

Über die Konstitution des Tabakmosaikvirus¹⁾

Von Dr. GERHARD SCHRAMM

Arbeitsstätte für Virusforschung der Kaiser-Wilhelm-Institute für Biochemie und Biologie, Berlin-Dahlem

Die Viren sind die kleinsten der bisher bekannten biologischen Einheiten, die selbstvermehrungsfähig sind. Die obere Grenze des Durchmessers liegt bei etwa 300μ , die untere bei $8-10\mu$. Sie zeigen auch von allen biologischen Einheiten die geringsten biologischen Leistungen. Sie können sich nicht mehr von sich aus aus einfachen organischen Bausteinen aufbauen, sondern müssen sich hierzu in den Energie- und Stoffwechsel einer lebenden Zelle einschalten. Die Viren stimmen in mancher Hinsicht mit den Lebewesen überein. Wie bei diesen erfolgt die Vermehrung im allg. unter Erhaltung der spezifischen Arteigenschaften. Jedoch kommen wie bei den Organismen sprunghafte Änderungen der Erbeigenschaften, Mutationen, vor. Den Viren fehlt dagegen ein anderes wichtiges Kennzeichen der Lebewesen, nämlich der Stoffwechsel. Man hat bisher weder eine Atmung noch eine Gärung der Viren feststellen können. Nach ihren biologischen Leistungen könnte man daher die Viren als unvollständige Lebewesen bezeichnen.

1. Der chemische Aufbau der Virusarten.

Aufschlußreicher als die biologische Einordnung der Viren ist die Untersuchung ihres chemischen Aufbaues. Von den uns bekannten Stoffklassen, die die Grundbausteine der Lebewesen ausmachen, weisen allein die Eiweiß-Stoffe die ungeheure Wandlungsfähigkeit auf, die die ganze Mannigfaltigkeit und Eigenart lebender Einzelwesen erklärbar macht. Selbst die kleinsten Viren mit einem Molekulargewicht von etwa $300\,000-400\,000$ könnten noch aus etwa 10 verschiedenen Eiweiß-Molekeln von der Größe des Eialbumins (Molekulargewicht $40\,000$) bestehen. Es wäre denkbar, daß die Viren ein lockeres, nach Größe und Gestalt nicht näher definiertes Aggregat verschiedener Eiweiß-Stoffe darstellten, etwa in der Art eines Plasmaklumpchens. In diesem Fall müßten die Einzelteilchen einer bestimmten Virusart untereinander erheblich verschieden sein, da bei der geringen Gesamtzahl der in ihnen enthaltenen Eiweiß-Molekeln das mehr oder weniger an einer Molekel stark ins Gewicht fallen müßte. Die chemische Untersuchung einzelner Virusarten hat nun gezeigt, daß sich eine solche Uneinheitlichkeit nicht feststellen läßt, sondern die bisher chemisch rein dargestellten kleineren Virusarten nach allen uns zur Verfügung stehenden Prüfungsverfahren eine völlige Übereinstimmung der Einzelteilchen unter sich aufweisen. Das einzelne Teilchen ist also nicht eine statistisch variierende Anhäufung verschiedener Eiweiß-Stoffe, sondern eine definierte chemische Verbindung, eine chemische Molekel.

Die wichtigsten Beweise für das Vorliegen einer bestimmten Konstitution der Viren sind: 1. Die Kristallisierbarkeit. Denn nur Teilchen, die in ihrer Größe, Gestalt und Ladung weitgehend übereinstimmen, können sich zu einem regelmäßigen Kristallgitter vereinigen. 2. Die regelmäßige innere Struktur. Einzelne Virusarten, wie z. B. das Tabakmosaikvirus, gleichen in ihrem inneren Aufbau einem Kristall. Die einzelnen Atome nehmen also eine bestimmte Lage in der Gesamtmolekel ein und sind in ganz bestimmter Weise miteinander verknüpft. 3. Die völlige Übereinstimmung der Einzelteilchen unter sich läßt sich auch dadurch beweisen, daß man das zu untersuchende Virus-Protein unter der Einwirkung einer Kraft durch eine Lösung hindurchbewegt. Aus der Gleichförmigkeit der Bewegung können dann Rückschlüsse auf die Einheitlichkeit der bewegten Teilchen gezogen werden. Als wirksame Kraft benutzt man hierbei entweder das Zentrifugalkraftfeld, das Diffusionsgefälle oder das elektrische Feld, mit deren Hilfe man die Einheitlichkeit hinsichtlich Größe, Gestalt und Ladung bestimmen kann.

¹⁾ Nach einem Vortrag auf der „Biochemischen Vortragsveranstaltung des VDCh“ in Berlin am 21./22. Mai 1943.

Das erste Virus, das als einheitlicher Eiweiß-Stoff erkannt wurde, ist das Tabakmosaikvirus (Stanley²⁾, 1935). Als weitere sicher einheitliche Viren sind zu nennen das Bushy Stunt-Virus der Tomate (Bawden u. Pirie³⁾), das Tabaknekrosevirus (Pirie u. Mitarb.⁴⁾), das Kartoffel-X-Virus (Stanley u. Wickoff⁵⁾), Bawden u. Pirie⁶⁾), das Kartoffel-Y-Virus (Bawden⁷⁾), Melchers⁸⁾), die Polyederviren der Insekten (Bergold u. Schramm⁹⁾), das Kaninchenpapillomvirus (Beard u. Wickoff¹⁰⁾), das Maul- und Klauenseuche-Virus (Janssen¹¹⁾) und das Encephalomyelitis-Virus der Maus (Gard u. Pedersen¹²⁾). Es darf allerdings nicht gefolgert werden, daß nun alle Virusarten einfach zusammengesetzte Eiweißmolekeln sind. Viele der größeren Virusarten haben eine kompliziertere Zusammensetzung. Es scheint ein fließender Übergang zu bestehen zwischen den aus einer einzigen Molekel bestehenden Viren über die komplizierter zusammengesetzten großen Virusarten zu den eigentlichen, aus Protoplasma bestehenden Organismen.

