

The slight difference between the present observations and those of PILET¹ may be due to his a) pre-treatment with Ringer's solution, which reduces the uptake of IAA⁷, b) use of a higher concentration of morphactin, c) absence of sucrose. It is, therefore, concluded that under the present experimental conditions morphactin inhibited the transport of IAA without materially affecting the uptake and the polarity.

In a preliminary study on the details of the effect of morphactin on the kinetics of auxin transport it has been observed that the morphactin pre-treatment also reduced the velocity. In addition, the effect of the presence of cations, especially Ca, on kinetics of auxin transport in morphactin-treated shoot and root sections is being investigated.

Zusammenfassung. Morphactin (IT 3456) verhindert den Auxin-Transport ohne wesentliche Wirkung auf Aufnahme und Polarität der Indolessigsäure 2-¹⁴C in *Zea mays* L. Koleoptilen.

S. M. NAQVI⁸

*Agricultural Research Department,
Atomic Energy Commission Research
Establishment Risø, DK-4000 Roskilde (Denmark),
27 July 1970.*

⁷ P. E. PILET, *Nature* 208, 1344 (1965).

⁸ I am grateful to the Pakistan and Danish Atomic Energy Commissions for the award of fellowship under which the above work was carried out. I am also thankful to E. Merck AG, Darmstadt, for kindly supplying the morphactins.

PRO EXPERIMENTIS

Vergleichende Untersuchungen an Proteinen von Influenzaviren¹

Bei einer Reihe von RNA²-Viren, die sich auf tierischen Zellen vermehren, wird Material aus der Wirtszelle in die Virushülle eingelagert. So sollen auch zelluläre Oberflächenantigene in die reifen Virionen eingebaut werden. Auf EAT²-Zellen wachsendes Influenzavirus z.B. wird durch eine solche Integration so antigen, dass es bei der Maus eine Immunisierung gegenüber EAT vermittelt und induziert. Dieses Phänomen ist offenbar bei der Virus-onkolyse beteiligt³. Untersuchungen an einer Reihe von RNA-Viren sprechen dafür, dass Wirtskomponenten kaum aus Protein, sondern vielmehr aus Lipoiden und Zuckern in ähnlicher Zusammensetzung wie in der Zellmembran bestehen⁴⁻²³.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, verschiedene Influenzaviren Typus A aus verschiedenen Wirten vergleichend zu reinigen, zu zerlegen und auf der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) zu analysieren. Folgende Resultate wurden erwartet: Unterschiede zwischen verschiedenen Typen, mögliche Unterschiede innerhalb eines Typs je nach Wirt, Identifikation einzelner Virusproteine.

Material und Methoden. Verwendet wurden der neurotrope, tumoradaptierte A₀-WSA- sowie der A-Melbourne(MEL)-Influenza-Stamm. MEL und WSA wurden im bebrüteten Hühnerei (MEL_{AII}, WSA_{AII}), WSA zudem in vivo und in vitro auf EAT (WSA_{Tu}) gezüchtet. Die dabei verwendeten Methoden sind z.T. publiziert²⁴⁻²⁶. Alle virushaltigen Flüssigkeiten wurden nach Standardmethoden auf hämagglutinierende Aktivität geprüft; Protein wurde quantitativ nach LOWRY²⁷ bestimmt. Verglichen wurden einerseits MEL_{AII} und WSA_{AII}, andererseits WSA_{AII}, WSA_{Tu} (in vivo) und WSA_{Tu} (in vitro). Zu diesem Zweck wurden die Viren aus den verschiedenen Quellen gereinigt²⁸⁻³⁰ und dann entweder gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert oder fraktioniert (Äthermethode³¹ und Desoxycholatmethode³²). Die PAGE wurde ähnlich durchgeführt wie beschrieben³³. Präparate wurden zu diesem Zweck zu 10 mg/ml in 0,01M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8, 2% rekristallisiertes SDS², 1% EtSH², 6M entionisierter Harnstoff, 30% Sucrose gelöst, während 1 Min in ein kochendes Wasserbad gestellt und während 1 Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In dieser Lösung werden Wasserstoffbrücken und -S-S-Bindungen zwischen Polypeptiden aufgebrochen. Laufbedingungen: 10 mA pro Röhrchen, zur Anode während 135 Min durch 6,5 cm hohe Gele mit Kühlung

