

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

71. Jahrgang · Nr. 2 · Seite 53–92 · 21. Januar 1959

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

Die Bedeutung der Nucleinsäuren für die Virus-Vermehrung

Von Prof. Dr. G. SCHRAMM

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

Nach einem Vortrag auf der Festsitzung der GDCh in Wiesbaden am 29. September 1958

Im Vergleich mit den Organismen, als deren Grundform wir die Zelle betrachten dürfen, sind die Viren sehr einfach gebaut. Sie unterscheiden sich äußerlich von den Organismen durch ihre geringe Größe sowie durch das Fehlen eines eigenen Stoffwechsels. Sie sind nicht in der Lage, Stoffe und Energien der unbelebten Natur für ihr Wachstum nutzbar zu machen, sondern sie können sich nur in lebenden Zellen vermehren. Infolge des einfachen Aufbaus der Viren ist ihre Vermehrung übersichtlicher als die Zellteilung. Die Einzelheiten der Struktur und des Vermehrungsmechanismus der Viren werden u. a. am Tabakmosaikvirus näher dargelegt.

Bedeutung der Nucleinsäuren für die Vermehrung der Organismen

Bei der Teilung einer Zelle wird nicht jeder Zellbestandteil unmittelbar verdoppelt. Wir unterscheiden zwischen selbstvermehrungsfähigen Einheiten und solchen, die sekundär in der Tochterzelle wieder gebildet werden. Zu den selbstvermehrungsfähigen Bestandteilen gehören vor allem die in den Kernen liegenden Chromosomen und unter Umständen gewisse Bestandteile des Plasmas, wie die Plastiden der Pflanzenzellen. Diese sind vor anderen Zellbestandteilen dadurch ausgezeichnet, daß sie sich identisch verdoppeln können und in der Lage sind, das Wachstum der neu entstehenden Zelle derart zu steuern, daß wieder ein der Mutterzelle entsprechender Organismus entsteht. In diesen Elementen sind die Erbfaktoren enthalten, die das äußere Erscheinungsbild im Laufe der Entwicklung bestimmen. Bei den vielzelligen Organismen ist die Spezialisierung noch weiter getrieben, indem nur bestimmte Zellen, nämlich die Geschlechtszellen, der Fortpflanzung dienen, während der übrige Organismus nur insofern an der Fortpflanzung beteiligt ist, als er Ernährung, Reifung und Vereinigung der Geschlechtszellen sichert. Die Grundfrage bei der Vermehrung und dem Wachstum komplizierter Organismen läuft also darauf hinaus, wie sich die Träger der Erbfaktoren vermehren und wie sie es fertig bringen, das Wachstum zu steuern. Um sich die erstaunliche Leistung dieser Erbfaktoren klar zu machen, muß man sich vor Augen halten, daß in der mikroskopisch kleinen Samenzelle, etwa eines größeren Säugetieres, die im Laufe vieler Millionen Jahre entwickelten Erbmerkmale enthalten sein müssen, um in jeder Generation wieder ausgeprägt zu werden. Schätzungen über die Zahl der Erbfaktoren, die das äußere Erscheinungsbild eines vielzelligen Organismus bestimmen, liegen in der Größenordnung von 10^4 bis 10^5 . Man hat berechnet, daß sämtliche in der heutigen Menschheit wirksamen Erbfaktoren sich in einem Raum unterbringen ließen, der nicht viel größer als ein Stecknadelkopf ist.

Für den Biochemiker erhebt sich nun die Frage, wie die Substanz beschaffen ist, die diese einzigartige Leistung vollbringt. Alle selbstvermehrungsfähigen Zellelemente sind chemisch dadurch gekennzeichnet, daß sie Nuclein-

säuren enthalten. Bekanntlich unterscheidet man zwischen zwei Typen von Nucleinsäuren, der Desoxyribonucleinsäure (DNS) und der Ribonucleinsäure (RNS). Die DNS findet sich fast ausschließlich in den Chromosomen des Kerns, während die RNS sowohl im Kern als auch im Zellplasma vorkommt. Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, daß die DNS der Träger der Erbfaktoren ist. Die Menge an DNS im Zellkern ist jeweils der Menge an genetischem Material proportional und z. B. in diploiden Zellen doppelt so hoch wie in haploiden, was für andere Komponenten des Zellkerns nicht der Fall ist. Besonders beweiskräftig für die Gennatur der DNS sind die klassischen Transformationsversuche von Avery und Mitarbeitern¹⁾, denen es gelang durch DNS, die aus einem Bakterienstamm gewonnen wurde, erbliche Eigenschaften auf einen anderen Stamm zu übertragen²⁾.