Bei den einfachen Virusarten, bei denen es sich um definierte Verbindungen handelt, ist somit eine Konstitutionsermittlung im Sinne der organischen Chemie möglich. Bei der Größe der zu untersuchenden Molekeln ist dies allerdings keine einfache Aufgabe. Sie erscheint aber besonders reizvoll, da es hierdurch möglich ist, über die einfachsten stofflichen Voraussetzungen des Lebens nähere Aufschlüsse zu erhalten.

2. Das Tabakmosaikvirus.

In der Virus-Forschung bildet das Tabakmosaikvirus (TM-Virus) ein besonders bevorzugtes Untersuchungsobjekt. Es ist der erste Krankheitserreger, dessen Filtrierbarkeit durch bakteriendichte Filter und damit Zugehörigkeit zu den Viren im heutigen Sinne aufgefunden wurde (Iwanowski 1889). Es ist auch das erste Virus, das chemisch rein dargestellt wurde, und seine physikalische und chemische Untersuchung ist auch bisher am weitesten fortgeschritten. Dies hat seinen Grund darin, daß das Tabakmosaikvirus verhältnismäßig leicht zugänglich ist. Mit nicht allzu großem Arbeitsaufwand kann man aus 1 kg Tabakpflanzen 2—3 g reines Virus-Protein erhalten. Die Darstellung aus dem Preßsaft der kranken Tabakpflanzen erfolgt (nach Entfernung chlorophyll-haltiger Eiweiß-Stoffe) durch Fällung mit Ammonsulfat und hochtourige Zentrifugierung (25 000 U/min) der konz. Virus-Lösung. In schwach saurer Lösung fällt das TM-Virus dann in Form parakristalliner Nadeln aus (Abb. 1).

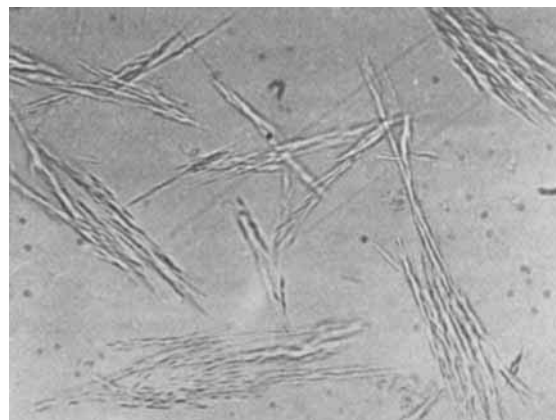
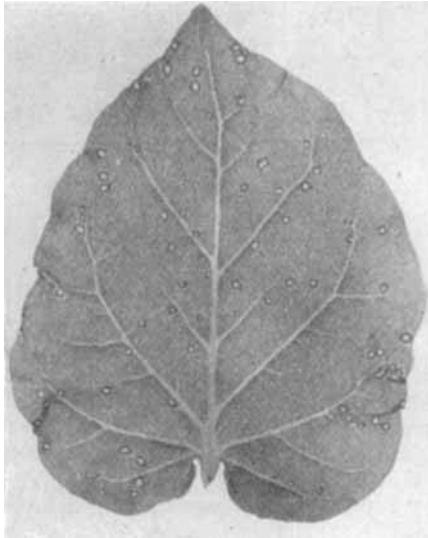


Abb. 1. Parakristalline Nadeln des Tabakmosaikvirus.
Vergrößerung 1 : 500.

²⁾ Science [New York] **81**, 644 [1935]. ³⁾ Brit. J. exp. Pathol. **19**, 251 [1938].
⁴⁾ Parasitology **30**, 543 [1938]. ⁵⁾ Science [New York] **85**, 181 [1937].
⁶⁾ Brit. J. exp. Pathol. **19**, 66 [1938].
⁷⁾ Plant Viruses and Virus Diseases. Leiden (Holland) 1939.
⁸⁾ Ber. dtsh. bot. Ges. **61**, 89 [1943]. ⁹⁾ Biol. Zbl. **62**, 105 [1942].
¹⁰⁾ Science [New York] **85**, 201 [1932]. ¹¹⁾ Naturwiss. **29**, 102 [1941].
¹²⁾ Science [New York] **94**, 493 [1941]. ¹³⁾ Bei der Korrektur gestrichen.



Nekrotische Einzelherde von Tabakmosaikvirus auf *Nicotiana glutinosa*.
(Nach G. Melchers.)

Größe und Gestalt.

Eine wichtige Voraussetzung für quantitative chemische Untersuchungen am TM-Virus ist zunächst die Bestimmung seiner Größe und Gestalt. Hierfür sind besonders Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge, Diffusionsmessungen, Röntgenuntersuchungen sowie die Elektronenmikroskopie geeignet. Messungen der Strömungsdoppelbrechung und der Viskosität sind hierfür weniger aufschlußreich gewesen, da die Theorie dieser Erscheinungen noch nicht genügend gesichert ist. Jedoch gaben gerade die Strömungsdoppelbrechung und das viscosimetrische Verhalten von TM-Virus-Lösungen den ersten Hinweis, daß dieses Virus eine langgestreckte stäbchenförmige Gestalt besitzen muß. Den unmittelbaren Beweis für das Vorliegen stäbchenförmiger Molekel erbrachte die elektronenmikroskopische Abbildung durch Kausche, Pfankuch u. H. Ruska¹⁴). Der Durchmesser der Teilchen wurde hierbei zu 15 μ bestimmt. Die Länge lag zwischen 150 und 300 μ . Der Durchmesser des Virus-Stäbchens kann jedoch auf röntgenographischem Wege noch genauer ermittelt werden. Nach Bernal u. Fankuchen¹⁵) besitzt das Virus einer hexagonalen Querschnitt mit einem Durchmesser von 15,0 μ . Über die Länge der Molekel können Röntgenuntersuchungen keinen näheren Aufschluß geben. Der genauen Längenmessung auf elektronenmikroskopischem Wege stehen gewisse Schwierigkeiten im Wege. Es zeigt sich nämlich, daß die Länge der Teilchen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen starker Schwankungen unterworfen ist und um einen statistischen Mittelwert variiert (Abb. 3). Die hier zutage tretende Uneinheitlichkeit ist bedeutend größer als die der gelösten Teilchen, die sich bei der Sedimentation in der Ultrazentrifuge einheitlich verhalten. Die Uneinheitlichkeit wird also durch die Aufnahmebedingungen verursacht. Unveröffentlichte Versuche vor H. Friedrich-Freksa zeigen, daß die Größenverteilung der abgebildeten Teilchen abhängig ist von der Art, wie diese auf die Trägerfolie aufgetrocknet werden. Die Virus-Teilchen zerbrechen hierbei leicht, so daß Bruchstücke verschiedener



Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Tabakmosaikvirenteilchen. Vergrößerung 1; 40000. (Phot. H. Friedrich-Freksa.)