auf ca. 10°C. Färbung mit Coomassieblau und Amidoschwarz. Es bestehen folgende lineare Beziehungen: (A) zwischen der Wanderungsdistanz eines Proteins und der Acrylamid-Monomer-Konzentration im Bereich von 2-10%; (B) zwischen dekadischem Logarithmus des Molekulargewichtes (*M*) und der Wanderungsdistanz eines Proteins, was die Schätzung unbekannter Molekulargewichte durch Koelektrophorese mit bekannten Proteinen gestattet^{29,33-39}. Die gefärbten Gele wurden mit einem Gilford-Scanner bei 610 nm ausgewertet.

Resultate und Diskussion. Die bei den Reinigungsgängen erzielten besten spezifischen Aktivitäten (HAE²/mg Protein) betragen: WSA_{AII} 100 000, WSA_{Tu} 66 000, MEL_{AII} 180 000. Das reflektiert die Labilität des H bei WSA. Entsprechend ist die Wiedergewinnung der hämagglutinierenden Aktivität nach Ätherfraktionierung: WSA_{AII}: 1%; WSA_{Tu}: 2%; MEL_{AII}: 16%. Im Prinzip sind wenigstens 3 Proteine in allen Influenzotypen zu erwarten: das Protein des RNP² (S-Antigen), das H (H-Antigen)

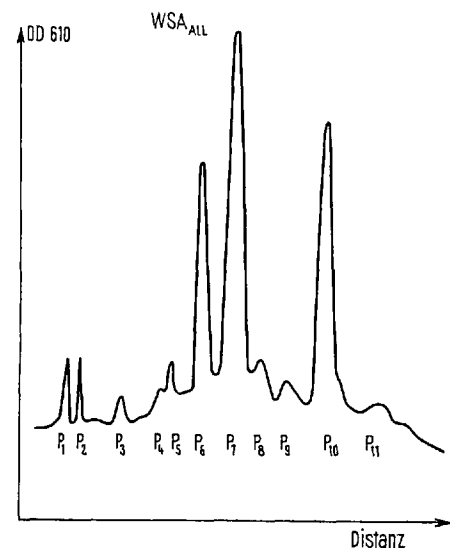


Fig. 1. Gelscanning von WSA. Aus Allantoisflüssigkeit gereinigtes WSA-Influenza-Virus in der Gel-Elektrophorese. Arbiträre Nummerierung der Peaks. Scanning bei 610 nm.

und die Neuraminidase (N). H und N können stammesspezifische Unterschiede aufweisen⁴⁰⁻⁴³, indes S in der Gruppe A konstant zu sein scheint. Würden zudem wirtsspezifische Proteine in die Hülle eingebaut, so müssten wirtsabhängige Unterschiede innerhalb eines Stammes postuliert werden.

WSA_{AI} (Figur 1), WSA_{Tu} in vivo und in vitro (Figur 2) zeigen bei arbiträrer fortlaufender Nummerierung die Banden P₁-P₁₁. Die kleinen Komponenten sind nicht identifiziert; es kann sich um Verunreinigungen oder eher um unzerlegte Multiple der Hauptkomponenten handeln. P₁-P₁₁ sind unabhängig vom Wirt stets vorhanden, und Unterschiede innerhalb des Stammes, je nach Wirt, konnten nicht festgestellt werden. Deutliche Unterschiede sind hingegen auszumachen zwischen den

beiden Stämmen (Figuren 1 und 2 einerseits, Figur 3 andererseits). MEL_{AI} zeigt die Banden P₁-P₁₂.