Das Molgewicht der DNS ist je nach der Herkunft verschieden, erreicht aber Werte von 8 bis $10 \cdot 10^6$. Die Struktur der DNS kann heute als weitgehend aufgeklärt gelten. Nach Watson und Crick³⁾ besteht die DNS aus zwei umeinander gewundenen Nucleotidketten, von denen jeweils eine der anderen komplementär ist. Aus räumlichen und Bindungsgründen steht jeweils dem Adenin das Thymin und dem Guanin das Cytosin gegenüber. In speziellen Fällen, z. B. in den Bacteriophagen, kann Cytosin durch 5-Hydroxy-methylcytosin, bzw. dessen Glykoside ersetzt sein. Infolge der Doppelstrang-Struktur ist die DNS-Moleköl verhältnismäßig starr, was sich vor allem in der hohen Eigenviscosität bemerkbar macht. Die identische Verdopplung geschieht wahrscheinlich in der Weise, daß der Doppelstrang auseinanderweicht und jede Hälfte sich wieder zu dem ursprünglichen Doppelstrang ergänzt. Das wird vor allem durch neuere Versuche bewiesen, bei denen das genetische Material durch geeignete Isotope markiert wurde^{4, 5)}. Meselson und Stahl⁶⁾ untersuchten durch Zentrifugieren in einem Dichtegradienten die Verteilung von

¹⁾ T. Avery, C. M. McLeod u. M. McCarty, J. exp. Medicine 79, 137 [1944].

²⁾ Übersicht s. bei S. Zamenhof: Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, Pergamon Press, London 1957, Bd. 6, S. 85.

³⁾ J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature [London] 171, 737 [1953].

⁴⁾ J. H. Taylor, P. S. Woods u. W. L. Hughes, Proc. nat. Acad. Sci. 43, 122 [1957].

⁵⁾ M. Meselson u. F. W. Stahl, ebenda 44, 671 [1958].

mit ^{15}N markierter DNS in einer Population von *Escherichia coli*, die in einem ^{14}N -haltigen Medium gezüchtet worden war. Sie fanden, daß der ^{15}N der DNS bei der Reduplikation gleichmäßig auf zwei Untereinheiten verteilt wird und daß jede Tochtermoleköl die Hälfte der Muttermoleköl erhält. Die markierte Untereinheit, die einem Einzelstrang entspricht, wird bei den nachfolgenden Teilungen als Ganzes weiter gegeben.

Umstrittener ist die Frage, wie die DNS ihre zweite Funktion erfüllt, nämlich den Aufbau der Zelle zu lenken. Diese Steuerung erfolgt wahrscheinlich über mehrere Zwischenstufen, wobei dem zweiten Typ der Nucleinsäuren, der RNS eine wichtige Funktion zukommt. Die Stufenfolge läßt sich etwa durch folgendes Schema wiedergeben:

DNS → RNS → Enzymproteine → Kohlenhydrate, Fette und übrige Bausteine.

Nach unseren heutigen Kenntnissen ist für die Übertragung der Eigenschaften die Reihenfolge der Nucleotide in der DNS maßgebend. Der einem Gen entsprechende Abschnitt auf der DNS erzeugt auf eine bisher noch ungeklärte Weise eine spezifische RNS, die wiederum durch eine besondere Reihenfolge ihrer Nucleotide gekennzeichnet ist. Nach neueren Untersuchungen besteht ein gewisser Zusammenhang zwischen der Basenzusammensetzung der DNS und der von dieser erzeugten RNS^{6, 7}. Die RNS kontrolliert ihrerseits die Bildung eines spezifischen, biologisch wirksamen Proteins, z. B. eines Enzyms. Die Menge, Art und das zeitliche Auftreten des Enzyms bestimmen die Ausbildung der übrigen Bestandteile und damit auch die Form des Organismus⁸). Diese Steuerungsfunktion der Proteine war schon seit langem bekannt. Auf ihr beruht auch ihr Name, der sich von dem griechischen Wort $\pi\varphi\omega\tau\epsilon\tau\epsilon\tau\gamma$ = die erste Rolle spielen ableitet. Nach der Entdeckung, daß die Struktur der Proteine ihrerseits durch die Nucleinsäuren bestimmt ist, ist dieser Name eigentlich nicht mehr zutreffend.

Bedeutung der Nucleinsäuren für die Vermehrung der Viren

Vergleichen wir nun die Virusvermehrung mit der Zellelemente, so ergeben sich eine Reihe von Übereinstimmungen. Als wichtigste Tatsache ist hervorzuheben, daß alle Viren Nucleinsäuren entweder vom DNS- oder vom RNS-Typ enthalten⁹). DNS findet sich u. a. in den einfachen Pflanzenviren, sowie in den kleineren tierpathogenen Viren vom Poliomyelitis oder Encephalitis-Typ, ferner in den Viren der Myxo-Gruppe, zu der das Virus der Influenza und die Geflügelpest-Viren gehören. DNS findet man in den größeren Säugetieviren vom Typ des Vaccine-Virus, in den Polyeder- und Kapselviren der Insekten, ferner in den Bacteriophagen. Es ist anzunehmen, daß die Virusnucleinsäuren sich an Stelle der normalen Nucleinsäuren in das oben angegebene Schema einschalten können. Statt der Zellbestandteile können nun virus-spezifische Substanzen gebildet werden. Die Viren unterscheiden sich von den endogenen nucleinsäure-haltigen Zellelementen dadurch, daß sie die Zelle, in der sie gebildet werden, spontan verlassen können, in eine andere Zelle eindringen und sich dort wiederum aufs neue vermehren. Dies wird dadurch ermöglicht, daß sie neben der Nucleinsäure eine Hülle be-

