

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DES TABAKMOSAIKVIRUS

H. G. AACH

Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen (Deutschland)

(Eingegangen den 12. Juli, 1958)

SUMMARY

Immunochemical investigation on the structure of TMV

TMV shells which were free from nucleic acid were obtained by reaggregation of A-protein. It was possible to show by serological reactions at pH 5.6 (precipitation and absorption technique) that they possess the same antigen structure as the intact TMV. There were serological specificities on free A-protein which were lost after reaggregation and which were also absent from intact TMV. Thus they appear to be localised on those parts of the surface of the A-protein which were covered after reaggregation to the TMV shell. But on intact TMV and also on reaggregated A-protein we found a strong characteristic antigen component which is absent from free A-protein. This component must owe its specificity to the lines of contact between the A-protein particles which are combined to form the TMV shell. The newly formed bonds will be the basis for the additional specificity. Therefore the connections of the protein sub-units between the A-protein particles must be different from those within the A-protein. Provided that there is only one type of repeating sub-unit, this could be realised by assuming a mirror-like right-left symmetry in the double-peptide chains and in the A-protein as is schematically shown in Fig. 5.

EINFÜHRUNG

Durch Behandlung mit schwachen Alkalien kann das Tabakmosaikvirus (TMV) reversibel aufgespalten werden¹. Dabei löst sich die Eiweisschülle in Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von etwa 90,000 auf ("A-Protein"²), und die Nukleinsäure wird frei. Bei pH-Werten $< 5.8 > 2.5$ reaggregieren die A-Proteinteilchen wieder zu Stäbchen, die bei vorsichtiger Behandlung auch infektiöse RNS einschliessen können³. Ist das A-Protein vorher durch Aussalzen von der Nukleinsäure abgetrennt worden, kann es bei saurer Reaktion zu RNS-freien Stäbchen reaggregieren⁴. KRAMER UND WITTMANN⁵ zeigten, dass sich solche reaggregierten Hüllen elektrophoretisch genau so wie die intakten Viren verhalten. Die Nukleinsäure im Innern hat also auf die charakteristische Beweglichkeit des TMV keinen Einfluss. Die freien A-Proteine haben dagegen elektrophoretische Beweglichkeiten, die von denen der intakten Partikeln erheblich abweichen. Also werden offenbar bei der Aufspaltung Ladungen frei, die beim intakten und reaggregierten Stäbchen nicht wirksam sind.

* Heutige Adresse: Botanisches Institut der Universität, Köln-Lindenthal.

Erstmalig wurden die serologischen Eigenschaften des A-Proteins von FRIEDRICH-FREKSA⁶ untersucht. Er fand, dass das A-Protein im Präzipitintest ein wirksames Antigen ist als das intakte Virus, dass es aber nicht imstande ist, das Antiserum gegen intaktes Virus zu erschöpfen. Dieses Ergebnis wurde von STARLINGER⁷ bestätigt. STARLINGER zeigte, dass nicht etwa die Nukleinsäure für die Restaktivität verantwortlich ist, die nach Erschöpfung des TMV-Antiserums mit A-Protein nachweisbar bleibt, und folgerte, es könne demnach nur die Bindung der Nukleinsäure im Innern der Viruspartikeln sein, die auch das Aussenmuster so verändere, dass eine serologische Spezifität "intaktes Virus" aufträte. Nachdem KRAMER UND WITTMANN⁵ nunmehr gezeigt haben, dass das Vorhandensein oder das Fehlen der Nukleinsäure keinen Einfluss auf die Ladungsverhältnisse an der Oberfläche hat, erscheint diese Erklärung jedoch recht unwahrscheinlich. Eine Wiederholung der Versuche FRIEDRICH-FREKSA's unter Einbeziehung von Antiserum gegen A-Protein und der serologischen Reaktionen des reaggregierten A-Proteins wurde daher erforderlich.

