

Nachweis verschiedener antigener Determinanten vom interspecies Typ in RNS-Tumoviren (C-Typ) der Säuger

Vergleichende serologische Untersuchung von Viren mehrerer Tierarten
und von einem als Menschenvirus deklarierten Isolat

Evidence for the Existence of Different Antigenic Determinants of the Interspecies
Type in Mammalian RNA-C-Type Tumor Viruses

Comparative Serological Studies on Viruses of Various Animal Species Including
a Virus Suggested to be of Human Origin

WERNER SCHÄFER, GERHARD HUNSMANN, VOLKER MOENNIG,
ROBERT WOLLMANN* und LISELOTTE PISTER
Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

und

FRIEDRICH DEINHARDT** und JOHN HOEKSTRA**

Department of Microbiology, Rush-Presbyterian - St. Luke's Medical Center, Chicago, Ill. 60612, USA

Professor ADOLF BUTENANDT zum 70. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforsch. 28 c, 214-222 [1973]; eingegangen am 26. Februar 1973)

Common antigens, mammalian C-type onkoviruses

In C-type particles of mammalian origin, two different antigenic determinants of the interspecies type have been revealed by a comparative study of murine-, feline-, suidian-, simian (woolly monkey) (SSV-1)- and RD₁₁₄-viruses. With respect to the distribution of interspecies determinants, these viruses can be arranged into two distinct groups; one comprises the rodent- and cat-, the other the pig- and monkey-viruses. RD₁₁₄-virus appears to share a certain non-interspecies antigenic component with cat viruses (strains Rickard and Gardner) but behaves, as far as its interspecies antigenic determinant is concerned, more similar to pig- and woolly monkey-viruses. In showing the serological differences mentioned, IgG antibody could replace whole serum.

Von den Antigenen, die in RNS-haltigen Tumoviren des C-Typs (C-Viren) der Säuger vorkommen, haben vor allem diejenigen eine größere Beachtung gefunden, die über ein breiteres Reaktionsspektrum verfügen und als gruppen-spezifische (gs) Antigene bezeichnet werden. Neben mehreren species-spezifischen gs-Antigenen (gs-spec. Antigene), die in den verschiedenen C-Virus-Serotypen der gleichen Säugerspecies vorhanden sind, konnte — zunächst durch Untersuchungen an C-Viren von Katze, Maus, Ratte und

Hamster — noch eine weitere gs-Komponente nachgewiesen werden, die auch in C-Viren anderer Säugerarten enthalten ist¹⁻⁵ und deshalb als gs-interspecies Antigen (gs-interspec. Antigen) bezeichnet wurde³. GEERING *et al.*², die sie zuerst beschrieben, nannten sie gs/3. In C-Viren des Huhnes und der Schlange ließ sich das gleiche Antigen nicht nachweisen^{2,3,6}.

Das große Interesse an den gs-Antigenen ist aus verschiedenen Gründen berechtigt. Zunächst einmal scheinen sie die Entwicklungsgeschichte der C-Viren und, da deren genetisches Material offenbar in allen Zellen enthalten ist und vertikal übertragen wird⁷⁻¹⁰, auch die ihrer Wirt widerzuspiegeln. Durch ihre genauere Analyse müßten sich demnach Aufschlüsse über die entwicklungsgeschichtlichen Beziehungen der verschiedenen C-Virusarten bzw. ihrer Wirtstiere zueinander gewinnen lassen. Außerdem ist es an Hand

* Jetzige Anschrift: Atomic Bomb Casualty Commission, 164 Sakurababa-machi, Nagasaki 850, Japan.

** These studies were supported in part by the U. S. Public Health Service Contract No. PH 43-62-179 and 73-3219 with the Special Virus Cancer Program of the National Cancer Institute.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. SCHÄFER, Max-Planck-Institut für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35/III.



dieser Antigene möglich, C-Viren mit relativ einfach durchführbaren, serologischen Reaktionen zu identifizieren, was vor allem bei der Suche nach Vertretern dieser Gruppe in weiteren Säugern, z. B. beim Menschen, von Bedeutung ist. Dafür sind natürlich Antisera, die den Nachweis von gs-interspec. Antigen gestatten, von besonderem Nutzen.

Fußend vor allem auf den Ergebnissen, die bei C-Viren verschiedener Nager und der Katze gewonnen wurden, herrschte bisher die Ansicht vor, daß nur eine einzige antigene Determinante vom interspecies-Typ bei den verschiedenen Säuger-C-Viren vorkommt. Nachdem inzwischen solche Viren bei einer Reihe weiterer Säugerspecies gefunden wurden, sind wir dieser Frage noch einmal nachgegangen. Für die vergleichende serologische Untersuchung standen uns neben C-Viren der Maus und der Katze auch solche von Affe und Schwein zur Verfügung sowie ein Stamm (RD₁₁₄), der in einer Gewebekultur menschlicher Tumorzellen gefunden wurde. Diese Viren wurden unter Verwendung von vier verschiedenen Antisera miteinander verglichen, die sämtlich mit gs-interspec. Antigen reagieren, aber in dieser Hinsicht, wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, unterschiedliche Reaktionsbreiten besitzen. Als serologische Nachweismethode wurde ausschließlich der Immundiffusionstest nach Ouchterlony benutzt, der es gestattet, etwa vorhandene, verschiedene antigene Determinanten voneinander zu unterscheiden.

Material und Methoden

Viruspräparate

Mäuse-Leukämie-Viren (MuLV)

Friend-Virus (FLV) wurde in STU-Maus-Embryo-Zellen¹¹, *Rauscher-Virus* (RLV) in JLSV₅-Zellen³ und *Gross-Virus* (GLV) in permanenten Ratten-Thymus-Zellkulturen³, die wir von Dr. JOACHIM, New York, erhielten¹², produziert. Die Viren wurden durch zweimaliges Ultrazentrifugieren bei ρ 10¹³ konzentriert, darauf im Zuckergradienten bei einer Dichte von 1,16 g/cm³ gebandet und schließlich gegen Phosphatgepufferte (pH 7,2) Kochsalzlösung (NaCl 7,2) dialysiert. Die Typspezifität der Virusstämme wurde in früheren Untersuchungen durch Neutralisationsversuche nachgewiesen¹⁴.

Katzen-C-Viren

Katzen-Leukämie-Virus (Rickard) (FeLV). Das Virus stammte von einer permanenten Katzen-Zell-Linie (F 422)³.

Katzen-Sarkom-Virus (Gardner) (FeSV). Das Virus wurde in Kulturen von embryonalen Katzenzellen produziert, die durch FeSV transformiert worden waren³. Die für die Reinigung der beiden Katzensviren benutzte Prozedur entsprach der bei den Mäuse-Viren verwendeten. Die gereinigten Viruspräparate wurden uns freundlicherweise von Dr. F. de NORONHA, Ithaca, zur Verfügung gestellt.

