

Properties of Mouse Leukemia Viruses

XII. Produktion größerer Mengen von Friend-Virus durch eine permanente Zell-Suspensions-Kultur (Eveline-Suspensions-Zellen)

Production of Substantial Amounts of Friend Leukemia Virus by a Suspension Tissue Culture Line (Eveline Suspension Cells)

Eveline Seifert, Michael Claviez, Hermann Frank, Gerhard Hunsmann*, Heinz Schwarz und Werner Schäfer

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforsch. 30 c, 698—700 [1975]; eingegangen am 10. Juli 1975)

Murine Leukemia Virus, Production, Suspension Tissue Culture

A suspension tissue culture producing large amounts of Friend leukemia virus was developed. Properties of the cells and the virus are described.

Die intensivere Bearbeitung eines Virus ist nur dann möglich, wenn ein System zur Verfügung steht, das es gestattet, das betreffende Agens frei von verunreinigenden anderen Virusarten in größerer Menge zu produzieren und ohne allzugroßen Aufwand zu isolieren. Als unsere Gruppe mit der Untersuchung der Mäuse-Leukämie-Erreger begann, wurden als Virusquellen vor allem das aus naheliegenden Gründen wenig geeignete Blutplasma infizierter Mäuse und die mit Rauscher-Virus infizierte Maus-JLSV₅-Zelllinie verwendet^{1,2}. Diese Zelle, die relativ große Mengen von Virus produziert und noch heute von zahlreichen Untersuchern benutzt wird, entsprach deshalb nicht unseren Anforderungen, weil sie sich nur im „layer“ vermehrt und in größerer Quantität ein vom Virus nur schwer abtrennbares visköses Material, wahrscheinlich Mucopolysaccharid, produziert. Außerdem legten wir Wert darauf, eine Linie zur Verfügung zu haben, die sich aus unserem eigenen, für spätere Tierversuche vorgesehenen, hochingezüchteten STU (Schäfer, Tübingen)-Mäuse-Stamm (80 Inzestgenerationen) ableitet, welcher nur eine sehr geringe spontane Leukämie- und Mammatumorm-Rate aufweist, und in dessen Embryonalzellen nach Züchtung in der Gewebekultur keine Antigene von Maus-C-Typ-Viren nachzuweisen waren³. In der vorliegenden Mitteilung soll kurz über die Entwicklung einer in Suspension

wachsenden und deshalb leicht in großer Menge kultivierbaren STU-Zelllinie, über ihre Eigenschaften und die des von ihr produzierten Friend-Virus berichtet werden.

Vor 5 Jahren wurde eine aus STU-Embryonen angelegte Primär-Gewebekultur mit einem Friend-Virus-Stamm (zellfreier Milzextrakt einer erkrankten Maus) infiziert, der dem Institut freundlicherweise von Dr. Odaka, Tokyo (Japan), überlassen wurde. Aus dieser Kultur entwickelte sich eine im „layer“ wachsende Permanent-Linie („Friend-Eveline-Layer-Stamm“), die — wie Abb. 1a** ausweist — bereits erhebliche Mengen von Friend-Virus bildete. Die Viruspartikeln waren hier — wie auch bei den unten zu beschreibenden, in Suspension wachsenden Zellen — praktisch nur in kernnahen Regionen der Zellmembran zu erkennen. Die Zellen, die sich in den Layer-Kulturen von der Unterlage ablösen, wurden gesammelt und getrennt in Kulturgefäßen gezüchtet, deren Inhalt durch Magnetrührstäbchen in Bewegung gehalten wurde. Daraus ging der seit nunmehr 5 Jahren in Suspension wachsende Zellstamm hervor, den wir als „Friend-Eveline-Suspensions-Stamm“ bezeichnen.

