

## Optimale Bedingungen für die Gewinnung von radioaktivem Tabakmosaikvirus.

Von

G. Wüstinger, E. Broda und H. Schönfellinger.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 30. Dezember 1954.)

Mit Tabakmosaikvirus infizierte Blätter wurden während 24 Stdn. zur Assimilation von radioaktivem Kohlendioxyd veranlaßt. Virus höchster spezifischer Radioaktivität wurde erhalten, wenn die Blätter kurz nach der Infektion dieser Radiophotosynthese unterworfen wurden; höchste Gesamtaktivität ergab sich bei Radiophotosynthese mindestens einen Monat nach Infektion. Ein beträchtlicher Teil der Aktivität befand sich im Nukleinsäureteil des Moleküls. Durch Infiltration von infizierten Blättern mit Radioglukose und nachfolgende Aufbewahrung im Dunkeln ergab sich ebenfalls radioaktives Virus; der Einbau des Radiokohlenstoffes in das Virus ist also nicht notwendig mit der Photosynthese gekoppelt.

Am Kohlenstoff markiertes Tabakmosaikvirus (TMV) wurde erhalten, indem Blätter, die individuell durch Reiben mit Viruslösung infiziert worden waren, in einer Atmosphäre belichtet wurden, die radioaktives Kohlendioxyd enthielt<sup>1</sup>. Nach Aufnahme des Kohlendioxyds wurde das Blatt homogenisiert, das Virus nach *Commoner*<sup>2</sup> mit Pufferlösung extrahiert, durch mehrfache isoelektrische Umfällung gereinigt und kolorimetrisch bestimmt<sup>2</sup>. Die Radioaktivität wurde nach Verbrennung zu Kohlendioxyd mit dem Gas-*Geiger-Zählrohr*<sup>3</sup> gemessen, dessen Ausbeute annähernd 100% beträgt. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Aktivität von ganz „jungem“ Virus mit der von ganz „altem“ Virus

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

<sup>2</sup> B. Commoner, F. L. Mercer, P. Merrill und A. Zimmer, Arch. Biochem. Biophysics 27, 271 (1950).

<sup>3</sup> E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. 58, 634 (1954).

verglichen<sup>4</sup>. Als „Alter“ wurde dabei der Zeitraum zwischen Infektion des Blattes und Radiophotosynthese bezeichnet. Es zeigte sich, daß „junges“ Virus unter sonst gleichen Bedingungen sehr viel höhere spezifische Aktivität annimmt als „altes“ Virus.

Es sollte nun die Abhängigkeit der Aktivität des Virus vom Alter über einen längeren Zeitraum geprüft werden, um den Übergang von jungem zu altem Virus zu erhalten. Diese Untersuchung bietet nicht nur theoretisches Interesse, sondern sie soll auch zeigen, in welchem Virusalter die Radiophotosynthese durchzuführen ist, um Virus möglichst hoher Radioaktivität zu erhalten.

Tabelle I. Ausbeute und Aktivität des Virus.

Versuch Nr.	Virusalter (Wochen)	Blattfrischgewicht (g)	Virusausbeute (mg)	Gesamtaktivität (min <sup>-1</sup> )	Spezifische Aktivität (min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
A 1	1	15	1,55	—	—
A 2	1	18	0,57	—	—
A 3	2	17	1,15	—	—
A 4	2	24	3,45	—	—
A 5	3	16	1,9	8400	4400
A 6	3	30	7,2	—	—
A 7	4	20	15,5	3400	220
A 8	4	17	58,5	11200	190
A 10	5	21	76	5800	76
A 11	6	17	115	7700	67
A 12	6	22	84	—	—
A 13	7	19	106	—	—
A 15	8	20	180	—	—
A 16	8	16	109	—	—
A 17	9	16	85	30000	350
A 18	9	16	76	15500	205
A 19	10	20	44	16000	360
A 21	11	7	53	34500	650
A 22	11	9	53	24500	470
B 1	2	7	1,5	3400	2300
B 2	2	25	6,1	9400	1550
B 3	3	18	5,7	5300	930
B 4	3	9	7,6	8800	1150
B 5	4	12	94,0	31000	330
B 6	4	13	110,0	27500	250
B 7	5	7	24,0	47500	2000
B 8	5	8	38,0	59500	1550
B 9	6	10	75,7	26500	350
B 10	6	9	22,9	3300	145
B 11	7	8	12,6	2900	230