sitzen, die dem Eindringen und dem Schutz der empfindlichen Nucleinsäure außerhalb der Zelle dient. Die Hülle weist bei den einzelnen Viren eine verschiedene Differenzierung auf. Im Gegensatz zu den komplizierten tierpathogenen Viren sind die Pflanzenviren, z. B. das Tabakmosaikvirus (TMV) nicht in der Lage, aktiv die unverletzte Zellmembran zu durchdringen. Eine Infektion erfolgt nur, wenn die Zellmembran durchlöchert wird. Innerhalb der Pflanzen können sich diese Viren ohne weiteres von Zelle zu Zelle ausbreiten, da in der Pflanze die Zellen durch Plasmabrücken miteinander verbunden sind und keine Membran überwunden werden muß. Die Proteinhülle hat in diesem Fall wahrscheinlich nur eine Schutzfunktion.

Die Forschung der letzten Zeit läßt für alle Viren immer deutlicher ein allgemeines Aufbauprinzip erkennen. Wir finden im Innern der Virusteilchen Nucleinsäure oder nucleinsäure-reiche Partikel, die für den eigentlichen Vermehrungsvorgang verantwortlich sind. Die äußere Hülle besteht bei den einfachen Viren nur aus Protein, bei den komplizierteren finden wir daneben auch Kohlenhydrate und Lipoide. Neuere Untersuchungen an einigen sehr unbeständigen Pflanzenviren vom Typ des Gurkenvirus 1 lassen es möglich erscheinen, daß es auch Viren ohne Proteinhülle gibt, die also nur aus RNS bestehen.

Untersuchungen am Tabakmosaikvirus

Von den einfachen RNS-haltigen Viren ist das Tabakmosaikvirus (TMV) besonders gut untersucht. Es ist eine stäbchenförmige Partikel mit einer Länge von 3000 Å, einem mittleren Durchmesser von 150 Å und einem Molekulgewicht von 40 Millionen¹⁰). Es besteht aus einem Ribonucleinsäure-Faden, der 5,6% des Gesamtgewichts ausmacht und von einer relativ einfach gebauten Proteinhülle umgeben ist. In schwach alkalischer Lösung dissoziiert das Protein von der RNS. Es zerfällt hierbei in Untereinheiten mit einem Molekulgewicht von etwa 100000. Beim Ansäuern der Lösung vereinigt sich dieses sogenannte A-Protein wieder zu Stäbchen, die in ihrer Struktur dem ursprünglichen Virus entsprechen, jedoch keine RNS enthalten und daher nicht mehr vermehrungsfähig sind¹⁰). Chemische Untersuchungen, insbesondere mit Hilfe der Endgruppenbestimmung, zeigten, daß das A-Protein mit dem Molekulgewicht 100000 noch nicht die kleinste Untereinheit des TMV-Proteins ist. Als Grundbaustein ist eine Peptidkette anzusehen, die aus etwa 150 Aminosäuren besteht und ein Molekulgewicht von rund 17000 besitzt. Die vollkommene Strukturaufklärung dieses Peptids steht noch aus. Alle bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, daß die Reihenfolge in jeder der insgesamt 2300 Untereinheiten dieselbe ist¹¹). Die Anordnung dieser Untereinheiten in der Virus-Moleköl konnte durch Röntgenuntersuchungen aufgeklärt werden. Nach den Untersuchungen von Franklin und Mitarbeitern¹¹) sind die Untereinheiten schraubenförmig aneinander gelegt, so daß ein Protein-Hohlzylinder entsteht. In diesen ist die Nucleinsäure eingelagert, die sich den durch die Protein-Untereinheiten gegebenen Windungen anpaßt (Abb. 1). Durch teilweise Entfernung der äußeren Proteinhülle konnte der Nucleinsäure-Faden im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden^{12, 13}). Wenn man die Virusteilchen mit einer kontrastreichen Salzlösung behandelt, kann der im Innern verlaufende Hohlkanal im

⁶) G. Zubay, Nature [London] 182, 112 [1958].

⁷) A. N. Belozersky u. A. S. Spirin, ebenda 182, 111 [1958].

⁸) Ausführliche Literaturangaben bei G. Schramm: Die identische Reproduktion der Proteine, Handb. d. Pflanzenphysiologie, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, Bd. VIII, S. 452 und: Der Mechanismus der identischen Reproduktion, ebenda, Bd. XIV, im Druck.

⁹) Ausführliche Literaturangaben bei G. Schramm, Annu. Rev. Biochem. 27, 102 [1958].

¹⁰) G. Schramm, Naturwissenschaften 31, 94 [1943].

¹¹) R. E. Franklin, A. Klug u. K. C. Holmes: Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses, Churchill Ltd., London 1957.