Die biologische Wirksamkeit des TM-Virus kann verhältnismäßig genau bestimmt werden. Das Virus erzeugt bei vielen Pflanzen eine allgemeine Erkrankung, die sich in einer mosaikartigen Aufhellung der Blätter äußert. Bei einigen Pflanzen jedoch erzeugt es beim Auftragen auf die Blattoberfläche nur lokal begrenzte nekrotische Einzelherde (Abb. 2). Die Zahl der auftretenden Nekrosen ist von der Konzentration der aufgetragenen Virus-Lösung abhängig und kann daher zur quantitativen Bestimmung der Virus-Wirksamkeit benutzt werden.

Länge entstehen, die z.T. wieder zu langen fadenförmigen Gebilden aggregieren können. Bei schonender Auftragung der Virus-Lösung in gefrorenem Zustand gelingt es, das Zerbrechen weitgehend zu vermeiden und Teilchen einheitlicher Länge zu erhalten mit einem Maximum von 250 μ . Wegen dieser Abhängigkeit der Größenverteilung von den Versuchsbedingungen werden von den verschiedenen Arbeitskreisen abweichende Werte für die Länge der aufgetrockneten Virus-Molekel gefunden, die zwischen 250 und 320 μ liegen. Wenn wir eine Länge von 250 μ als wahrscheinlichsten Wert annehmen, ergibt sich hieraus, aus dem röntgenographischen Querschnitt und aus dem spezifischen Gewicht der Teilchen von 1,35 für das TM-Virus ein Molekulargewicht von $40 \cdot 10^6$.

Das Molekulargewicht des TM-Virus läßt sich unabhängig hiervon ohne Voraussetzungen über die Hydratation und Gestalt der Teilchen aus der Senkungsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge und der Diffusionsgeschwindigkeit berechnen. Genauere Messungen der Diffusionskonstanten, die G. Bergold in der letzten Zeit in einer von ihm entwickelten Mikroausführung des Lammchen Diffusionsapparates ausführte, ergeben, daß diese von der Konzentration abhängig ist. Das gleiche ist für die Sedimentationskonstante bekannt. Werden beide Werte auf unendlich kleine Konzentrationen extrapoliert, so ergibt sich nach unseren noch nicht ganz abgeschlossenen Messungen ein Molekulargewicht von $46 \cdot 10^6$. Mit diesem Wert stimmen das elektronenmikroskopisch ermittelte Molekulargewicht und die Ergebnisse viscosimetrischer Messungen gut überein.

Zusammensetzung.

Das TM-Virus besteht aus Eiweiß und Nucleinsäure. Andere Bausteine sind bisher nicht nachgewiesen. Jedoch sind in den bisher besten Analysen nur 68 % der Gesamtbausteine im einzelnen festgelegt¹⁶) (Tab. 1). Es muß daher die Frage offen bleiben, wie weit außer diesen beiden Hauptkomponenten noch andersartige Gruppen in der Molekel enthalten sind. Durch Verbesserung der Methodik der Eiweiß-Analyse, etwa durch Anwendung chromatographischer Verfahren, wird es hoffentlich

Tabelle 1.
Zusammensetzung des TM-Virus.

Komponente	Gehalt in %
Amino-N (als NH_3)	2,4
Alanin	1,9
Arginin	9,0
Asparaginsäure	2,6
Cystein	0,7
Glutaminsäure	5,3
Glykokoll	0,0
Histidin	0,0
Leucin	6,1
Lysin	0—0,2
Methionin	0,0
Phenylalanin	6,0
Prolin	4,6
Serin	6,4
Threonin	5,3
Tyrosin	3,9
Tryptophan	4,5
Valin	3,9
Nucleinsäure	5,8
Summe	68,4

möglich sein, ein vollständigeres Bild über die Zusammensetzung zu gewinnen. Es wird weiterhin notwendig sein, die auf analytischem Wege gewonnenen Ergebnisse durch Untersuchungen an der unversehrten Molekel zu kontrollieren. Dies kann z. B. durch elektrochemische Messungen geschehen, durch die man die Art und Zahl der im Virus enthaltenen sauren und basischen Gruppen genau bestimmen kann. Insbes. wären hier die elektrometrische Titration, die Messung des Membranpotentials sowie die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Beweglichkeit im elektrischen Feld zu nennen. Eine andere Kontrolle der Analysenwerte ist durch eine Auswertung des Absorptionsspektrums des TM-Virus möglich, aus dem der Gehalt an Nucleinsäure und aromatischen Aminosäuren abzulesen ist.

Hierzu ist es notwendig, das Spektrum möglichst weitgehend in seine Einzelteile aufzulösen. Nach Untersuchungen von Schramm u. Dannenberg¹⁷) setzt sich die Extinktion einer TM-Virus-Lösung im ultravioletten Licht zusammen aus der reinen Absorption des Virus und dem Lichtverlust, der durch die seitliche Streuung des Lichtes an den Virus-Teilchen bedingt ist. Die Streuung läßt sich aus der Extinktion oberhalb der Wellenlänge von 310 μ , wo noch keine Absorption stattfindet, messen. Es zeigte sich, daß die durch die Streuung verursachte Extinktionskonstante K dem Rayleighschen Gesetz folgt und der 4. Potenz der Wellenlänge umgekehrt proportional ist. Sie kann daher für den gesamten Absorptionsbereich berechnet und von der Gesamttextinktion abgezogen werden. Da die Streuung eine Funktion des Volumens der streuenden Teilchen ist, kann die Streuung experimentell auch dadurch ausgeschaltet werden, daß man das Virus in kleine Bruchstücke spaltet. Das auf diese Weise ermittelte reine Absorptionsspektrum des Virus konnte durch Abtrennung der Nucleinsäure von dem Eiweiß weiter in das Absorptionsspektrum der Nucleinsäure und der Eiweiß-Komponente zerlegt werden. Es gelang somit eine quantitative Bestimmung

¹⁴) Naturwiss. 27, 292 [1939].