<sup>4</sup> H. Schönfellinger und E. Broda, Mh. Chem. 85, 33 (1954).

Die Versuchstechnik blieb unverändert. Die Pflanzen wurden Mitte Mai ins Freie versetzt. Die Pflanzen der A-Serie wurden am 29. Juni und 2. Juli, die der B-Serie am 25. und 26. August mit Virus infiziert. Die Radiophotosynthese wurde mit 111,5 mg Kohlendioxyd der spezifischen Aktivität 0,058 Mikrocurie pro Milligramm durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Parallelversuche angestellt. Nur jene Versuche wurden in bezug auf Radioaktivität ausgewertet, bei denen das Kohlendioxyd fast zur Gänze assimiliert worden war; für den kleinen unassimilierten Rest wurde dann korrigiert. Versuche mit mangelhafter Assimilation wurden in Tabelle 1 durch Striche bezeichnet.

Offenbar sind die individuellen Schwankungen zwischen den Blättern sehr beträchtlich. Die Ursache mag darin liegen, daß die Blätter sich durch ihre Stellung an der Pflanze, ihre individuelle Vitalität, ihre Besonnung usw. unterscheiden. Man erkennt auch, daß das Virus in der B-Serie anfangs schneller gewachsen ist als in der A-Serie. Der Grund dafür ist unbekannt, doch sei darauf hingewiesen, daß die B-Versuche mit älteren Pflanzen als die A-Versuche angestellt wurden. Auch mögen veränderte Witterungsverhältnisse eine Rolle gespielt haben (übrigens wurde beobachtet, daß in Pflanzen, die unter ungünstigen Bedingungen gehalten wurden, auch das Virus nur langsam wächst). Jedenfalls können Schlüsse nur aus Mittelwerten gezogen werden.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Virusaktivität vom Alter (Mittelwerte).

Virusalter (Wochen)	Versuche	Virusgehalt des Blattes (%)	Aktivität in Virus (%)	Rel. spez. Aktivität des Virus (%)
0,9	4	0,0050	0,034	71
1	A 1—2	0,0067	—	—
1,5	4	0,014	0,087	73
2	A 3—4, B 1—2	0,017	0,046	24
3	A 5—6, B 3—4	0,038	0,054	23
4	A 7—8, B 5—6	0,51	0,13	2,7
5	A 10, B 7—8	0,40	0,27	6,7
6—7	A 11—13, B 9—11	0,46	0,072	1,4
8—9	A 15—18	0,65	0,16	3,1
10—11	A 19, 21—22	0,59	0,18	3,8

In Tabelle 2 sind auf Grund der Tabelle 1 die Mittelwerte für den Virusgehalt des frischen Blattes, für den Anteil des Virus an der Gesamtradioaktivität des Blattes und für das Verhältnis der spezifischen Radioaktivitäten (Aktivität/Masse) von Viruskohlenstoff und Gesamtblattkohlenstoff („relative spezifische Aktivität“, ausgedrückt in Prozent) gezogen. Dabei ist, wie zuvor, der Kohlenstoffgehalt des frischen Tabakblattes einheitlich zu 5% angenommen<sup>4</sup>.

