

# Der Einbau von Radiokohlenstoff in Tabakmosaikvirus verschiedenen „Alters“\*.

Von

H. Schönfellingner und E. Broda.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 12. Dez. 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 17. Dez. 1953.)

Tabakblätter wurden wenige Tage nach der Infektion mit Mosaikvirus zur photosynthetischen Aufnahme radioaktiven Kohlenstoffs veranlaßt. Das Virus wurde sodann isoliert und die Abhängigkeit der spezifischen Radioaktivität des Virus von dem seit der Infektion verflossenen Zeitraum („Alter“ des Virus) geprüft. Es ergibt sich, daß in dem untersuchten Bereich sowohl die spezifische Radioaktivität des Virus als auch die Gesamtradioaktivität des Virus weit höher ist, als wenn die Photosynthese mit dem virusgesättigten Blatt erfolgt. Dieses Ergebnis ist auch für die praktische Darstellung des markierten Virus bedeutungsvoll.

## Einleitung.

Wir haben früher ein Verfahren zur Herstellung von radioaktivem Tabakmosaikvirus (TMV) beschrieben<sup>1</sup>. Nach diesem Verfahren wird ein infiziertes Tabakblatt zur Assimilation von Radiokohlensäure veranlaßt. Das aus dem Blatt nach bekannten Methoden gewonnene Virus erweist sich als radioaktiv.

Diese ersten Versuche wurden, um eine möglichst große Masse an Virus aus einzelnen Blättern gewinnen zu können, mit „altem“ Virus angestellt, d. h. zwischen der Infektion und der radioaktiven Photosynthese wurde ein langer Zeitraum (mehrere Monate) verstreichen gelassen. Man nimmt gewöhnlich an, daß ein Blatt sich innerhalb einer so langen Zeit mit Virus sättigt. Daß das Virus sich unter diesen Umständen als radioaktiv erweist, kann entweder dadurch gedeutet werden,

---

\* Herrn Prof. Dr. A. Franke zum 80. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> H. Schönfellingner und E. Broda, Mh. Chem. 83, 837 (1952).

daß das Virus sogar nach so langer Zeit immer noch wächst, wenn auch das Wachstum nach anderen Methoden nicht mehr erfaßt werden kann; oder dadurch, daß dieses „alte“ Virus zwar tatsächlich in Sättigung, also in stationärer Konzentration, vorliegt, aber mit anderen Blattbestandteilen Kohlenstoff austauschen, also doch noch am Stoffwechsel teilnehmen kann.

Jedenfalls war zu erwarten, daß von „jungem“, noch wachsendem Virus bei der radioaktiven Photosynthese mehr Radiokohlenstoff je Menge des vorhandenen Virus eingebaut wird als von altem, stationärem Virus. Es mußte daher das junge Virus eine größere spezifische Aktivität (Radioaktivität pro Masseneinheit) als das alte Virus erwerben. Bei jungem Virus wäre eine geringe Ausbeute an Substanz mit hoher spezifischer Aktivität zu erwarten, bei altem Virus eine große Ausbeute mit geringer spezifischer Aktivität. Unter gewissen Umständen könnte möglicherweise die Verwendung von jungem statt altem Virus nicht nur zur Bildung von Virus verbesserter spezifischer Aktivität, sondern sogar auch zum Einbau einer größeren Absolutmenge von Radiokohlenstoff in das Virus — also zu einer größeren Gesamtaktivität des Virus — führen. Dies sollte nun experimentell nachgeprüft werden.

### Versuchsergebnisse.

Das in der ersten Veröffentlichung beschriebene experimentelle Verfahren wurde im wesentlichen beibehalten. Wieder wurden Pflanzen von *Nicotiana tabacum* verwendet, die im Frühling ins Freie verpflanzt wurden und dort über den Sommer wuchsen. Die Pflanzen wurden durch Abschneiden der Knospen am Blühen verhindert. Die Infektion erfolgte im September. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Kohlensäure (111,5 mg pro Versuch) betrug diesmal 0,224 Mikrocurie pro Milligramm.

