

Partielle Reinigung und biologisch-serologische Charakterisierung Kohlenhydrat-haltiger Komponenten aus Präparaten von Friend-Leukämie-Virus

Partial Purification and Biological-serological Characterization of Carbohydrate Containing Components from Preparations of Friend-leukemia-virus

Volker Moennig, Gerhard Hunsmann und Werner Schäfer

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforsch. **28 c**, 785—788 [1973]; eingegangen am 1. Juni 1973)

Glycoproteins, mouse leukemia virus

Die Viren der Mäuse-Leukämie (MuLV) tragen an ihrer Oberfläche knopfartige Gebilde („Knöpfe“)¹. Ähnliche Strukturen wurden auch bei Leukämieviren anderer Säuger gefunden (H. Frank, unveröffentlicht). Nach neueren Befunden^{2,3} scheinen die Knöpfe von MuLV im wesentlichen aus Glykoproteinen zu bestehen, von denen dem einen (G_1) ein Molekulargewicht von etwa 60 000 dalton (d), dem anderen (G_2) ein solches von etwa 70 000 d zugeschrieben wird⁴. Nach Untersuchungen von Schäfer *et al.*² sowie Witter *et al.*³ scheint mindestens eines derselben Träger der hämagglutinierenden Aktivität zu sein, die sich beim intakten MuLV im allgemeinen erst nach Bebrüten mit Neuraminidase und Phospholipase C feststellen läßt⁵. Außerdem soll ein typspezifisches Antigen (IIv), das mit neutralisierendem und Hämagglutinations (HA)-hemmendem Antikörper reagiert^{2,6}, sowie ein gruppenspezifisches (gs) Antigen des species spezifischen Typs⁷ (gs spec. Antigen, IIgs) vorhanden sein. Das letztere wurde zunächst durch den Immunodiffusionstest nach Ouchterlony bei isoliertem Hämagglutinin² dargestellt und später in Versuchen nachgewiesen, in welchen isolierte, nicht hämagglutinierende Strukturen des Gross-Virus (GLV), bei denen es sich wahrscheinlich um freie Knöpfe oder Knopfbestandteile handelte, durch Zusatz von heterologem Friend (FLV)- bzw. Rauscher-Virus (RLV)-Antiserum zu HA-aktiven Einheiten rekonstituiert werden konnten (HA-Rekonstitution)⁶. Schließlich ergaben sich bei HA-Inhibitionstesten mit Antiserum gegen Katzenleukämievirus (FeLV) gewisse Hinweise dafür, daß auch ein gs-Antigen vom interspecies-Typ (gs interspec. Antigen) mit den Knöpfen von MuLV assoziiert ist⁶.

Hühnerleukämieviren (HLV) weisen anstelle von Knöpfen dornenartige Fortsätze an ihrer Oberfläche

auf, die an ihrem freien Ende ein kugelförmiges Gebilde tragen. Bolognesi *et al.*⁸ gelang es, diese Struktur in hochgradig reiner Form zu isolieren. Sie konnten zeigen, daß sie ebenfalls aus zwei Glykoproteinen aufgebaut ist und typspezifisches Antigen sowie breiter reagierende antigene Komponenten enthält. Außerdem war diese Struktur des HLV in der Lage, eine Infektion empfänglicher Zellen mit aktivem HLV zu verhindern (Interferenz).

