

# ANGEWANDTE CHEMIE

51. Jahrgang, Nr. 13, Seiten 181—196, 2. April 1938

## Das Virusproblem

Von Dr. FEODOR LYNEN, Chemisches Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München  
Eing. 14. März 1938

Die Anfänge der Virusforschung gehen auf Iwanowski zurück, der im Jahre 1892 feststellte, daß der Saft mosaikkranker Tabakpflanzen auch nach Filtration durch ein *Chamberland*-Filter noch infektiös war, obwohl solche Filter alle bis dahin bekannten Lebewesen zurückhielten. Erst Beijerinck fand 6 Jahre später die Erklärung für diesen Versuch. Er erkannte, daß es sich hier um einen von Bakterien verschiedenen Krankheitserreger handelte, der die Infektion verursachte. Im selben Jahre fanden Loëffler u. Frosch die Ursache der Maul- und Klauenseuche des Rindes in einem filtrierbaren Virus, und im Jahre 1901 deckten dieselben Forscher auch das Gelbfieber als Viruskrankheit auf. Die Zahl der Krankheiten, die durch diese neue Klasse von Erregern hervorgerufen werden, ist sehr groß; bis heute sind ungefähr 150 Viruskrankheiten entdeckt worden. Darunter sind die bekanntesten: Pocken, Masern, Kinderlähmung, Windpocken, Ziegenpeter, Tollwut, Gürtelerose, Rötel, Schnupfen und Herpes. Auch bei der Grippeerkrankung scheint ein Virus beteiligt zu sein. Ferner ist das *Rous*-Sarkom der Hühner und das *Shope*sche Hautpapillom der wilden Kaninchen durch zellfreie Filtrate übertragbar, wobei noch besonders hervorgehoben sei, daß letzteres nahe Beziehungen zum Carcinom aufweist.

Wenn man sich vor Augen hält, daß gefährliche Seuchen, die jedes Jahr viele Opfer fordern, ihre Ursache in einem derartigen Virus haben, so ist es verständlich, daß die Wissenschaft alles aufgeboten hat, um in die Geheimnisse dieser Erreger einzudringen. In der letzten Zeit sind gerade von Chemikern bedeutende Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt worden, so daß hier ein Überblick über die bisherigen Ergebnisse wohl gerechtfertigt erscheint.

Die Erscheinungsform der Viruskrankheiten ist sehr vielgestaltig. Manche Erreger bedingen durch ihre Anwesenheit die Zerstörung der Wirtszelle; Beispiele dafür sind: Herpes, Pocken, Maul- und Klauenseuche. Andere Virusarten rufen Zellwucherungen hervor, wie wir sie bei der Hühnerpest und bei gewissen Tumoren und Warzen beobachten. Eine dritte Gruppe von Viruskrankheiten fällt durch das Vorhandensein eigenartiger intracellulärer Einschlüsse auf. Diese treten bei Variola Vaccine, Rabies fixe und Tabakmosaik in Erscheinung. Diese Einschlußkörper hielt man lange Zeit für das infektiöse Agens. Im Jahre 1904 entdeckte *Borrel* (1) in den Beulen pestkranker Hühner eine Unzahl von sehr kleinen Körpern. Als derartige „Elementarkörper“ auch bei anderen Viruskrankheiten gefunden wurden, vermutete man in ihnen den Träger der Aktivität. Die Identität dieser Elementarkörper mit den Viren wurde unter anderem durch die Bestimmung ihrer Größe wahrscheinlich.

Ursprünglich sah man in dem Passieren bakteriendichter Filter eine Eigentümlichkeit des Virus. Diese Differenzierung ließ sich jedoch nicht aufrechterhalten, als neu entdeckte Viren von derartigen Membranen zurückgehalten wurden. Manche Viren sind sogar so groß, daß sie, mit spezifischen Farbstoffen (2) gefärbt, im Mikroskop sichtbar sind. Auf folgenden drei Wegen ist die Größe der Viren zu bestimmen:

### 1. Ultraviolett-Mikrophotographie.

Nach *Abbe* können in einem Mikroskop nur solche Objekte zur Abbildung gelangen, deren Größe die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichtes mehrfach überschreitet. Für sichtbares Licht liegt die Grenze bei 275 m $\mu$ , für das kurzwellige ultraviolette Licht

erst bei 170 m $\mu$ . *J. Barnard* (3) führte die Ultramikroskopie in die Virusforschung ein und konnte mit ihrer Hilfe den Durchmesser größerer Viren bestimmen. Wenn man sicher ist, daß die gewonnenen Mikrophotographien Abbildungen sind, so läßt sich die Größe dieser Gebilde ohne weiteres feststellen. Die Entscheidung darüber, ob man Abbildungen oder Beugungsfiguren vor sich hat, ist schwer zu treffen, und darum haftet dieser Methode eine gewisse Unsicherheit an. Da die Ultraviolett-Mikrophotographie jedoch stets Maximalzahlen ermittelt, ist sie eine gute Stütze für andere Meßmethoden.

### 2. Ultrafiltration.

Die Ultrafiltration wurde von *H. Bechhold* (4) im Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt (Main) entwickelt: Das Ultrafilter hat man sich als Sieb vorzustellen. Die Größe von Teilchen kann bestimmt werden, wenn ein Sieb von bekannter Maschenweite sie gerade noch durchläßt, ein anderes, von geringerer Maschenweite, sie aber schon zurückhält. Die Schwierigkeit der Ultrafiltration liegt einmal in der genauen Festlegung der Porenweite und dann in der exakten Bestimmung eines Faktors, der die bekannte Porenweite mit der Größe der Teilchen verbindet. Mit dieser Methode hat hauptsächlich *Elford* (5) die Größe von vielen Virusarten gemessen.