Zur Kultivierung werden die Eveline-Suspensions-Zellen in einer Dichte von $\sim 10^5$ Zellen/ml in einem modifizierten Eagle's Medium angesetzt, das 10% inaktiviertes foetales Kalbserum enthält. Als Kulturgefäße werden 1-Liter-Glasflaschen verwendet, die ein mit etwa 150 Umdrehungen/min rotierendes Magnetrührstäbchen enthalten. Sie werden mit 400 ml zellhaltigem Medium beschickt. Unter diesen Bedingungen vermehren sich die Eveline-Zellen bei 37 °C innerhalb von 96 Stunden um das Zehnfache auf etwa 10^6 Zellen/ml, womit gleichzeitig die maximale Zelldichte erreicht ist (Abb. 2).

Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 1b) sind die Eveline-Suspensions-Zellen im allge-

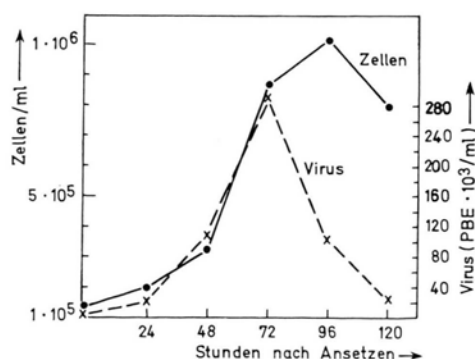
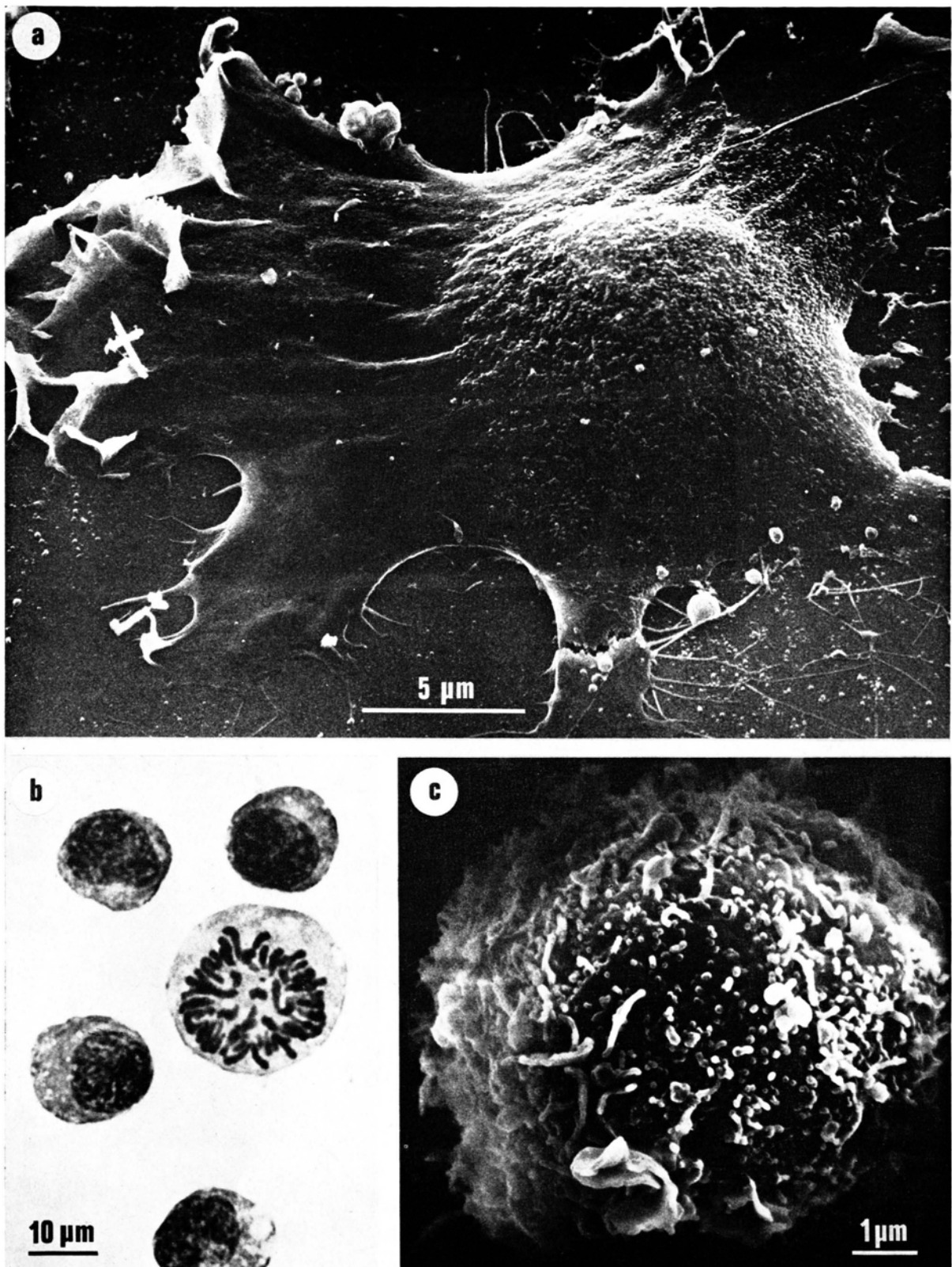