Bei den bisherigen Versuchen, die glykoprotein-haltige Oberflächenkomponente von MuLV zu isolieren^{2,3}, wurde das Virus zunächst durch Schütteln mit Tween 80 und Äther (TE) bzw. mit Äther allein degradiert. Das danach gewonnene hämagglutinierende Material enthielt neben Glykoprotein aber noch größere Mengen von Lipid, das wahrscheinlich von der äußeren Virusmembran her stammt sowie ein Virusprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 12 000 d, das nach neuesten Untersuchungen⁹ ebenfalls Kohlenhydrat enthalten soll und wahrscheinlich im Lipid der Virushülle eingebettet ist. Nachdem festgestellt wurde, daß die Knöpfe von MuLV nur relativ locker auf der Virushülle aufsitzen und z. B. schon beim Zentrifugieren im Dichtegradienten von dieser abgelöst werden^{1,3}, wurde versucht, sie ohne Anwendung von Detergentien und Lipidlösungsmitteln von den Viruspartikeln zu lösen und anschließend zu isolieren. Wie im folgenden gezeigt wird, konnten dabei Fraktionen, die als Hauptbestandteile Kohlenhydrat-haltige Komponenten enthalten, gewonnen werden. Sie besitzen nach den bisher durchgeführten Prüfungen diejenigen biologischen Aktivitäten, die der knopfartigen Virusoberflächenstruktur zugeschrieben werden. Die beiden isolierten Kohlenhydrat-haltigen Komponenten werden im folgenden als G_1 und G_2 bezeichnet, obwohl die entsprechenden Fraktionen neben virusspezifischem noch anderes Material enthalten.

Bei der Isolierung von G_1 und G_2 wurde wie folgt vorgegangen: FLV wurde in STU-Mauszellen produziert¹⁰. Aus 1,5 l Gewebekulturmedium wurde das Virus zunächst bei ρ 10 (Spinco-Rotor 21)¹¹ ausgeschleudert. Die gewonnenen Sedimente lösten wir mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in 30 cm³ Phosphatgepufferter (pH 7,2) 0,8-proz. NaCl-Lösung (NaCl 7,2). Danach wurde das Virus nochmals bei ρ 10, jetzt aber im Spinco Rotor SW 50.1, sedimentiert und anschließend im Branson (Soest, Niederlande)-Ultraschallwasserbad in NaCl 7,2 (3 cm³) suspendiert (~1 min). Dem Konzentrat wurden dann 3 cm³ einer 70-proz. (Gewicht/Volumen) Rohrzucker-Lösung und etwa 40 min später schnell 24 cm³ NaCl 7,2 zugefügt. Dieses Gemisch zentrifugierten wir schließlich 20 min bei 50 000 Umdrehungen/min (upm) im Spinco Rotor SW 50.1. Die elektronen-

optische Untersuchung der danach im Sediment enthaltenen Viruspartikeln zeigte, daß die Knöpfe weitgehend von ihnen entfernt waren und demnach im Überstand enthalten sein mußten.

Die Überstände von 12 derartigen Aufarbeitungen wurden gesammelt und unter Verwendung einer Diaflo PM 10-Membran (Amicon Corp., Lexington, Mass.) etwa 30-fach konzentriert. Das Konzentrat wurde im linearen Rohrzuckergradienten (20–70%) 15 Std. bei 45 000 upm im Rotor SW 50.1 zentrifugiert. Danach waren zwei UV (280 nm)-Absorptionsbereiche bei Dichten von 1,12 und 1,23 g/cm³ zu beobachten. Das 1,12 g/cm³-Material enthielt, wie die analytische Acrylamid-Gelelektrophorese (in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT))¹² zeigte, vor allem G₁ und G₂, daneben aber auch noch das 31 000 d Virusprotein P₄⁹. In der 1,23 g/cm³-Fraktion waren dagegen neben zahlreichen, nicht ohne weiteres identifizierbaren Proteinen nur geringe Mengen von G₁ und G₂ zu finden. Das in den gewonnenen 1,12 g/cm³-Fraktionen enthaltene P₄ konnte, nachdem sie gegen NaCl 7,2 dialysiert waren, durch Gelfiltration über eine Sephadex-G150-Säule¹³ weitgehend von G₁ und G₂, die schneller wanderten, abgetrennt werden. Die Fraktionen, in denen diese enthalten waren, wurden gegen Tris-Puffer (0,1 M Tris HCl, pH 7,8) dialysiert und schließlich über eine Ionenaustauschersäule (DEAE A-50, Pharmacia, Uppsala), die mit dem gleichen Puffer equilibriert war, chromatographiert (Elution mit 0–0,8 M NaCl in 0,1 M Tris HCl, pH 7,8). Dabei eluierte das restliche P₄ vor G₁ und G₂, die in einem relativ breiten UV (280 nm)-Absorptionsgipfel vorhanden waren. Mehrere aufeinanderfolgende Fraktionen (F₄–F₇) dieses Gipfels wurden mit Hilfe der Diaflo PM 10-Membran konzentriert. Bis auf die DEAE-Chromatographie (bei 20 °C) wurden alle Aufarbeitungsprozeduren in der Kälte (4 °C oder Eisbad) durchgeführt. Proteingehalt (Bestimmung nach Lowry *et al.*¹⁴) der einzelnen konzentrierten Fraktionen: F₄: 0,16 mg/cm³, F₅: 0,23 mg/cm³, F₆: 0,31 mg/cm³, F₇: 0,24 mg/cm³.

