

## 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“)<sup>1</sup>. Ähnliche Strukturen wurden auch bei Leukämieviren anderer Säuger gefunden (H. Frank, unveröffentlicht). Nach neueren Befunden<sup>2, 3</sup> 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 wird<sup>4</sup>. Nach Untersuchungen von Schäfer *et al.*<sup>2</sup> sowie Witter *et al.*<sup>3</sup> 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 lässt<sup>5</sup>. Außerdem soll ein typspezifisches Antigen (IIv), das mit neutralisierendem und Hämagglutinations (HA)-hemmendem Antikörper reagiert<sup>2, 6</sup>, sowie ein gruppenspezifisches (gs) Antigen des species spezifischen Typs<sup>7</sup> (gs spec. Antigen, IIgs) vorhanden sein. Das letztere wurde zunächst durch den Immunodiffusionstest nach Ouchterlony bei isoliertem Hämagglutinin<sup>2</sup> 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)<sup>6</sup>. 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 ist<sup>6</sup>.

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

Sonderdruckanforderungen an Prof. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35.

auf, die an ihrem freien Ende ein kugelförmiges Geblide tragen. Bolognesi *et al.*<sup>8</sup> 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 glykoproteinhaltige Oberflächenkomponente von MuLV zu isolieren<sup>2, 3</sup>, 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 herstammt sowie ein Virusprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 12 000 d, das nach neuesten Untersuchungen<sup>9</sup> 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<sup>1, 3</sup>, 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 viruspezifischem noch anderes Material enthalten.

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



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

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 Stdn. 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/cm<sup>3</sup> zu beobachten. Das 1,12 g/cm<sup>3</sup>-Material enthielt, wie die analytische Acrylamid-Gelelektrophorese (in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT))<sup>12</sup> zeigte, vor allem G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>, daneben aber auch noch das 31 000 d Virusprotein P<sub>4</sub><sup>9</sup>. In der 1,23 g/cm<sup>3</sup>-Fraktion waren dagegen neben zahlreichen, nicht ohne weiteres identifizierbaren Proteinen nur geringe Mengen von G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> zu finden. Das in den gewonnenen 1,12 g/cm<sup>3</sup>-Fraktionen enthaltene P<sub>4</sub> konnte, nachdem sie gegen NaCl 7,2 dialysiert waren, durch Gelfiltration über eine Sephadex-G150-Säule<sup>13</sup> weitgehend von G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>, 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 P<sub>4</sub> vor G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub>, die in einem relativ breiten UV (280 nm)-Absorptionsgipfel vorhanden waren. Mehrere aufeinanderfolgende Fraktionen (F<sub>4</sub>–F<sub>7</sub>) 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. Proteininhalt (Bestimmung nach Lowry *et al.*<sup>14</sup>) der einzelnen konzentrierten Fraktionen: F<sub>4</sub>: 0,16 mg/cm<sup>3</sup>, F<sub>5</sub>: 0,23 mg/cm<sup>3</sup>, F<sub>6</sub>: 0,31 mg/cm<sup>3</sup>, F<sub>7</sub>: 0,24 mg/cm<sup>3</sup>.

Die Analyse von F<sub>4</sub>–F<sub>7</sub> in der Gelelektrophorese<sup>12</sup> lieferte das in Abb. 1\* wiedergegebene Ergebnis. Die im Gesamtivirus enthaltenen Hauptproteine P<sub>1</sub> (10 000 d), P<sub>2</sub> (12 000 d), P<sub>3</sub> (15 000 d), P<sub>4</sub> (31 000 d)<sup>9</sup> waren in keiner der isolierten Fraktionen (F<sub>4</sub>–F<sub>7</sub>) zu finden. Von den Proteinen mit Molekulargewichten >31 000 d fehlten die meisten, von einigen waren nur Spuren nachzuweisen. Angereichert waren dagegen G<sub>1</sub> und/oder G<sub>2</sub>, die durch Parallelfärbung der jeweiligen beiden Gel-Hälften mit Coomassie Blau (Proteine) und Perjodsäure-

Schiff-Reagens (PAS) (Kohlenhydrate)<sup>12</sup> identifiziert wurden. Fraktion F<sub>4</sub> enthielt hauptsächlich G<sub>1</sub>, geringere Mengen von G<sub>2</sub> und eine durch Coomassie Blau färbbare Komponente, die etwas langsamer als G<sub>2</sub> wandert. Ab F<sub>5</sub> nimmt die Menge von G<sub>2</sub> relativ zu und ab F<sub>6</sub> der Gehalt an G<sub>1</sub> merklich ab. F<sub>7</sub> besteht im wesentlichen aus G<sub>2</sub> und einer nur durch Coomassie Blau färbaren Komponente, die etwas schneller als G<sub>2</sub> wandert und auch in F<sub>5</sub> und F<sub>6</sub> in größerer Menge vorhanden ist.

