

Tableau I.

Souche	Type	UV 30 sec % survivance			Chromogenèse en milieu lactate (fluorescine)	Type respiratoire terminal prédominant
		Difco (cytochromique)	Lactate (flavinique)	Lactate + glyoxylate (très cytochromique)		
B 50 (dissociation maximale = 100% S)	S	12	17,6		+	Cytochromique
B 52 (dissociation maximale = 37% S 63% R)	S	26,5	36	24	++	Cytochromique
	R	40,5	47,5	32,5	+++	Flavinique (auto-oxydable)

Tableau II.

Souche	Type	UV 30 sec + lux 90 min % survivance			% photorestoration		
		Difco	Lactate	Lactate + glyoxylate	Difco	Lactate	Lactate + glyoxylate
B 50 (souche peu chromogène)	S	55,2	41,3		78	57	
B 52 (souche chromogène)	S	81,5	61	77	68	41,3	69
	R	95	85	80	56	44	59

Les types *R* et *S* sont obtenus par les méthodes habituelles (dilution suivie de plating) à partir des souches âgées. Les milieux de culture sont les suivants: difco 8% (peu chromogène, cytochromique), lactate d'ammonium 2% (chromogène, flavinique) et lactate d'ammonium 2% + glyoxylate de sodium 4% (achrome, très cytochromique); ces deux derniers milieux sont complétés par des sulfate de magnésium 0,3% et phosphate bibasique de potassium 0,3%; le milieu difco par du chlorure de sodium 5%. Le pH est ajusté à 7,1. Les cultures agitées mécaniquement se font à la température de 25 °C. Source d'UV: lampe Westinghouse WL 782 L; les pétris sont placés à une distance de 1 m, une incubation de 90 min est observée entre leur inoculation et le traitement aux UV. Source de lumière: tubes à luminescence Philips TL 40 W/55.

La respiration terminale adoptée dépend dans une large mesure du milieu nutritif. Toutes les fois que nous favorisons l'adoption d'une respiration essentiellement cytochromique, nous diminuons le taux de survie; au contraire, en respiration terminale flavinique il y a pour un même type, augmentation de la résistance aux UV. Le fait que les colonies *R*, quelles que soient les conditions du milieu, ont une tendance fondamentale vers une respiration terminale flavinique¹, est certainement un des éléments responsables de leur haut taux de survie.

La photorestoration, par contre, est plus importante chez les «Smooth» que chez les «Rough». Si nous favorisons l'alternative respiratoire dans le sens cytochromique, nous augmentons la capacité de photorestoration. Le fait que

les colonies *S*, quelles que soient les conditions du milieu, ont une tendance fondamentale vers une respiration terminale cytochromique¹, est certainement un des éléments responsables de leur haut taux de photorestoration.

Summary. Smooth colonies of *Pseudomonas fluorescens* are more sensitive to UV than Rough colonies. Resistance to UV is in relation to the presence of a flavinic terminal respiratory system; photoreactivation is more important when terminal respiration is cytochromic.

A. EL-SABEH, H. GREPPIN et F. CHODAT

Institut de Botanique Générale, Université de Genève (Suisse), 24 avril 1967.

Beziehungen zwischen phagozytierenden, virusinfizierten Myeloblasten des Huhnes in vitro und den «gray bodies»

Suspendiert man Myeloblasten eines Huhnes, das mit dem Virus der Hühnermyeloblastose infiziert wurde, in ein Kulturmöedium mit 40–50% Hühnerserum, so bilden sich ovoide Einschlüsse im Zytosplasma. Sie werden «gray bodies» genannt¹. Die Teilchen, die etwa Mitochondriengrößen erreichen, wurden mit der Virusbildung und der Mitochondrienentstehung in Verbindung gebracht². Kürzlich glaubte man, ihre wahre Natur und Aufgabe darin zu sehen, dass sie von der Zelle aufgenommene Teilchen sammeln und unter Umständen auflösen^{3,4}. Unter anderm legte ihre Fermentausstattung diese Vermutung nahe⁵.

Während einer fluoreszenz- und elektronenoptisch-immunologischen Studie zum Nachweis und über die in-

trazellulare Verteilung des Antigens des Myeloblastosevirus und dessen tumorspezifischen Antigenen in Suspensionskulturen von Hühnermyeloblasten⁶ wurden in den Zellen Teilchen gesehen, die den im Phasenkontrastmikro-

¹ R. A. BONAR, D. F. PEARSONS, G. S. BEAUDREAU, C. BECKER und J. W. BEARD, J. natn. Cancer Inst. Cancer Inst. 23, 199 (1959).