Bei der chemischen Abtrennung des Virus wurde diesmal in allen Fällen bei der letzten isoelektrischen Umfällung 0,5 g inaktive Glukose als Rückhalteträger zugesetzt, um eine Adsorption aktiver Zucker zu verhindern. Die Verbrennung des Virus erfolgte immer unter Trägerzusatz nach der nassen Methode von *Van Slyke* und *Folch*, die Messung der Radioaktivität in Form von  $\text{CO}_2$  in einem Gas-Geiger-Zählrohr verbesserter Konstruktion<sup>2</sup>.

In Tabelle 1 sind sämtliche neue Ergebnisse wiedergegeben. Die Ergebnisse wurden mit Blättern zweier Pflanzen erhalten, wobei die Blätter mit gerader Nummer der einen, mit ungerader Nummer der anderen Pflanze entstammen. Der Versuch Nr. 3 fällt, obwohl weder am Blatt noch an den Lösungen auffällige Beobachtungen gemacht wurden, so stark aus der Reihe, daß wir ihn bei der Berechnung von Mittelwerten für Tabelle 2 außer acht lassen wollen.

Zum Vergleich des alten mit dem jungen Virus dient nun Tabelle 2. Die Daten über das junge Virus sind die Mittelwerte aus Tabelle 1 der gegenwärtigen Veröffentlichung, wobei einerseits die Versuche der ersten vier Tage, andererseits jene der zweiten vier Tage zu je einem Mittelwert

<sup>2</sup> G. Rohringer und E. Broda, Z. Naturforsch. 8 b, 159 (1953).

Tabelle 1. Ausbeute und Aktivität von „jungem“ Virus.

Versuch Nr.	Virusalter (Tage)	Blattfrischgewicht (g)	Virusausbeute (mg)	Spezifische Aktivität ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ TMV)	Gesamtaktivität ( $\text{min}^{-1}$ )
1	5	13	0,48	34300	16500
2	6	11	0,56	36400	20400
3	7	11	(0,32)	(114500)	(36700)
4	8	11	0,68	29200	19900
5	9	14	0,80	49500	39600
6	10	11	1,64	20800	34100
7	11	17	2,32	18500	43000
8	12	10	2,28	33700	76800

zusammengefaßt sind. Die Daten über das alte Virus sind der ersten Veröffentlichung entnommen, und zwar sind die Mittelwerte aus den Versuchen 4 bis 6 der dortigen Tabelle 1 gebildet worden. Das sind die drei verlässlichsten Versuche, nämlich die erfolgreichen Versuche unter Einsatz der größten Menge Radiokohlenstoff. Die Daten der genannten Tabelle wurden für die vorliegende Tabelle 2 durch Multiplikation mit 0,52 auf gleiche Basis umgerechnet; das ist das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der eingesetzten Kohlensäure. Gemessen wurde früher und jetzt mit gleicher Ausbeute. Die Angaben der vierten Vertikalspalte stellen nur eine Näherung dar, da die Kohlenstoffgehalte der Blätter — wenn auch auf Grund früherer Analysen — nur geschätzt wurden (5%); der Kohlenstoffgehalt des TMV beträgt 50%.

Tabelle 2. Vergleich von jungem und altem Virus (Mittelwerte).

Alter (Tage)	Menge TMV (mg)	Spezifische Aktivität ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ TMV)	Verhältnis der spez. Aktivitäten von Virus- und Blattkohlenstoff	Gesamtaktivität ( $\text{min}^{-1}$ )	Verhältnis der Gesamtaktivität in TMV und Blatt
6,3	0,57	33000	0,71	19000	$3,4 \cdot 10^{-4}$
10,5	1,8	31000	0,73	48000	$8,7 \cdot 10^{-4}$
200	12,4	1150	0,027	14000	$2,4 \cdot 10^{-4}$

### Diskussion.

Folgende Schlüsse können aus Tabellen 1 und 2 gezogen werden:

1. Das junge Virus erreicht innerhalb der Versuchsperiode, also bis zum 12. Tag, auch nicht annähernd die stationäre (maximale) Konzentration im Blatt. Unsere Wachstumskurve steigt also viel langsamer an als die von *Commoner et al.*<sup>3</sup> — allerdings unter grundverschiedenen experimentellen Bedingungen — erhaltene Kurve.