### 3. Ultrazentrifugierungsmethode.

Man kann in der Zentrifuge künstlich ein Gravitationsfeld herstellen, welches die Erdanziehung um das Viertausendfache übertrifft. Befindet sich eine Lösung in einem derartigen Schwerefeld, so stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion der gelösten Teilchen ein. Dieses Gleichgewicht bewirkt, daß die Konzentration der Lösung nach oben hin abnimmt. Mißt man nun die Konzentration in verschiedenen Höhen, so läßt sich daraus das Gewicht und durch Einführung der Dichte die Größe berechnen (Sedimentationsgleichgewichtsmethode).

Die zweite Möglichkeit der Größenbestimmung liegt in der Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Unter sonst gleichen Bedingungen sinken in einem Gravitationsfeld suspendierte Teilchen um so langsamer, je kleiner sie sind. Der mathematische Ausdruck für diese allgemeine Regel stammt von *Stokes*. Mit ihrer Hilfe ermittelt man leicht aus der Sedimentationsgeschwindigkeit die Größe der Teilchen. Die Methode der Ultrazentrifuge ist vornehmlich von *T. Svedberg* (6) entwickelt worden. *H. Bechhold* (4) hat sie als erster zur Messung der Virusgröße herangezogen.

Die Ergebnisse der Größenbestimmung bei verschiedenen Virusarten sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Größe der Virusarten in m $\mu$  nach *Barnard*, *Bechhold*, *Elford*<sup>1)</sup>.

| Virusarten:                 | Ultraviolett-photographie<br>( <i>Barnard</i> ) | Zentrifuge<br>( <i>Bechhold</i> ) | Ultrafiltration<br>( <i>Elford</i> ) |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Variola-Vaccine             | 160—170   | 160—180                           | 125—175                              |
| Kanarienvirus               | 160—170   | 120                               | 125—175                              |
| Herpes simplex              |   | 200                               |                                      |
| Hktomelie                   | 180—140   |                                   | 100—150                              |
| Borna-Virus                 | 110—140   |                                   | 85—125                               |
| Lymphogranul. inguin.       |   |                                   | 125                                  |
| Rabies fixe                 |   |                                   | 125                                  |
| Influenza                   |   | 85—100                            | 80—120                               |
| Hühnerpest                  | 70—110  | 110                               | 60—90                                |
| Rous-Sarkom                 |   | 70                                | 75—100                               |
| Vesicular-Stomatitis        |   |                                   | 75—100                               |
| Rift-Tal-Fieber             |   |                                   | 30                                   |
| Tabak-Mosaik                |   |                                   | 25                                   |
| Gelbfieber                  |   |                                   | 22                                   |
| Louping ill                 |   |                                   | 18                                   |
| Polyomyelitis <sup>2)</sup> |   |                                   | 10                                   |
| Maul- und Klauenseuche      |   |                                   | 8—12                                 |

Bakteriophagen<sup>3)</sup>:

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Coli-Phage              | 90    |
| Staphyloc. Phage        | 60—75 |
| Megather.-Phage         | 35—45 |
| S. <sub>10</sub> -Phage | 15—17 |

Vergleichswerte:

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Roter Blutkörper             | 7500    |
| Bacterium <i>Prodigiosum</i> | 1000    |
| Staphylokokkus               | 800     |
| Pleuro-Pneumonie-Erreger     | 200—500 |
| Hämocyanin-Molekül           | 24      |
| Ovalbumin-Molekül            | 4,3     |
| Hämoglobin-Molekül           | 3—5     |

<sup>1)</sup> Zusammengestellt von *K. Herzberg*, Klin. Wschr. 15, 1666 (1936).

<sup>2)</sup> Polyomyelitis = Kinderlähmung.

<sup>3)</sup> S. w. u.

Die bei den Methoden der Ultrafiltration und Ultrazentrifugation notwendigen Konzentrationsbestimmungen wurden unter Ausnutzung der Infektionsfähigkeit durchgeführt. In diesen Fällen mißt man die Größe des Virus. Im Ultramikroskop hingegen wird der Durchmesser des sichtbaren „Elementarkörpers“ bestimmt. Sind nun Virus und Elementarkörper ein und dasselbe, so müssen die nach den verschiedenen Methoden gemessenen Größen übereinstimmen. Da dies auch tatsächlich der Fall ist, wird die Identität von Virus und Elementarkörper sehr wahrscheinlich gemacht.

Aber noch eine andere, äußerst interessante Tatsache wird durch die Tabelle aufgedeckt. Sieht man sich die „Vergleichswerte“ näher an, so fällt einem der Sprung vom Hämocyaninmolekül zum Pleuro-Pneumonie-Erreger auf. Und gerade diese Lücke füllen die verschiedenen Virusarten und Bakteriophagen<sup>1)</sup> aus; sie bilden den Übergang von den toten Molekülen zu den lebenden Organismen. Aber nicht nur in der Größe nehmen Virus und Bakteriophage eine Zwischenstellung ein, auch in allen anderen Eigenschaften weisen sie eine Ähnlichkeit sowohl mit Molekülen als auch mit Lebewesen auf.

In der Art ihrer Vermehrung zeigen die Viren gegenüber den Bakterien eine Besonderheit. Es steht zurzeit fest, daß sich die Vermehrung nur innerhalb lebender Zellen vollziehen kann. Alle Versuche, nach denen es gelungen sein sollte, den Virus in zellfreien Nährösungen zu züchten, konnten nicht bestätigt werden. Der Teilungsvorgang innerhalb der Zelle läßt sich bei einigen Viruskrankheiten mit Hilfe der Viktoriablaufärbung (2) sichtbar machen. Die Vermehrung erfolgt gleichmäßig, wahrscheinlich durch Zweiteilung; Entwicklungsstadien wurden nirgends gefunden.