Schweine-Virus (SV). Das Virus wurde aus permanent in Gewebekultur gehaltenen Zellen eines lymphoblastischen Lymphknotens von einem Schwein gewonnen (H. STRANDSTRÖM et al., V. MOENNIG et al., in Vorbereitung), nachdem diese mit Bromdeoxyuridin behandelt worden waren. Es wurde entweder auf die vorher beschriebene Weise isoliert oder zunächst durch Polyäthylenglykoll präzipitiert¹⁵ und anschließend im Dichtegradienten gereinigt. Seine physikalisch-chemischen und biochemischen Eigenschaften (elektronenoptisches Verhalten, Dichte, 60-70S RNS, reverse Transkriptase) entsprechen denen anderer C-Viren. Serologisch unterscheidet es sich von MuLV und FeLV (V. MOENNIG et al., in Vorbereitung).

Affen (Lagothrix)-Sarkom-Virus, Typ 1 (AV)¹⁶. Das Virusmaterial, das ein Gemisch aus einem Sarkom-Virus (SSV-1) und einem ihm assoziierten nicht-Sarkom-bildenden C-Virus (SSAV-1) darstellt¹⁷, wurde in Kulturen von Marmoset-Tumorzellen produziert¹⁸ und durch Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

RD₁₁₄-Virus stammt von menschlichen Rhabdomyosarkomzellen, die in Katzenembryonen passagiert wurden¹⁹. Es standen uns davon zwei durch Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigte Präparate zur Verfügung. Eines wurde uns von Pfizer Research Laboratories, Maywood, überlassen, das andere von Dr. JAMES BOWEN, Houston/Texas. Beide verhielten sich serologisch gleich.

Sämtliche Viren wurden nach der Reinigung durch Behandeln mit Tween-80 und Äther degradiert¹⁴, anschließend, um nicht zerlegtes Virus zu entfernen, bei ρ 7,5 zentrifugiert und schließlich durch Druckdialyse gegen NaCl 7,2 konzentriert. Im allgemeinen wurden für den Ouchterlony-Test Präparate verwendet, die 1-4 mg Protein/cm³ enthielten. Ergab ein entsprechender Ansatz keine klare Präzipitationslinie, so wurde eine 3-4fach größere Menge von Antigen eingesetzt.

Antisera

MuLV-Antisera

*Rgs-Serum*¹⁴ stammt von einem Kaninchen, das mit isoliertem gs-Antigen (~ 32 000 d Protein) des RLV hyperimmunisiert wurde. Das Virus wurde aus JLSV₅-Zellkulturen gewonnen, gereinigt, durch Behandeln mit Tween-Äther zerlegt und das erwähnte Protein durch Sephadex-Chromatographie und Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert²⁰. Bei Prüfung in der Acetat-Zellulose-Elektrophorese²⁰ (Trennung nach Ladung) und in der Gelelektrophorese²¹ (Trennung nach

Größe) erwies es sich als rein. Das Serum gestattet sowohl die Darstellung der Haupt-gs-spec. Komponenten (gs/1 und gs/2) wie von gs-interspec. (gs/3) Antigen im Präzipitationstest^{14,22}.

FP₄-Serum. Für die Immunisierung eines Kaninchens verwendeten wir eine für uns freundlicher Weise durch Dr. D. P. BOLOGNESI und Dr. R. GREEN, Durham, isolierte ~ 32 000 d Protein-Fraktion von FLV, das in STU-Maus-Embryozellen¹¹ produziert worden war. Das Protein wurde durch Behandeln des Virus mit Guanidinhydrochlorid in Lösung gebracht und anschließend durch Chromatographie in gelelektrophoretisch reiner Form gewonnen²³. Zur Immunisierung wurde es in komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Bei zwei Impfungen im Abstand von 5 Wochen wurden etwa 1,7 mg Protein appliziert. 10 Tage nach der letzten Impfung wurde das Serum gewonnen. Außer gs/1 und gs/2 spec. Antigenen von MuLV läßt sich mit diesem Serum auch gs-interspec. Antigen darstellen²⁴.

MSV-Serum. Das Serum stammt von Ratten, auf die Material eines Tumors übertragen wurde, der durch Maus-Moloney-Sarkom-Virus (MSV) in Ratten erzeugt worden war²⁵. Eine geringere Menge dieses Serums wurde uns freundlicherweise von Dr. R. GILDEN, Bethesda, für Vergleichsversuche überlassen. Das Serum ist, wie die Untersuchungen der Gruppe in Bethesda sowie unsere Erfahrungen zeigten, gut zur Darstellung von gs-spec. Antigenen von MuLV und gs-interspec. Antigen der Säugerviren geeignet.

Katzen-Virus-Antiserum

FeLV-Serum. Das Serum wurde durch Dr. R. WILSNACK, Huntingdon Laboratories, Baltimore, Md., unter der Laborbezeichnung 'Goat-I-S-8-Serum' hergestellt. Es stammt von einer Ziege, die mit gereinigtem FeLV hyperimmunisiert wurde, welches vorher durch Tween-Äther-Behandlung zerlegt worden war. Nach Untersuchungen von OROSZLAN *et al.*²⁶, die das gleiche Serum verwendeten, und eigenen Erfahrungen stellt es im Ouchterlony-Test neben verschiedenen gs-spec. Antigenen der Katzenviren auch eine gs-interspec. Komponente dar.

Sämtliche Seren erwiesen sich in umfangreichen Kontrollversuchen (Präzipitations- und z. T. auch Komplementbindungs-Teste) als virusspezifisch. Als Kontrollantigene wurden Extrakte aus verschiedenen Arten normaler Zellen (von Maus, Katze, Schwein, Affe, Mensch), Blutplasmen der verschiedenen Tier-species und foetales Kälberserum benutzt. Bei der Herstellung der Extrakte wurde 1 cm³ gewaschener, gepackter Gewebekulturzellen in 1 cm³ NaCl 7,2 homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand als Antigen verwendet.

Mit Ausnahme des FeLV-Serums wurden die Seren, um klarere Reaktionen zu erhalten, vor der Verwendung im Immunodiffusionstest etwa 3:1 durch Druckdialyse gegen NaCl 7,2 konzentriert¹⁴. Vom FeLV-

Serum wurde jeweils das 1¹/₂fache der Menge, die für die Füllung eines Loches im Agargel ausreicht, angesetzt (Nachfüllen).