¹⁵) J. gen. Physiol. 25, 111, 147 [1941]

¹⁶) A. F. Ross, J. biol. Chemistry 142, 685 [1942].

¹⁷) Ber. Dtsch. Chem. Ges. 77, 53 [1944].

der verschiedenen Virusarten unter Verwendung sehr geringer Mengen Virus-Protein. Die Absorption der reinen Eiweiß-Komponente setzt sich additiv aus den Spektren der drei aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan zusammen²⁷⁾. Sie kann somit zur Kontrolle des analytisch bestimmten Gehaltes an diesen Aminosäuren dienen.

Die Nucleinsäure des TM-Virus ist ein Polyribonucleotid, das in seiner Zusammensetzung der Hefenucleinsäure sehr ähnlich ist. Als basische Komponenten enthält sie: Guanin, Adenin, Cytosin und Uridylsäure¹⁹⁾. Die letztere soll sich etwas von der aus Hefenucleinsäure isolierten Uridylsäure unterscheiden. Nach neueren Angaben kommt der Virus-Nucleinsäure ein Molekulargewicht von 11 000 zu²⁰⁾. Hiernach würde also eine Molekel TM-Virus etwa 200 Molekeln Nucleinsäure enthalten.

Biologische Funktion der Einzelbausteine. Durch systematische Abwandlung der Virus-Molekel ist es möglich, in die biologische Funktion der Einzelbausteine Einblick zu erhalten. Es wurde gefunden, daß man die Amino-Gruppen des Virus durch Acetylierung mit Keten oder Umsatz mit Phenylisocyanat blockieren kann, ohne daß hierbei die Vermehrungsfähigkeit verlorengeht. Die Nachkommen dieser Virus-Derivate enthalten wieder freie Amino-Gruppen (Schramm u. Müller²⁰⁾). Da die Spaltung unphysiologischer Amino-Derivate, wie sie z. B. die Phenylureide darstellen, im pflanzlichen Organismus wenig wahrscheinlich ist, darf man annehmen, daß der größte Teil der freien NH₂-Gruppen für den Vermehrungsvorgang ohne Bedeutung ist. Auch bei der Oxydation der Sulfhydryl-Gruppen des Virus mit Jod bis zur Sulfon-Stufe bleibt die Fähigkeit zur Selbstvermehrung erhalten²¹⁾. Jede Veränderung am Tyrosin-Rest, z. B. durch Jod-Substitution oder Veresterung, führt dagegen zur Inaktivierung. Von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Virus ist auch die Nucleinsäure. Nach Untersuchungen von Caspersson²²⁾ ist die Gegenwart von Nucleinsäure bei jeder Eiweiß-Vermehrung notwendig. Sie ist daher überall dort zu finden, wo eine Eiweiß-Vermehrung stattfindet, z. B. in den Chromosomen, und tritt dementsprechend in hoher Konzentration auf in den eiweiß-produzierenden Drüsen und schnell wachsenden Geweben, wie dem Embryonal- und Tumor-Gewebe. Da bisher in jedem näher untersuchten Virus-Protein Nucleinsäure festgestellt wurde, wird diese auch bei der Virus-Vermehrung eine entscheidende Rolle spielen. In Übereinstimmung hiermit zeigen Versuche mit nucleinsäure-spaltenden Fermenten, daß durch Hydrolyse der Nucleinsäure die Vermehrungsfähigkeit des TM-Virus sofort verschwindet, obgleich hierbei das Molekulargewicht des Virus unverändert bleibt (G. Schramm²³⁾). Weitere, noch nicht veröffentlichte Versuche zeigten, daß entgegen der ursprünglichen Ansicht hierbei die Spaltstücke der Nucleinsäure auch nach der Hydrolyse an das Protein gebunden bleiben.

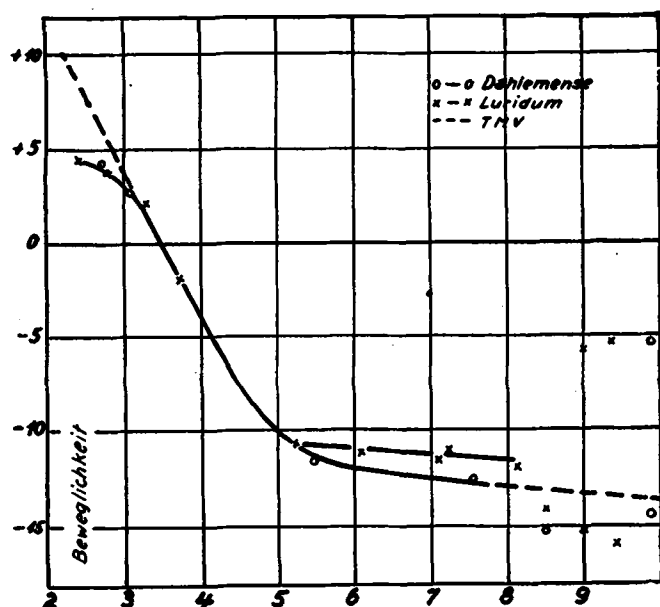


Abb. 4. Beweglichkeitskurve des Dahlemense- u. Luridum-Stammes im Vergleich zu der des gewöhnlichen TM-Virus.

¹⁹⁾ H. S. Loring, J. biol. Chemistry 130, 251 [1939].

²⁰⁾ Zitat nach S. S. Cohen u. W. M. Stanley, ebenda 140, 833 [1941].

²¹⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 266, 48 [1940]; 274, 267 [1942].

²²⁾ M. L. Anson u. W. M. Stanley, J. gen. Physiol. 24, 679 [1941].

²³⁾ Naturwiss. 29, 38 [1941].

²⁴⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 582 [1941].

