

Vergleich des latent in L-Zellen enthaltenen „Virus“ mit dem Rauscher-Virus der Mäuse-Leukämie

WERNER SCHÄFER, HERMANN FRANK
und LISELOTTE PISTER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforsch. 23 b, 1275—1276 [1968]; eingegangen am 8. Juli 1968)

In L-Zellen wurde mit Hilfe der Komplementbindungs-Reaktion (KBR) Antigen nachgewiesen, das für Mäuse-Leukämie-Viren (MLV) charakteristisch ist¹. Dieser Befund machte es sehr wahrscheinlich, daß die früher ultrahistologisch²⁻⁴ in diesem Mäuse-Zell-Stamm gefundenen Virus-ähnlichen Partikeln MLV darstellen. Um diese Annahme experimentell weiter abzusichern, wurde das entsprechende Material nunmehr eingehender untersucht und mit dem Rauscher-Virus, einem der Laboratoriums-Standard-Stämme der MLV-Gruppe, verglichen. Der Nachweis des Antigens erfolgte dabei wiederum mit der KBR; das Antiserum stammte von einem Kaninchen, welches mit gespaltenem Rauscher-Virus immunisiert wurde; gelegentlich wurde ein Serum von Ratten, die ein Moloney-Sarkom trugen, benutzt (nähere Angaben s. l. c.¹).

Aus Homogenat von L-Zellen ließ sich das Antigen mit einem relativ einfachen Verfahren anreichern und reinigen. Dabei wird das in gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) aufgenommene Ausgangsmaterial zunächst mit Frigen (Hoechst) (Vol.-Verhältnis 1:2) im „Starmix“ 4 Min. in der Kälte homogenisiert. Das pH der nach kurzem Zentrifugieren gewonnenen Wasserphase wird anschließend durch Zugabe von HCl auf 4,5 eingestellt und der entstehende Niederschlag durch niedrigtouriges Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wird gegen gepufferte Kochsalzlösung dialysiert, aus ihm schließlich das Antigen durch 50-proz. Sättigung mit Ammonsulfat ausgefällt und in gepufferter NaCl-Lösung aufgenommen. Die Antigen-Ausbeute bei diesem Verfahren betrug etwa 27 Prozent. Die spezifische Aktivität stieg von 1390 KBR-Einheiten/mg Protein auf 7000 KBR-Einheiten/mg Protein.

In der analytischen Ultrazentrifuge ließen sich in dem so gewonnenen Konzentrat zwei Gradienten nachweisen, von denen der größere mit ~3 S, der kleinere mit ~18 S sedimentiert (Abb. 1 a)*. Durch Zentrifugieren (28 Std. bei 23 000 UpM im Rotor SW 25 der Spinco L2) im linearen Zuckergradienten (5–20%) ließen sich das 3- und 18 S-Material voneinander trennen (Abb. 2). $OD_{260/280}$ betrug für das 3 S-Material 0,71, für das 18 S-Material 0,70. Ein mit beiden Anti-

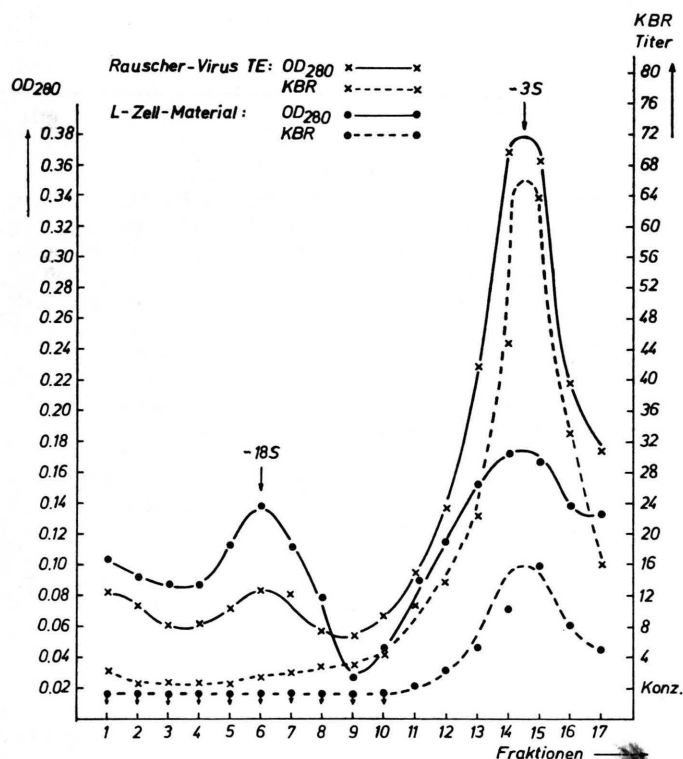


Abb. 2. Zentrifugation von L-Zell-Material und Spaltprodukten des Rauscher-Virus im Zuckergradienten. $OD_{280\text{ m}\mu}$ und KBR-Titer (MLV-Kaninchen-Serum) der einzelnen Fraktionen.