Die Analyse von F₄–F₇ in der Gelelektrophorese¹² lieferte das in Abb. 1 * wiedergegebene Ergebnis. Die im Gesamtvirus enthaltenen Hauptproteine P₁ (10 000 d), P₂ (12 000 d), P₃ (15 000 d), P₄ (31 000 d)⁹ waren in keiner der isolierten Fraktionen (F₄–F₇) zu finden. Von den Proteinen mit Molekulargewichten >31 000 d fehlten die meisten, von einigen waren nur Spuren nachzuweisen. Angereichert waren dagegen G₁ und/oder G₂, die durch Parallelfärbung der jeweiligen beiden Gel-Hälften mit Coomassie Blau (Proteine) und Perjodsäure-

Schiff-Reagens (PAS) (Kohlenhydrate)¹² identifiziert wurden. Fraktion F₄ enthielt hauptsächlich G₁, geringere Mengen von G₂ und eine durch Coomassie Blau färbbare Komponente, die etwas langsamer als G₂ wandert. Ab F₅ nimmt die Menge von G₂ relativ zu und ab F₆ der Gehalt an G₁ merklich ab. F₇ besteht im wesentlichen aus G₂ und einer nur durch Coomassie Blau färbbaren Komponente, die etwas schneller als G₂ wandert und auch in F₅ und F₆ in größerer Menge vorhanden ist.

Im Hinblick auf die biologischen Eigenschaften wurden in erster Linie F₅ und F₇ und nur gelegentlich F₄ und F₆ untersucht.

In einem Stichversuch, in dem wir F₅ in einer Endverdünnung von 1/400 einsetzten, wurde zunächst geprüft, ob dieses ebenso wie ein entsprechendes Isolat von HLV⁸ in der Lage ist, eine Interferenz zu erzeugen sowie neutralisierende Antikörper zu absorbieren (Technik s. l. c.^{2,3}). Wie Tab. I ausweist,

Tab. I. Prüfung der Fraktion F₅ auf interferierende Wirkung und die Fähigkeit, neutralisierende Antikörper zu absorbieren.

Ansatz ^a	Zahl der Plaques ^b pro 0,2 cm ³ Ansatz
FLV + Medium	104
FLV + F ₅ (1 : 400)	0
FLV + neutral. Antiserum (1 : 100)	1
FLV + (neutral. Antiserum 1 : 100 + F ₅ 1 : 400)	47

a. Zu 0,6 cm³ einer geeigneten Virusverdünnung (FLV) wurden 0,15 cm³ der angegebenen Zusätze hinzugefügt. Die angegebenen Verdünnungswerte wurden nach Herstellung der 0,75 cm³ enthaltenden Mischungen erreicht. Bebrütung der neutral. Antiserum/F₅-Mischung: 1 Stde. 18 °C plus 18 Std. 4 °C. Bebrütung der virushaltigen Mischungen: 1 Stde. 18 °C plus 1 Stde. 4 °C.