Im Hinblick auf die *biologischen Eigenschaften* wurden in erster Linie F<sub>5</sub> und F<sub>7</sub> und nur gelegentlich F<sub>4</sub> und F<sub>6</sub> untersucht.

In einem Stichversuch, in dem wir F<sub>5</sub> in einer Endverdünnung von 1/400 einsetzten, wurde zunächst geprüft, ob dieses ebenso wie ein entsprechendes Isolat von HLV<sup>8</sup> in der Lage ist, eine *Interferenz* zu erzeugen sowie *neutralisierende Antikörper zu absorbieren* (Technik s. l. c.<sup>2,3</sup>). Wie Tab. I ausweist,

Tab. I. Prüfung der Fraktion F<sub>5</sub> auf interferierende Wirkung und die Fähigkeit, neutralisierende Antikörper zu absorbieren.

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

a. Zu 0,6 cm<sup>3</sup> einer geeigneten Virusverdünnung (FLV) wurden 0,15 cm<sup>3</sup> der angegebenen Zusätze hinzugefügt. Die angegebenen Verdünnungswerte wurden nach Herstellung der 0,75 cm<sup>3</sup> enthaltenden Mischungen erreicht. Bebrütung der neutral. Antiserum/F<sub>5</sub>-Mischung: 1 Stde. 18 °C plus 18 Stdn. 4 °C. Bebrütung der virushaltigen Mischungen: 1 Stde. 18 °C plus 1 Stde. 4 °C.

b. Bestimmung durch den XC-Test (Rowe *et al.*<sup>20</sup>).

ist dies der Fall. Während das verwendete Viruspräparat ohne Zusatz von F<sub>5</sub> 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 F<sub>5</sub> behandelten Serums nur auf 47 zurück (Absorption neutralisierender Antikörper durch F<sub>5</sub>); 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 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> und P<sub>4</sub>, die gelelektrophoretisch nicht mehr zu finden waren, ließen sich in F<sub>5</sub> auch durch entsprechende *komponentenspezifische Seren*<sup>9</sup> 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 wurde<sup>15</sup>. Der Neutralisationstiter dieses Serums ist  $<1/5000$ . Im Ouchterlony-Test bildet es mit homologem MuLV zwei Präzipitationslinien<sup>15</sup>, 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)<sup>15, 16</sup> 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 Proteink Mengen 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*)<sup>10</sup>, das gegen Maus-Plasma-RLV hergestellt und wie G-FLV-Serum mit Normal-Antigenen absorbiert wurde, stellt, wie früher gezeigt werden konnte<sup>17, 2, 16</sup>, im Ouchterlony-Test (vgl. Abb. 2 e) neben den gs-spec. Antigenen gs/1, gs/2 (innere Linie) und Iggs (äußere Linie), das sehr wahrscheinlich dem Protein  $P_1$  entspricht<sup>9, 16</sup>, noch Antigen  $IIggs$  und nur sehr schwach das typspezifische Antigen  $IIv$  dar<sup>17</sup> (mittlere (z. Tl. doppelte) Linie; diese ist bei FLV stärker als bei GLV, da beim ersten sowohl  $IIggs$  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 ( $IIggs$ )

über; gegenüber der von GLV zeigte sie eine feine, kaum erkennbare Spur, die auf das Antigen  $IIv$  zurückzuführen sein dürfte<sup>17</sup>. Die in  $P_4$  (gs/1 und gs/2) und  $P_1$  (wahrscheinlich Iggs) 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 Nicht-abbiegen der äußeren Iggs-Linien von FLV und GLV). — Für den Nachweis von gs interspec. Antigenen benutzten wir zwei Antiseren, die gegen FeLV (Rickard), das mit TE behandelt war, in Ziegen hergestellt wurden. Von ihnen stellt, wie frühere Untersuchungen zeigten<sup>18</sup>, das *Goat I-S-8-Serum* (Dr. Wilsack, 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 <sup>3</sup> ]	Gehalt an (vgl. Abb. 1) G <sub>1</sub>	Gehalt an G <sub>2</sub>	HA-Titer ohne Zusatz von IgG	HA-Titer nach Zusatz von IgG aus rekonstit. fKS-Serum FTE/H-Serum
$F_4$	0,16	+++	+	$>1/4$	$>1/4$
$F_6$	0,31	+	+++	$>1/4$	1/1024
$F_7$	0,24	±	+++	1/32	1/512