¹²) G. Schramm, G. Schumacher u. W. Zillig, Z. Naturforsch. 10b, 481 [1955].

¹³) R. G. Hart, Proc. nat. Acad. Sci. 41, 261 [1955].

Elektronenmikroskop abgebildet werden^{14, 15}). Es gelang auch¹⁵), Ultradünnsschnitte des TMV herzustellen, in denen der innere Hohlzylinder deutlich sichtbar wird.

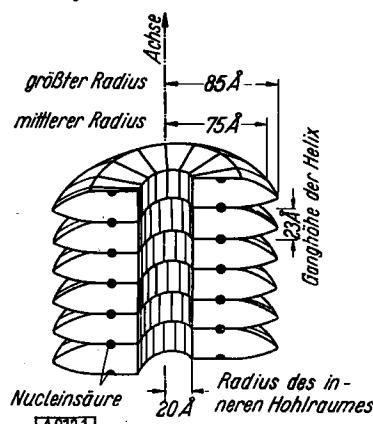


Abb. 1. Aufbau des Tabakmosaik-Virus nach R. Franklin
(nähere Einzelheiten vgl. diese Ztschr. 69, 196 [1957])

Nach diesen Studien über den Aufbau des TMV gelang es schließlich, auch Einblick in die Funktion der einzelnen Komponenten zu erhalten. Es konnte auf direktem Wege gezeigt werden, daß für die Vermehrung allein die Ribonucleinsäure verantwortlich ist. Schramm, Schumacher und Zillig¹²) fanden zunächst, daß Teilchen, bei denen die Proteinhülle teilweise entfernt war, noch infektiös waren. Dies führte zu der Vermutung, daß mindestens der größte Teil des Proteins für den Infektionsvorgang nicht notwendig ist. Um diese Ansicht weiter zu stützen, wurde nach Methoden gesucht, um das Protein vollständig zu entfernen, ohne die Nucleinsäure zu zerstören. Dies gelang uns durch Extraktion der Viruslösung mit Phenol. In diesem Lösungsmittel ist das Protein leicht löslich, während die Nucleinsäure in der wäßrigen Phase verbleibt¹⁶). In gemeinsamen Versuchen mit Gierer¹⁷) wurde festgestellt, daß die protein-freie RNS für sich allein noch infektiös ist, und durch eine Reihe von Kontrollen konnte einwandfrei gesichert werden, daß diese Infektiosität nicht auf einer Beimengung von intakten Virusteilchen oder von Virusprotein beruht. Unabhängig von uns gelang es Fraenkel-Conrat und Mitarbeitern¹⁸), das Protein durch eine Behandlung mit Netzmitteln, z. B. Natrium-dodecylsulfat, abzutrennen und eine infektiöse RNS zu erhalten. Die Infektiosität der reinen RNS ist etwa 500 mal geringer als die der gleichen Menge RNS im TMV. Fraenkel-Conrat¹⁹) und Mitarbeiter konnten jedoch durch Wiedervereinigung der RNS mit dem A-Protein die Infektiosität beträchtlich steigern. Es ist also anzunehmen, daß die geringe Infektiosität nur darauf beruht, daß ein Teil der ungeschützten RNS beim Eindringen in die Zelle zerstört wird. Die RNS des TMV kann also ebenso wie die DNS der Zellkerne als genetisches Material dienen. Der Einfluß auf die spezifische Proteinsynthese ist sogar entsprechend dem oben angegebenen Schema direkter als bei der DNS.

Für die infektiöse RNS aus TMV wurde ein Molgewicht von 2,3 Millionen bestimmt; dies entspricht dem gesamten RNS-Gehalt eines TMV-Teilchens^{20, 21}). In einem Virus sind insgesamt 6000 Nucleotide enthalten, die zu einem

¹⁴) H. E. Huxley: Proc. Conf. Electron Microscopy, Stockholm 1956, Academic Press, New York 1957, S. 260.

¹⁵) H. Fernandez-Moran u. G. Schramm, Z. Naturforsch. 13b, 67 [1958].

¹⁶) H. Schuster, G. Schramm u. W. Zillig, ebenda 11b, 339 [1956]; A. Gierer u. G. Schramm, Nature [London] 177, 702 [1956]; Z. Naturforsch. 11b, 138 [1956].

¹⁷) H. Fraenkel-Conrat, B. Singer u. R. C. Williams, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 25, 87 [1957].

¹⁸) H. Fraenkel-Conrat u. B. Singer: Symp., 4. Internat. Kongreß f. Biochemie, Wien 1958.

¹⁹) A. Gierer, Nature [London] 179, 1297 [1957].