IgG Antikörper von FP₄-Serum

a. Behandlung mit β -Mercaptoäthanol

Es wurde das von OROSZLAN *et al.*²⁶ bei entsprechenden Untersuchungen benutzte Verfahren verwendet, das ursprünglich von DEUTSCH und MORTON²⁷ beschrieben wurde.

b. Isolierung von IgG

Nach der von WEIR²⁸ beschriebenen Methode wurde IgG Antikörper zunächst mit Ammonsulfat gefällt und anschließend über eine DEAE-Säule chromatographiert. Die gewonnene IgG Fraktion wurde schließlich durch Druckdialyse konzentriert. Das Endvolumen entsprach etwa 1/3 der eingesetzten Serummenge. In der Immunoelktrophorese lieferte das Präparat gegen Anti-Kaninchen-Globulin-Serum nur eine Bande. Sie entsprach derjenigen, die Kaninchen-Normal-Serum bildete, wenn es gegen Anti-Kaninchen-IgG-Serum reagierte.

Immunodiffusions-Test nach Ouchterlony

Für den Test wurden die "Immunoplates, Pattern C", der Hyland-Laboratories, Costa Mesa, Cal., mit 2% Noble Agar verwendet¹⁴. Nach dem Ansetzen wurden die Platten bis zu 72 Std. in einer feuchten Kammer bei 20 °C gehalten. Sie wurden mit einer Polaroid-Kamera in Abständen von etwa 12 Std. fotografiert.

Ergebnisse

1. Prüfung der verschiedenen Viren mit Rgs- und FeLV-Serum

Zunächst prüften wir die von uns bisher in erster Linie zum Nachweis von gs-interspec. Antigen benutzten Rgs- und FeLV-Seren auf ihre Reaktion mit den verschiedenen Viren (Abb. 1).

a. Rgs-Serum

Wurde das gegen gereinigtes MuLV-gs-Antigen gerichtete Rgs-Serum gegen FeLV und FeSV angesetzt (Abb. 1a), so bildeten die beiden Katzenviren eine starke durchgehende gs-interspec. Präzipitationslinie, welche in die von den verschiedenen MuLV-Serotypen gebildeten Linien einmündet, ohne jedoch deren Hauptteile abzubiegen (partielle Identitätsreaktion). Die in der ursprünglichen Richtung weiterverlaufenden Teile (Spuren) der MuLV-Linien sind auf die in den Mäuse-Viren enthaltenen gs-spec. Antigene gs/1 und gs/2, mit denen das Serum ebenfalls reagiert, zurückzuführen.

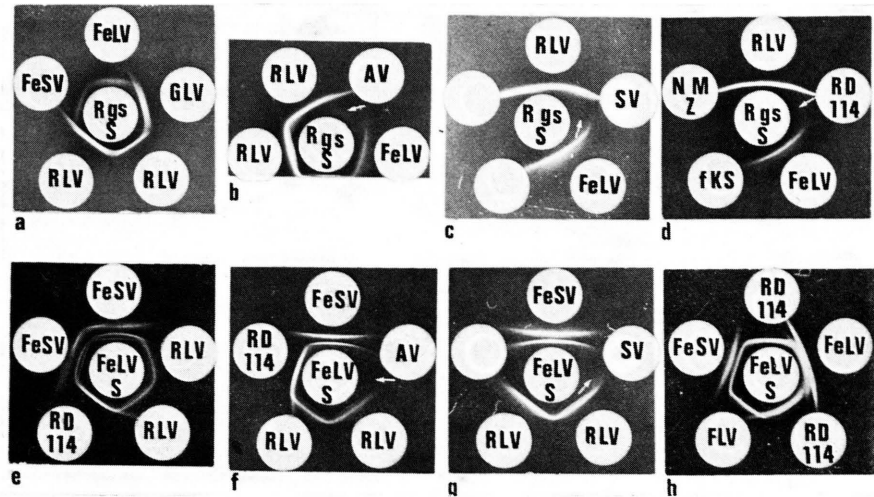


Abb. 1. Reaktionen der verschiedenen Viren mit Rgs- (a-d) und FeLV- (e-h) Serum. RgsS = Rgs-Serum; FeLVs = FeLV-Serum. NMZ = Extrakt aus normalen Maus-Embryo-Zellen. fKS = Foetales Kälberserum. Übrige Abkürzungen siehe Text.

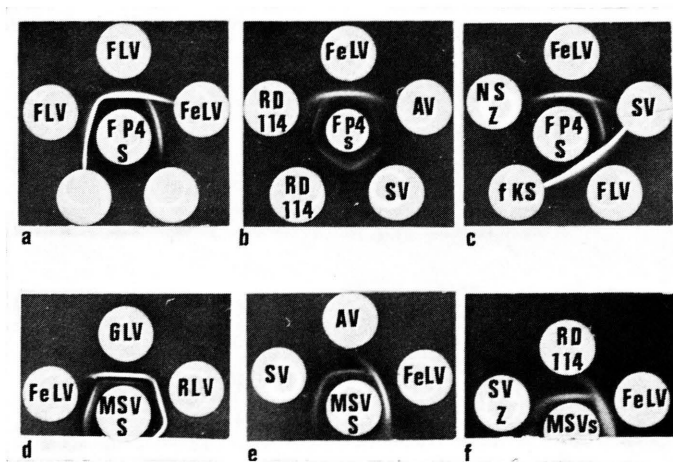


Abb. 2. Reaktionen der verschiedenen Viren mit FP4- (a-c) und MSV- (d-f) Serum. FP4S = FP4-Serum; MSVs = MSV-Serum. SVZ = Extrakt aus SV enthaltenden Schweinezellen, hergestellt wie Extrakte aus normalen Zellen (s. Text). Bei GLV (Abb. 2d) bildet das gs-interspec. Antigen eine eigene, feine Linie¹⁴.

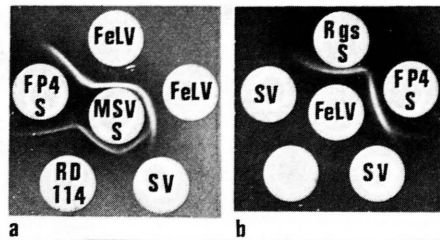


Abb. 3. Vergleich verschiedener MuLV-Antiseren miteinander. Verhalten gegenüber einigen Viren. a. Vergleich von FP4- und MSV-Serum. b. Vergleich von FP4- und Rgs-Serum.

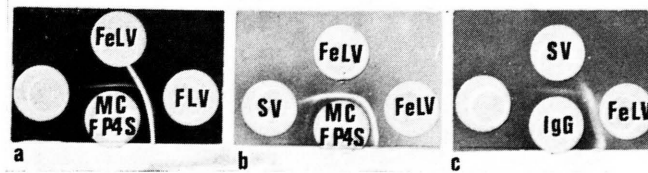


Abb. 4. Präzipitation von MuLV(FLV), FeLV und SV durch IgG-Antikörper. a. und b. β -Mercaptoäthanol behandeltes FP4-Serum (MC FP4S). c. Isoliertes IgG des FP4-Serums.

Gelegentlich gaben sich MuLV gs/1-, gs/2- und gs/3 (interspec.)-Antigen durch besondere Linien zu erkennen.