Abb. 2. Friend-Eveline-Suspensions-Kultur. Vermehrung der Zellen und Plaque-bildenden Virus-Einheiten (PBE) bei 37 °C.

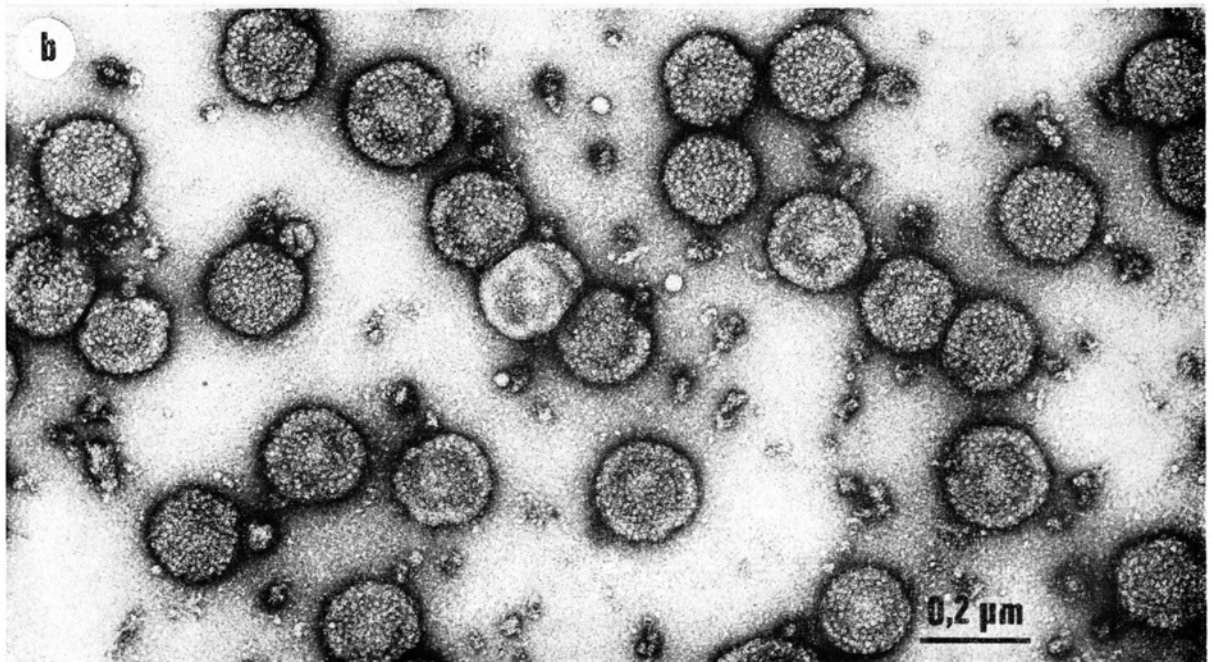
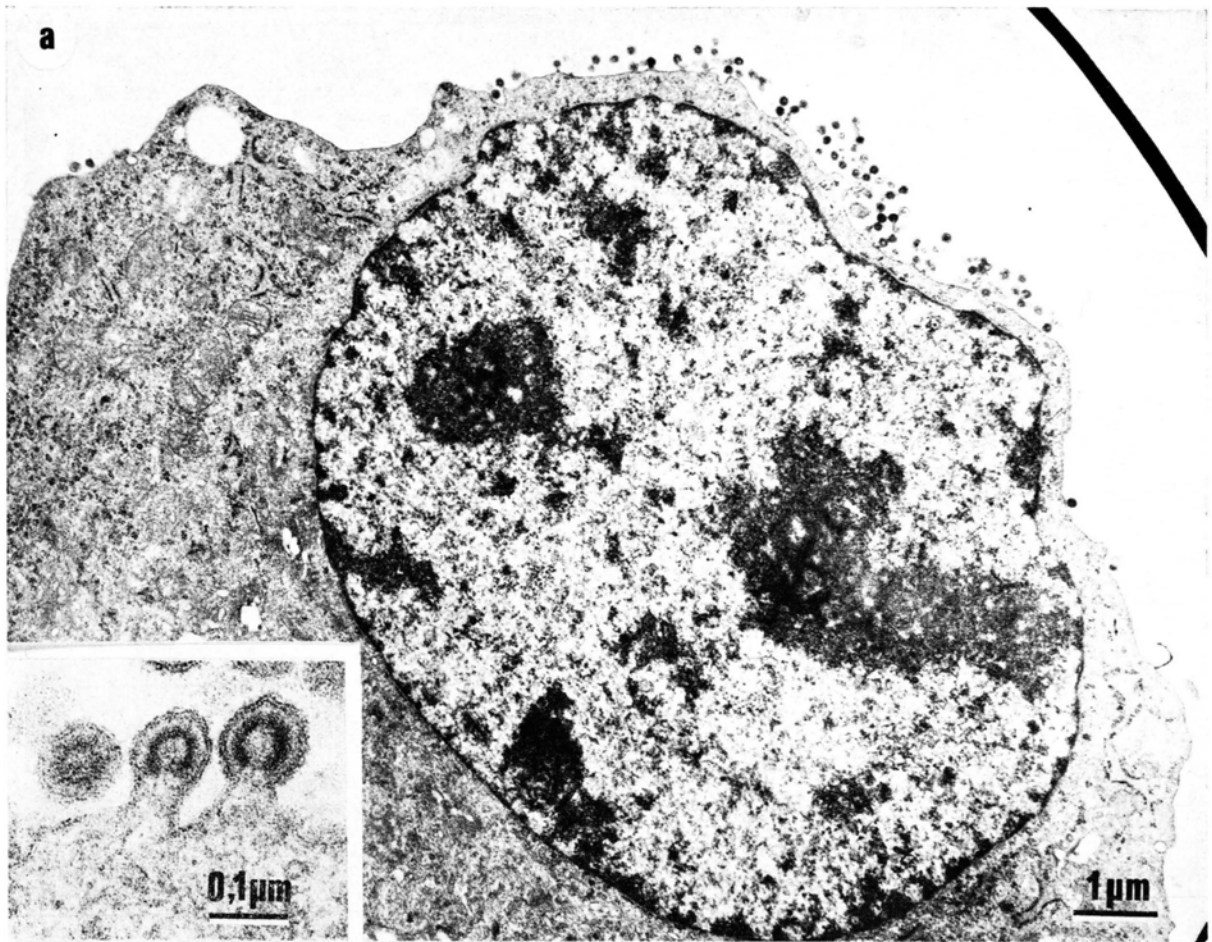
* Forschergruppe Tumormimmunologie, Freiburg/Breisgau. Sonderdruckanforderungen an W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35/III.

** Abbn. 1a—c siehe Tafel auf Seite 698 a.





Abbn. 1 a—c. (Legende siehe Tafel S. 698 c)



Abbn. 3 a—b (Legende siehe Tafel S. 698 c)
 Zeitschrift für Naturforschung 30 c, Seite 698 b.

Abb. 1. a. Friend-Eveline-Layer-Zelle. Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop. b. Friend-Eveline-Suspensions-Zellen, 72 Stunden nach dem Ansetzen der Kultur entnommen. Wright-Giemsa-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme. c. Zelle wie in b. Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop.