¹ W. SCHÄFER u. E. SEIFERT, Virology 35, 323 [1968].

² S. DALES u. A. F. HOWATSON, Cancer Res. 21, 193 [1961].

³ D. A. KINDIG u. W. H. KIRSTEN, Science [Washington] 155, 1543 [1967].

⁴ A. S. CROMACK, J. gen. Virol. 2, 195 [1968].

* Abbn. 1 a–4 b s. Tafel S. 1276 a.

seren erfaßbares MLV-spezifisches Antigen war, wie die Austestung der verschiedenen Zuckergradienten-Fractionen in der KBR ergab, nur im 3 S-Material enthalten (Abb. 2). Die spezifische Aktivität betrug hier 16 000 KBR-Einheiten/mg Protein. Sie liegt über derjenigen reiner Präparate von Spaltprodukten eines Influenza- und Parainfluenza-Virus^{5, 6}.

Aus dem Kultur-Medium von L-Zellen konnten durch hochtouriges Zentrifugieren (16×10^5) Partikeln ausgeschleudert werden, die elektronenoptisch den MLV-Teilchen entsprechen (Abb. 3 a und b). Wahrscheinlich sind diese Partikeln mit den Einheiten identisch, in die nach neuesten Untersuchungen von KINDIG et al.⁸ ¹⁴C-Uridin eingebaut wird und die die gleiche Dichte wie die ML-Viren haben.

Durch Schütteln mit Tween 80 und Äther⁹ wurden aus dem entsprechenden hochkonzentrierten (1000-fach) Präparat neben inhomogenem Material wiederum solche von ~3 S und ~18 S gewonnen, von denen das 3 S-Material die antigene Aktivität enthielt und auch in seinen sonstigen Eigenschaften ($OD_{260/280}$, spez. Aktivität) dem aus dem L-Zell-Homogenat gewonnenen 3 S-Produkt entsprach.

Beim Rauscher-Virus führte die Behandlung mit Tween 80 und Äther zu einem analogen Ergebnis (Abb. 1 b). Verwendet wurde für diesen Versuch ein aus infiziertem Mäuseplasma gewonnenes, hochgereinigtes Präparat, das wir dem Entgegenkommen von Dr. F. J. RAUSCHER, Bethesda (USA), verdanken. $OD_{260/280}$ für die gewonnene 3 S-Fraktion betrug hier 0,89. Die spezifische antigene Aktivität lag bei 20 000 KBR-Einheiten/mg Protein.

Bei den 18 S-Fractionen der verschiedenen Provenienz wurde eine weitere Charakterisierung auf elektronenoptischem Wege zu erreichen versucht. Dabei wurde festgestellt, daß sie in allen Fällen aus etwa 120 bis 130 Å großen Teilchen bestehen, bei denen es sich offenbar um Zylinder handelt, die aus Untereinheiten aufgebaut sind und einen zentralen Hohlkanal enthalten (Abb. 4 a und b).

Wie die beschriebenen Untersuchungen zeigen, setzt der in unserem Institut gehaltene L-Zell-Stamm Partikeln in Freiheit, die vom Rauscher-Virus und anderen ML-Viren elektronenoptisch nicht zu unterscheiden sind. Darüberhinaus lassen sich aus hochgereinigtem Rauscher-Virus und L-Zell-Material gleichartige Komponenten gewinnen, von denen die eine mit ~3 S, die andere mit ~18 S sedimentiert. Die 3 S-Komponenten reagieren sämtlich mit MLV-Antiserum und zeigen dadurch, daß L-Zell-Agens und Rauscher-Virus zumindest in diesem Strukturanteil antigene Beziehungen aufweisen. In