b. Bestimmung durch den XC-Test (Rowe *et al.*²⁰).

ist dies der Fall. Während das verwendete Viruspräparat ohne Zusatz von F₅ 104 Plaques hervorrief, konnte es nach dessen Zugabe keine sichtbaren Plaques mehr erzeugen (Interferenz). Während das unbehandelte, neutralisierende Antiserum die Plaquezahl von 104 auf 1 reduzierte, ging diese bei Verwendung des mit F₅ behandelten Serums nur auf 47 zurück (Absorption neutralisierender Antikörper durch F₅); bei der Beurteilung dieses Ergebnisses ist noch zu berücksichtigen, daß der entsprechende Effekt durch das nachgewiesene Interferenzphänomen beeinflusst wurde.

Die serologische Untersuchung der isolierten Fraktionen im Ouchterlony-Test bestätigte die bisherigen Feststellungen weitgehend. Die Virusproteine P₁, P₂ und P₄, die gelelektrophoretisch nicht mehr zu finden waren, ließen sich in F₅ auch durch entsprechende komponentenspezifische Seren⁹ nicht nach-

* Abb. 1 und 2 siehe Tafel auf Seite 788 a.

weisen. Erwähnt sei aber, daß das P_4 -Antiserum mit F_5 gelegentlich eine sehr feine Linie bildete, die allerdings nicht stabil war. — Für die Erfassung des typspezifischen Antigens, das durch den Serumabsorptionsversuch bereits festgestellt worden war, benutzten wir ein Antiserum (*G-FLV-Serum*), das durch Immunisierung einer Ziege mit TE degradiertem FLV gewonnen und mit normalen Mausantigenen und foetalem Kälberserum abgesättigt wurde¹⁵. Der Neutralisationstiter dieses Serums ist $< 1/5000$. Im Ouchterlony-Test bildet es mit homologem MuLV zwei Präzipitationslinien¹⁵, von denen die äußere scharfe (Abb. 2 a) durch das typspezifische Antigen IIv, die innere, meist breite durch die in der P_4 -Fraktion des Virus enthaltenen gs-spec. Antigene gs/1 und gs/2 (Abb. 2 b)^{15, 16} hervorgerufen wird. Mit dem ebenfalls in der P_4 -Fraktion enthaltenen gs-interspec. Antigen reagiert es nicht. Die Prüfung von F_5 mit diesem Serum ergab (Abb. 2 b), daß es zwar die typspezifische Antigenkomponente IIv, nicht aber die in P_4 vorhandenen antigenen Determinanten gs/1 und gs/2 enthält (F_5 -Linie geht in äußere FLV-Linie über, kreuzt aber die innere FLV- und die P_4 -Linie). Nach Absorption mit dem homologen FLV reagierte das Serum nicht mehr mit F_5 , wohl aber — wie beim Nachweis eines typspezifischen Antigens zu erwarten — nach analoger Absättigung (gleiche Proteinmengen der TE-degradierten, gereinigten Viren) mit dem heterologen GLV (Abb. 2 c). F_4 und F_7 unterschieden sich im Verhalten gegenüber G-FLV-Serum nicht von F_5 (Abb. 2 d). — Ein weiteres Serum (*RSDS/3-Serum*)¹⁰, das gegen Maus-Plasma-RLV hergestellt und wie G-FLV-Serum mit Normal-Antigenen absorbiert wurde, stellt, wie früher gezeigt werden konnte^{17, 2, 16}, im Ouchterlony-Test (vgl. Abb. 2 e) neben den gs-spec. Antigenen gs/1, gs/2 (innere Linie) und Igs (äußere Linie), das sehr wahrscheinlich dem Protein P_1 entspricht^{9, 16}, noch Antigen IIgs und nur sehr schwach das typspezifische Antigen IIv dar¹⁷ (mittlere (z. Tl. doppelte) Linie; diese ist bei FLV stärker als bei GLV, da beim ersteren sowohl IIgs wie IIv erfaßt werden). Ließen wir dieses Serum mit F_5 reagieren (Abb. 2 e), so ging dessen (z. Tl. doppelte) Präzipitationslinie in die mittlere Linie von FLV und GLV (IIgs)