Wichtige Zusammenhänge zwischen der Konstitution des TM-Virus und seinen biologischen Eigenschaften ergeben sich auch aus der chemischen Untersuchung der Veränderungen, die das TM-Virus bei der Mutation erleidet. Von Melchers u. Schramm^{24, 25, 26)} wurde eine auf Tomaten vorkommende Variante des TM-Virus isoliert, die gegenüber dem gewöhnlichen TM-Virus (Var. vulgare) als Var. Dahlemense bezeichnet wurde. Das Dahlemense-Virus ist biologisch, immunologisch und chemisch mit dem TM-Virus nahe verwandt, läßt sich aber in jeder Weise eindeutig von dem Vulgare-Stamm unterscheiden. Der auffallendste chemische Unterschied ergibt sich bei der Messung der pH-Abhängigkeit der Beweglichkeit im elektrischen Feld (Abb. 4). Unterhalb pH 3 zeigt die Beweglichkeitskurve des Dahlemense-Virus eine charakteristische Erniedrigung gegenüber der Vulgare-Kurve, die wohl auf einem Mindergehalt an basischen Gruppen beruht. Oberhalb pH 3 stimmt die Beweglichkeitskurve des Dahlemense-Virus vollständig mit der des TM-Virus überein. Beide Viren können zu sog. Gelbstämmen mutieren, die ein auffallendes hellgelbes bis weißes Mosaik auf Tabak erzeugen. Hierbei erleiden beide Viren gleichsinnige Veränderungen, die sich wiederum auf biologischem, serologischem und chemischem Wege nachweisen lassen, so daß man hier von einer Parallelmutation sprechen kann. Wichtig ist nun, daß bei der Mutation des Dahlemense-Virus zu dem entsprechenden Gelbstamm (Luridum) die charakteristischen Unterschiede zwischen den beiden Ausgangsstämmen (Vulgare und Dahlemense) erhalten bleiben. Elektrochemisch bleibt also bei der Mutation des Dahlemense-Virus zu dem Luridum-Virus die Beweglichkeitskurve unterhalb pH 5 unverändert, während oberhalb pH 5 beim Luridum-Virus die für die Gelbmutante charakteristische Erniedrigung der anodischen Beweglichkeit auftritt, die sich in ähnlicher Weise auch bei der Mutation des Vulgare-Virus zu seinem Gelbstamm Flavum feststellen läßt (Abb. 4). Entsprechend diesen chemischen Befunden bleiben auch die biologischen und serologischen Unterschiede bei der Mutation dieser Stämme erhalten. Es muß daher im TM-Virus eine Reihe verschiedener Wirkungsbereiche vorliegen, die unabhängig voneinander mutieren können. Wenn wir die einzelnen Wirkungsbereiche mit Buchstaben bezeichnen, so läßt sich die hier vorliegende Parallelmutation etwa durch folgendes Schema wiedergeben (Abb. 5):

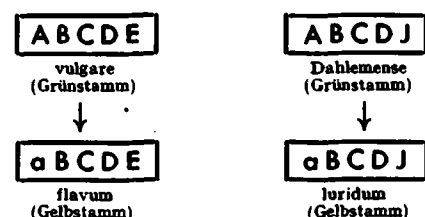


Abb. 5. Schema der Gelbmutation des Vulgare- und Dahlemense-Stammes.

Struktur des Tabakmosaikvirus. Physikalische und chemische Untersuchungen zeigen, daß die Einzelbausteine in der Virus-Molekel außerordentlich regelmäßig angeordnet sind.

Hierfür sprechen zunächst die Untersuchungen mit polarisiertem Ultraviolettlicht an gerichteten Virus-Teilchen (Butenandt, Friedrich-Freska, Hartwig u. Scheibe²⁷⁾). Es ist aus Untersuchungen von Scheibe²⁸⁾ und anderen bekannt, daß die charakteristischen Absorptionsbanden aromatischer Ringsysteme im polarisierten Licht nur dann auftreten, wenn der elektrische Vektor des Lichtes in der Ebene der Ringe schwingt. Durch diese Tatsache ist es möglich, die Lage aromatischer Systeme innerhalb einer größeren Molekel festzustellen, wenn die Molekel selbst in bestimmter Weise ausgerichtet werden kann. Werden nun die stäbchenförmigen Molekeln des TM-Virus durch Strömung in einer Capillare parallel gerichtet, so zeigt sich, daß im polarisierten ultravioletten Licht die charakteristische Absorptionsbande, die durch den Indol-Ring des Tryptophans verursacht wird, nur deutlich hervortritt, wenn der elektrische Vektor des Lichtes senkrecht zur Längsachse des TM-Virus schwingt

²⁴⁾ G. Melchers, G. Schramm, H. Trumit u. H. Friedrich-Freska, Biol. Zbl. 60, 524 [1940].

²⁵⁾ G. Melchers, Naturwiss. 29, 48 [1942].

²⁶⁾ G. Schramm u. L. Rebsburg, ebenda 30, 48 [1942].

²⁷⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 274, 276 [1942].

²⁸⁾ Diese Ztschr. 53, 632 [1939]; Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 47, 77 [1941].

(Abb. 6). Hieraus muß geschlossen werden, daß die Indol-Ringebenen des Tryptophans innerhalb der Virus-Molekel parallel zueinander ausgerichtet sind und senkrecht zur Längsachse der Molekel stehen. Das gleiche gilt für die Purin-Ringebenen der Nucleinsäure. Wenn die Purin-Ringe senkrecht zur Virus-Achse ausgerichtet sind, müssen die Nucleinsäure-Ketten vorwiegend parallel zur Längsachse der Molekel verlaufen. Hiernach haben also sowohl das Tryptophan als auch die Nucleinsäure-Molekeln eine genau definierte Lage innerhalb der Gesamtmolekel.