Es zeigt sich also, daß nach etwa 3 Wochen ein enormer Anstieg des Virusgehaltes des Blattes und ein ebenso auffallender Absturz der spezifischen Aktivität des Virus stattfindet. Danach bleiben Virusgehalt und spezifische Aktivität, soweit die Reproduzierbarkeit der Versuche reicht, konstant. Daraus folgt, daß auch der in Virus eingebaute Anteil des gesamten Radiokohlenstoffes (Spalte 4) im gleichen Bereich konstant bleibt; er ist in diesem Bereich etwa 5- bis 6mal größer als kurz nach der Infektion. Eine Abnahme der spezifischen Aktivität des Virus mit zunehmendem Alter wurde auch bei Zufuhr von Radiophosphor in Form von Phosphatlösung zum infizierten Blatt beobachtet<sup>5, 6</sup>.

Die relative spezifische Aktivität des Virus von 4 bis 11 Wochen stimmt etwa mit jener (2,7%) von sehr altem Virus (200 Tage Wachstum<sup>1, 4</sup>) überein. Dies deutet darauf hin, daß die Wachstums- oder Stoffwechselvorgänge, die einen Eintritt von Radiokohlenstoff in das Virusmolekül ermöglichen, sich in diesem Stadium nicht mehr stark ändern. Was jedoch den Anteil des Virus an der Gesamtaktivität betrifft, so ist der unmittelbare Vergleich der neuen mit den alten Daten dadurch erschwert, daß in den früheren Versuchen das Virus nicht annähernd die gleiche Konzentration im Blatt erreicht hatte wie in den jetzt vorliegenden Versuchen.

Vom praktischen Standpunkt der Gewinnung von aktivem Virus folgt also, daß die höchste spezifische Aktivität erhalten wird, wenn sehr junges Virus der Radiophotosynthese unterworfen wird, daß aber viel mehr Radiokohlenstoff für den Virusaufbau verwertet wird, wenn man nach der Infektion einen Monat zuwartet.

Einige orientierende Versuche wurden zur Feststellung unternommen, zu welchem Teil der Radiokohlenstoff in den Eiweiß- bzw. Nukleinsäureteil eingebaut wird. TMV (Radiophotosynthese 30 bis 50 Tage nach Infektion im Winter vollzogen) wurde der Behandlung mit Trichloroessigsäure nach *Schramm*<sup>7</sup> unterworfen. Dabei bleibt die Nukleinsäure in Lösung, während das Eiweiß ausfällt. Aktivitätsbestimmungen der Nukleinsäurefraktion zeigten an einer Reihe von Proben übereinstimmend, daß etwa ein Fünftel der Aktivität in der Nukleinsäure sitzt. Da der Nukleinsäuregehalt des TMV etwa 5,5% beträgt<sup>8</sup>, ist die spezifische Aktivität des Kohlenstoffes der Nukleinsäure mehrfach größer als die des Kohlenstoffes im Gesamt-TMV. Dieser Befund steht qualitativ mit Ergebnissen in Einklang, die gelegentlich der Untersuchung der Ver-

<sup>5</sup> *B. Kassanis*, J. Gen. Microbiol. **9**, 467 (1953).

<sup>6</sup> *F. C. Bawden*, briefliche Mitteilung.

<sup>7</sup> *G. Schramm* und *G. Braunitzer*, Z. Naturforsch. **5 b**, 297 (1950).

<sup>8</sup> *H. Dannenberg*, *G. Schramm* und *H. Flammersfeld*, Z. Naturforsch. **3 b**, 241 (1948).

teilung des Radiokohlenstoffes über die einzelnen Aminosäuren des TMV erhalten wurden<sup>9</sup>, wobei freilich von Sommerpflanzen ausgegangen wurde.

