischen Präzipitation des „gebundenen Antigens“ auf, konnte aber hier durch entsprechende Kontrollversuche in seiner Bedeutung abgeschätzt werden.

Trotz der vorne erwähnten Einschränkungen steht das folgende Schema der Vorgänge bei der Penetration des KP-Virus durch die Zell-Membran nicht im Gegensatz zu den bisherigen Befunden:

1. Das KP-Virus wird bei der Penetration durch die Zell-Membran zerlegt. Die RNS-haltigen Produkte binden sich offenbar in der Hauptsache fest an Zellstrukturen. Das freie Virus-Lipid scheint dagegen weniger fest gebunden zu sein.

2. Bei einem Teil der RNS-haltigen Produkte handelt es sich um „gebundenes Antigen“. Außerdem findet man freie Virus-RNS.

3. Ob diese freie RNS durch einen zweiten Zerlegungsprozeß, eine Zerlegung des „gebundenen Antigens“ in Protein und RNS freigemacht wurde, ist noch nicht entschieden. Es könnte auch eine zweite, davon unabhängige RNS sein.

4. Möglicherweise ist die freie RNS das eigentliche infizierende Agens, wie dies für das Tabak-Mosaik-Virus von GIERER und SCHRAMM kürzlich bewiesen wurde<sup>12</sup>.

Frau I. MUSSGAY-KLOETZEL danken wir sehr für ihre wertvolle und unermüdliche Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung der Mittel.