Die Entwicklung der Gewebszüchtung (7) erwies sich für die Virusforschung als außerordentlich fruchtbar. Drei Verfahren wurden zur Kultivierung des Virus ausgearbeitet. Diese kann in Hühnertropfenkulturen, in Schalen und Flaschen nach Carrel u. Rivers (8), oder aber auf der Eihaut des befruchteten Hühnereis nach Goodpasture, Woodruff u. Buddingh (9) erfolgen. Diese Methoden haben die Möglichkeit geschaffen, eine große Zahl von Viren außerhalb des Tierkörpers zur Vermehrung zu bringen und somit der Untersuchung zugänglich zu machen.

Es war verschiedentlich versucht worden, mit chemischen Methoden Licht in das Virusrätsel zu bringen, aber diese Bemühungen hatten nur wenig Erfolg. Erst W. M. Stanley<sup>2)</sup> im Rockefeller-Institut Princeton und daneben Bawden u. Pirie (10) im Hopkins-Laboratorium in Cambridge haben mit ihren Arbeiten das Virusproblem der Lösung einen beträchtlichen Schritt nähergebracht. Stanley machte die Tabakmosaikkrankheit, die, wie schon gesagt, Iwanowski u. Beijerinck als erste Viruskrankheit entdeckt hatten, zum Gegenstand seiner Untersuchung. Diese Virusart war insofern ein besonders geeignetes Versuchsobjekt, als sie eine starke Vermehrungstendenz und eine relativ große Beständigkeit aufweist.

Um eine Anreicherung des infektiösen Agens durchführen zu können, war eine Testmethode zur Verfolgung der Wirksamkeit notwendig. Holmes (11) hatte gezeigt, daß die Blätter einer Bohnenart (*Phaseolus vulgaris*) nach dem Anreiben mit dem Saft kranker Tabakpflanzen lokale nekrotische Stellen aufweisen. Die Anzahl dieser Nekrosen steht in direktem Zusammenhang mit der Aktivität des angewandten Präparates, und somit ist es möglich, durch einfaches Auszählen die Wirksamkeit zu bestimmen.

Die Anreicherung des Virus (12) wurde nun mit den üblichen Reinigungsmethoden der Eiweißchemie ausgeführt. Bleifällung entfernt Verunreinigungen, wiederholtes Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Adsorption an Cellit und anschließende Elution führten zu einem kristallisierten Präparat, das fast die gesamte Wirksamkeit des Ausgangsmaterials in 500fach angereichertem Zustand enthält. 15 maliges Umkristallisieren änderte die Wirksamkeit nicht. Da alle Versuche, die Aktivität von den Kristallen abzutrennen, fehlgingen, scheint es wohl gerechtfertigt, das isolierte Protein als Virus anzusprechen.

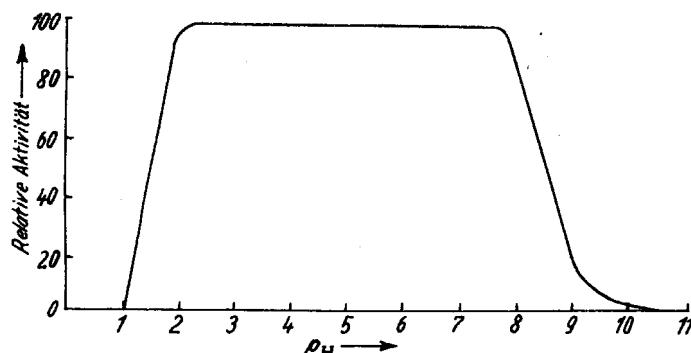
Nach Wyckoff u. Corey (13) ist das Röntgendiagramm der Viruskristalle das Interferenzbild eines echten Kristalls, der aus langen Molekülen aufgebaut ist. Im Gegensatz dazu vertreten Bawden, Bernal u. Fankuchen (14) die Ansicht, daß das Beugungsbild durch die Moleküle selbst hervorgerufen wird, die stäbchenförmige Gestalt (10mal so lang wie breit) besitzen sollen. Die „Kristalle“ sollen Parakristalle sein, welche nur zweidimensionale Regelmäßigkeit aufweisen. Für die Annahme einer stäbchenförmigen Molekülgestalt spricht auch der Befund von Takahashi u. Rawlins (15), daß der Saft mosaikkranker Tabakpflanzen Strömungsdoppelbrechung zeigt im Gegensatz zu Extraktten gesunder Pflanzen. Das Experiment wurde mit dem kristallisierten Virus wiederholt und bestätigt.

Die kristallisierten Präparate haben die Eigenschaften von Eiweißkörpern. Sie geben positive Millon-, Biuret-, Xanthoprotein, Glyoxylsäure- und Folin-Reaktion. Das Molekül baut sich aus 51% C, 7,2% H und 16,7% N auf. Bezüglich des Phosphor- und Schwefelgehalts läßt sich vorerst noch keine klare Entscheidung treffen. Stanley isolierte zuerst Präparate, die 0,51% P und 0,24% S enthielten, und konnte diese Elemente ohne Aktivitätsverlust durch Dialyse abtrennen (16). Demgegenüber steht der Befund von Bawden u. Pirie (10), daß Phosphor und Schwefel integrierende Bestandteile des Virusmoleküls sind und nur unter Zerstörung der Aktivität vom Eiweiß getrennt werden können. Der Phosphor ist in einer Nucleinsäure gebunden, weshalb die englischen Forscher den isolierten Virus ein Nucleoprotein nennen. Die Entscheidung in dieser Streitfrage müssen kommende Versuche bringen. Immerhin wäre es äußerst interessant, wenn sich Stanleys Befund, daß ein biologisch aktiver Eiweißkörper weder Phosphor noch Schwefel enthält, als richtig herausstellen würde. Das Virusprotein wird von den gewöhnlichen Eiweißfällungsmitteln niedergeschlagen. Trichloressigsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin, Bleiacetat, Safranin, Alkohol, Aceton, Ammoniumsulfat fällen das Protein und beseitigen damit parallelgehend auch die Wirksamkeit. Der isoelektrische Punkt des Virus liegt bei  $p_H = 3,3$ . Auch sein Ultraviolet-Absorptionsspektrum (17) ist das Spektrum eines Eiweißkörpers. Es stimmt mit dem schon früher bestimmten Zerstörungsspektrum von angereicherten, aber noch nicht ganz reinen Viruslösungen überein. 8stündige Belichtung einer 0,5%igen Viruslösung mit dem Licht einer Quecksilberlampe zerstört die Aktivität vollständig. Ebenso vernichten Wasserstoffsuperoxyd, Formaldehyd und salpetrige Säure die Wirksamkeit (18). Die auf diese Weise inaktivierten Präparate behalten aber bestimmte serologische und chemische Eigenschaften bei. So sind sie noch kristallisierbar, und die Kristalle wie deren Röntgeninterferenzen lassen sich von denen des aktiven Virusproteins nicht unterscheiden. Kräftigere Behandlung, wie Einwirkung von starken Säuren oder Laugen, Oxydation mit Kaliumpermanganat, Chromsäure, oder Erhitzen über 75°, bis zu welcher Temperatur der Virus stabil ist, bewirkt Denaturierung des Proteins, Verlust der Wirksamkeit und der charakteristischen Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Die Eigenschaften der Bakteriophagen s. w. u.