²⁰) A. Gierer, Z. Naturforsch. 13b, 477, 485 [1958].

einzigem Strang vereinigt sind. Gierer hat infektiöse RNS mit Ribonuclease gespalten. Hierbei zeigte sich, daß bereits ein einziger Bruch genügt, um die Infektiosität zu zerstören. Bruchstücke des Strangs sind nicht mehr infektiös. Aus der Kinetik der Abbaureaktion ergab sich weiterhin zwingend, daß die RNS aus TMV im Gegensatz zur DNS aus einer einzigen Nucleotidkette besteht. Jede Spaltung einer Phosphat-Brücke führt zu einer Verkürzung der Kette, was bei einem Mehrstrang-Modell nicht der Fall ist, da die Bruchstücke durch die Nachbarkette zusammengehalten werden. Ein Mehrstrang-Modell der RNS ist auch deswegen nicht möglich, weil die Kette dann zu kurz wäre, um das gesamte TMV-Teilchen entsprechend dem Franklin-Modell schraubenförmig zu durchlaufen. Das Einstrang-Modell erklärt auch viele andere Tatsachen, z. B. die viel geringere Viscosität gegenüber einer DNS gleicher Größe, sowie die größere Aggregationstendenz. Aus den Versuchen von Gierer geht eindeutig hervor, daß für die Infektiosität die intakte Nucleotidkette erforderlich ist.

Im gleichen Sinne sprechen auch chemische Versuche, die von Schuster und Schramm²²) ausgeführt wurden. Durch Behandlung der RNS mit HNO_2 gelingt es, die Amino-Gruppen der basischen Reste in die Hydroxyl-Gruppen zu verwandeln, ohne daß eine Spaltung der Nucleotidkette eintritt. Hierbei wird Adenin in Hypoxanthin, Guanin in Xanthin und Cytosin in Uracil verwandelt. Durch Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der einzelnen Basen und gleichzeitige Messung der Inaktivierungsgeschwindigkeit wurde gefunden, daß die Umwandlung eines von 3000 Nucleotiden genügt, um die RNS zu inaktivieren. Da der RNS-Strang insgesamt 6000 Nucleotide enthält, ist also mindestens die Hälfte aller Nucleotide für die Vermehrungsfähigkeit der RNS notwendig und eine Änderung dieser Bausteine führt zum Verschwinden der Vermehrungsfähigkeit.

Gleichzeitig lassen diese Versuche die Möglichkeit offen, daß bei einem gewissen Teil der Nucleotide eine Desamierung nicht zu einer Inaktivierung, sondern zu einer Änderung der biologischen Eigenschaften unter Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit führt^{23, 24}). Die RNS des TMV oder auch dieses selbst wurden in geeigneter Weise mit HNO_2 umgesetzt und die aus dieser veränderten RNS hervorgegangenen Teilchen einzeln untersucht. Es zeigte sich tatsächlich, daß die chemische Umsetzung zu Mutanten des TMV führte. Die Zahl der auftretenden Mutanten ist erstaunlich groß. Selbst bei verhältnismäßig geringen Umsetzungen werden über 80% erblich veränderte Stämme gefunden. Die quantitative Durchrechnung ergibt, daß die Veränderung eines einzigen Nucleotids genügt, um entweder die Molekel zu inaktivieren oder zu mutieren und daß somit jedes einzelne Nucleotid für die Funktion der RNS von Bedeutung ist. Es ist damit zum erstenmal gelungen, unmittelbar durch eine definierte chemische Änderung einer genetischen Substanz im Reagenzglas erbliche Änderungen zu erreichen.

Untersuchungen an anderen Viren

Es gelang nun, die beim TMV bewährte Phenol-Methode auch auf andere Viren zu übertragen. Bei verschiedenen tierpathogenen Viren, so beim Virus der Poliomyelitis^{25, 26}) und verwandten Viren^{27, 28}), bei einem Encephalitis-

²²) H. Schuster u. G. Schramm, Z. Naturforsch., im Druck.

²³) A. Gierer u. K. W. Munday, Nature [London], im Druck.

²⁴) K. W. Munday u. A. Gierer, Z. Vererbungsforsch., im Druck.

²⁵) J. S. Colter, H. H. Bird, A. W. Moyer u. R. A. Brown: Virology 4, 522 [1957].

²⁶) H. E. Alexander, G. Koch, I. M. Mountain, K. Sprunt u. O. van Damme ebenda 5, 172 [1958].

²⁷) J. S. Colter, H. H. Bird u. R. A. Brown, Nature [London] 179, 859 [1957].

²⁸) R. M. Franklin, E. Wecker u. C. Henry, Virology, im Druck.

Viren^{30, 30, 31)} und neuerdings auch beim Virus der Maul- und Klaue- und Schleimhautseuche^{32, 33)}, konnte durch Extraktion mit Phenol infektiöse, protein-freie RNS hergestellt werden. Auch bei diesen Viren ist also allein die RNS für den Vermehrungsprozeß verantwortlich. Bemerkenswert ist, daß, soweit dies geprüft wurde, die infektiöse RNS stets ein Molgewicht von rund 2 Millionen besitzt, also etwa die gleiche Größe hat wie beim TMV. Interessanterweise findet sich eine RNS gleicher Größe auch in normalen Zellen verschiedener Herkunft, z. B. in den Lebermikrosomen³⁴⁾. Man gewinnt den Eindruck, daß für die Synthese zelleigner oder zellfremder Proteine in der Zelle eine bestimmte Größe der RNS bevorzugt wird. Vielleicht steht hiermit im Zusammenhang, daß man auch bei den Proteinen die Bevorzugung bestimmter Molgewichte bzw. einfacher Vielfacher davon feststellen kann.