diesem Zusammenhang dürfte von Interesse sein, daß auch von den Geflügel-Leukose-Viren, die morphologisch den ML-Viren ähnlich sind, ein Antigen mit einer S_{20} von etwa 3 S gewonnen werden kann¹⁰. Es ist in allen Viren dieser Gruppe enthalten, weist aber keine serologische Verwandtschaft zu dem MLV-Antigen auf¹. Die 18 S-Komponente scheint zumindest strukturell im L-Zell-Agens und im Rauscher-Virus ähnlich beschaffen zu sein. Ob es sich dabei um einen virusspezifischen Anteil handelt, der von dem verwendeten Antiserum nicht erfaßt wird, oder um zelleigenes Material, das von den Viruspartikeln mitgeschleppt wird, kann z. Z. noch nicht entschieden werden. Vorläufige serologische Untersuchungen mit Antiseren gegen normale Maus-Antigene sprechen gegen die letztgenannte Vermutung.

Bisher ist es weder uns noch anderen Autoren (s. l. c.⁸) gelungen, mit dem L-Zell-Agens in Mäusen eine Leukämie bzw. einen Tumor zu erzeugen oder es auf Mäusezellen in der Gewebekultur zu übertragen. Das schließt jedoch nicht aus, daß es sich hier um einen übertragbaren Erreger handelt. Von den Geflügel-Leukose-Viren ist bekannt, daß hier Subtypen existieren, die lediglich Tiere bzw. Zellen einer bestimmten genetischen Konstitution infizieren können¹¹. Das gleiche könnte für das L-Zell-Agens zutreffen. Eine Entscheidung über die Frage, ob es übertragbar ist, kann deshalb erst gefällt werden, wenn die verschiedenen Wirtsgenotypen berücksichtigt wurden. Im übrigen besteht noch die Möglichkeit, daß das Agens in irgendeiner Weise defekt ist, wie es bei Rous-Sarkom- und ML-Viren beobachtet wurde^{12, 13}.

Die bislang vorliegenden Befunde rechtfertigen u. E. bereits die Feststellung, daß in L-Zellen ein Virus der MLV-Gruppe vorliegt. Nach unseren serologischen Untersuchungen sind Viren dieser Art auch in LS-Zellen – L-Zellen, die in Suspension gezüchtet werden – und in RVP₃-Zellen – Mäusezellen (C 57/Bl), die durch Rous-Virus transformiert wurden – enthalten¹. Eine Arbeitsgruppe in Bethesda (USA) wies kürzlich in einigen der dort gehaltenen permanenten Mäuse-Zell-Linien ebenfalls ML-Viren nach¹⁴. Wir müssen also damit rechnen, daß ML-Viren in permanenten Maus-Zellstämmen weit verbreitet, wenn nicht gar generell vorhanden sind. Dies sollte man bei der Interpretation von Versuchen, die mit derartigen Stämmen durchgeführt werden, berücksichtigen.

Herrn P. GIEBLER danken wir für seine Mitarbeit, Herrn Dr. F. J. RAUSCHER, Bethesda, für die Überlassung von Serum und Virusmaterial.

⁵ W. SCHÄFER, in: The Nature of Viruses, herausg. durch G. E. W. WOLSTENHOLM und E. C. P. MILLAR, Churchill Ltd., London 1957, p. 91.

⁶ R. ROTT, Zbl. Vet. Med. B 12, 74 [1965].

⁷ P. GIEBLER, Z. Naturforschg. 13b, 238 [1958].

⁸ D. A. KINDIG, R. KARP u. W. H. KIRSTEN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 1103 [1968].

⁹ E. A. ECKERT, R. ROTT u. W. SCHÄFER, Virology 24, 426 [1964].

¹⁰ H. BAUER u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. 20b, 815 [1965].

¹¹ P. K. VOGT u. R. ISHIZAKI, Virology 26, 664 [1965].

¹² H. HANAFUSA, T. HANAFUSA b. H. RUBIN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 572 [1963].

¹³ H. IGEL, R. J. HUEBNER, B. DEPPA u. S. BUMGARNER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1870 [1967].

¹⁴ W. T. HALL, W. F. ANDRESEN, K. K. SANFORD, V. J. EVANS u. I. W. HARTLEY, Science [Washington] 156, 85 [1967].