<sup>2)</sup> Eine ausgezeichnete Zusammenfassung der chemischen Arbeiten über das Virusproblem ist in den Erg. d. Physiologie 39, 294 (1937), von Stanley erschienen.

Die  $p_H$ -Stabilität ist aus folgender Abbildung ersichtlich.



pH-Stabilität des Tabakmosaikvirusproteins (nach Stanley).

Die Aktivitätsbestimmung wurde jeweils nach 12 h durchgeführt.

Molekulargewichtsbestimmungen, die *Svedberg* (19) am Virusprotein durchführte, lieferten Werte von 15—20 Millionen. Dabei ergab sich, daß die kristallisierten Präparate molekular inhomogen waren und durch öfteres Umkristallisieren noch uneinheitlicher wurden. Das Protein ist in der Pflanze molekular homogen und wird erst im Verlauf der Aufarbeitung uneinheitlich. Das ausnehmend hohe Molekulargewicht erlaubt nun eine sehr spezifische und schonende Reinigung mit der von *Wyckoff* entwickelten präparativen Ultrazentrifuge (20). In einem Schwerefeld von über 60000 facher Erdgravitation wird der Virus aus dem Pflanzensaft quantitativ niedergeschlagen. Er kann durch wiederholtes Auflösen in Wasser und anschließendes Zentrifugieren vollständig von Begleitstoffen befreit werden. Das auf diese Weise dargestellte Protein ist kristallin und einheitlich und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 17000000. *Stanley* nimmt an, daß der so dargestellte Virus mit dem in der Pflanze vorhandenen identisch ist. *Bawden* u. *Pirie* (10) hingegen kommen zu dem Schluß, daß im Verlauf der Reinigung sowohl mit der chemischen Methode als auch in der Ultrazentrifuge Aggregation des genuinen Virus zu größeren Molekülen eintritt. Die stabförmigen Moleküle sollen sich dabei Ende an Ende zusammenlagern, wodurch ein langgestrecktes Gebilde entsteht.

Um die Frage zu entscheiden: Ist das kristallisierte Protein der aktive Virus oder ist eine Verunreinigung desselben das wirksame Agens, studierte *Stanley* das Verhalten der Proteinlösung bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen in der Ultrazentrifuge (21). Wenn die Aktivität von einer Verunreinigung herrührt, die am Protein adsorbiert ist, oder von einer dissoziierbaren Gruppe desselben, so müßte es möglich sein, durch Zentrifugieren bei verschiedenen H-Ionen-Konzentrationen aktiven Bestandteil und Protein zu trennen. Das war nicht der Fall, vielmehr war die Aktivität einer Lösung stets ihrem Gehalt an Virusprotein proportional. Bei  $p_H$ -Werten  $< 2$  bzw.  $> 8$  begannen die großen Moleküle in kleinere Bruchstücke zu zerfallen, und damit parallelgehend nahm auch die Aktivität der Lösungen ab. (Siehe  $p_H$ -Stabilitätskurve.) Inaktivierung ist jedoch nicht immer mit vollständiger Zerstörung des Moleküls verbunden. Mit Wasserstoffsuperoxyd inaktiviertes Protein hat dasselbe Molekulargewicht wie der aktive Virus. Auch immunologisch unterscheiden sich aktives und inaktiviertes Protein nicht.

*Purdy* hatte entdeckt, daß der Saft mosaikkranker Pflanzen ein spezifisches Antigen (22) enthält. Das Serum von Kaninchen, die mit dem Saft mosaikkranker Tabakpflanzen gespritzt worden waren, gibt sowohl mit rohem Extrakt als auch mit dem kristallisierten Virus in einer Verdünnung von 1:1000000 positive Präcipitinreaktion. Das Antigen des Preßsaftes ist mit dem kristallisierten

Protein identisch (23). Der Extrakt gesunder Pflanzen enthält kein Antigen und gibt auch mit dem Antiserum gegen kristallisiertes Virusprotein keine Präcipitinreaktion. Bemerkenswert ist ferner, daß auch mit schonend inaktiviertem Virusprotein ein Serum herstellbar ist, das eine neutralisierende Wirkung auf die Virusaktivität ausübt. Dieser Befund kann zu großer Bedeutung kommen, wenn sich herausstellen sollte, daß auch Viruskrankheiten von Mensch und Tier auf die Wirkung solch hochmolekularer Eiweißkörper zurückzuführen sind. Man hätte dann die Möglichkeit, durch derartige Inaktivierungsreaktionen Impfstoffe zu erhalten, die, obwohl selbst unwirksam, die Bildung von Virus-Antikörpern anregen.