Im Gegensatz zu den Katzenviren lieferten AV, SV und RD₁₁₄-Virus (Abbn. 1b-d), obwohl sie — bezogen auf Proteingehalt — in bis zu 10-fach höherer Konzentration eingesetzt wurden, nur sehr feine, kaum erkennbare Linien (Pfeile), wenn sie mit dem heterologen Rgs-Serum reagierten. Sie zeigen eine partielle Identitätsreaktion sowohl mit MuLV wie mit FeLV.

b. FeLV-Serum

FeLV-Serum bildete mit Katzen-Sarkom-Virus (FeSV) zwei Hauptlinien und eine feine innere Linie (Abb. 1e), die sich nicht immer von der benachbarten Hauptlinie absetzte (Abbn. 1f, g, h). Sämtliche Linien werden durch gs-Antigene verursacht. Bei FeLV, gegen welches das Serum gerichtet ist, wurde gelegentlich eine zusätzliche Linie beobachtet, die sehr wahrscheinlich durch das entsprechende typspezifische Antigen hervorgerufen wird. Sie liegt in der Nähe der inneren gs-Linie(n); meist verschmilzt sie damit (Abb. 1h).

Bei Reaktion von FeLV-Serum mit dem heterologen MuLV wurde eine relativ starke interspec.-Bande gefunden (Abbn. 1e, f, g, h), die sich gelegentlich (Abbn. 1e, f, g) in zwei Linien aufspaltete. Sie mündet(n) in nur eine der FeSV- oder FeLV-Banden ein (Spurbildung durch die eng benachbarte(n) Linie(n)), die offenbar das gs-interspec. Antigen der Katzenviren repräsentiert (Abbn. 1e, h).

Von den übrigen Viren verhielten sich SV und AV gegenüber FeLV-Serum ähnlich wie gegen Rgs-Serum, d. h. es entstanden kaum erkennbare Präzipitationslinien (Abbn. 1f, g (Pfeile)), die partielle Identitätsreaktionen sowohl mit FeLV wie mit MuLV zeigen (Spurbildungen durch die letzteren).

Das als Menschenvirus angesehene RD₁₁₄-Virus, dessen Wirtszellen in Katzenembryonen passagiert wurden und das mit Rgs-Serum in ähnlicher Weise wie AV und SV reagierte, zeigte gegenüber dem Katzenvirus-Antiserum ein anderes Verhalten als diese beiden Viren. Im Gegensatz zu ihnen bildete es eine klare Präzipitationslinie (Abbn. 1e, f, h). Dies geschah selbst dann, wenn nur $\frac{1}{4}$ der Antigenmenge verwendet wurde, die von ihm bei der Reaktion mit Rgs-Serum eingesetzt war. Die betreffende Linie nimmt im Gegensatz zu der durch MuLV gebildeten (Abbn. 1e, h) beide inneren gs-Antigen-Linien von FeSV auf (Abbn. 1e, f, h). Es muß danach im RD₁₁₄-

Virus eine mit FeLV-Serum reagierende Komponente enthalten sein, die in MuLV nicht vorkommt. Das ergibt sich auch aus der Feststellung, daß die RD₁₁₄-Linie eine klare Spur gegenüber der von MuLV bildet (Abbn. 1e, f, h). Sie wurde regelmäßig bei Verwendung der verschiedenen RD₁₁₄-Virus- und MuLV-Präparate beobachtet. Wurde anstelle von FeSV FeLV, d. h. das für das Antiserum homologe Katzenvirus verwendet (Abb. 1h), so gab sich bei diesem eine zusätzliche Komponente durch Bildung einer Spur zu erkennen, die in RD₁₁₄-Virus nicht enthalten ist. Sie dürfte dem typspezifischen Antigen des FeLV zuzuschreiben sein. Dieser Befund entspricht dem von OROSZLAN *et al.*²⁶ mit FeLV-Antiserum erhobenen, wurde aber von diesen Autoren in anderer Weise interpretiert (s. Besprechung der Ergebnisse).

Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigen, reagieren die verschiedenen Viren im heterologen Ansatz in unterschiedlicher Weise mit den beiden verwendeten Seren. Die beiden Katzenviren und MuLV bilden mit Rgs- bzw. FeLV-Serum klare, AV und SV dagegen kaum erkennbare Präzipitationslinien. RD₁₁₄-Virus verhält sich gegenüber Rgs-Serum wie die beiden letzteren, nicht aber gegen FeLV-Serum. Sein Verhalten gegenüber diesem läßt vermuten, daß es neben einem interspecies Antigen noch eine für Katzen-C-Viren charakteristische antigene Komponente enthält.

2. Prüfung der verschiedenen Viren mit FP₄- und MSV-Serum

Die unterschiedlichen Reaktionen der beiden vorher behandelten Seren mit den verschiedenen Viren legten den Verdacht nahe, daß bei den Säuger-C-Viren mehrere Arten von interspec.-Determinanten vorkommen. Die Untersuchungen mit FP₄- und MSV-Serum (Abb. 2), die klar erkennbare Präzipitationslinien vom interspecies Typ mit allen untersuchten Viren liefern, bestätigten diese Annahme.

Beide Antiseren bildeten — wie Rgs-Serum — mit den heterologen Katzenviren Linien, die partielle Identitätsreaktionen mit den von verschiedenen MuLV-Serotypen hervorgerufenen gs-Antigen-Banden zeigen (Abbn. 2a, d).

SV, AV und RD₁₁₄-Virus verursachten mit FP₄- und MSV-Serum selbst dann klare Präzipitationslinien, wenn wir von ihnen nur etwa $\frac{1}{3}$ der Antigenmengen verwendeten, die bei den Reaktionen mit Rgs- und FeLV-Serum eingesetzt waren (Abbn. 2b, c, e, f, Abb. 3a). Bei SV und AV war nur eine Linie zu sehen, bei RD₁₁₄-Virus spaltete sie sich, wenn FP₄-Serum be-

nutzt wurde, gelegentlich in eine Haupt- und zwei feine Nebenlinien auf (Abb. 2b), die aber sämtlich in die FeLV-interspec.-Linie einmünden. Wichtig für unsere Fragestellung ist, daß die durch FP₄- und MSV-Serum mit SV, AV und RD₁₁₄-Virus gebildeten gs-interspecies Präzipitationsbanden nur partielle Identitätsreaktionen mit den FeLV-interspec.-Banden lieferten (starke Spurbildungen durch die letzteren) (Abb. 2b, c, e, f, Abb. 3a). Untereinander scheinen die durch die beiden Seren darstellbaren interspecies Antigene von Schwein-, Affen- und „Menschen“-Virus aber weitgehend ähnlich zu sein. Ihre Präzipitationslinien gehen im allgemeinen voll ineinander über (Abb. 2b, e, Abb. 3a). Bei RD₁₁₄-Virus besteht die Möglichkeit, daß eine antigene Determinante, die durch eine der feinen Präzipitationslinien dargestellt wird (äußere Linie bei Reaktion mit FP₄-Serum (Abb. 2b)), in SV und AV interspec. Antigen nicht enthalten ist (Verdacht auf Spurbildung in Abb. 2b).