METHODEN

Die Präzipitin- und Erschöpfungsteste wurden genau wie früher beschrieben⁸ bei 0 bis 2° durchgeführt. Die Darstellung des A-Proteins erfolgte vom TMV-Stamm *vulgare*⁹ bei 2° in Anlehnung an die Vorschriften von SCHRAMM² und FRAENKEL-CONRAT³ wie folgt: Die Viruslösung (1–3 %) wurde mit dem gleichen Volumen 0.1 M Glykokoll-NaOH-Puffer pH 10.4 versetzt und 24 h in demselben Puffer dialysiert. Zur Entfernung des ungespaltenen Restes wurde 60 min bei 100,000 g zentrifugiert und im Überstand das A-Protein durch Zugabe von 50 % des Volumens gesättigter ammoniakalischer Ammoniumsulfatlösung präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugieren bei 5,000 g wurde das Sediment in dem Glykokollpuffer wie vor aufgenommen und die Fällung noch zweimal wiederholt. Schliesslich wurde dialysiert und spektrophotometrisch die Abwesenheit von Nukleinsäure kontrolliert. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260–280 m μ lag stets unter 0.65. Das freie A-Protein wurde in physiologischer Kochsalzlösung verwandt, die mit 0.01 M Glykokoll bei pH 8.6 gepuffert war, reaggregiertes A-Protein in physiologischer Kochsalzlösung, die mit 0.01 M Azetat bei pH 4.5 gepuffert war. — Die beiden benutzten Antiseren gegen TMV hatten einen Antikörpergehalt von 6.7 bzw. 16.0 mg/ml, die beiden Antiseren gegen A-Protein 6.0 bzw. 6.9 mg/ml. — Die Stickstoffbestimmungen erfolgten nach dem Mikro-Kjeldahlverfahren.

ERGEBNISSE

Die Abhängigkeit der Menge der aus dem TMV-Antiserum ausgefällten Antikörper von der einpipettierten Menge Antigen ist in Fig. 1 dargestellt. Die Kurven, die sich mit einem zweiten Antiserum als reproduzierbar erwiesen, bestätigen die Befunde FRIEDRICH-FREKSA's⁶, dass das A-Protein anfangs ein wirksames Antigen als das homologe Virus ist. Mit steigenden Mengen des A-Proteins wird aber ungefähr bei 150 μ g Antigen-N auf 0.5 ml Antiserum der Sättigungspunkt erreicht. Bei noch grösseren A-Proteinmengen kommt es zur Bildung löslicher Komplexe, und die Menge präzipitierter Antikörper nimmt wieder ab. Dagegen stieg die Kurve für den ausgefällten Antikörper-N bei Verwendung von intaktem TMV als Antigen bis zu 250 μ g Antigen-N fast stetig an. Die Reaktionen des reaggregierten A-Proteins waren zwar

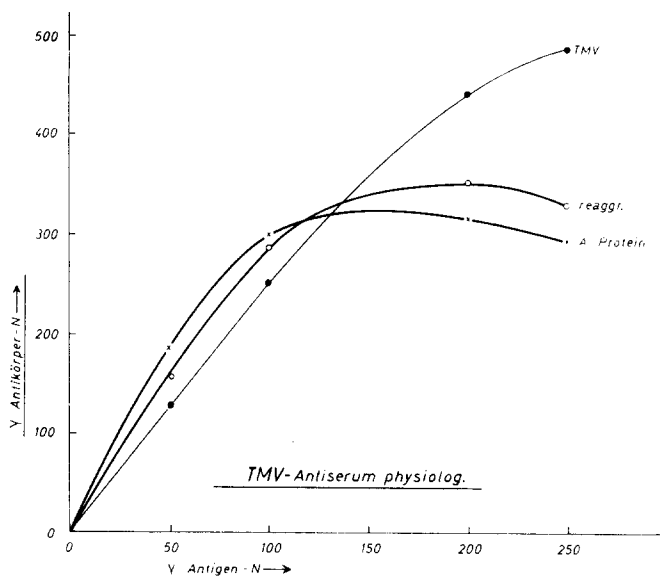


Fig. 1. Die aus je 0.5 ml eines Antiserums gegen intaktes TMV bei physiologischem pH-Wert (pH 7.9) durch steigende Antigenmengen ausgefällten Antikörper. Antigene: intaktes TMV, freies A-Protein und reaggregiertes A-Protein. Antikörpergehalt des Serums 6.7 mg/ml.