Schließlich sollte geprüft werden, ob der Einbau von Kohlenstoff in Virus mit der Photosynthese gekoppelt ist. Zu diesem Zwecke wurden die Tabakblätter, die vorher wie üblich 24 Stdn. an der Pflanze unter Lichtabschluß gehalten worden waren, auch während der folgenden Behandlung mit Radiokohlenstoff (48 Stdn.) im Dunkeln gehalten. Der Radiokohlenstoff wurde daher dem Blatt nicht in Form von Kohlendioxyd, sondern von radioaktiver Glukose zugeführt. Das Blatt stand in einer kleinen Vase, die mit etwa 4 cm<sup>3</sup> Wasser mit einem Gehalt von 0,25 mg Glukose der Gesamtaktivität 0,4  $\mu$ C gefüllt war. Diese Technik der Zuführung radioaktiver Stoffe wurde von *Krotkov* beschrieben<sup>10</sup>. Die aufgenommene Glukosemenge wurde bestimmt, indem nach Ende der Infiltration die Gesamtradioaktivität von je 6 bis 8 Blattstücken gemessen und dann auf das Gesamtgewicht des Blattes bezogen wurde. Das Virus wurde in der üblichen Weise aus dem Blatt gewonnen, kolorimetriert und auf Radioaktivität geprüft.

Je drei derartige Infiltrationsversuche wurden 10 Tage, 6 Wochen und 13 Wochen nach der Infektion ausgeführt. Die Virusgehalte entsprachen etwa jenen der Tabelle 1. Die Menge der vom Blatt aufgenommenen Radioglukose schwankte stark, lag aber fast immer zwischen 5 und 10% der angebotenen Menge. Auch der Anteil des Radiokohlenstoffes, der in das Virus eingebaut wurde, war großen Schwankungen unterworfen, so daß auf eine quantitative Diskussion verzichtet werden muß. Immerhin konnte qualitativ festgestellt werden, daß junges Virus auch unter diesen Bedingungen höhere spezifische Aktivität als altes Virus annimmt. Bei älterem Virus lag der Anteil des Virus an der Gesamtaktivität des Blattes zumeist in der Größenordnung von mehreren Zehntel Prozent; die relative spezifische Aktivität des TMV scheint höher zu sein als bei Einbau von Radiokohlenstoff durch Photosynthese.

Die Infiltrationsversuche erbringen den gesuchten Nachweis, daß Radiokohlenstoff im Dunkeln aus Glukose auf TMV übergehen kann. Dies ist auch zu erwarten, weil erstens überhaupt in Anwesenheit von Kohlehydrat Eiweißsynthese durch Blätter auch im Dunkeln erfolgt<sup>5</sup>, und zweitens TMV auch in Kulturen chlorophyllfreier Wurzeln wächst<sup>11</sup>. Es besteht also keine zwingende Kopplung von Virusstoffwechsel und Photosynthese, wenn auch das Wachstum von TMV in abgetrennten Blättern durch Licht gefördert wird<sup>5, 12</sup>. Dagegen erfolgt z. B. eine

<sup>9</sup> *F. Passler* und *T. Schönfeld*, *Mh. Chem.* **86**, 88 (1955).

<sup>10</sup> *R. G. S. Bidwell*, *G. Krotkov* und *G. B. Reed*, *Arch. Biochem. Biophysics* **48**, 72 (1954).

<sup>11</sup> *G. Melchers*, briefliche Mitteilung.

<sup>12</sup> *W. N. Takahashi*, *Amer. J. Bot.* **34**, 496 (1947).

Bildung von Kohlehydraten aus markierter Ameisen-, Essig- oder Milchsäure in Tabakblättern überhaupt nur im Licht<sup>13</sup>.

Wir danken Herrn Prof. *R. Biebl* für die Erlaubnis zur Benützung des Universitäts-Versuchsgartens, Dr. *F. C. Bawden*, F. R. S. (Rothamsted, England), Prof. *G. Krotkov* (Kingston, Kanada), Prof. *G. Schramm* (Tübingen) und Prof. *G. Melchers* (Tübingen) für wertvolle Ratschläge, sowie den Herren *Kobel*, *Reithoffer* und *Wannek* für praktische Hilfe bei der Züchtung des Tabaks.

<sup>13</sup> *G. Krotkov*, *P. V. Vittorio* und *G. B. Reed*, Arch. Biochem. Biophysics 48, 147 (1954).