Bei einigen anderen tierpathogenen Viren aus der Gruppe der Influenza und der Geflügelpest ist es bisher noch nicht gelungen, eine infektiöse RNS herzustellen. Ob dies lediglich methodisch bedingt ist, oder ob bei diesen kompliziert zusammengesetzten Viren noch andere Stoffe als Induktoren der Virussynthese benötigt werden, bleibt abzuwarten.

Unter den DNS-haltigen Viren liegen die klarsten Ergebnisse bei den Phagen vor. Durch radioaktive Markierung des DNS- und des Proteinanteils konnten Hershey und Chase³⁵⁾ zeigen, daß beim Infektionsvorgang nur die im Innern der Phagen befindliche DNS in die Wirtszelle injiziert wird, während die reine Proteinhülle im Außenmedium verbleibt. Die genetische Information, die für den Aufbau der folgenden Phagen-Generationen notwendig ist, ist demnach nur in der DNS enthalten. Neue Versuche zeigen, daß die DNS nicht unmittelbar die Proteine der Phagenhülle erzeugt, sondern daß auch hier eine RNS dazwischen geschaltet ist³⁶⁾. Der Versuch, Bakterien direkt mit reiner isolierter Phagen-DNS zu infizieren, ist allerdings bisher noch nicht gelungen. Nach Entfernung der Bakterienmembran ist es jedoch möglich, die Zelle mit Extrakten zu infizieren, die neben DNS noch andere Bestandteile der Phagen enthalten³⁷⁾.

Funktion der Ribonucleinsäure beim Infektionsvorgang

Die Erkenntnis, daß die Nucleinsäure der eigentlich selbstvermehrungsfähige Bestandteil der Viren ist, führt nun auch zu einer klareren Auffassung über den Vermehrungsmechanismus der Viren. Die Vorgänge, die sich nach dem Eindringen des Virusteilchens in der Zelle abspielen, sind sehr schwer zu untersuchen, da hierbei der gesamte Stoffwechsel und die Enzymausstattung der Wirtszelle beteiligt ist. An einigen Beispielen aus eigenen Untersuchungen am TMV sei gezeigt, welche neuen experimentellen Möglichkeiten sich ergeben. Es war anzunehmen, daß das Abstreifen der Proteinhülle, wie wir es im Reagenzglas ausführen, auch beim natürlichen Infektionsvorgang vor sich geht. Beim TMV wie bei den meisten anderen Viren stellt man fest, daß kurz nach der Infektion das Virus nicht mehr in seiner ursprünglichen Form vorliegt, es kann als solches nicht mehr in der infizierten Zelle nachgewiesen werden. Man nennt diese Periode, in der das Virus scheinbar nicht vorhanden ist, Eclipse oder Latenzzeit. Ver-

³⁰⁾ E. Wecker u. W. Schäfer, Z. Naturforsch. 12b, 415 [1957].

³¹⁾ E. Wecker, Virology, im Druck.

³²⁾ E. Wecker, Z. Naturforsch., im Druck.

³³⁾ F. Brown, R. F. Selles u. D. L. Stewart, Nature [London] 182, 535 [1958].

³⁴⁾ M. Musgäy u. K. Strohmeyer, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh., im Druck.

³⁵⁾ A. Gierer, Z. Naturforsch., im Druck.

³⁶⁾ A. D. Hershey u. M. Chase, J. gen. Physiol. 36, 39 [1952].

³⁷⁾ E. Volk, Symp., 4. Internat. Kongr. f. Biochemie, Wien 1958.

³⁸⁾ J. Spizizen, Proc. nat. Acad. Sci. 43, 694 [1957].

suche von Schramm und Engler³⁸⁾ zeigten, daß die Latenzperiode des TMV unter gewissen Standardbedingungen im türkischen Tabak etwa 30 Stunden beträgt. Vor Ablauf dieser Latenzperiode ist auch mit den empfindlichsten biologischen Testmethoden kein vollständiges Virus nachzuweisen. Nach Ablauf dieser 30 Stunden setzt dann die Bildung des fertigen Virus mit großer Geschwindigkeit ein, um dann später wieder abzuklingen. Da für das Abstreifen der Proteinhülle eine gewisse Zeit erforderlich ist, war zu erwarten, daß bei der Infektion mit freier RNS die Latenzperiode verkürzt wird. Wir fanden nun, daß bei Infektion mit RNS der Anstieg der Viruskonzentration im Blatt 10 Stunden früher erfolgt als bei der Infektion mit dem vollständigen Virus. Damit ist ein Teil der Latenzperiode erklärt. Es bleibt nun zu untersuchen, was in den restlichen 20 Stunden geschieht, bevor das Virus fertiggestellt ist. Wir vermuten, daß zunächst einmal eine Vermehrung der RNS eintritt. Diese Ansicht ließ sich durch eine entsprechende Versuchsanordnung stützen. Zunächst findet ein Anstieg der freien infektiösen RNS statt, die Proteinsynthese setzt etwas später ein, erreicht dann aber eine höhere Geschwindigkeit als die der RNS-Produktion³⁹⁾. Das gebildete Protein vereinigt sich mit der RNS zum fertigen Virus. Da mehr Protein als RNS zur Verfügung steht, wird schließlich der größte Teil der vorhandenen freien RNS mit Protein umhüllt und zum fertigen Virus vereinigt.