wenig, aber deutlich verschieden von denen des freien A-Proteins. Die Mengen ausgefällter Antikörper lagen jeweils zwischen denen für freies A-Protein und denen für intaktes Virus als Antigen. Im wesentlichen ähnelt der Kurvenverlauf des reaggregierten dem des freien A-Proteins. Deutlicher werden die Verhältnisse durch die Anwendung der Erschöpfungsmethode. 1.5 ml TMV-Antiserum wurden so lange mit A-Protein versetzt, bis keine Reaktion mehr stattfand. Nunmehr waren alle Antikörper, die Spezifitäten besaßen, die auch auf dem A-Protein vorkommen, ausgefällt. Versetzte man nunmehr das erschöpfte Antiserum mit dem homologen Antigen, intaktem Virus, trat eine starke Immunreaktion ein. Die neuerlich ausgefällten Antikörper bewiesen eine Musterspezifität, die nur auf dem intakten Virus vorhanden war und dem A-Protein fehlte. Auch in diesem Test wich das reaggregierte A-Protein etwas vom Verhalten des A-Proteins ab. Es vermochte mit dem erschöpften Antiserum ebenfalls zu reagieren. Das Präzipitat mit 45 μ g N war allerdings erheblich geringer als die 136 μ g N des intakten Virus (Tabelle I).

TABELLE I

1.5 ml TMV-Antiserum bei physiologischem pH-Wert 4 mal erschöpft mit insgesamt 1.0 mg N A-Protein-Antigen.

Drittel	Getestet mit 0.1 mg N	Präzipitat-N mg
1	TMV	0.136
2	A-Protein	keins
3	reaggregiertem A-Protein	0.045
Im Sauren getestet mit 0.1 mg N		
2	reaggregiertem A-Protein	0.153

Einen ganz anderen Verlauf ergaben die Reaktionen mit dem Antiserum gegen A-Protein (Fig. 2). Die Präzipitate mit dem homologen Antigen waren zwei- bis dreimal so stark wie die mit dem heterologen intakten Virus. Reaggregiertes und freies A-Protein lagen mit ihren Werten wieder dicht beieinander. Viermaliges Versetzen des Antiserums gegen A-Protein führte zwar noch nicht zur völligen Erschöpfung, doch wurde aus den unterschiedlichen Präzipitaten (Tabelle II) ganz deutlich, dass das A-Protein Spezifitäten enthält, die dem intakten Virus fehlen. Das reaggregierte A-Protein verhielt sich wieder weitgehend wie das freie A-Protein.

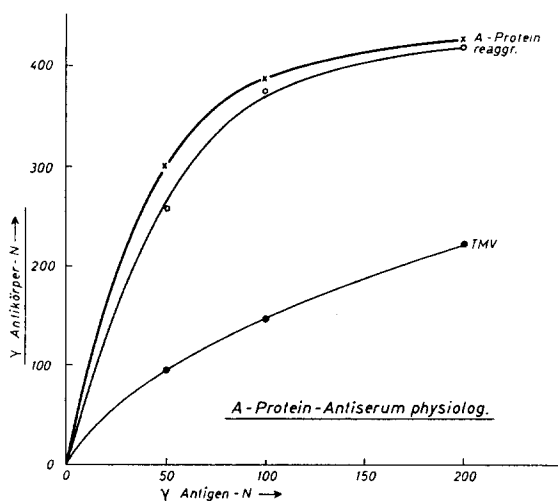


Fig. 2. Die aus je 0.5 ml eines Antiserums gegen A-Protein bei physiologischem pH-Wert durch steigende Antigenmengen ausgefällten Antikörper. Antikörpergehalt des Serums 6.0 mg/ml.

TABELLE II

1.5 ml A-Protein-Antiserum bei physiologischem pH-Wert 4 mal versetzt mit insgesamt 1.5 mg N TMV.