über; gegenüber der von GLV zeigte sie eine feine, kaum erkennbare Spur, die auf das Antigen IIv zurückzuführen sein dürfte¹⁷. Die in P_4 (gs/1 und gs/2) und P_1 (wahrscheinlich Igs) enthaltenen gs-spec. Antigene ließen sich auch mit diesem Serum nicht in F_5 nachweisen (Kreuzung der F_5 -Linie mit den inneren Linien von FLV und GLV, sowie Nichtabbiegen der äußeren Igs-Linien von FLV und GLV). — Für den Nachweis von gs interspec. Antigen benutzten wir zwei Antiseren, die gegen FeLV (Rickard), das mit TE behandelt war, in Ziegen hergestellt wurden. Von ihnen stellt, wie frühere Untersuchungen zeigten¹⁸, das *Goat I-S-8-Serum* (Dr. Wilsnack, Baltimore) nur eine der beiden bisher festgestellten interspec. Determinanten (a) klar im Ouchterlony-Test dar. Dieses Serum lieferte weder mit F_5 noch F_7 eine deutliche Präzipitationslinie. Das zweite, bisher noch nicht näher geprüfte Serum (*FeLV-Serum*, Dr. de Noronha, Ithaca) bildete dagegen nach Absorption mit normalen Katzen-Antigenen und foetalem Kälberserum mit F_5 und F_7 jeweils eine starke und eine sehr feine Linie, die beide in eine der Banden einmündeten, die bei der Reaktion des Serums mit Mäuseleukämie-Virus (FLV) entstanden (Abb. 2 f). Absorption des Serums mit einem Extrakt von FLV produzierenden STU-Mauszellen entfernte die entsprechenden Antikörper, nicht aber die Absättigung mit einem Extrakt von normalen STU-Zellen (analoge Mengen) (Abb. 2 g). Danach scheinen gewisse interspec. Determinante(n) in F_5 und F_7 enthalten zu sein.

Schließlich wurden die isolierten Fraktionen noch darauf untersucht, ob in ihnen *Normal-Antigene* vorhanden sind. Verwendet wurden Kaninchen-Antiseren gegen normales foetales Kälberserum (*fKS-Serum*) und normales Maus-Blut-Plasma (*Maus-Plasma-Serum*). Zu unserer Überraschung ließ sich dabei sowohl in F_4 wie F_5 und F_7 Material nachweisen, das mit fKS-Serum reagierte. Bei F_7 (Abb. 2 h) war nur eine, bei F_4 und F_5 waren dagegen mehrere Präzipitationslinien zu sehen. F_5 lieferte außerdem eine schwache Reaktion mit Maus-Plasma-Antiserum. Die mit fKS-Serum reagierenden Antigene werden im folgenden als fKS-Antigene bezeichnet.

Hämagglutinationsversuche wurden mit F_4 , F_6 und F_7 durchgeführt (Tab. II). F_4 und F_6 verursach-

Tab. II. Prüfung von F_4 , F_6 und F_7 auf HA-Aktivität.

Fraktion	Protein [mg/cm ³]	Gehalt an (vgl. Abb. 1)		HA-Titer ohne Zusatz von IgG	HA-Titer nach Zusatz von IgG aus rekonstit. fKS-Serum	
		G ₁	G ₂		FTE/H-Serum	
F_4	0,16	+++	+	$> 1/4$	$> 1/4$	$> 1/4$
F_6	0,31	+	+++	$> 1/4$	1/1024	1/64
F_7	0,24	±	+++	1/32	1/512	1/32