Abb. 3. a. Friend-Eveline-Suspensions-Zelle, 72 Stunden nach Kulturbeginn. Dünnschnitt. Elektronenmikroskopische Aufnahme. b. Gereinigtes Friend-Virus aus einer Eveline-Suspensions-Kultur mit knopfartigen Gebilden an der Virusoberfläche. Elektronenoptische Aufnahme. Negativ-Kontrastierung mit Uranyl-Azetat.

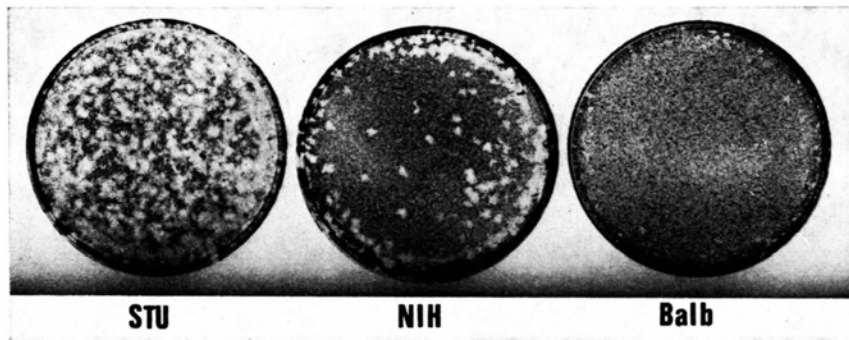


Abb. 4. Prüfung des Friend-Eveline-Virus im XC-Test unter Verwendung von embryonalen STU-, NIH-Swiss- und Balb/c-Maus-Zellen.

meinen rund mit einem Durchmesser von $15-20\ \mu\text{m}$ und enthalten einen großen, meist exzentrisch gelegenen Kern. Im Rasterelektronenmikroskop³ (Abb. 1 c) kann man auf ihnen, wenn sie in der Vermehrungsphase der Kultur entnommen wurden, zahlreiche Teilchen von der Größe der C-Typ-Viren ausmachen. Bei der Untersuchung von Dünnschnitten mit dem Durchstrahlungs-Elektronenmikroskop (Abb. 3 a **) zeigte sich, daß diese Teilchen die für C-Partikeln typische Innenstruktur aufweisen (siehe stark vergrößerter Ausschnitt) und — wie schon vorher erwähnt — praktisch nur in kernnahen Regionen zu finden sind. Elektronenoptisch wurde keine Zelle gefunden, die frei von Virusteilchen war.

Verfolgt man in solchen Kulturen die Bildung von infektiösem Virus mit Hilfe des XC-Testes⁴, so ergibt sich, daß dessen Menge während der Vermehrung der Zellen bis zu 72 Stunden nach dem Ansetzen der Kultur um das 100- bis 300-fache zunimmt (Abb. 2). Anschließend fällt dann die Zahl der Plaque-bildenden Einheiten (PBE) steil ab, offenbar weil die Zellen, die sich nicht vermehren, kaum noch Virus bilden und das vorhandene sehr schnell bei 37°C inaktiviert wird. Die Instabilität des Erregers ist wohl auch einer der Gründe dafür, daß selbst im zellfreien Medium der 72 Stunden alten Kultur nur ~ 0.3 PBE auf eine Zelle entfallen (s. Abb. 2), obwohl elektronenoptisch eine wesentlich größere Zahl von Partikeln auf den Zellen gefunden wurde. Durch Ultrazentrifugieren ließen sich zu dieser Zeit aus 1000 ml Kulturmedium durchschnittlich etwa 10 mg Virusprotein gewinnen. Das entspricht, wenn man ein Partikelgewicht von $3,9 \times 10^8$ zugrundelegt⁵, etwa $1,5 \times 10^{10}$ physikalischen Virusteilchen pro ml Medium. Danach wäre 72 Stunden nach dem Ansetzen nur jedes 50 000-ste Teilchen in der Lage, einen Plaque im XC-Ansatz zu erzeugen.