Drittel	Gesetzt mit 0.1 mg N	Präzipitat-N mg
1	TMV	0.034
2	A-Protein	0.201
3	reaggregiertem A-Protein	0.218

Ob das A-Protein in aggregiertem oder in nicht aggregiertem Zustand vorliegt ist lediglich durch den pH-Wert der Lösung bedingt. Alle vorstehend beschriebenen serologischen Versuche wurden bei dem physiologischen pH-Wert der Kaninchen-Antiseren durchgeführt; er wurde als pH 7.9 ermittelt. Das Fehlen eines sicheren Unterschiedes von nicht aggregiertem und reaggregiertem A-Protein könnte schliesslich darauf beruhen, dass das reaggregierte A-Protein in dem schwach alkalischen Milieu bereits weitgehend wieder zerfallen war, ehe die Immunreaktion eintrat. Deshalb wurde die Reaktion im Säuren geprüft.

Je 0.5 ml TMV-Antiserum wurden jeweils mit der dreifachen Menge 0.1 N Azetatpuffer von abnehmenden pH-Wert versetzt und das Präzipitat mit je 0.25 mg N TMV bestimmt (Tabelle III). Kontrollen ohne Antigen zeigten, dass es bei pH 5.6

TABELLE III

0.5 ml TMV-Antiserum mit 1.5 ml 0.1 N Acetatpuffer der in Spalte 1 angegebenen Zusammensetzung ergaben die in Spalte 3 angegebenen pH-Werte und in Spalte 4 angegebenen Präzipitaten mit 0.25 mg N TMV.

<i>0.1 N Na-Acetat</i> <i>0.1 N Essigsäure</i>	<i>pH des Puffers</i>	<i>pH-Wert der</i> <i>Serum-Puffermischung</i>	<i>Präzipitat-N</i> <i>mg</i>
20:0	—	8.05	0.450
14:1	5.66	6.4	0.463
17:3	5.28	5.6	0.452

noch nicht zu unspezifischen Präzipitaten kam. Die Immunreaktion lieferte also durchaus brauchbare Werte auch unter diesen Bedingungen. Beim pH-Wert 5.6 ist reaggregiertes A-Protein aber noch gut beständig und nicht zerfallen. Deshalb wurden die vorbeschriebenen Präzipitationsreihen noch einmal unter diesen Bedingungen wiederholt. Sowohl bei der Reaktion mit TMV-Antiserum (Fig. 3) als auch bei der Reaktion mit A-Protein-Antiserum (Fig. 4) lagen nunmehr die Kurven für das intakte Virus und für das reaggregierte A-Protein dicht beieinander und waren deutlich verschieden von der für das A-Protein. Im Säuren reagierte das durch A-Protein erschöpfte TMV-Antiserum mit reaggregiertem A-Protein genau so wie mit intaktem Virus (Tabelle I), und im Säuren liess sich TMV-Antiserum mit reaggregiertem A-Protein völlig erschöpfen, ohne dass eine Restaktivität für das intakte Virus übrig blieb (Tabelle IV). Zur Kontrolle gegenüber unspezifischen Präzipitaten, die womöglich die Antikörper enthalten könnten, wurde eine Parallelmenge Antiserum jedesmal mit den gleichen Mengen Puffer versetzt wie das Versuchsröhrchen, lediglich ohne Viruseiweiss, und mitzentrifugiert. Es entstand nur ein hauchartiger Niederschlag, und am Schluss war die volle Aktivität noch erhalten.

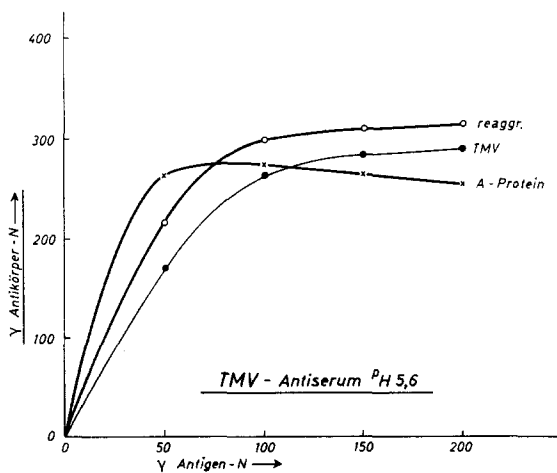


Fig. 3. Die aus je 0.1 ml eines Antiserums gegen intaktes TMV beim pH-Wert 5.6 durch steigende Antigenmengen ausgefällten Antikörper. Antikörpergehalt des Serums 16.0 mg/ml.