Aufgrund dieser Ergebnisse nehmen wir an, daß die gs-interspec. Antigene von AV, SV und RD₁₁₄-Virus untereinander eng verwandt, aber verschieden von denen der Mäuse- und der bisher näher untersuchten Katzen-C-Viren sind.

3. Unmittelbarer Vergleich von MuLV-Antiseren

Wurden im gleichen Ansatz die Präzipitationsreaktionen von MuLV-Antiseren miteinander verglichen, dann zeigte sich, daß FP₄- und MSV-Serum, wie nach den vorher beschriebenen Versuchen zu erwarten, sich gegen FeLV bzw. RD₁₁₄-Virus gleich verhalten (Abb. 3a). Die von beiden Seren gebildeten Präzipitationslinien gehen jeweils kontinuierlich ineinander über.

FP₄- und Rgs-Serum differieren, obwohl sie beide gegen das ~ 32 000 d Protein von MuLV hergestellt wurden, nach den vorher beschriebenen Versuchen in ihrem Verhalten gegenüber den untersuchten Viren. Es wurde erwartet, daß die unterschiedliche Qualität der beiden Seren auch dann zum Ausdruck kommt, wenn sie zusammen gegen FeLV angesetzt werden, das mit beiden klare interspecies Reaktionen liefert. Das Ergebnis eines entsprechenden Experimentes gibt Abb. 3b wieder. Entgegen unserer Erwartung bildet danach die von FP₄-Serum erzeugte Linie keine eindeutige Spur gegenüber der von Rgs-Serum verursachten Bande, sondern nur eine schwache Andeutung einer solchen. Aufgrund dieses Befundes nehmen wir an, daß das Spektrum der interspec. Antikörper in

beiden Seren gleich ist, ihr Mengenverhältnis aber verschieden.

4. Darstellung der interspec.-Antigene durch IgG-Antikörper

Kürzlich wurde von OROSZLAN und Mitarb.²⁵ berichtet, daß zumindest gewisse MuLV-Antiseren gs-interspec. (gs/3) Antigen-Präzipitationslinien bei Katzen-, Ratten- und Hamsterviren nur bilden, wenn sowohl IgG wie IgM Antikörper vorhanden sind. Da die Möglichkeit bestand, daß die von uns beobachteten partiellen Identitätsreaktionen nicht auf Unterschieden zwischen den einzelnen Antigenen beruhen, sondern durch eine unterschiedliche Beteiligung der beiden Antikörperklassen vorgetäuscht werden, setzten wir entsprechende Versuche mit Serummaterial (FP₄-Serum) an, das nur IgG-Antikörper enthielt. Wie aus Abb. 4a hervorgeht, stellt β -Mercaptoäthanol behandeltes FP₄-Serum die FeLV interspec. Linie und deren partielle Identitätsreaktion mit MuLV ebenso dar wie unbehandeltes FP₄-Serum. Außerdem liefert es, wie Abb. 4b ausweist, mit FeLV und SV ein Präzipitationsbild, das dem mit komplettem FP₄-Serum entspricht (Abb. 2c) Ähnlich verhielt sich das aus FP₄-Serum durch Chromatographie gewonnene IgG, das in der Immunelektrophorese auf Reinheit geprüft wurde. In Abb. 4c ist seine Reaktion mit FeLV und SV dargestellt.

Besprechung der Ergebnisse

Wie aus den beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, bestehen eindeutige Unterschiede im Präzipitationsverhalten der gs-interspec. Antigene gewisser Säuger-C-Viren. In dieser Hinsicht können beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen zwei Hauptgruppen unterschieden werden. Die eine umfaßt die Viren der Maus und die bisher näher untersuchten Erreger der Katze. Zu ihr gehören sehr wahrscheinlich auch die des Hamsters und der Ratte, deren gs-interspec. Antigene nach serologischen Untersuchungen anderer Autoren^{2,5} identisch mit denen der vorher genannten Tierarten sind. In die zweite Gruppe ordnen wir das SV und AV ein. Das RD₁₁₄-Virus, auf das später noch näher eingegangen wird, lehnt sich zwar enger an die Viren der letztgenannten Gruppe an, unterscheidet sich aber von diesen in gewisser Hinsicht.

Die vorgeschlagene Einteilung ergibt sich zunächst einmal aus der Feststellung, daß die geprüften Seren

im heterologen System (Darstellung von interspec. Antigen) in unterschiedlicher Stärke mit den einzelnen Viren reagieren. Tab. I faßt die entsprechenden Ergebnisse noch einmal zusammen. Die darin aufgezeigten Unterschiede können nicht darauf beruhen, daß von einigen Viren geringere Antigenmengen als von anderen eingesetzt wurden. Sie waren in den betreffenden Versuchen bei den mit Rgs- und FeLV-Serum schwach reagierenden Viren AV, SV und z. T. (Rgs-Serum) RD₁₁₄ - bezogen auf Proteingehalt - bis zu 10 mal größer als bei denen, die klare Reaktionen verursachten (FeLV, MuLV). Außerdem zeigte sich, daß die mit den beiden Seren kaum reagierenden Viren mit anderen (FP₄- und MSV-Serum) noch in wesentlich geringerer Menge eindeutige Präzipitate lieferten. Demnach dürften mit hoher Wahrscheinlichkeit Unterschiede in der antigenen Beschaffenheit der interspec. Komponente der verschiedenen Viren für das beobachtete Phänomen verantwortlich sein. Daß dies zutrifft, ergibt sich, wenn man die Präzipitationsbilder betrachtet, die durch FP₄- und MSV-Serum erzeugt wurden, welche gut mit allen verwendeten Viren reagieren. Wurden die zur zweiten Gruppe gehörenden Affen- und Schweine-Viren sowie das RD₁₁₄-Virus gegen diese MuLV-Antiseren angesetzt, so lieferten sie mit dem zur ersten Gruppe gehörenden FeLV nur partielle Identitätsreaktionen. Da sich dieses Verhalten bei ausschließlicher Verwendung von IgG-Antikörper nicht änderte, kann die unterschied-

liche Beteiligung verschiedener Antikörperklassen²⁸ dafür nicht verantwortlich sein.