Elektronenoptisch wurden in einer Vielzahl von Proben niemals andere als C-Typ-Partikeln gefunden. Xenotropes Mäuse-C-Virus ließ sich mit dem Gewebekultur-Test nach Fischinger *et al.*⁶ in unserem Material nicht nachweisen. Nach Infektion von embryonalen Mäusezellen des Balb/c-, NIH-Swiss- und STU-Stammes mit der gleichen Virus-Verdünnung ergab sich das in Abb. 4 * wiedergegebene Bild im XC-Test. Die Plaques waren am schwächsten ausgeprägt in der Balb/c-, wesentlich stärker in der NIH-Swiss- und am stärksten in der STU-Zellkultur.

Serologisch verhält sich, wie unsere bereits publizierten Untersuchungen⁷⁻¹¹ gezeigt haben, das von der Eveline-Suspensions-Kultur erzeugte Virus wie

ein klassisches Friend-Virus. Entsprechende typspezifische Antigene wurden sowohl in dem isolierten Protein P12 wie auch in dem Hauptglykoprotein GP71 nachgewiesen^{10, 11}.

Die Prüfung im Versuchstier ergab aber, daß das im Ausgangsmaterial (Maus-Milz-Extrakt) enthaltene Focus-bildende Virus nicht mehr nachzuweisen ist. Weder nach intravenöser noch nach intraperitonealer Injektion des zellfreien Eveline-Virus in STU-Mäuse waren entsprechende Herde 9 Tage post infectionem (p.i.) in der Milz zu beobachten, die in den mit Milzvirus infizierten Kontrollen massenhaft auftraten. Vorhanden ist in der Eveline-Kultur aller Wahrscheinlichkeit nach nur dasjenige Friend-Agens, das als Helfervirus für das defekte Focus-bildende Virus fungiert und dessen antigenes Oberflächenmuster bestimmt. Injizierten wir durch Filtrieren zellfrei-gemachtes Kulturmedium intraperitoneal (0,1 ml) in Babymäuse (Abb. 5), so

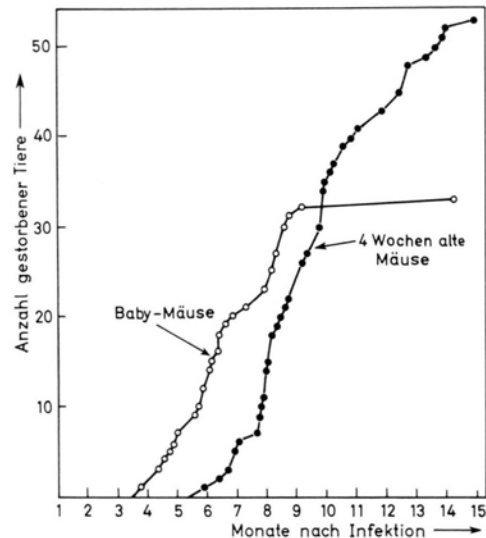


Abb. 5. Sterbezeiten (Monate p.i.) von STU-Mäusen, die kurz nach der Geburt („Babymäuse“) bzw. im Alter von 4 Wochen mit Virus (zellfrei) aus einer Eveline-Suspensions-Kultur infiziert wurden. Als Babymäuse infiziert wurden 34 Tiere; davon starben innerhalb von 15 Monaten p.i. 33 Tiere. Von 35 Kontrollmäusen verendeten im gleichen Zeitraum 4 interkurrent. Im Alter von 4 Wochen wurden 55 Tiere infiziert; davon starben innerhalb von 15 Monaten p.i. 53 Tiere. Von 55 Kontrollmäusen verendeten im gleichen Zeitraum 3 interkurrent.

starben die Tiere vom 4. bis zum 14. Monat p.i. nahezu 100-prozentig und wiesen enorm vergrößerte Milzen (bis zu 1,6 g schwer), Lebern und in wenigen Fällen (3%) auch Thymusdrüsen auf. Bei Mäusen, die erst im Alter von 4 Wochen intraperitoneal infiziert wurden (0,2 ml), trat

** Abbn. 3 a und b siehe Tafel auf Seite 698 b.

* Abb. 4 siehe Tafel auf Seite 698 c.