ten weder vor, noch nach Neuraminidase- und Phospholipase C-Behandlung eine HA (Titer $< 1/4$), während unbehandeltes F₇ einen HA Titer von $1/32$ besaß. Da uns für Rekonstitutionsexperimente keine geeigneten heterologen Seren (GLV-Antiseren) zur Verfügung standen, wurde für diese Zwecke ein mit Normal-Antigenen (einschl. fKS-Antigenen) abgesättigtes FLV-Kaninchen-Antiserum (FTE/H-Serum) benutzt, das relativ geringe Mengen von neutralisierendem (Anti-IIv), aber größere von HA-rekonstituierendem Antikörper (wahrscheinlich Anti-IIgs) enthält⁶. Setzten wir isoliertes IgG dieses Serums den F₄- und F₆-Präparaten zu (Technik s. l. c.⁶), so zeigte F₄ keine feststellbare HA, F₆ aber einen HA-Titer von $1/1024$. Zusatz des gleichen IgG's zu F₇ hatte zur Folge, daß dessen HA-Titer 16-fach anstieg. Die HA-Aktivitäten ließen sich durch isoliertes IgG eines stark neutralisierenden FLV-Antiserums (G-FLV-Serum)¹⁵, nicht aber von IgG des fKS-Serums inhibieren (Technik s. l. c.⁶). Außer durch IgG von FTE/H-Serum konnte eine — allerdings geringe — HA-Rekonstitution bei F₆ auch durch fKS-Serum IgG erreicht werden. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, daß hier gewisse fKS-Antigene an die virusspezifische Komponente adsorbiert waren.

Die Interpretation unserer mit den isolierten Fraktionen erzielten Ergebnisse wird dadurch erschwert, daß in ihnen neben G₁ und/oder G₂ mindestens noch eine weitere geleelektrophoretisch nachweisbare Komponente sowie fKS-Antigen(e) enthalten sind. Trotzdem erscheint uns aufgrund früherer Befunde^{2,3} die Annahme berechtigt, daß die in ihnen gefundenen virusspezifischen Aktivitäten mit G₁ und/oder G₂ assoziiert sind.

Nachweisen ließen sich folgende in den Virusglykoproteinen erwarteten (s. oben) Prinzipien: Die antigenen Determinanten IIv (typ-spezifisch) und

IIgs (spec.), ein interferierendes und ein hämagglutinierendes Prinzip. Das letztere scheint vor allem oder nur in G₂ enthalten zu sein (s. Tab. II); es liegt in nicht hämagglutinierenden, wahrscheinlich monovalenten Strukturen vor, die durch geeignete Antikörper (Anti IIgs, vgl. l. c.⁶) zu multivalenten, HA-aktiven Einheiten verknüpft werden können. Schließlich scheinen, wie nach HA-Inhibitionsversuchen⁶ zu erwarten, noch gewisse interspec. Determinante(n) vorhanden zu sein, die offenbar von der im Virusprotein P₄ enthaltenen und durch Goat I-S-8-Serum darstellbaren Determinante a¹⁸ verschieden sind. Zur Zeit kann aber die Möglichkeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um das mit der reversen Transkriptase des Virus assoziierte interspec. Antigen¹⁹ handelt. Eine entsprechende enzymatische Aktivität wurde jedoch in den für die Aufarbeitung benutzten Zentrifugen-Überständen nicht gefunden. Die Virusproteine P₁ — P₄ waren serologisch und/oder geleelektrophoretisch nicht in unseren Präparaten nachzuweisen.

Was die fKS-Antigene anlangt, so besteht die Möglichkeit, daß entsprechende kreuzreagierende Komponenten Bestandteile der Virusglykoproteine sind. Wahrscheinlicher ist aber, daß sie insgesamt Verunreinigungen darstellen, die sich physikalisch-chemisch und u. U. sogar chemisch nur wenig von ihnen unterscheiden. Durch Anwendung weiterer Trennverfahren hoffen wir, diese Frage klären zu können.

A. Mayerhofer, J. Müller, L. Pister, E. Seifert und I. Spratte danken wir für ihre Mitarbeit, Dr. F. de Noronha, Ithaca, für Überlassung von Serum.