Mosaikvirus befällt nicht nur Tabak, sondern auch Bohne (siehe Testreaktion), Tomate (16), Spinat, Phlox (24) und viele andere Gewächse. So oft kranke Pflanzen untersucht wurden, immer konnte ein hochmolekulares Protein mit denselben oder zumindest nahezu denselben Eigenschaften isoliert werden. *Stanley* hebt besonders die Tatsache hervor, daß Phlox und Tabak, obwohl die Eiweißstoffe der gesunden Pflanzen keinerlei serologische Beziehung aufweisen, nach der Infektion Proteine bilden, die chemisch und serologisch identisch sind. Dies ist seiner Ansicht nach ein Beweis, daß das Virusprotein nicht durch einfache Polymerisation von Eiweißeinheiten entsteht, die in der Pflanze vorgebildet sind.

Es gibt mehrere Stämme von Tabakmosaikvirus; dabei ist es möglich, daß ein Stamm spontan aus dem anderen entsteht<sup>3)</sup>.

Auf den Blättern von Tabakpflanzen, die mit dem normalen Mosaikvirus infiziert worden sind und dadurch ein grüngesprenkeltes, verkrüppeltes Aussehen bekommen haben, treten gelegentlich gelbe Flecken auf, aus denen *McKinney* (25) einen sog. gelben Mosaikvirusstamm isolierte. *Jensen* (26) konnte in ausgedehnten Untersuchungen zeigen, daß dieser neue Virusstamm nicht ein Begleiter des gewöhnlichen Virus ist, sondern gelegentlich aus diesem entsteht. *Jensen* hat über 50 Stämme des Tabakmosaikvirus isoliert, die alle aus dem gewöhnlichen Virus hervorgegangen sind. Auch die Änderung der Umweltbedingungen kann der Anlaß zur Bildung einer neuen Viruskrankheit sein. So konnte *Holmes* (27), allein durch Aufbewahren der kranken Pflanzen bei höherer Temperatur, einen anderen Mosaikstamm erzeugen.

*Stanley* hat aus verschiedenen Stämmen (16) des Tabakmosaikvirus die hochmolekularen Proteine isoliert und miteinander verglichen. Dabei stellte er fest, daß die einzelnen Proteine sehr ähnlich sind. Z. B. hat der Virus aus aukuba-mosaikkranken Pflanzen dieselbe Aktivität, chemische Zusammensetzung, dasselbe Kristallbild, Röntgendiagramm und dieselben serologischen Eigenschaften wie der gewöhnliche Virus. Geringe Unterschiede bestehen nur in der Kristallgröße, der Löslichkeit und im isoelektrischen Punkt. Ähnliche Ergebnisse brachte auch die Untersuchung des oben erwähnten Mosaikvirusstammes von *Holmes*. Die Mutation eines Virus wird also von geringen Veränderungen im Proteinmolekül begleitet. Die Tatsache, daß eine Änderung in den biologischen Eigenschaften von einer Änderung in den chemischen Eigenschaften begleitet wird, deckt die nahe Beziehung zwischen chemischem Bau und

<sup>3)</sup> Diese „Mutationsfähigkeit“ ist eine Eigenschaft vieler Virusarten. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Pockenvirus. Dieser Erreger geht durch Übertragung auf Kälber in einen anderen Stamm über, der, obwohl seine Krankheitssymptome viel leichter sind, noch die serologischen Eigenschaften des ursprünglichen Virusstammes besitzt. Hierauf beruht die Schutzimpfung gegen Pocken. Durch Impfen mit Kälberlymphie wird eine leichte Krankheit hervorgerufen; die dabei gebildeten Antikörper verleihen aber nicht nur gegen die Vaccine, sondern auch gegen den virulenten Pockenvirus Immunität.

biologischer Wirkung des Virusproteins auf. Die verschiedenen Stämme des Tabakmosaikvirus scheinen einer Familie von nahe verwandten Proteinen anzugehören.

Die Natur der schon früher erwähnten Zelleinschlüsse, welche mit der Mosaikkrankheit einhergehen, wurde von *Beale* (28) aufgeklärt. Aus ihrem Verhalten gegen verdünnte Säure oder Lauge ergab sich eine Beziehung der Zelleinschlüsse zu dem isolierten Protein. Es ist jedoch noch eine andere Komponente am Aufbau des Einschlußkörpers beteiligt. *Bawden* u. *Pirie* (10) zeigten, daß das isolierte Virusprotein mit Clupein einen schwerlöslichen Niederschlag gibt. Da Protamine und Histone fast in allen Zellen vorkommen, wäre es ihrer Meinung nach möglich, daß die Einschlußkörper in virusinfizierten Pflanzen und Tieren aus derartigen Komplexen bestehen. In Tabakpflanzen, die mit dem maskierten Virusstamm von *Holmes* infiziert sind, treten keine Zelleinschlüsse auf; bei dieser Krankheit fehlt aber auch die ungeheure Zunahme des Eiweißgehalts, welche die Infektion mit dem gewöhnlichen Stamm begleitet.

In ihren allerletzten Arbeiten befaßten sich *Stanley* und *Wyckoff* mit der Isolierung hochmolekularer Proteine bei anderen Viruskrankheiten. Bei der teilweise außerordentlichen Empfindlichkeit der Viren hatte die chemische Reinigungsmethode keinen Erfolg. Erst die spezifische Abtrennung mit Hilfe der Ultrazentrifuge brachte den Beweis, daß auch bei diesen Viruskrankheiten ein hochmolekularer Eiweißstoff der Träger der Wirksamkeit ist. Auf diese Virusproteine werden die folgenden Abschnitte näher eingehen.