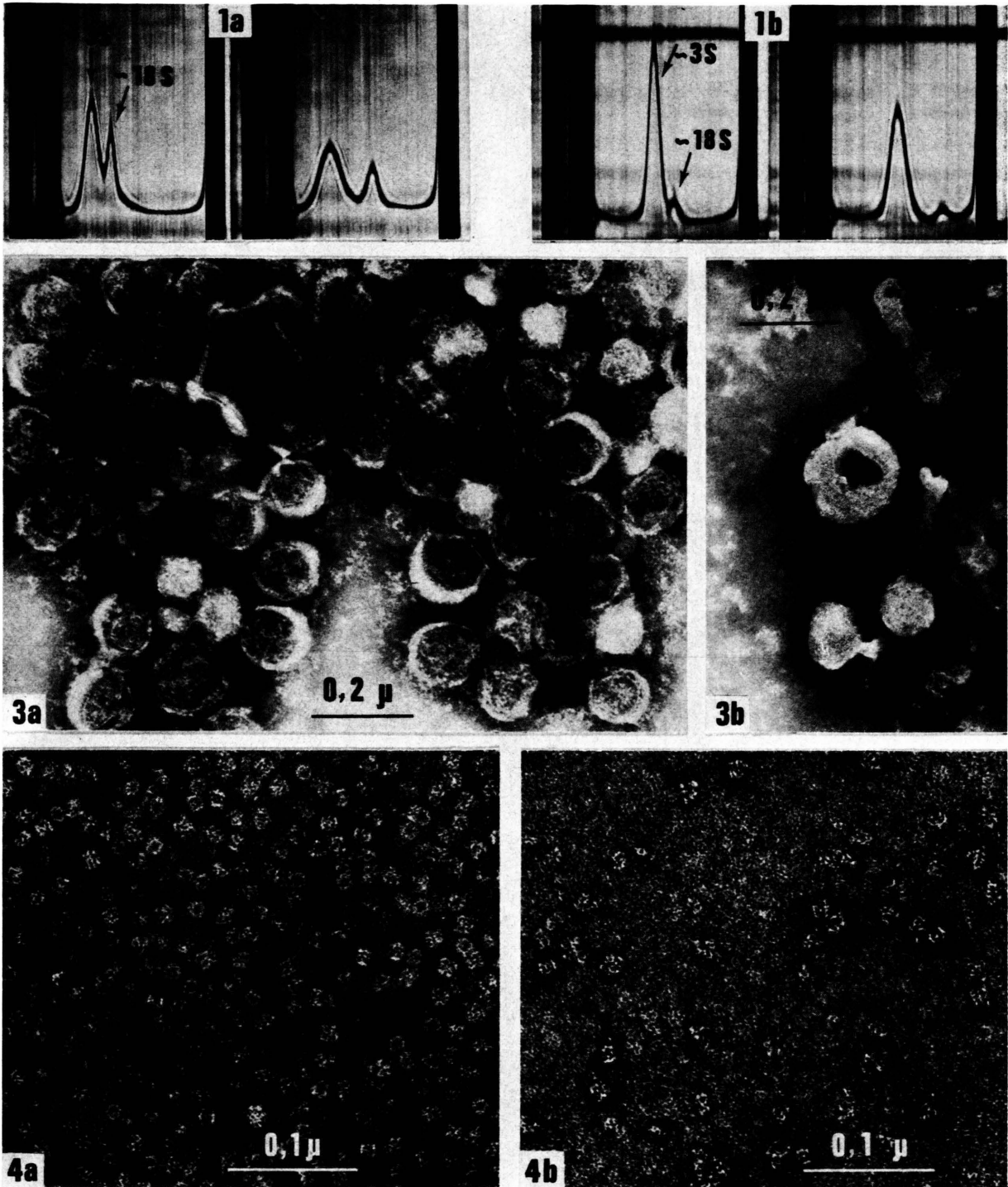


Abb. 1. Sedimentationsdiagramme. a) Material aus L-Zellen, 42040 U.p.M.; links: 12 Min., rechts: 28 Min. Laufzeit, Winkel 40° . b) Spaltmaterial des Rauscher-Virus, 42040 U.p.M.; links: 12 Min., rechts: 28 Min. Laufzeit, Winkel: 30° .

Abb. 3. Partikeln aus Kulturmedium von L-Zellen, durch Ultrazentrifugieren 1000-fach angereichert. a) Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure nach Fixierung mit OsO_4 . b) Dasselbe, aber ohne Fixierung.

Abb. 4. 18 S-Partikeln nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. a) aus L-Zell-Material, b) aus Rauscher-Virus.