Anmerkung bei Korrektur: Das elektrophoretisch wie G₁ wandernde, PAS-färbare Material (s. Abb. 1) konnte inzwischen durch Antikörper gegen foetales Kälberserum aus den gewonnenen Fraktionen weitgehend entfernt werden.

- ¹ M. V. Nermut, H. Frank u. W. Schäfer, *Virology* **49**, 345 [1972].
- ² W. Schäfer, J. Lange, P. J. Fischinger, H. Frank, D. P. Bolognesi u. L. Pister, *Virology* **47**, 210 [1972].
- ³ R. Witter, H. Frank, V. Moennig, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 330 [1973].
- ⁴ D. P. Bolognesi, *Advances in Virus Research* **Bd. 19**, im Druck.
- ⁵ W. Schäfer u. J. Szántó, *Z. Naturforsch.* **24b**, 1324 [1969].
- ⁶ R. Witter, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 346 [1973].
- ⁷ W. Schäfer, J. Lange, L. Pister u. E. Seifert; F. de Noronha u. F. W. Schmidt, *Z. Naturforsch.* **25b**, 1029 [1970].
- ⁸ D. P. Bolognesi, H. Bauer, H. Gelderblom u. G. Hüper, *Virology* **47**, 551 [1972].
- ⁹ R. Green, D. P. Bolognesi, W. Schäfer, L. Pister, G. Hunsmann u. F. de Noronha, *Virology*, im Druck.
- ¹⁰ W. Schäfer u. E. Seifert, *Virology* **35**, 323 [1968].
- ¹¹ P. Giebler, *Z. Naturforsch.* **13b**, 238 [1958].

- ¹² D. P. Bolognesi u. H. Bauer, *Virology* **42**, 1097 [1970].
- ¹³ W. Schäfer, F. A. Anderer, H. Bauer u. L. Pister, *Virology* **38**, 387 [1969].
- ¹⁴ O. H. Lowry, H. J. Rosebrough, L. Farr u. R. J. Randall, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951].
- ¹⁵ J. Lange, H. Frank, G. Hunsmann, V. Moennig, R. Wollmann u. W. Schäfer, *Virology* **53**, 457 [1973].
- ¹⁶ W. Schäfer, H. Bauer, D. P. Bolognesi, P. J. Fischinger, H. Frank, H. Gelderblom, J. Lange u. M. V. Nermut, *Proceed. 25th Symp. Found. Canc. Res.*, im Druck.
- ¹⁷ W. Schäfer, P. J. Fischinger, J. Lange u. L. Pister, *Virology* **47**, 197 [1972].
- ¹⁸ W. Schäfer, G. Hunsmann, V. Moennig, R. Wollmann u. L. Pister; F. Deinhardt u. J. Hoekstra, *Z. Naturforsch.* **28c**, 214 [1973].
- ¹⁹ E. M. Scolnick, W. P. Parks, G. J. Todaro u. S. A. Aaronson, *Nature [London] New Biol.* **235**, 35 [1972].
- ²⁰ W. P. Rowe, W. E. Pugh u. J. W. Hartley, *Virology* **42**, 1136 [1970].

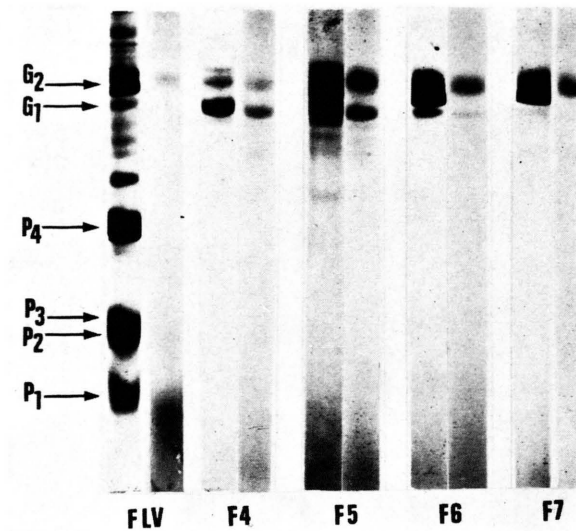


Abb. 1. Analytische Gelelektrophorese des Gesamt-Virus (FLV) und der daraus isolierten Fraktionen F₄–F₇. Links jeweils: Coomassie-Blau-Färbung; rechts: PAS-Färbung. Wanderungsrichtung von oben nach unten.