Der Tabak-ring-spot-Virus (29) ist so unbeständig, daß er schon bei Zimmertemperatur vollständig zerstört wird. Dieselbe Instabilität besitzt auch das aus infizierten Tabakpflanzen isolierte Protein. Einstündiges Stehen bei  $p_H$  3, sowie 5 Minuten langes Erhitzen auf 64° bewirkt Denaturierung und Inaktivierung des Eiweißkörpers.

*Bawden* u. *Pirie* isolierten aus Gurkenpflanzen, die mit Virus 3 und 4 infiziert waren, auf chemischem Wege ein kristallisiertes Protein (30). Es ist in seinen Eigenschaften dem Tabakmosaikvirus ähnlich, und wie dieser ein verhältnismäßig stabiler Eiweißkörper. Hingegen ist Gurkenmosaikvirus 1 (29) außergewöhnlich empfindlich, weshalb das entsprechende Protein nur in geringen Mengen kristallisiert erhalten wurde. Der Virus zerfällt schon bei 0° allmählich in kleinere Bruchstücke. Ein empfindlicher Virus läßt sich mit einem kurzlebigen radioaktiven Element vergleichen. Beide sind im Gleichgewichtszustand von Bildung und Zerfall nur in geringen Mengen vorhanden, obwohl der Umsatz an sich beträchtlich sein kann. Daraus folgt, daß die Menge Virusprotein, welche isoliert wird, um so kleiner ist, je instabiler der Virus ist. Es ist daher zu erwarten, daß bei einem sehr empfindlichen Virus überhaupt kein hochmolekulares Protein abgetrennt werden kann.

Der *Shopesche Kaninchenpapillom*-Virus wurde von *Beard* u. *Wyckoff* (31) aus dem warzigen Gewebe von Kaninchenpapillomen isoliert, mit einem Molekulargewicht von 25000000, einem Wert, der etwas höher, aber von der gleichen Größenordnung ist wie der des Tabakmosaikvirusproteins. Dieser Eiweißstoff erwies sich nach der Reinigung mit der Ultrazentrifuge als außergewöhnlich infektiös; 1 mg genügt, um die Krankheit in etwa 1000000 Kaninchen hervorzurufen. Die Ausbeute an Papillomprotein betrug 0,22—0,81 mg pro 1 g Gewebe. Der Virus ist zwischen  $p_H$  3,3 und 7 stabil. Zwischen  $p_H$  7 und 10,1 tritt langsame Inaktivierung auf, ohne daß dabei die Sedimentationskonstante geändert wird. Das Protein denaturiert beim Erhitzen auf 66—67°. Ebenso wird die Aktivität des

Papillomextraktes bei 67° erniedrigt und bei 70° vollständig zerstört. Das *Shopesche Kaninchenpapillom* zeigt autonomes, progressives Wachstum. In innere Organe, wie Leber, Milz und Muskeln, eingepflanzt, wuchert es wie eine bösartige Neubildung und führt oft zum Tode der Versuchstiere.

Auch bei der Pferde-Encephalomyitis-Krankheit (32) hat der isolierte hochmolekulare Eiweißkörper die Eigenschaften des Virus. Er weist ein Molekulargewicht von 25000000 auf und zerfällt bei gewöhnlicher Temperatur in niedriger molekulare Bruchstücke. Unter denselben Bedingungen geht auch die Wirksamkeit des viruskranken Gewebes verloren.

#### Bakteriophage.

Im Jahre 1917 machte *F. d'Herelle* (33) die Beobachtung, daß das bakterienfreie Filtrat aus dem verdünnten Kot eines Rekonvalescenten mit Shigadysenterie die Eigenschaft hatte, den Erreger dieser Krankheit, den *Shigabacillus*, in seiner Kultur aufzulösen. Die aufgelöste Kultur erlangte dabei ihrerseits die Fähigkeit, eine andere Kultur aufzulösen. Dies war die Entdeckung einer übertragbaren Bakterienkrankheit, deren Erreger sich im Verlauf der Bakterienauflösung vermehrte. *D'Herelle* vermutete ein unsichtbares Lebewesen, das er „bakteriophagum intestinale“ nannte. Neben dem *d'Herelleschen* Dysenteriophage existieren noch zahlreiche andere Bakteriophagen. Sie gleichen den Virusarten neben der Unsichtbarkeit im Mikroskop auch darin, daß sie sich nur in Gegenwart lebender Zellen vermehren.

Über die Frage: Ist der Bakteriophage ein Lebewesen oder ist er ein lebloses Ferment, entbrannte auf dem ersten „Internationalen Kongreß für Mikrobiologie“ in Paris im Jahre 1930 ein Streit zwischen *d'Herelle* und dem französischen Forscher *Bordet*. Jeder konnte für seine Ansicht experimentelle Beweise anführen, so daß eine prinzipielle Entscheidung nicht möglich war. Dieser Gegensatz der Meinungen blieb sowohl beim Bakteriophage als auch bei den Viren bis heute bestehen.

Der Zusammenhang zwischen Virus und Bakteriophage wurde durch die Isolierung hochmolekularer Eiweißstoffe erhellt. *M. Schlesinger* (4) hat sich eingehend mit dem Bakterium-Coli-Phage beschäftigt. Filtrations- und Sedimentationsversuche führten zu einem Durchmesser der Phagenteilchen von 100 m $\mu$ . Denselben Wert lieferten die Größenbestimmungen im Ultramikroskop. Auch konnte *Schlesinger* die Agglutination des Phagenteilchens durch spezifisches Antiserum verfolgen. Durch diese Versuche war die Identität der sichtbaren Teilchen mit den Erregern bewiesen.