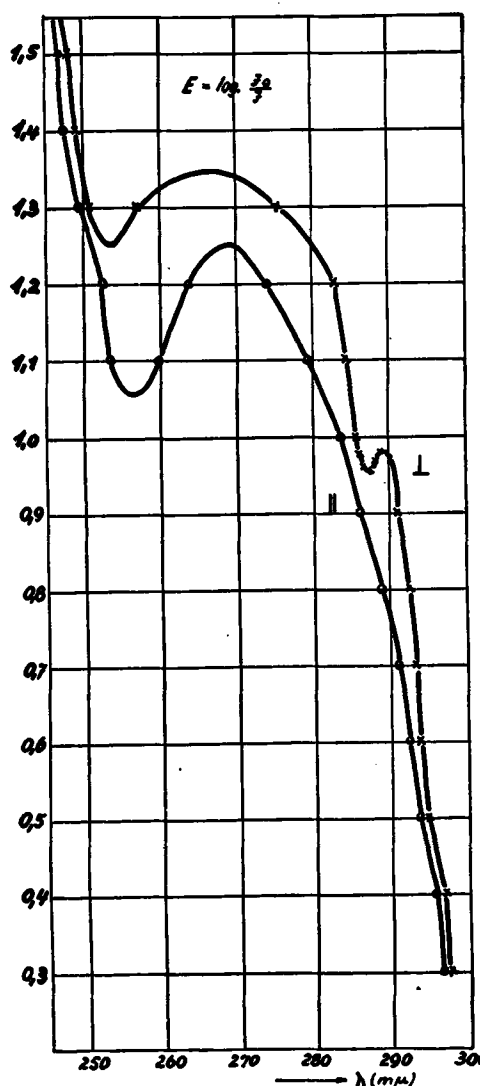


Abb. 6. Absorption des durch Strömung ausgerichteten Tabakmosaikvirus im polarisierten ultravioletten Licht.

(Nach Butenandt, Friedrich-Freksa, Hartwig und Scheibe.)

⊥ = Elektr. Lichtvektors senkrecht z. Strömungsrichtung
|| = Elektr. Lichtvektor parallel z. Strömungsrichtung

Die Regelmäßigkeit im Aufbau des TM-Virus tritt auch bei beiden Untersuchungen mit Röntgenstrahlen hervor. Es ergeben sich regelmäßige Abstände der einzelnen Netzebenen, woraus hervorgeht, daß den einzelnen Atomen innerhalb der Gesamtmolekel eine ganz bestimmte Lage zukommt. Aus der näheren Analyse der Röntgendiagramme ergibt sich nach Bernal u. Fankuchen¹⁵⁾ eine rhomboedrische Elementarzelle, die eine Dimension von $67 \times 87 \text{ \AA}$ besitzt (Abb. 7). Aus dem Volumen dieser Elementarzelle und ihrem spezifischen Gewicht berechnet sich für diese ein

Molekulargewicht von 370 000. Es ist anzunehmen, daß jeweils drei Elementarzellen eine hexagonale Scheibe von 68 \AA Dicke und 150 \AA Dmr. bilden. Etwa 40 dieser Scheiben, wie Geldstücke einer Geldrolle aufeinandergelegt, würden dann die Gesamtlänge der Virus-Molekel ergeben.

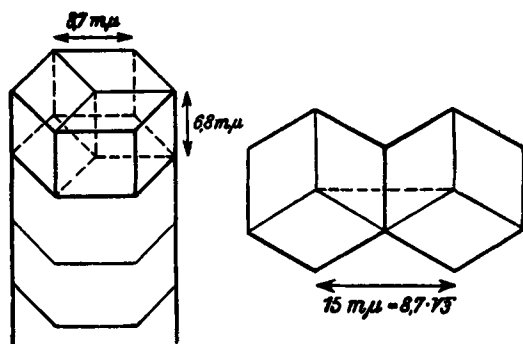


Abb. 7. Struktur des Tabakmosaikvirus.
(Nach den Röntgenuntersuchungen von Bernal und Fankuchen.)

Die Unterteilung des Virus in gleichartige Untereinheiten konnte auch auf chemischem Wege nachgewiesen werden (G. Schramm²⁰⁾). Im alkalischen Gebiet knapp außerhalb der

pH-Stabilitätsgrenze zerfällt das TM-Virus in biologisch inaktive einheitliche Spaltstücke, für die sich aus der Sedimentations- und Diffusionskonstante ein Molekulargewicht von 360 000 ergibt, das recht gut mit dem der röntgenographisch ermittelten Elementarzelle übereinstimmt. Neben einem nucleinsäure-freien Spaltstück dieser Größe wurde auch ein gleich großes nucleinsäure-haltiges Spalt-Protein isoliert. Als Zwischenstufen treten bei der Spaltung größere, ebenfalls nucleinsäure-haltige Komponenten auf.

Aus diesen Befunden geht also hervor, daß das TM-Virus aus etwa 130 der Größe und Ladung nach gleichen Untereinheiten besteht. Die größenordnungsmäßige Übereinstimmung dieser Zahl mit der in dem TM-Virus enthaltenen Nucleinsäure-Molekel und die Isolierung des nucleinsäure-haltigen Spaltproduktes macht es wahrscheinlich, daß jede Untereinheit eine Molekel Nucleinsäure enthält. Da die Nucleinsäure bei der Elektrophorese nicht von der Protein-Komponente abdissoziiert, darf man annehmen, daß diese nicht nur salzartig, sondern auch durch homöopolare Bindungen (z. B. Wasserstoff-Brücken) mit dem Protein-Gerüst verbunden ist.

Durch Denaturierungsmittel, wie z. B. stärkeres Alkali, kann die Nucleinsäure vollständig von dem Eiweiß getrennt werden. Die bei der Behandlung mit starkem Alkali auftretenden Eiweiß-Spaltstücke wurden von Pfankuch²⁰⁾ näher untersucht. Sie neigen stark zur Aggregation und sind im neutralen Gebiet fast unlöslich. Sie unterscheiden sich in diesem Punkt sowie in ihrem elektrophoretischen und serologischen Verhalten eindeutig von den unter milden Bedingungen erhaltenen primären Spaltstücken vom Molekulargewicht 360 000.