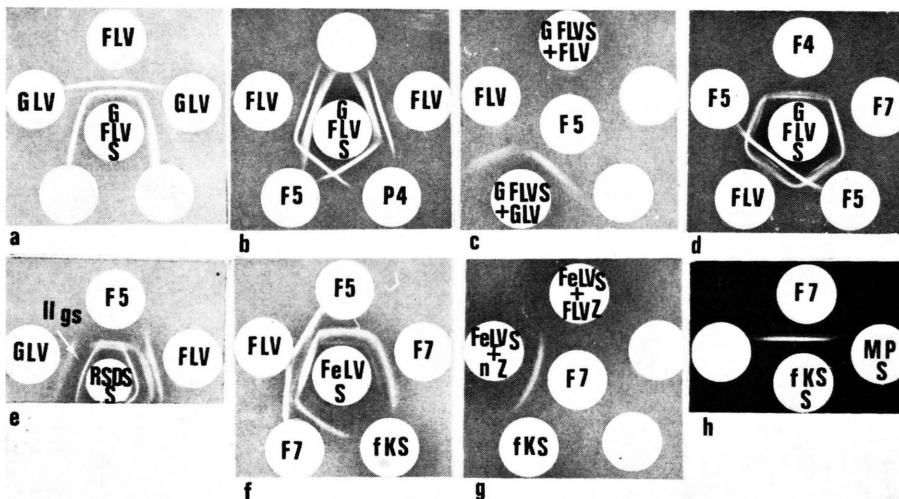


Abb. 2. Ouchterlony-Teste.

- Reaktion von Friend- und Gross-Virus mit G-FLV-Serum (G FLV-S). FLV und GLV = TE degradiertes, gereinigtes Friend- und Gross-Virus. Die äußere, nur bei FLV erscheinende Linie enthält das typspezifische Antigen IIv, die innere durchgehende Linie die gs-spec. Antigene gs/1 und gs/2¹⁶.
- Prüfung von F₅ mit G-FLV-Serum. P₄ = Isoliertes 31.000 d Protein von FLV⁹; Darstellung der in ihm enthaltenen gs-spec. Antigene gs/1 und gs/2.
- Absättigung von G-FLV-Serum mit FLV (G FLV-S + FLV) und GLV (G FLV-S + GLV); Reaktion der absorbierten Serumproben mit F₅.
- Prüfung von F₄, F₅ und F₇ mit G-FLV-Serum.
- Prüfung von F₅ mit RSDS/3-Serum (RSDS-S). Äußere Linien von FLV und GLV: Antigen Igs (spec.). Mittlere Linien: vor allem Antigen IIgs (spec.). Innere Linien: gs/1 und gs/2 (spec.)^{16, 17}.
- Prüfung von F₅ und F₇ mit FeLV-Serum (FeLV-S). fKS = foetales Kälberserum.
- Absättigung von FeLV-Serum mit Extrakten von FLV-infizierten (FeLV-S + FLV-Z) und normalen STU-Zellen (FeLV-S + nZ); Reaktion der absorbierten Serumproben mit F₇.
- Prüfung von F₇ mit Antiserum gegen foetales Kälberserum (fKS-S) und gegen normales Maus-Plasma (MP-S). Die verwendeten Konzentrationen von F₄, F₅ und F₇ entsprechen etwa 0,5 mg/cm³ (durch Nachfüllen erreicht).