Demselben Forscher gelang eine Anreicherung der Wirksamkeit durch Zentrifugieren (34), wobei sich eine eiweißhaltige Substanz als Bodenkörper absetzte. Neuerdings hat *Northrop* (35) aus infizierten Staphylokokkuskulturen ein hochmolekulares Protein isoliert, das aus einheitlichen Molekülen vom Gewicht 300000000 besteht. Andrerseits fand aber der amerikanische Forscher, daß das Molekulargewicht von der Konzentration abhängig ist. Mit steigender Verdünnung nimmt die Sedimentationskonstante ab, während die Diffusionsfähigkeit gleichzeitig zunimmt. *Northrop* vermutet ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen großen Molekülen (Mol.-Gew. 300000000—500000000), bei welchem in der verdünnten Lösung die Bildung kleiner Moleküle begünstigt ist. Mit der Sedimentation des Proteins geht die Abtrennung der Wirksamkeit parallel. Ebenso gibt das Absorptionspektrum des isolierten Eiweißkörpers die Wellenlänge des Lichtes an, bei der Zerstörung der Aktivität erfolgt, wie überhaupt Denaturierung des Proteins mit dem Verlust der Phageaktivität parallel geht. Der

Eiweißkörper wird oberhalb 50° und bei (einer Wasserstoffionenkonzentration)  $< 5$  zerstört.

So oft die Erreger von Viruskrankheiten angereichert werden konnten, wurde ein hochmolekulares Protein isoliert, das die charakteristischen Eigenschaften des Virus besitzt. Es war bisher noch in keinem Fall möglich, die Virusaktivität von den Proteinen abzutrennen, vielmehr deuten alle Befunde darauf hin, daß Änderungen in der Virusaktivität Änderungen an den isolierten Proteinen mit sich bringen. Das bis heute erarbeitete Tatsachenmaterial spricht dafür, daß die verschiedenen Virusproteine mit den entsprechenden Viren identisch sind.

Die Frage, ob Virusproteine belebt oder unbelebt sind, erscheint zurzeit sinnlos, da es nach *N. W. Pirie* (36) keine allgemein gültige wissenschaftliche Definition des „Lebens“ gibt. Eine Definition darf, um brauchbar zu sein, kein System ausschließen, das allgemein als lebend angesehen wird, noch darf es ein anderes einbeziehen, das als nicht lebend gilt. Anpassungsfähigkeit, Reizbarkeit, Bewegung, Stoffwechsel, Größe, Wachstum und Fortpflanzung sind Äußerungen des Lebens, die zur Begriffsbildung geeignet scheinen. Aber bei kritischer Betrachtung ist keine derselben brauchbar. Einige Bakterien ebenso wie viele Tier- und Pflanzenparasiten besitzen keine Anpassungsfähigkeit. Reizbarkeit ist weder bei den Pflanzen noch bei den Bakterien allgemein vorhanden, und unbewegliche Arten sind unter den einzelligen Organismen häufig. Auch die Anwesenheit eines Stoffwechsels ist als Kriterium des Lebens nicht geeignet. Es gibt Bakterien und Sporen, die lebensfähig bleiben, ohne dabei einen Stoffwechsel zu zeigen. Andrereits sind von Biochemikern viele künstliche Systeme zusammengestellt worden, die atmen und gären, ohne daß sie als lebend angesehen werden. Es wurde die Behauptung aufgestellt, das Volumen eines Virus sei zu klein, um alle Aktivitäten des Lebens unterzubringen, jedoch ist unbekannt, wie viele Aktivitäten zum Leben gehören. Wachstum und Fortpflanzung sind Eigenschaften, die *Pirie* ausführlich behandelt hat, aber auch sie sind zur Definition des Lebens ungeeignet, da auch ein Kristall in seiner übersättigten Lösung wachsen kann. Gibt man einen Kupfervitriolkristall in eine wäßrige Lösung von gelbem Blutlaugensalz, so wächst aus dem Kristall ein baumartiges Gebilde aus Kupferferrocyanid. In ähnlicher Weise könnte man sich auch die Gewichtszunahme eines Virus in der Wirtszelle vorstellen. Man braucht nur anzunehmen, daß das Virusteilchen einen Kristallisationskeim für einen normalen Zellbestandteil darstellt. Ist dieser für das normale Zellgeschehen notwendig, so wird mehr von ihm nachgebildet und dementsprechend kann auch mehr von ihm auskristallisieren, bis die Zelle an Stoffwechselmüdigkeit leidet. Zwar stützt sich diese Theorie auf keinen Beweis; aber sie kann auch nicht durch das Argument widerlegt werden, daß der Virus eine andere chemische Zusammensetzung aufweist als die Wirtszelle. Der kristallisierte Zellbestandteil kann ja normalerweise in großer Verdünnung vorliegen und somit der Analyse entgehen.

Auch die Vermehrungsfähigkeit ist nicht auf lebende Systeme beschränkt. Die Enzyme Pepsin und Trypsin entstehen autokatalytisch aus ihren Vorstufen Pepsinogen bzw. Trypsinogen. Eine Spur aktives Ferment verursacht die Bildung einer praktisch unendlichen Menge seinesgleichen, vorausgesetzt, daß genügend Proferment zur Verfügung steht. Bei diesen Systemen könnte man einwenden, daß sie auf Vorstufen angewiesen sind, die ihrerseits von lebenden Zellen synthetisiert werden. Aber diesen Einwand kann man auch bei allen Wirbeltieren erheben, die ja Nahrungsstoffe benötigen, deren Bildung in lebenden Organismen vor sich geht. Die Entstehung von Trypsin vergleicht *Stanley* mit der Vermehrung der Viren. Jede Zelle enthält