Es erhebt sich die Frage, an welchen Zellstrukturen sich die einzelnen Teilprozesse abspielen. Um dies zu klären, wurden von Schramm und Röttger⁴⁰⁾ mit Hilfe der von Coons entwickelten Technik der fluoreszierenden Antikörper Untersuchungen an infizierten Tabakpflanzen unternommen. Man geht hierbei so vor, daß man den Antikörper gegen das TMV durch Bindung an Fluoreszein markiert. Der im Fluoreszenzlicht stark leuchtende Antikörper wird nun spezifisch an denjenigen Zellorten gebunden, an denen sich das entsprechende Antigen, also das Protein des TMV, findet. Orte, an denen keine Proteinsynthese abläuft, bleiben dunkel. Von dem infizierten Gewebe wurden im Gefriermikrotom Dünnschnitte hergestellt und diese mit dem fluoreszierenden Antikörper behandelt. Hierbei ergab sich klar, daß das Virusprotein nur im Cytoplasma vorhanden ist, die Zellkerne und die Chloroplasten, die ebenfalls als Orte der Proteinsynthese in Frage kämen, blieben dunkel. Über den Ort der RNS-Synthese läßt sich mit dieser Technik nichts aussagen, da die RNS nicht als Antigen wirkt und daher auch nicht mit entsprechenden Antikörpern reagieren kann. Hierüber geben jedoch Untersuchungen Auskunft, die von Zech⁴¹⁾ mittels der mikrospektrographischen Methode erhalten wurden. Er fand, daß nach der Infektion zunächst der RNS-Gehalt des Kerns, dann der des Cytoplasmas ansteigt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Untersuchungen ein vorläufiges Bild der Bildung des TMV in der Zelle. Beim Eindringen des Virusteilchens wird die Nucleinsäure in Freiheit gesetzt. Diese tritt in den Zellkern ein und wird dort vermehrt. Anschließend gelangt die RNS in das Cytoplasma und veranlaßt dort die Bildung des spezifischen Hüllproteins. In der Endphase vereinigt sich dann das Protein mit der RNS zu den fertigen Virus-Teilchen, die in der Lage sind, beim Eindringen in eine andere Wirtspflanze den Cyclus aufs neue zu beginnen. Die Ausbreitung des Virus von einer Zelle zur anderen in der

³⁸⁾ G. Schramm u. R. Engler, Nature [London] 181, 916 [1958].

³⁹⁾ G. Schramm u. R. Engler, unveröffentlicht.

⁴⁰⁾ G. Schramm u. B. Röttger, unveröffentlicht.

⁴¹⁾ H. Zech u. L. Vogt-Köhne, Naturwissenschaften 42, 327 [1955].

Wirtspflanze geschieht möglicherweise auf der Stufe der RNS. Weitere Arbeiten werden nötig sein, um diese Arbeitshypothese im einzelnen zu stützen. Insbesondere bleibt der feinere chemische Mechanismus der RNS-Entstehung und die Art, wie die entstandene RNS das Protein erzeugt, noch offen. Unsere rasch fortschreitenden Kenntnisse über die Biosynthese der Proteine lassen aber hoffen, daß wir auch über diese Fragen bald nähere Auskunft erhalten können.

Ähnliche Versuche, wie sie hier für das Tabakmosaikvirus beschrieben sind, sind auch bei den RNS-haltigen tierpathogenen Viren ausgeführt worden, so daß möglicherweise das für das TMV entwickelte Schema eine allgemeinere Geltung besitzt. Komplizierter liegen die Verhältnisse in den Fällen, in denen wir es nicht mit einem einzigen Hüll-

protein zu tun haben, sondern verschiedene Eiweißkomponenten in einem Virus vorkommen. Untersuchungen von Schäfer^{42, 43)} und Mitarbeitern zeigen, daß ein bestimmtes Nucleoproteid bereits im Kern gebildet wird, ein anderes Protein im Cytoplasma und daß die verschiedenen Komponenten dann in der Nähe der Zellmembran zu einem vollständigen Virus vereinigt werden. Die Synthese eines Virusproteins ist ein besonders übersichtliches Beispiel der Bildung eines spezifischen Proteins in der Zelle. Die in der Virusforschung erarbeiteten Ergebnisse dürften nicht nur für die Kenntnis der Viruskrankheiten, sondern ganz allgemein für die Grundlagen der Biologie von Bedeutung sein.