DISKUSSION

Der Vergleich der Ergebnisse der A-Protein-Serologie bei schwach alkalischer und bei saurer Reaktion zeigt deutlich, dass das A-Protein nur im Säuren vorwiegend in

TABELLE IV

2,9 ml TMV-Antiserum + 0.1 ml N Acetatpuffer (pH-Wert der Mischung 5.6) wurde 7 mal erschöpft mit insgesamt 2 mg N reaggregiertem A-Protein-Antigen. Die Kontrolle wurde gleichzeitig jedesmal nur mit der Pufferlösung versetzt.

Hälfte		Gesetzt mit 0.1 mg N	Präzipitat-N mg
1	Versuch	reaggregiertem A-Protein	keins
2	Versuch	TMV	keins
1	Kontrolle	reaggregiertem A-Protein	0.355
2	Kontrolle	TMV	0.346

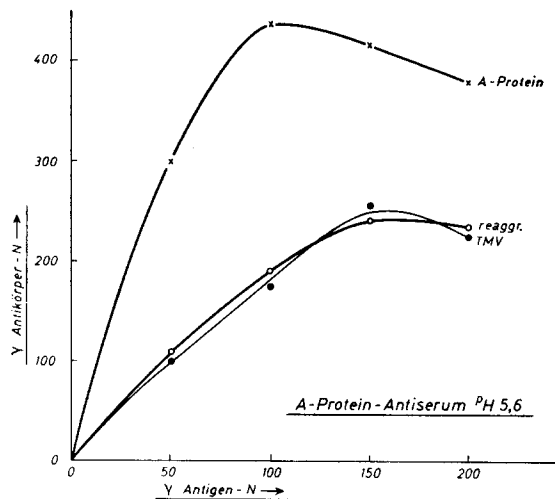


Fig. 4. Die aus je 0.5 ml eines Antiserums gegen A-Protein beim pH-Wert 5.6 durch steigende Antigenmengen ausgefällten Antikörper. Antikörpergehalt des Serums 6.0 mg/ml.

aggregierter Form existiert. In reaggregiertem Zustand unterscheidet es sich in den serologischen Eigenschaften praktisch nicht vom intakten Virus. Das Vorhandensein der RNS hat also entgegen der Annahme STARLINGERS keinen Einfluss auf die antigenen Eigenschaften der TMV-Oberfläche. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden von KRAMER UND WITTMANN, die zwischen den elektrophoretischen Eigenschaften intakter Viren und reaggregierter A-Proteine keine Differenzen fanden.—Bei der Reaggregation der A-Proteinpartikeln zur Eiweißshülle verschwinden serologisch aktive Flächen. Es bleiben aber nicht nur die Antigenspezifitäten der nunmehr die Zylinderoberfläche bildenden Flächenteile der A-Proteinpartikeln erhalten, sondern bei der Zusammenlagerung treten gleichzeitig die Spezifitäten auf, die für das intakte Virus charakteristisch sind. Wenn man annimmt, dass das TMV-Protein aus identischen Untereinheiten, Polypeptidketten mit einem Molegewicht von ungefähr 16,000, zusammengesetzt ist¹⁰, wird die Stabilität der A-Proteinpartikeln, die aus etwa 6 solcher Peptidketten bestehen, nur schwer verständlich. Auch bleibt zu erklären, warum bei der weiteren Zusammenlagerung der A-Proteinpartikeln zu grösseren Aggregaten neue serologische Spezifitäten auftreten. Setzt man