ten weder vor, noch nach Neuraminidase- und Phospholipase C-Behandlung eine HA (Titer <1/4), während unbehandeltes  $F_7$  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) enthält<sup>6</sup>. Setzten wir isoliertes IgG dieses Serums den  $F_4$ - und  $F_6$ -Präparaten zu (Technik s. l. c.<sup>6</sup>), so zeigte  $F_4$  keine feststellbare HA,  $F_6$  aber einen HA-Titer von 1/1024. Zusatz des gleichen IgG's zu  $F_7$  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)<sup>15</sup>, nicht aber von IgG des fKS-Serums inhibieren (Technik s. l. c.<sup>6</sup>). Außer durch IgG von FTE/H-Serum konnte eine – allerdings geringe – HA-Rekonstitution bei  $F_6$  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  $G_1$  und/oder  $G_2$  mindestens noch eine weitere gelektrophoretisch nachweisbare Komponente sowie fKS-Antigen(e) enthalten sind. Trotzdem erscheint uns aufgrund früherer Befunde<sup>2,3</sup> die Annahme berechtigt, daß die in ihnen gefundenen virusspezifischen Aktivitäten mit  $G_1$  und/oder  $G_2$  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  $G_2$  enthalten zu sein (s. Tab. II); es liegt in nicht hämagglutinierenden, wahrscheinlich monovalenten Strukturen vor, die durch geeignete Antikörper (Anti IIgs, vgl. l. c.<sup>6</sup>) zu multivalenten, HA-aktiven Einheiten verknüpft werden können. Schließlich scheinen, wie nach HA-Inhibitionsversuchen<sup>6</sup> zu erwarten, noch gewisse interspec. Determinante(n) vorhanden zu sein, die offenbar von der im Virusprotein  $P_4$  enthaltenen und durch Goat I-S-8-Serum darstellbaren Determinante a<sup>18</sup> verschiedenen 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. Antigen<sup>19</sup> handelt. Eine entsprechende enzymatische Aktivität wurde jedoch in den für die Aufarbeitung benutzten Zentrifugen-Überständen nicht gefunden. Die Virusproteine  $P_1$  –  $P_4$  waren serologisch und/oder gelektrophoretisch 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  $G_1$  wandernde, PAS-färbbare Material (s. Abb. 1) konnte inzwischen durch Antikörper gegen foetales Kälberserum aus den gewonnenen Fraktionen weitgehend entfernt werden.

- <sup>1</sup> M. V. Nermut, H. Frank u. W. Schäfer, *Virology* **49**, 345 [1972].
- <sup>2</sup> W. Schäfer, J. Lange, P. J. Fischinger, H. Frank, D. P. Bolognesi u. L. Pister, *Virology* **47**, 210 [1972].
- <sup>3</sup> R. Witter, H. Frank, V. Moennig, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 330 [1973].
- <sup>4</sup> D. P. Bolognesi, *Advances in Virus Research* **Bd. 19**, im Druck.
- <sup>5</sup> W. Schäfer u. J. Szántó, *Z. Naturforsch.* **24b**, 1324 [1969].
- <sup>6</sup> R. Witter, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 346 [1973].
- <sup>7</sup> W. Schäfer, J. Lange, L. Pister u. E. Seifert; F. de Noronha u. F. W. Schmidt, *Z. Naturforsch.* **25b**, 1029 [1970].
- <sup>8</sup> D. P. Bolognesi, H. Bauer, H. Gelderblom u. G. Hüper, *Virology* **47**, 551 [1972].
- <sup>9</sup> R. Green, D. P. Bolognesi, W. Schäfer, L. Pister, G. Hunsmann u. F. de Noronha, *Virology*, im Druck.
- <sup>10</sup> W. Schäfer u. E. Seifert, *Virology* **35**, 323 [1968].
- <sup>11</sup> P. Giebler, *Z. Naturforsch.* **13b**, 238 [1958].
- <sup>12</sup> D. P. Bolognesi u. H. Bauer, *Virology* **42**, 1097 [1970].
- <sup>13</sup> W. Schäfer, F. A. Anderer, H. Bauer u. L. Pister, *Virology* **38**, 387 [1969].
- <sup>14</sup> O. H. Lowry, H. J. Rosebrough, L. Farr u. R. J. Randall, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951].
- <sup>15</sup> J. Lange, H. Frank, G. Hunsmann, V. Moennig, R. Wollmann u. W. Schäfer, *Virology* **53**, 457 [1973].
- <sup>16</sup> 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.
- <sup>17</sup> W. Schäfer, P. J. Fischinger, J. Lange u. L. Pister, *Virology* **47**, 197 [1972].
- <sup>18</sup> W. Schäfer, G. Hunsmann, V. Moennig, R. Wollmann u. L. Pister; F. Deinhardt u. J. Hoekstra, *Z. Naturforsch.* **28c**, 214 [1973].
- <sup>19</sup> E. M. Scolnick, W. P. Parks, G. J. Todaro u. S. A. Aaronson, *Nature [London] New Biol.* **235**, 35 [1972].
- <sup>20</sup> W. P. Rowe, W. E. Pugh u. J. W. Hartley, *Virology* **42**, 1136 [1970].