bestimmte Proteine, und nur diese Proteine werden fortlaufend von ihr produziert. Diese Spezifität der Eiweißsynthese wird durch Proteinasen bedingt, also durch Eiweißkörper, welche die Bildung anderer Eiweißkörper katalysieren. Es ist nun nicht einzusehen, warum es für ein derartiges Enzym schwerer sein sollte, sich zu synthetisieren, als ein anderes Protein. Eine Proteinase, die ihre eigene Bildung katalysiert, ist aber mit einem Virusprotein direkt vergleichbar. *Stanleys* Theorie der Virusvermehrung gibt auch eine Erklärung für die Mutation eines Virusstammes. Wendet man die Tatsache, daß chemische Reaktionen neben dem Hauptprodukt stets auch geringe Mengen von Nebenprodukten liefern, auf die Virusproteine an, so kann bei der Vermehrung gelegentlich auch ein etwas anderer Eiweißkörper entstehen. Er verursacht durch den Unterschied in seinem chemischen Aufbau ein anderes Krankheitsbild und steht am Anfang eines neuen Virusstammes. Wachstum und Fortpflanzung sind Zelleigenschaften, die sehr leicht von außen her beeinflußt werden können, so daß die Unfähigkeit eines Experimentators, die Vermehrung eines Systems aufzuzeigen, in der ungünstigen Wahl der Versuchsbedingungen begründet sein kann. Die Bemühungen, einen Virus *in vitro* zu züchten, sind erst zu kurzen Datums, als daß die Festlegung der Kulturbedingungen möglich gewesen wäre.

Unter all den von *Pirie* geprüften Eigenschaften befindet sich keine einzige, die zur Definition des Lebens geeignet wäre, so daß der englische Forscher zu dem Schluß kommt: — Until a valid definition has been framed it seems prudent to avoid the word "life" in any discussion about border-line systems and to refrain from saying that certain observations on a system have proved that it is or is not "alive". —

[A. 21.]

#### Schrifttum.

- (1) *A. Borrel*, C. r. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **57**, 642 [1904]. — (2) *K. Herzberg*, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. I **180**, 183, 326 [1933], **181**, 358 [1934], **186**, 257 [1936]; Klin. Wschr. **18**, 381, 1363 [1934], **15**, 916, 1385, 1665 [1936]. — (3) *J. E. Barnard*, Proc. Roy. Soc. Biol. **109**, 360 [1931]; J. Roy. microsc. Soc. **52**, 530 [1932]. — (4) *H. Bechhold*, Z. physik. Chem. **60**, 257 [1907], **64**, 328 [1908]; Kolloid-Z. **66**, 329 [1934], **67**, 66 [1934]. — (5) *W. J. Elford*, Proc. Roy. Soc. Biol. **112**, 384 [1933]. — (6) *T. Svedberg*, Kolloid-Z. **67**, 2 [1934]; Nature, London **189**, 1051 [1937]. — (7) *E. Haagen*, Arch. exp. Zellf. **18**, 360 [1936]. — (8) *T. M. Rivers*, Filterable viruses, Baltimore 1928; Physiol. Rev. **12**, 423 [1932]. — (9) *Goodpasture*, Woodruff u. Buddingh, Amer. J. Path. **8**, 271 [1932]. — (10) *F. C. Bawden* u. *N. W. Pirie*, Proc. Roy. Soc. Biol. **128**, 274 [1937]. — (11) *F. O. Holmes*, Bot. Gaz. **87**, 39 [1929]. — (12) *W. M. Stanley*, Science, New York **81**, 644 [1935]; Phytopathology **26**, 305 [1936]. — (13) *R. W. G. Wyckoff* u. *R. B. Corey*, J. biol. Chemistry **116**, 51 [1936]. — (14) *F. C. Bawden*, *N. W. Pirie*, *J. D. Bernal* u. *J. Fankuchen*, Nature, London **188**, 1051 [1936]; *J. D. Bernal* u. *J. Fankuchen*, ebenda **189**, 923 [1937]. — (15) *W. N. Takahashi* u. *T. E. Rawlins*, Science, New York **77**, 26 [1933], **86**, 103 [1937]. — (16) *W. M. Stanley*, J. biol. Chemistry **117**, 325, 733 [1937]. — (17) *G. J. Lavin* u. *W. M. Stanley*, ebenda **118**, 269 [1937]. — (18) *W. M. Stanley*, Science, New York **88**, 626 [1936]. — (19) *J. Eriksson-Quensel* u. *T. Svedberg*, J. Amer. chem. Soc. **58**, 1863 [1936]. — (20) *R. W. G. Wyckhoff*, Naturwiss. **25**, 481 [1937]. — (21) *W. M. Stanley*, J. biol. Chemistry **117**, 755 [1937]. — (22) *H. A. Purdy*, J. exp. Medicine **49**, 919 [1929]. — (23) *W. M. Stanley*, Science, New York **81**, 644 [1935]; Phytopathology **26**, 305 [1936]. — (24) *W. M. Stanley*, Amer. J. Bot. **24**, 59 [1937]. — (25) *H. H. McKinney*, Phytopathology **16**, 893 [1926]. — (26) *J. H. Jensen*, ebenda **28**, 964 [1933]. — (27) *F. O. Holmes*, ebenda **24**, 845 [1934]. — (28) *H. P. Beale*, Contrib. Boyce Thompson Inst. **8**, 413 [1937]. — (29) *W. M. Stanley* u. *R. W. G. Wyckoff*, Science, New York **85**, 181 [1937]. — (30) *F. C. Bawden* u. *N. W. Pirie*, Brit. J. exp. Pathol. **18**, 275 [1937]. — (31) *J. W. Beard* u. *R. W. G. Wyckoff*, Science, New York **85**, 201 [1937]. — (32) *R. W. G. Wyckoff*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **86**, 771 [1937]. — (33) *F. d'Herelle*, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. **165**, 373 [1917]. — (34) *M. Schlesinger*, Biochem. Z. **264**, 6 [1933]. — (35) *J. H. Northrop*, Science, New York **84**, 90 [1936]; Collecting Net **12**, 188 [1937]. — (36) *N. W. Pirie*: in „Perspectives in Biochemistry“, Hopkins Presentation Volume, Camb. Univ. Press, 1937.