– bezogen auf den Infektionstermin – der Tod im allgemeinen etwa 2 Monate später ein (Abb. 5). Neben den vorher erwähnten Veränderungen wurden bei ihnen – vor allem, wenn sie nach dem 8. Monat p. i. verendeten – häufig Tumoren in den Nieren und im Bauchraum gefunden. Unser in Mäusen passagiertes Friend-Virus tötet dagegen die STU-Mäuse, selbst wenn sie erst im Alter von 10–12 Wochen intraperitoneal infiziert wurden, innerhalb von 2–3 Monaten p. i.

Für die Produktion größerer Virusmengen, wie wir sie für die Isolierung der einzelnen Virusstrukturproteine benötigten, wurden die Kulturen in der vorher beschriebenen Weise angesetzt, und das Medium 72 Stunden später geerntet. Nachdem die Zellen daraus durch Zentrifugieren bei ρ 0,5 (60 min)¹² entfernt waren, schleuderten wir anschließend das Virus bei ρ 10 (60 min) aus, lösten es vorsichtig unter möglichster Vermeidung von Scherkräften mit Hilfe von Pasteur-Pipetten in Phosphat

gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) und konzentrierten es schließlich durch nochmaliges Zentrifugieren bei ρ 10 (60 min). Auf solche Weise gewonnene Präparate wiesen einen relativ hohen Reinheitsgrad auf (Abb. 3 b). Die Oberfläche nahezu sämtlicher Viruspartikeln war dicht besetzt mit den knopfartigen Gebilden, die das Virusglykoprotein GP71 enthalten¹³. Wie wir in früheren Untersuchungen zeigen konnten¹³, wird diese für die biologische Aktivität des Virus wichtige Komponente durch andere Reinigungsprozeduren – wie Fällung mit Polyäthylenglykokol und Dichtegradientenzentrifugation – weitgehend entfernt. Unter Anwendung der hier beschriebenen Virus-Produktions- und Reinigungs-Methoden konnten GP71 und andere Viruskomponenten in Mengen isoliert werden, die für eine eingehendere seroimmunologische und chemische Untersuchung ausreichen.

Die Autoren danken P. Fischinger, Bethesda, USA für die Untersuchung des Materials auf xenotropes Virus.

¹ W. Schäfer u. E. Seifert, *Virology* **35**, 323 [1968].

² W. Schäfer u. J. Szántó, *Z. Naturforsch.* **24b**, 1324 [1969].

³ G. Hunsmann, M. Claviez, V. Moennig, H. Schwarz u. W. Schäfer, *Virology*, im Druck.

⁴ W. P. Rowe, W. E. Pugh u. J. W. Hartley, *Virology* **42**, 1136 [1970].

⁵ I. Salmeen, L. Rimai, L. Liebes, M. A. Rich u. J. J. McCormick, *Biochemistry* **14**, 134 [1975].

⁶ P. J. Fischinger, C. S. Blevins u. S. Nomura, *J. Virol.* **14**, 177 [1974].

⁷ W. Schäfer, P. J. Fischinger, J. Lange u. L. Pister, *Virology* **47**, 197 [1972].

⁸ W. Schäfer, J. Lange, P. J. Fischinger, H. Frank, D. P. Bolognesi u. L. Pister, *Virology* **47**, 210 [1972].

⁹ R. Witter, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 346 [1973].

¹⁰ R. W. Green, D. P. Bolognesi, W. Schäfer, L. Pister, G. Hunsmann u. F. de Noronha, *Virology* **56**, 565 [1973].

¹¹ G. Hunsmann, V. Moennig, L. Pister, E. Seifert u. W. Schäfer, *Virology* **62**, 307 [1974].

¹² P. Giebler, *Z. Naturforsch.* **13b**, 238 [1958].

¹³ R. Witter, H. Frank, V. Moennig, G. Hunsmann, J. Lange u. W. Schäfer, *Virology* **54**, 330 [1973].