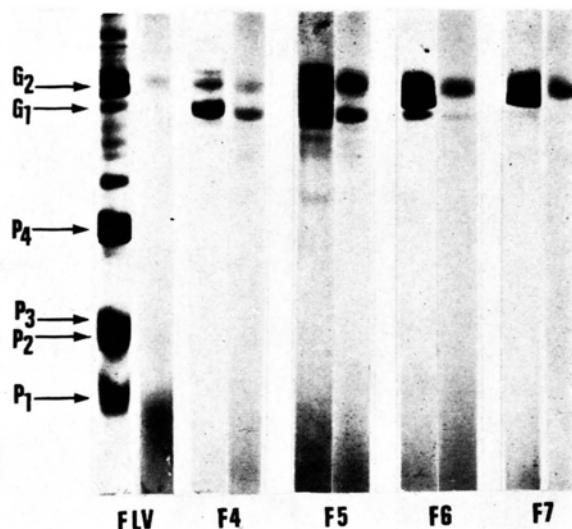


Abb. 1. Analytische Gelelektrophorese des Gesamt-Virus (FLV) und der daraus isolierten Fraktionen F<sub>4</sub>–F<sub>7</sub>. Links jeweils: Coomassie Blau-Färbung; rechts: PAS-Färbung. Wanderungsrichtung von oben nach unten.

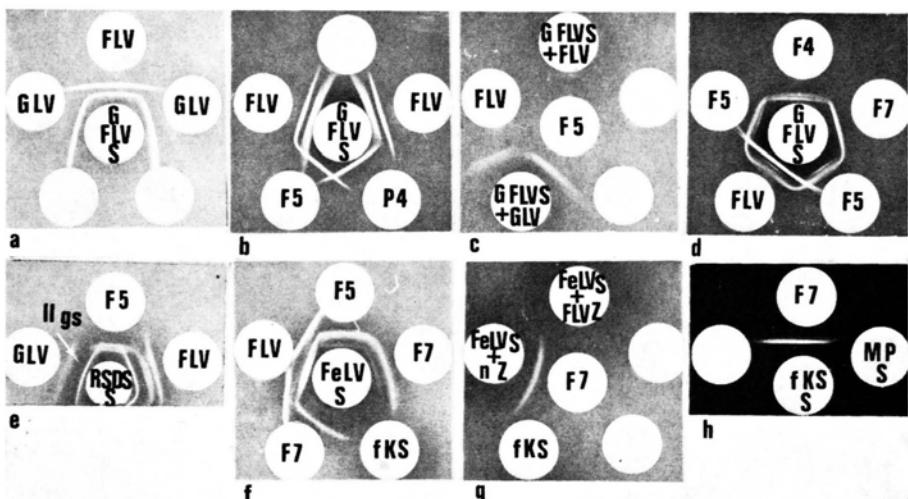


Abb. 2. Ouchterlony-Teste.

- 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/2<sup>16</sup>.
- Prüfung von F<sub>5</sub> mit G-FLV-Serum. P<sub>4</sub> = Isoliertes 31.000 d Protein von FLV<sup>9</sup>; 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 F<sub>5</sub>.
- Prüfung von F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> und F<sub>7</sub> mit G-FLV-Serum.
- Prüfung von F<sub>5</sub> 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.)<sup>16, 17</sup>.
- Prüfung von F<sub>5</sub> und F<sub>7</sub> mit FeLV-Serum (FeLV-S). fKS = foetales Kälberserum.
- Absättigung von FeLV-Serum mit Extracten von FLV-infizierten (FeLV-S + FLV-Z) und normalen STU-Zellen (FeLV-S + nZ); Reaktion der absorbierten Serumproben mit F<sub>7</sub>.
- Prüfung von F<sub>7</sub> mit Antiserum gegen foetales Kälberserum (fKS-S) und gegen normales Maus-Plasma (MP-S). Die verwendeten Konzentrationen von F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> und F<sub>7</sub> entsprechen etwa 0,5 mg/cm<sup>3</sup> (durch Nachfüllen erreicht).