Eingegangen am 11. Oktober 1958 [A 913]

⁴²⁾ P. M. Breitenfeld u. W. Schäfer, Virology 4, 328 [1957].

⁴³⁾ W. Schäfer, Nova Acta Leopoldina 79, 38 [1957].

Koordinationserscheinungen in Elektrolytlösungen von Halogeniden und Oxyhalogeniden

Von Prof. Dr. techn. et phil. V. GUTMANN und cand. phil. M. BAAZ

Institut für Anorganische und Allgemeine Chemie der T. H. Wien

Zahlreiche Reaktionen, die in Lösungen von Halogeniden und Oxyhalogeniden zur Bildung von Komplexverbindungen führen, werden auf Halogenid-Ionen-Übergänge zurückgeführt. In den Lösungen wird die Bildung von Halogenid-Brücken angenommen. In Oxyhalogenid-Systemen tritt eine weitere Koordinationsmöglichkeit durch die Gegenwart von Sauerstoff hinzu. Die Konkurrenz der beiden Koordinationsgleichgewichte ist vermutlich für das verschiedene Verhalten von sauren und basischen Lösungen verantwortlich. Vor allem in konzentrierten Lösungen spielt auch die Assoziation der Metallchloride eine Rolle.

1. Einleitung

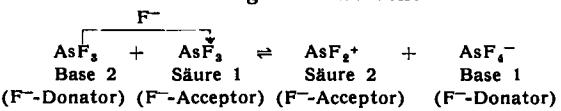
In den letzten Jahren wurden unsere Kenntnisse über Umsetzungen in nicht-wäßrigen Elektrolytsystemen durch Einbeziehung von Halogeniden und Oxyhalogeniden als Lösungsmittel beachtlich vermehrt¹⁻⁵⁾. Im Vordergrund der Untersuchungen standen dabei präparative Gesichtspunkte sowie die Behandlung von sog. Säure-Basen-Reaktionen. Letztere wurden analog zu Protonen-Übergängen in Wasser und anderen protonen-haltigen Lösungsmitteln in Form von Halogenidionen-Übergängen dargestellt⁶⁾. In Erweiterung der Brönstedschen Säure-Base-Definition wurde als Säure ein Anionen-Acceptor und als Base ein Anionen-Donator in diesen Lösungssystemen bezeichnet⁶⁾. Je nach der Natur des übergehenden Ions kann von fluoridotropen, chloridotropen oder bromidotropen Solvatosystemen gesprochen werden.

Bekanntlich werden in Wasser sowohl die Protonen-Übergänge, als auch die Koordinationsverhältnisse weitgehend durch den tetraedrischen Aufbau des Lösungsmittels bestimmt, der über Wasserstoff-Brücken zustande kommt. In Elektrolytlösungen hängen die Koordinationsverhältnisse in hohem Maße von der Gegenwart von Komplexbildnern und den gegenseitigen Konzentrationsverhältnissen ab.

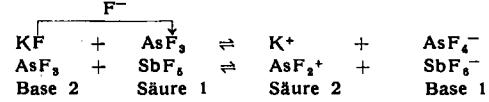
Hier soll der gegenwärtige Stand der Kenntnisse über Koordinationsverhältnisse in Lösungen solcher Halogenide und Oxyhalogenide erörtert werden, die als ionisierende Lösungsmittel fungieren.

2. Koordinationserscheinungen in Fluoriden

Woolf und Greenwood⁷⁾ haben Arsen(III)-fluorid als ionisierendes Lösungsmittel erkannt. Die in geringem Maße im reinen Solvens eintretende Bildung von Solvens-Ionen kann auf Fluoridionen-Übergänge zwischen (amphoteren) Solvens-Molekülen zurückgeführt werden:



Als guter Fluoridionen-Donator gegenüber dem Solvens fungiert z. B. Kaliumfluorid als Base (die Verbindung KAsF_4 kann aus den Lösungen gewonnen werden), während Antimon(V)-fluorid unter Aufnahme von Fluorid-Ionen das Hexafluoroantimonat-Ion bildet (saure Funktion).



Derartige Fluorid-Übergänge werden um so leichter eintreten, je geringer die damit verbundenen strukturellen Änderungen sind. Auf Grund des Raman-Spektrums stellt die Arsen(III)-fluorid-Molekel eine regelmäßige Pyramide dar⁸⁾, die auch als Tetraeder beschrieben werden kann, dessen vierte Ecke durch das einsame Elektronenpaar besetzt ist. Es ist möglich, daß zwei Arsen(III)-fluorid-Moleküle derart zusammentreten, daß nach Errichtung einer Fluor-Brücke eine trigonal bipyramidale Struktur einheitlich erkennbar wird, in der eine der drei äquatorialen Positionen durch das einsame Elektronenpaar eingenommen

⁷⁾ A. A. Woolf u. N. N. Greenwood, J. chem. Soc. [London] 1950, 2250.

⁸⁾ D. M. Yost u. J. E. Sherborne, J. chem. Physics 2, 125 [1935].