Sehr aufschlußreich ist auch die serologische Untersuchung der Spaltstücke, die gemeinsam mit H. Friedrich-Freksa durchgeführt wurde. Es zeigte sich, daß die unter milden Bedingungen erhaltenen Spalt-Proteine noch ihre volle antigene Wirksamkeit besitzen. Infolge der vergrößerten Oberfläche binden sie sogar mehr Virus-Antikörper als das Virus selbst. Werden die Spaltstücke durch stärkeres Alkali denaturiert, so geht ein Teil der antigenen Wirksamkeit verloren, und es werden nicht mehr alle Virus-Antikörper präzipitiert. Besonders interessant ist die Frage, wie weit die einzelnen, in dem TM-Virus festgestellten Wirkgruppen auf verschiedene Spaltstücke verteilt sind, oder ob die oben mit A, B, C usw. bezeichneten Wirkgruppen in jedem der Spaltstücke mit dem Molekulargewicht 360 000 enthalten sind. Durch eine entsprechende Versuchsanordnung ließ sich zeigen, daß alle Spaltstücke serologisch unter sich gleich sind, also jedes bereits alle antigenen Wirkgruppen enthält.

Bei der näheren Untersuchung der Spaltstücke ergab sich der überraschende Befund, daß beim Ansäuern der alkalischen Lösung der nucleinsäure-freien Spaltkomponente bzw. des entsprechenden Nucleoproteids die Spaltstücke wieder zu einem einheitlichen hochmolekularen Protein von der Größe und Gestalt des TM-Virus zusammentreten. Die elektronenmikroskopische Abbildung des rückgebildeten Proteins zeigt, daß dieses wiederum eine stäbchenförmige Gestalt besitzt. Es kristallisiert in gleicher Weise wie das Virus in parakristallinen Nadeln und zeigt in der Ultrazentrifuge die gleiche Sedimentationskonstante. Das rückgebildete Protein besitzt jedoch keine Vermehrungsfähigkeit.

Das rückgebildete Protein unterscheidet sich auch dadurch von dem Virus²¹⁾, daß es oberhalb pH 6 im allg. über bestimmte Zwischenstufen wieder in die niedermolekularen Spaltstücke zerfällt. Es verhält sich also ähnlich wie andere hochmolekulare Eiweiß-Stoffe, z. B. das Hämocyanin (Molekulargewicht $8 \cdot 10^6$), das ebenfalls reversibel in bestimmte kleinere Teilchen vom halben, achtel oder sechzehntel Molekulargewicht dissoziieren kann. Wird hingegen die Rückbildung der hochmolekularen stäbchenförmigen Molekel in Gegenwart von Phosphat vorgenommen, so erhält man ein Protein, das sich in seiner pH-Stabilität nicht vom TM-Virus unterscheidet. Eine biologische Wirksamkeit des auf diese Weise hergestellten hochmolekularen Nucleoproteids war jedoch ebenfalls nicht festzustellen. Es ist zu hoffen, daß durch die nähere Untersuchung der Spaltung und der Rückbildung auch die Bedingungen aufgefunden werden können, unter denen die Synthese eines vermehrungsfähigen Proteins aus

¹⁵⁾ Naturwiss. 31, 94 [1948].

²⁰⁾ Biochem. Z. 206, 125 [1940]; Naturwiss. 31, 98 [1948].

²¹⁾ Unveröffentlichte Versuche.

inaktiven, niedermolekularen Bausteinen möglich ist. Die Leichtigkeit, mit der die charakteristische äußere Gestalt und Größe des Virus aus den Spaltstücken wieder zurückgebildet werden kann, zeigt, daß die Form und Größe des Virus energetisch vor unzähligen anderen möglichen Formen der Aggregation ausgezeichnet sein müssen und sich anscheinend zwangsläufig aus den Eigenschaften der Spaltstücke ergeben. Man ist daher wohl zu dem Schluß berechtigt, daß diese niedermolekularen Komponenten auch eine Zwischenstufe bei der biologischen Synthese des Virus in der Pflanze bilden. Auch die bei der Mutation erfolgende gleichzeitige Umwandlung aller Untereinheiten ist wohl nur unter der

Annahme verständlich, daß die Bildung einer Virusmolekel ihren Ausgangspunkt von einer einzigen Untereinheit nimmt, aus der dann durch eine Reihe identischer Verdopplungen die vollständige Molekel entsteht,

Es zeigt sich also, daß durch eine genaue Konstitutionsermittlung der Virusarten sichere experimentelle Grundlagen für die theoretische Deutung der Selbstvermehrung der Virusarten und damit der Lebewesen überhaupt gewonnen werden. Darüber hinaus wird es bei einer genauen Kenntnis der Konstitution der Virusarten möglich sein, auch neue Ansatzpunkte für die Bekämpfung der Virus-Krankheiten bei Mensch, Tier und Pflanze zu finden.

Eingeg. 24. Januar 1944. [A. 4.]

Die diffusionsechten Farbbildner des Agfacolorfilms

Von Dr. W. SCHNEIDER, Dr. A. FRÖHLICH und Dr. H. SCHULZE

Aus den Wissenschaftl.-Farbenphotogr. Laboratorien der I. G. Farbenindustrie A.-G. AGFA, Wolfen

Von den beiden theoretisch denkbaren Möglichkeiten der Dreifarbenphotographie haben sich bis heute nur die subtraktiven Verfahren einen umfassenden und ständig steigenden Anwendungsbereich sichern können. Das sind Verfahren, bei denen das Licht Veränderungen an einer lichtempfindlichen Substanz — im allg. einem Silber-Salz — bewirkt; mit deren Hilfe in Sekundärprozessen entsprechende Farbstoffbilder erzeugt werden. Bei den älteren subtraktiven Dreifarbenverfahren bestanden die Sekundärprozesse meist in Ausbleich-, Virage- oder Tonungsprozessen. Der Anteil der organischen Chemie beschränkte sich dabei im wesentlichen auf die Lieferung geeigneter Farbstoffe aus vorhandenen Sortimenten. Für eine universelle Anwendung waren diese Verfahren viel zu kompliziert.