<sup>3</sup> B. Commoner, F. L. Mercer, P. Merrill und A. Zimmer, Arch. Biochemistry 27, 271 (1950).

2. Das junge Virus zeigt unvergleichlich höhere spezifische Aktivität als das alte Virus. Die große Kraft des rasch wachsenden TMV zum Einbau von neu assimiliertem Kohlenstoff kommt besonders anschaulich darin zum Ausdruck, daß die spezifische Aktivität des TMV-Kohlenstoffs in der ersten Zeit nach der Infektion größenordnungsmäßig dem Mittelwert der spezifischen Aktivität des gesamten Blattkohlenstoffs gleichkommt (vierte Spalte). Nach allen Erfahrungen nehmen sonstige Eiweißkörper höherer Pflanzen neu assimilierten Kohlenstoff nur langsam auf.

3. Innerhalb der beträchtlichen Schwankungsbreite der hier beschriebenen Versuche ist kein Gang der spezifischen Aktivität im Altersbereich 5 bis 12 Tage festzustellen. Dieses Ergebnis ist unter Annahme einer exponentiellen Wachstumskurve verständlich. Schon *Commoner et al.* haben auf Grund ihrer kolorimetrischen Bestimmungen einen Wachstumsmechanismus für TMV postuliert, der in einem weit von der Sättigung entfernten Altersbereich exponentielle Zunahme beinhaltet. Es ist demnach der Zuwachs an Virus je Zeiteinheit  $dA/dt$  der Menge an schon vorhandenem Virus  $A$  proportional. Dann gilt

$$dA/dt = k' A.$$

Nun sei weiter für den gleichen Bereich die nicht unvernünftige Annahme gemacht, daß das Virus seinen Kohlenstoffbedarf stets aus den gleichen Vorprodukten (chemischen Stoffen im Blatt) deckt. Dann ist die vom Virus aufgenommene Menge Radiokohlenstoff  $B$  der während der Photosynthese zuwachsenden Virusmenge proportional, also

$$B = k'' \cdot dA/dt.$$

Daher gilt

$$B = k' k'' A,$$

d. h. das Mengenverhältnis Radiokohlenstoff zu Virus ( $B/A$ ), aus dem man durch Multiplikation mit der Zerfallskonstante  $\lambda$  die spezifische Aktivität erhält, ist von der Zeit (dem Alter des Virus) unabhängig.

Natürlich kann diese Unabhängigkeit der spezifischen Aktivität vom Alter nur in einem gewissen Bereich (nämlich dem des exponentiellen Wachstums) gelten. Bei längerem Zuwarten muß die spezifische Aktivität sich allmählich dem für gesättigte Blätter geltenden niedrigen Wert nähern.

4. Die Gesamtaktivität des jungen Virus steigt in dem untersuchten Altersbereich rasch an und liegt jedenfalls oberhalb der Gesamtaktivität des alten Virus. Es muß also bei mittlerem Alter ein Optimum auftreten.

Die Wahl des besten Zeitpunktes für die radioaktive Photosynthese bei der präparativen Darstellung des markierten Virus für Stoffwechsel-

versuche wird davon abhängen, ob in erster Linie hohe spezifische Aktivität oder hohe Gesamtaktivität des Virus gewünscht wird. Die nächste Aufgabe ist die Bestimmung der Lage des Optimums der Gesamtaktivität.

Wir danken Herrn Prof. Dr. *L. Ebert* für sein höchst aktives Interesse, der Österr. Tabak-Regie und der *Van 't Hoff*-Stiftung, Amsterdam, für großzügige finanzielle Unterstützung, sowie Herrn Obergärtner *F. Wannek* und Frl. *Ingeborg Probst* für ihre praktische Hilfe bei der Züchtung des Tabaks.