² R. A. BONAR, D. WEINSTEIN, J. R. SOMMER, D. BEARD und J. W. BEARD, Natn. Cancer Inst. Monogr. 4, 251 (1960).

³ U. HEINE, C. BECKER, R. A. BONAR und J. W. BEARD, J. natn. Cancer Inst. 31, 731 (1963).

⁴ U. HEINE, R. A. BONAR, C. BECKER und J. W. BEARD, Natn. Cancer Inst. Monogr. 17, 677 (1964).

⁵ G. DE THÉ, C. BECKER und J. W. BEARD, J. natn. Cancer Inst. 32, 201 (1964).

⁶ CHR. LANDSCHÜTZ, unveröffentlichte Experimente, Durham (1963–1964).

skop beobachteten «gray bodies» sowohl in ihrer Grösse als auch in der Verteilung entsprachen. Nach Behandlung der Zellen mit Fluoreszein-iso-thiozyanat-markiertem Globulin-Antiglobulin des Huhnes zeigten sie eine starke grüne Fluoreszenz, die sich deutlich von den anderen Zellstrukturen abhob und die spezifisch ist. Der Ursprung des nachgewiesenen Globulins muss im Nährmedium zu suchen sein. Dass es sich nicht in den intrazellulär liegenden «gray bodies» angesammelt hatte, sondern von aussen mit diesen von der Zelle phagozytiert wurde, zeigt folgendes Experiment: Markiert man Hühnerserum mit Fluoreszein-iso-thiozyanat und vermischt die zentrifugierten Zelltrümmer des Überstandes einer Suspensionskultur mit dem Serum, so findet eine Antigen-Antikörperreaktion statt, da die Myeloblasten Forssmann-Antigen enthalten und das benutzte Hühnerserum, das von Hühnerschlachtereien stammte, heterophile Antikörper enthält⁶. Sie werden erst nach sorgfältiger, erschöpfender Adsorption mit Hammelerythrozyten entfernt. Gibt man die markierten und in Phosphatpuffer gewaschenen Zelltrümmer zu sorgfältig mit vorgewärmter Hankslösung von Zelltrümmern freigeschütteten Myeloblasten in das vorgewärmte Medium, so zeigen die Zellen schon nach 30 min grün fluoreszierende Teilchen, die vorher phasenoptisch (jedoch nicht am gleichen Präparat) als «gray bodies» erkannt wurden. Da die Anzahl der ursprünglichen «gray bodies» 48 h nach dem letzten Mediumwechsel relativ gering ist, wurde dieser Zeitpunkt für den Versuch gewählt. Der geringe Proteingehalt der Einschlüsse⁷ spricht ferner gegen eine Akkumulation von Globulin in denselben, wie sie in Analogie zu den Versuchen mit Goldteilchen bei «Segregationsorganellen» zu erwarten wäre⁸. Das oberflächlich adsorbierte Serumglobulin verliert seine Antigenität nach etwa 12 h. Die «gray bodies» sind also von der Zelle phagozytierte Zelltrümmer, die gegebenenfalls als sekundäre Lysosomen zu betrachten sind und nicht als ursprüngliche Zellorganellen⁹. Dass sie manchmal Überreste von Mitochondrien enthalten¹, spricht für den extrazellulären Ursprung der «gray bodies». Zum Zwecke ihrer Resorption werden sie dann von den eigentlichen Zellysosomen mit Enzymen beschickt.

Ob der Myeloblast nun die Fähigkeit zur Pinozytose hat oder auch zur Phagozytose fähig ist, wäre wohl eine mehr oder weniger akademische Frage⁸. Die Zellen bei der Erythroblastose des Huhnes verhalten sich hinsichtlich Phagozytose und «gray body»-Bildung gleich. Unterschiedliche Beobachtungen sind auf andere Verhältnisse bei Zellzahl, Serummenge und Konzentration der heterophilen Antikörper zurückzuführen^{1,9}. Die Befunde sind weitere Hinweise dafür, dass nicht nur Serumproteine, sondern auch heterologe Antikörper die Phagozytose unterstützen und auch auslösen können⁸. Neuere Versuche zeigen die Wirksamkeit von Antikörpern auf die Phagozytose¹⁰. Eine Schwellung von Mitochondrien in der Zelle, wie sie bei relativ hoher Serumkonzentration im Gewebekulturmedium an den Myeloblasten beobachtet wurde, war früher an anderen Tumorzellen unter der Wirkung von heterologen Antikörpern beschrieben worden^{11,12}.