Nun waren zwar schon seit einigen Jahrzehnten vor allem von R. Fischer recht klare, wenn auch rein theoretische Vorstellungen über eine einfache Lösung der Dreifarbenphotographie entwickelt worden. Dabei sollten in drei unmittelbar übereinandergelagerten, für rotes bzw. grünes bzw. blaues Licht empfindlichen Schichten mit Hilfe von in diesen Schichten vorhandenen Verbindungen, den „Farbbildnern“, Farbstoffe erzeugt werden. Während nun die photographische und technische Seite dieser Vorstellungen entweder schon teilweise Gestalt gewonnen hatte oder durch Anpassen bekannter Farbbildungsreaktionen an die besonderen Bedingungen des photographischen Entwicklungsprozesses keine grundsätzlichen Schwierigkeiten zu bieten schien, blieb der entscheidende Teil der Aufgabe, nämlich die Verhinderung der Diffusion der Farbbildner von einer Schicht in die andere, ungelöst. Noch bis in die jüngste Zeit hinein finden wir in allen Veröffentlichungen¹⁾ die Ansicht vertreten, daß diese Diffusionsechtheit durch eine möglichst große Unlöslichkeit erzwungen werden soll, ohne daß dabei berücksichtigt wurde, daß dadurch nicht nur die Transparenz der hergestellten Schichten, sondern auch die Reaktionsfähigkeit des Farbstoffbildners herabgesetzt wird. Außerdem müssen Körper, die einer photographischen Schicht zugesetzt werden sollen, indifferent gegenüber der Emulsion und den Sensibilisierungsfarbstoffen sein. Weiter verlangen die Ansprüche an Löslichkeit, Eigenfarbe und Reaktionsfähigkeit eine eingehende Berücksichtigung. Solche Körper gab es nicht und ebensowenig irgendwelche Arbeiten, die erlaubt hätten, Schlüsse auf die mutmaßliche Konstitution derartiger Verbindungen zu ziehen.

Im folgenden soll ein Überblick über den bisher nur zum Teil aus Patentschriften bekanntgewordenen Weg gegeben werden, der zur Synthese der diffusionsfesten Farbbildner des Agfacolorfilms führte.

Aufbau des Agfacolorfilms.

Zunächst seien kurz Aufbau und Wirkungsweise des Agfacolor-Verfahrens²⁾ vorangestellt.

Das nachstehende Schema (Abb. 1) gibt einen Querschnitt durch den Agfacolorfilm.

Auf einer Seite eines Schichtträgers befinden sich drei für verschiedene Teile des Spektrums empfindliche Halogen-

silber-Schichten unmittelbar übereinandergelagert, deren jede einen diffusionsfesten Farbbildner enthält. Außerdem befindet sich zur besseren Farbtrennung zwischen oberster und zweiter Schicht ein Gelbfilter. Durch eine einzige Entwick-

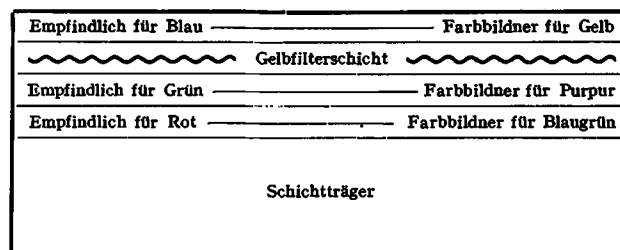
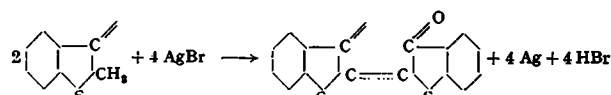


Abb. 1. Querschnitt durch den Agfacolorfilm.

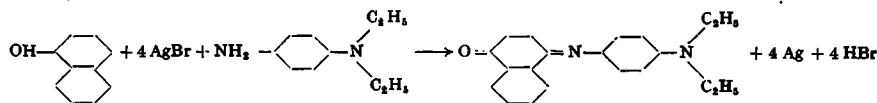
lung mit einem Farbbildner entstehen gleichzeitig in allen drei Schichten Farbstoff- und Silber-Bilder. Nach Bleichen der Silber-Bilder mit einem Oxydationsmittel werden die gebildeten Silber-Salze und das nicht angegriffene Rest-Halogen-silber in allen Schichten gleichzeitig herausgelöst, und man erhält ein reines subtraktives Dreifarbenbild, da auch die Gelbfilterschicht durch die Behandlungsbäder mit entfernt wird.

Stand der Technik bis zum Beginn der Arbeiten.

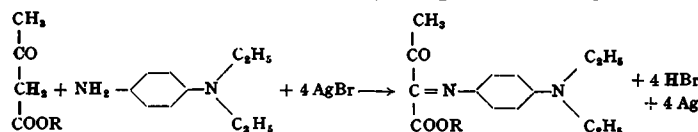
Das Agfacolor-Verfahren macht von der Farbstoffbildungsreaktion Gebrauch, die von Rudolf Fischer aufgefunden und in der deutschen Patentschrift 253 335 aus dem Jahre 1912 beschrieben wurde. Fischer hatte den Anwendungsbereich von Homolhas Entdeckung³⁾ der farbigen Entwicklung beträchtlich erweitert, indem er statt nur eines Farbbildners deren zwei auf das belichtete Halogensilber einwirken ließ. Homolha arbeitete z. B. nach Gl. 1:



während der von Fischer aufgefundenen Prozeß nach Gl. 2 verläuft:



Fischer schlug auch vor, nach Einbeziehung der von Sachs aufgefundenen Azomethin-Reaktion⁴⁾ entsprechend Gl. 3:



mit drei „Farbbildnern“ und einem Entwickler die drei subtraktiven Teilfarben Gelb, Purpur und Blaugrün herzustellen und den von ihm aufgefundenen Entwicklungsprozeß auf das zuerst von Ducos du Hauron angegebene Prinzip der subtraktiven Farbenphotographie zu übertragen. Nach seinen An-

¹⁾ K. u. L. Schinzel: Das Lichtbild, Ausgabe 2, XII, S. 19, September 1936 (vgl. auch Brit. Pat. 508 762, Prior. v. 7. Juli 1936).

²⁾ W. Schneider, Chemiker-Ztg. 65, 369 [1941].

³⁾ Photogr. Korresp. 1907, 55.

⁴⁾ P. Ehrlich u. F. Sachs, Ber. dtsch. chem. Ges. 32, 2341 [1899].