jedoch eine Asymmetrie der Peptidketten voraus, so könnte man annehmen, dass die Zusammenlagerung der Polypeptidketten zum A-Protein auf einer anderen Art der Bindung beruht als jener, welche die A-Proteinpartikeln bei der Reaggregation zur Eiweisschülle zusammenhält. Diese zweite Art der Bindung wäre dann für das Auftreten der Antigenspezifität "intaktes Virus" verantwortlich. Fig. 5 zeigt in Anlehnung an ein von KLUG UND FRANKLIN¹¹ vorgeschlagenes Schema, wie man sich die auf der Aussenseite der Eiweisschülle liegenden Flächen von sechs Polypeptidketten einer A-Proteinpartikel zu denken hätte. Die Pfeile sind dabei auf die Peptidkettengrenzen innerhalb des A-Proteins gerichtet; zwischen den A-Proteinteilchen sind die Pfeile von den Peptidkettengrenzen fort gerichtet. — Bisher sind allerdings chemisch-konstitutive Anhaltspunkte für eine solche spiegelbildliche Symmetrie der Doppelpeptidketten und der A-Proteinpartikeln nicht vorhanden.

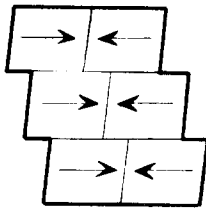


Fig. 5. Schematische Darstellung einer A-Protein-Partikel mit 3 spiegelbildlich symmetrischen Doppelpeptidketten.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch serologische Reaktionen bei pH 5.6 (Präzipitations- und Erschöpfungstechnik) gelang es zu zeigen, dass nukleinsäurefreie TMV-Hüllen, die durch Reaggregation von A-Protein erhalten worden waren, die gleichen antigenen Eigenschaften aufweisen wie das intakte TMV. Das freie A-Protein besitzt serologische Spezifitäten, die dem intakten TMV und dem reaggregierten A-Protein fehlen. Sie sind also auf den Flächen lokalisiert, die bei der Zusammenlagerung zum Stäbchen zugedeckt werden. Aber auch das intakte TMV bzw. das reaggregierte A-Protein weisen eine starke charakteristische Antigenkomponente auf, die auf dem freien A-Protein fehlt. Diese neue Komponente muss also an den Kontaktstellen der A-Proteinpartikeln beim Zusammentreten entstehen. Die Polypeptidketten, die das A-Protein aufbauen, müssen demnach innerhalb des A-Proteins in einer anderen Bindung vorliegen als der zwischen den einzelnen A-Proteinpartikeln. Durch eine spiegelbildliche Rechts-links-Symmetrie der Doppelpeptidketten und des A-Proteins könnte diese Bedingung auch beim Vorhandensein identischer Untereinheiten (Polypeptidketten) verwirklicht sein.

LITERATUR

- ¹ G. SCHRAMM, *Naturwissenschaften*, 31 (1943) 94; *Z. Naturforsch.*, 2b (1947) 112 und 249.
- ² G. SCHRAMM, G. SCHUHMACHER UND W. ZILLIG, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 481.
- ³ H. FRAENKEL-CONRAT UND R. C. WILLIAMS, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.* 41 (1955) 690.
- ⁴ G. SCHRAMM UND W. ZILLIG, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 493.
- ⁵ E. KRAMER UND H. G. WITTMANN, *Z. Naturforsch.*, 13b (1958) 30.
- ⁶ H. FRIEDRICH-FREKSA, G. MELCHERS UND G. SCHRAMM, *Biol. Zentr.*, 65 (1946) 187.
- ⁷ P. STARLINGER, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 339.
- ⁸ H. G. AACH, *Z. Naturforsch.*, 12b (1957) 614.
- ⁹ G. MELCHERS, G. SCHRAMM, H. TRURNIT UND H. FRIEDRICH-FREKSA, *Biol. Zentr.*, 60 (1940) 524.
- ¹⁰ J. I. HARRIS UND C. A. KNIGHT, *Nature*, 170 (1952) 613.
- G. SCHRAMM, G. BRAUNITZER UND J. W. SCHNEIDER, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 298.
- C. I. NIU UND H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5882.
- ¹¹ A. KLUG UND R. E. FRANKLIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 199.