Zu einer analogen Einteilung der verschiedenen Säuger-C-Viren, wie sie aufgrund des Verhaltens ihrer interspec. Antigene hier vorgeschlagen wird, kommt man, wenn man die serologischen Eigenschaften ihrer reversen Transkriptasen betrachtet (s. Tab. I). Wie SCOLNICK *et al.*²⁹ fanden, inhibiert Antikörper gegen MuLV-Transkriptase zwar das homologe Enzym am stärksten (> 95%), bis zu einem gewissen Grade aber auch Ratten- (60%), Hamster- (40%) und Katzen (FeLV)- (60%) Virus-Polymerase, nicht jedoch das entsprechende Enzym von zwei Affenviren (SSV-1 (= AV) und Gibbon Lymphom Virus) und von RD₁₁₄-Virus. Analog wirkte Antikörper gegen FeLV-Transkriptase, der das Katzenvirus-Enzym am stärksten (> 90%), das der Nagerviren zu etwa 40-50% hemmte, die der Affenviren und des RD₁₁₄ aber wiederum nicht. Etwas später berichtete die gleiche Gruppe^{29a}, daß die Polymerase des RD₁₁₄-Virus immunologisch von der der Affen-Viren verschieden sei. LONG *et al.*^{29b} stellten jedoch mit einem Anti-RD₁₁₄-Polymerase-Serum fest, daß enge serologische Beziehungen zwischen ihnen bestehen; auch mit ihrem Serum konnten die Polymerasen des RD₁₁₄-Virus und der Affen-Viren von denen der Mäuse- und Katzen-Viren (FeLV) abgegrenzt werden. Schließlich wiesen PARKS und SCOLNICK^{29c} mit Hilfe von Radioimmunversuchen nach, daß die dabei erfaßten interspec.

Tab. I. Verhalten der Antigene verschiedener Viren (Ouchterlony-Test) und ihrer reversen Transkriptasen (Enzym-Inhibitionstest) gegenüber homologen und heterologen Antiseren. Die Enzym-Inhibitionswerte (ausgedrückt in % Inhibition) wurden der Arbeit von SCOLNICK *et al.*²⁹ entnommen. Die Stärke der Präzipitate ist durch \pm — +++ ausgedrückt. Die durch * gekennzeichneten Reaktionen wurden durch homologe Antiseren verursacht. n. g. = Nicht geprüft.

Teste	Antiseren	Viren				
		MuLV	FeLV	RD ₁₁₄	AV	SV
Ouchterlony-Test	Rgs-Serum	++++*	++	\pm	\pm	\pm
	FeLV-Serum	++	++++*	++	\pm	\pm
	FP ₄ -Serum	++++*	++	++	++	++
	MSV-Serum	++++*	++	++	++	++
Enzym-Inhibitionstest	MuLV-Polym.-S.	>95%*	60%	<5%	<5%	n. g.
	FeLV-Polym.-S.	50%	>90%*	<5%	<5%	n. g.

Antigene von Nager- und Katzen-Viren sich von denen der Affenviren unterscheiden.

Aufgrund der Ergebnisse unserer serologischen Analysen mit dem Ouchterlony-Test nehmen wir an, daß die interspec. Antigene der Viren der ersten Gruppe (Nager-Viren, FeLV, FeSV) mindestens zwei verschiedene Determinanten (a und b) enthalten. In den Viren der zweiten Gruppe (AV, SV, RD₁₁₄) kommt von diesen nur b in klar nachweisbarer Menge vor. Ob hier a gänzlich fehlt oder nur in wesentlich geringerer Menge vorliegt, ließe sich durch Absorptionsversuche entscheiden, die durchgeführt werden sollen, sobald die betreffenden Viren in ausreichender Menge verfügbar sind. Man kann wohl damit rechnen, daß bei Prüfung weiterer Seren und Viren weitere interspec. Determinanten nachgewiesen werden, zumal bei RD₁₁₄-Virus gelegentlich bis zu 3 interspecies-Linien auftraten; ähnliches wurde auch bei Reaktion von FeLV mit MuLV-Antiserum beobachtet.

Von den bei unseren Untersuchungen verwendeten Antiseren reagieren FP₄- und MSV-Serum mit beiden postulierten Determinanten, während Rgs- und FeLV-Serum bevorzugt a präzipitieren. Worauf diese Unterschiede im Reaktionsspektrum beruhen, ist nicht klar. Von Bedeutung könnte in dieser Hinsicht sein, daß für die Herstellung der beiden letztgenannten Seren Material verwendet wurde, das nach Behandeln der Viren mit Tween-Äther gewonnen war. Beim FP₄-Serum stammte die zur Immunisierung benutzte MuLV-Komponente, die in ihrem elektrophoretischen Verhalten dem für die Gewinnung von Rgs-Serum verwendeten Protein entsprach, dagegen aus Viruspartikeln, welche mit Guanidin-Hydrochlorid behandelt wurden. Das MSV-Serum schließlich wurde von Ratten gewonnen, in die Material eines Sarkoms transplantiert wurde, das durch MSV induziert worden war. Es könnte sein, daß unter den beiden letztgenannten Bedingungen weitere antigene Determinanten des Virus in eine immunogene oder besser immunogene Form überführt wurden. Eine kombinierte Aktion von IgG und IgM Antikörper scheint nur bei gewissen Seren für die Erzeugung von gs-interspec. Präzipitaten erforderlich zu sein²⁵. Darauf hatte bereits die Feststellung von OROSZLAN *et al.*²⁵ hingewiesen, daß bei einem Ziegen-FeLV-Serum der IgG Antikörper allein die Reaktion auslöst. Das gleiche trifft, wie vorher bereits ausgeführt, für unser FP₄-Serum zu.

Die Tatsache, daß FP₄-Serum mit beiden interspecies Determinanten reagiert, deutet darauf hin, daß sowohl

a wie b in der *Virusproteinfraktion* von MuLV enthalten ist, der ein Molekulargewicht von $\sim 32\,000$ d zugeschrieben wird. In dieser Fraktion, die mehr als 30% des gesamten Virusproteins darstellt, wurden außerdem die gs-spec. Antigene gs/1 und gs/2 gefunden²². Man muß aber wohl damit rechnen, daß noch in weiteren Virusstrukturproteinen Determinanten vom interspecies Typ vorkommen. Darauf deutet u. a. die Feststellung hin, daß sich aus degradiertem (Tween-Äther) MuLV z. B. durch Sephadex-Filtration eine Komponente gewinnen läßt, die keine nachweisbare Menge von gs/1 und gs/2, wohl aber interspecies Antigen enthält³⁰. Weiterhin wurden kürzlich Hinweise dafür gewonnen, daß in der hämagglutinierenden Virusoberflächenstruktur eine interspecies Determinante enthalten ist³¹. Schließlich ist die reverse Transkriptase bis zu einem gewissen Grade (s. Tab. I) als interspec. Antigen anzusehen. Eine endgültige Klärung der Verhältnisse ist wohl erst zu erwarten, wenn alle Viruskomponenten in reiner Form vorliegen.