Dass nicht nur Viren, Goldteilchen oder Serumproteine mit Zelltrümmern durch Phagozytose in den virusproduzierenden Myeloblasten unter den experimentellen Bedingungen eindringen können, sondern auch dem Kulturmedium zugesetzte Substanzen oder markierte Chemikalien und in angereicherter oder sogar veränderter Form, ist bei der Auswertung von biochemischen Ergebnissen an diesem Zell-Virus-System in Rechnung zu setzen. Bei der Verarbeitung der Zellen für den Aufschluss werden die Zelltrümmer oft mit den Zellen sedimentiert, und bei

der Gewinnung der Virusteilchen werden sie nicht sorgfältig aus der Virussuspension herauszentrifugiert, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann¹³⁻¹⁷. So färbt sich ein Ausstrich einer nach den beschriebenen Methoden gereinigten Virussuspension¹⁸, sogar nach einem siebenmaligen Reinigungzyklus, sei sie aus Hühnerplasma, sei sie aus dem Gewebekulturmedium gewonnen, mit Methylenblau. Da der Myeloblast reich an Adenosintriphosphatase ist, scheint die Virustitration mit der Methode der elektronenoptischen Teilchenzählung gegenüber der Titration auf der Basis des dem Virus einverleibten Enzyms verlässlicher zu sein. Andernfalls könnte ein Befund, wie die Produktion von Virus in devitalisierten Zellen, zum Thema ernsthafter Diskussionen werden analog dem «gray body»-Problem¹⁹.

Methoden. Das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A), die Technik der Virusvermehrung im Huhn und in der Gewebekultur waren die gleichen wie früher beschrieben²⁰. Die benutzten Seren wurden erschöpfend bei 37°C und in der Kälte an Hammelerythrozyten adsorbiert. Die Reinigung der mit Fluoreszein-iso-thiozyanat markierten Seren erfolgte an einer Sephadex-Säule. Ausstriche wurden 6 min in Azeton fixiert und die gefärbten Präparate mit NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Eine Fluoreszenzeinrichtung von Reichert wurde benutzt²¹.

Summary. The so-called 'gray bodies' in chicken myeloblasts infected with the myeloblastose virus are phagocytized cell debris. Some difficulties concerning this virus-cell-system are pointed out.

CHR. LANDSCHÜTZ^{22,23}

Department of Surgery, Duke University Medical Center, Durham (North Carolina, USA), 20. April 1967.

- ⁷ J. R. SOMMER, D. WEINSTEIN, C. BECKER, G. S. BEAUDREAU, D. BEARD und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 28, 75 (1962).
- ⁸ M. L. KARNOVSKY, *Physiol. Rev.* 42, 143 (1962).
- ⁹ U. HEINE, G. S. BEAUDREAU, C. BECKER, D. BEARD und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 26, 359 (1961).
- ¹⁰ G. GERISCH, O. LÜDERITZ und E. RUSCHMANN, *Z. Naturf.* 22b, 109 (1967).
- ¹¹ H. J. LÖBLICH und CHR. LANDSCHÜTZ, *Ver. dt. Ges. Path.* 345 (1959).
- ¹² H. J. LÖBLICH und CHR. LANDSCHÜTZ, *Z. Krebsforsch.* 63, 335 (1960)..
- ¹³ R. A. BONAR, R. H. PURCELL, D. BEARD und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 37, 705 (1963).
- ¹⁴ J. HUPPERT, F. LACOUR, J. HAREL und L. HAREL, *Cancer Res.* 26, 1561 (1966).
- ¹⁵ L. SVERAK, G. S. BEAUDREAU und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 29, 355 (1962).
- ¹⁶ H. BAUER, *Z. Naturf.* 21b, 453 (1966).
- ¹⁷ H. BAUER und W. SCHÄFER, *Z. Naturf.* 20b, 815 (1965).
- ¹⁸ R. H. PURCELL, R. A. BONAR, D. BEARD und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 28, 1003 (1962).
- ¹⁹ R. ZISCHKA, A. J. LANGLOIS, P. R. RAO, R. A. BONAR und J. W. BEARD, *Cancer Res.* 26, 1839 (1966).
- ²⁰ C. BECKER, G. S. BEAUDREAU, W. CASTLE, B. W. GIBSON, D. BEARD und J. W. BEARD, *J. natn. Cancer Inst.* 29, 455 (1962).
- ²¹ Addendum: Z. A. COHN und E. PARKS, *J. exp. Med.* 125, 1091 (1967), berichten über eine immunologische Induktion der Pinozytose in Makrophagen.
- ²² Die Arbeit wurde unterstützt durch Research grant No. C-4572 an die Duke University vom National Cancer Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, durch Grant No. E-844 von der American Cancer Society, Inc. und durch den Dorothy Beard Research Fund.
- ²³ Derzeitige Anschrift: Forschergruppe Praeventivmedizin am Max-Planck-Institut für Immunbiologie, 78 Freiburg (Deutschland).