RD₁₁₄-Virus wurde, wie bereits erwähnt, aus menschlichen Tumorzellen isoliert, die in Katzenembryonen passagiert wurden¹⁹, und dabei natürlich der Gefahr einer Infektion mit Katzen-C-Viren ausgesetzt waren. Außer in anderen serologischen Testen (z. B. Enzyminhibitionstest²⁹) wurde es auch im Immundiffusionsversuch²⁶ mit einer Reihe von C-Viren verglichen. Dabei wurde unseres Wissens von den Katzen-Viren jedoch lediglich das FeLV herangezogen. In einem Versuch, in dem die betreffenden Autoren²⁶ dieses zusammen mit RD₁₁₄-Virus und MuLV gegen Goat-I-S-8-Serum (= FeLV-Antiserum) ansetzten, bildete die innere FeLV-Linie eine Spur sowohl gegenüber der RD₁₁₄- wie der MuLV-Bande, während die beiden letzteren kontinuierlich ineinander übergingen. Aus diesen und weiteren serologischen Befunden folgerten die Autoren, daß RD₁₁₄-Virus kein für Katzensviren charakteristisches gs-spec. Antigen enthält, sondern nur das auch in MuLV vorkommende gs-interspec. Antigen, und deshalb wahrscheinlich ein reines Menschen-C-Virus darstellt.

Unsere Ergebnisse sind damit nicht in Einklang zu bringen. Zwar fanden wir ebenso wie die vorher erwähnten Autoren²⁶ eine Spurbildung, wenn wir das FeLV-Antiserum gegen RD₁₁₄ und FeLV ansetzten, nicht aber, wenn wir statt des letzteren FeSV verwendeten. In diesem Fall beobachteten wir vielmehr, daß sich die innere FeSV-Linie in zwei Linien aufspal-

tete und die von RD₁₁₄ gebildete Präzipitationsbande beide voll aufnahm (s. Abb. 1e). Im Gegensatz dazu ging die von MuLV gebildete Linie nur in eine derselben über, die offenbar das interspec. Antigen des FeSV darstellt. Danach muß im RD₁₁₄-Virus eine mit FeLV-Serum reagierende antigene Komponente enthalten sein, die im MuLV gs-interspec. Antigen nicht nachweisbar ist. Darauf deutete auch unsere, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Beobachtungen²⁶ stehende Feststellung hin, daß die RD₁₁₄-Linie gegenüber der von MuLV eine deutliche Spur ausbildete, selbst dann, wenn größere Mengen von MuLV eingesetzt wurden (s. u. a. Abb. 1e). Die Spur, die FeLV (s. Abb. 1h), nicht aber FeSV, gegenüber RD₁₁₄-Virus zeigte, dürfte nach unserer Ansicht durch ein typspezifisches FeLV-Antigen hervorgerufen werden und nicht, wie OROSZLAN *et al.*²⁶ annehmen, durch ein Katzenvirus-gs-spec. Antigen.

Schwer zu erklären ist, warum wir, nicht aber OROSZLAN *et al.*²⁶, nur eine partielle Identitätsreaktion zwischen RD₁₁₄-Virus und MuLV beobachteten, obwohl das gleiche FeLV-Antiserum benutzt wurde. Von uns konnte dieses Ergebnis in zahlreichen Versuchen reproduziert werden, in denen wir verschiedene MuLV-Stämme und zwei von verschiedenen Laboratorien hergestellte RD₁₁₄-Viruspräparate benutzten. In diesem Zusammenhang könnte von Bedeutung sein, daß wir eine größere Menge von Antiserum verwendeten und außerdem die Reaktionen bis zu 72 Std. beobachteten; häufig treten die für partielle Identitätsreaktionen charakteristischen Spuren erst nach längerer Zeit in Erscheinung.

Auch nach unseren Ergebnissen ist RD₁₁₄-Virus sicher nicht identisch mit einem der bisher näher untersuchten Katzen-C-Viren; es enthält jedoch eine antigene Komponente, die zwar in diesen, nicht aber in C-Viren der Maus vorkommt und wahrscheinlich ein gs-spec. Antigen der Katzen-Viren darstellt. Nach neuesten, noch nicht veröffentlichten Befunden (persönliche Mitteilung von FISCHINGER sowie von LIVINGSTON u. TODARO) soll RD₁₁₄-Virus serologisch eng mit einem anderen, kürzlich gefundenen C-Virus der Katze verwandt sein.

Nach den nunmehr vorliegenden Erkenntnissen scheinen die in den C-Viren enthaltenen Antigene die *Entwicklungsgeschichte* dieser Viren und ihrer Wirte in detaillierterer Form wiederzuspiegeln, als man ursprünglich vermutete^{6,8,9}. Bezieht man die hier beschriebenen Ergebnisse mit ein, dann könnte sich folgendes Bild ergeben: die entwicklungsgeschichtlich ältesten An-

tigene dürften diejenigen interspec. Komponenten sein, die in allen bisher untersuchten Säuger-C-Viren vorkommen. Sie sind wahrscheinlich schon im Ursäuger in Erscheinung getreten. Die Feststellung, daß in C-Viren der Nager eine andere Konstellation von interspec. Determinanten vorliegt als in denen von Schwein und Affe, läßt vermuten, daß die entsprechenden Antigen-Muster sich erst bei gemeinsamen Vorfahren der betreffenden Tiergruppen ausprägten. Entwicklungsgeschichtlich scheint in der Tat das Schwein den Primaten näherzustehen als den kleinen Nagern³². In diesen Rahmen lassen sich allerdings nicht ohne weiteres unsere Befunde bei FeLV und FeSV einordnen. Dabei muß man aber berücksichtigen, daß im Laufe der Entwicklung gelegentlich C-Viren entstanden, die horizontal übertragen werden konnten (z. B. Sarkomviren). Treten sie bei Nagern auf, so können sie aus naheliegenden Gründen vor allem die Katze infizieren und durch genetische Interaktion mit den ursprünglichen C-Viren dieser Tierart deren antigenes Spektrum verändern. Möglicherweise stellt das vorher erwähnte, neu isolierte C-Virus und damit u. U. auch das mit ihm angeblich eng verwandte RD₁₁₄-Virus das eigentliche Katzen-C-Virus dar. Die gs-species Antigene, die sich auf die verschiedenen C-Viren der gleichen Species beschränken, sind aller Wahrscheinlichkeit nach in den Urahnen der betreffenden Arten aufgetreten. Die typspezifischen Antigene schließlich sind, wie vor allem die Untersuchungen bei C-Viren des Huhnes gezeigt haben³³, bis zu einem gewissen Grade den jeweiligen Wirtsgenotypen angepaßt. Wir vermuten deshalb, daß sie sich erst zusammen mit diesen ausbildeten und die entwicklungsgeschichtlich jüngsten Antigene der C-Viren darstellen.

Die hier entwickelte Vorstellung über die Zusammenhänge zwischen den Antigenen der C-Viren und der Entwicklungsgeschichte dieser „Erreger“ und ihrer Wirte kann beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen nur hypothetischen Charakter haben. Die serologische Analyse weiterer Viren dieser Art wird zeigen, wie weit sie berechtigt ist.

Nachdem unsere Untersuchungen demonstriert haben, daß sich die interspec. Antigene gewisse Säuger-C-Viren verschieden verhalten und daß eine Determinante, die in C-Viren von Primaten vorkommt, nur mit bestimmten Antisera klar erfaßt werden kann, läßt sich auch eine Erklärung dafür finden, warum serologisch noch kein zwingender Beweis für das Vorkommen eines C-Virus in menschlichem Tumormaterial erbracht werden konnte. Wir benutzten für diesen

Zweck bisher unser Rgs-Serum. Mit ihm erhielten wir in einigen Fällen positive Reaktionen, die allerdings relativ schwach waren^{3,4}. Besser dafür geeignet dürfte nach den hier gewonnenen Erfahrungen ein Serum wie das FP₄-Antiserum sein. Die bisher in dieser Richtung mit ihm durchgeführten Prüfungen lieferten bereits einige ermutigende Ergebnisse.

E. SEIFERT danken wir für ihre Mitarbeit, Drs. D. P. BOLOGNESI und R. GREEN, Durham, Dr. J. BOWEN, Houston, Dr. R. GILDEN, Bethesda, Dr. H. JOACHIM, New York, Dr. F. de NORONHA, Ithaca, Pfizer Laboratories, Maywood, und Dr. H. STRANDSTRÖM, Helsinki, für Überlassung von Material.

- ¹ G. GEERING, W. D. HARDY, L. J. OLD u. E. DE HARVEN, *Virology* **36**, 678 [1968].
- ² G. GEERING, T. AOKI u. L. J. OLD, *Nature* [London] **226**, 265 [1970].
- ³ W. SCHÄFER, J. LANGE, L. PISTER, E. SEIFERT, F. DE NORONHA u. F.-W. SCHMIDT, *Z. Naturforsch.* **25b**, 1029 [1970].
- ⁴ W. SCHÄFER u. F. DE NORONHA, *J. am. vet. med. Assoc.* **158**, 1092 [1971].
- ⁵ R. V. GILDEN u. S. OROSZLAN, *ibida* **158**, 1099 [1971].
- ⁶ R. V. GILDEN u. S. OROSZLAN, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1021 [1972].
- ⁷ R. J. HUEBNER u. G. J. TODARO, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **64**, 1087 [1969].
- ⁸ G. J. TODARO u. R. J. HUEBNER, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1009 [1972].
- ⁹ W. SCHÄFER, *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **220**, 3 [1972].
- ¹⁰ W. P. ROWE, D. R. LOWY, N. TEICH u. J. W. HARTLEY, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1033 [1972].
- ¹¹ W. SCHÄFER u. E. SEIFERT, *Virology* **35**, 323 [1968].
- ¹² H. G. JOACHIM, *J. Nat. Canc. Inst.* **42**, 101 [1969].
- ¹³ P. GIEBLER, *Z. Naturforsch.* **13b**, 238 [1958].
- ¹⁴ W. SCHÄFER, P. J. FISCHINGER, J. LANGE u. L. PISTER, *Virology* **47**, 197 [1972].
- ¹⁵ M. HORZINEK, *Americ. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 588 [1969].
- ¹⁶ G. J. THEILEN, D. GOULD, M. FORLER u. D. DUGWORTH, *J. Nat. Canc. Inst.* **47**, 881 [1971].
- ¹⁷ L. G. WOLFE, R. K. SMITH u. F. DEINHARDT, *ibida* **48**, 1905 [1972].
- ¹⁸ L. G. WOLFE, F. DEINHARDT, G. H. THEILEN, H. RABIN, T. KAWAKAMI u. L. K. BUSTAD, *ibida* **47**, 1115 [1971].
- ¹⁹ R. M. McALLISTER, M. NICOLSON, M. B. GARDNER, R. W. RONGEY, S. RASHEED, P. S. SARMA, R. J. HUEBNER, M. HATANAKA, S. OROSZLAN, R. V. GILDEN, A. KABIGTING u. L. VERNON, *Nature* [London] *New Biol.* **235**, 3 [1972].
- ²⁰ W. SCHÄFER, F. A. ANDERER, H. BAUER u. L. PISTER, *Virology* **38**, 387 [1969].
- ²¹ W. SCHÄFER, J. LANGE, P. J. FISCHINGER, H. FRANK, D. P. BOLOGNESI u. L. PISTER, *Virology* **47**, 210 [1972].
- ²² W. SCHÄFER, H. BAUER, D. P. BOLOGNESI, P. J. FISCHINGER, H. FRANK, H. GELDERBLOM, J. LANGE u. M. V. NERMUT, *Proceed. 25th Sympos. Fundam. Cancer Res.*, M. D. Anderson Hospital and Tumor Inst., Houston, Texas, im Druck.
- ²³ R. C. NOWINSKI, E. FLEISSNER, N. H. SARKAR u. T. AOKI, *J. Virology* **9**, 359 [1972].
- ²⁴ J. LANGE, H. FRANK, G. HUNSMANN, V. MOENNIG, R. WOLLMANN u. W. SCHÄFER, *Virology*, im Druck.
- ²⁵ S. OROSZLAN, D. BOVA, R. TONI u. R. V. GILDEN, *Science* [Washington] **176**, 420 [1972].
- ²⁶ S. OROSZLAN, D. BOVA, M. H. MARTIN WHITE, R. TONI, C. FOREMAN u. R. V. GILDEN, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1211 [1972].
- ²⁷ H. F. DEUTSCH u. J. I. MORTON, *Science* [Washington] **125**, 600 [1957].
- ²⁸ D. M. WEIR, in *Handbook of experimental Immunology*, p. 4 and 23, Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh 1967.
- ²⁹ E. M. SCOLNICK, W. P. PARKS, G. J. TODARO, u. S. A. AARONSON, *Nature* [London] *New Biol.* **235**, 35 [1972].
- ^{29a} E. M. SCOLNICK, W. P. PARKS u. G. J. TODARO, *Science* [Washington] **177**, 1119 [1972].
- ^{29b} C. LONG, R. SACHS, J. NORVELL, V. HUEBNER, M. HATANAKA u. R. GILDEN, *Nature* [London] *New Biol.* **241**, 147 [1973].
- ^{29c} W. P. PARKS u. E. M. SCOLNICK, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1766 [1972].
- ³⁰ W. SCHÄFER, *Bibl. haemat. (Karger, Basel)*, No. **39**, 1182 [1973].
- ³¹ R. WITTER, G. HUNSMANN, J. LANGE u. W. SCHÄFER, *Virology*, im Druck.
- ³² E. THENIUS u. H. HOFER, *Stammesgeschichte der Säugetiere*, Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960.
- ³³ P. K. VOGT, R. ISHIZAKI u. R. DUFF, *Subviral Carcinogenesis*, Herausg. Y. Ito, p. 297, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan 1966.