Bei Isolation des RNP nach Äther- oder Desoxycholatbehandlung zeigt sich die erwartete Gleichheit der Laufdistanz eines Polypeptides, das hier als P₇ bezeichnet ist. Der Proteinkomponenten des Influenza-RNP entspricht ein Polypeptid, in das drei RNA-Typen verpackt wer-

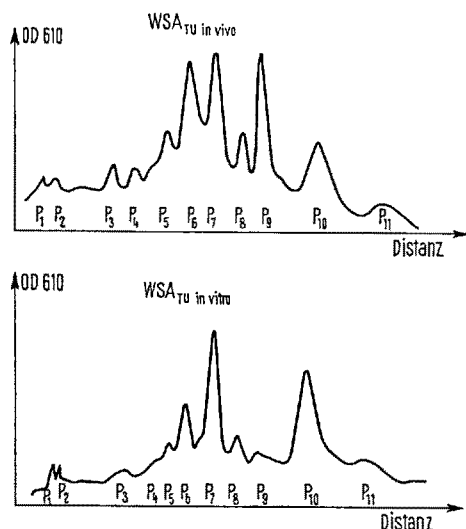


Fig. 2. Gelscanning von WSA. Aus in vivo Onkolysat (EAT im Mäuseaszytes, infiziert mit adaptiertem WSA) gereinigtes WSA-Virus (oben) und in EAT in vitro gebildetes und aus der Kulturflüssigkeit gereinigtes WSA-Virus (unten). Nummerierung der Peaks wie in Figur 1. Scanning bei 610 nm.

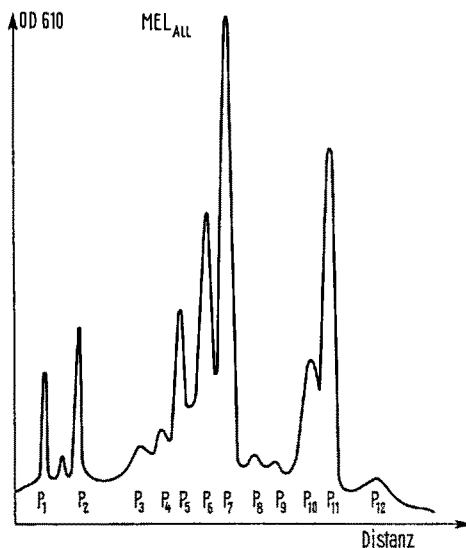


Fig. 3. Gelscanning von MEL. Aus Allantoisflüssigkeit gereinigtes MEL-Influenza-Virus in der Gel-Elektrophorese. Arbiträre Nummerierung der Peaks. Scanning bei 610 nm.

¹ Arbeit mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 5254.3). Frl. U. KOHLER danke ich für Mitarbeit und Herstellung der Skizzen.

² Abkürzungen und Bezugsquellen: Coomassieblau (Mann); DOC, NaDesoxycholat (Fluka); EAT, Ehrlich Aszites Tumor; EtSH, β -Mercaptoethanol (Fluka); H, Haemagglutinin; HAE, haemagglutinierende Einheit; N, Neuraminidase; RNA, Ribonukleinsäure; RNP, Ribonukleoprotein; SDS, NaLaurylsulfat (Serva).

³ J. LINDENMANN und P. A. KLEIN, J. exp. Med. 126, 93 (1967).

⁴ W. SMITH, G. BELYAVIN und F. W. SHEFFIELD, Proc. R. Soc. B 143, 504 (1955).

⁵ K. MUNK und W. SCHÄFER, Z. Naturforsch. 66, 372 (1951).

⁶ D. BEARD, S. BEAUDREAU, R. A. BONAR, D. G. SHARP und J. W. BEARD, J. natn. Cancer Inst. 18, 231 (1957).

⁷ J. W. BEARD, Poultry Sci. 35, 203 (1956).

⁸ T. BÄCHI, W. GERHARD, J. LINDENMANN und K. MÜHLETHALER, J. Virol. 4, 769 (1969).

⁹ J. HOERNI, Path. Microbiol. 33, 215 (1969).

¹⁰ L. H. FROMMHAGEN, C. A. KNIGHT und N. K. FREEMAN, Virology 8, 176 (1959).

¹¹ W. G. LAVER und R. G. WEBSTER, Virology 30, 104 (1966).

¹² J. J. HOLLAND und E. D. KIEHN, Science 167, 202 (1970).

¹³ H. A. BLOUGH und J. M. TIFFANY, Proc. natn. Acad. Sci., USA 62, 242 (1969).

¹⁴ J. M. TIFFANY und H. A. BLOUGH, Science 163, 573 (1969).

¹⁵ H.-D. KLENK und P. W. CHOPPIN, Virology 37, 155 (1969).

¹⁶ H.-D. KLENK und P. W. CHOPPIN, Virology 38, 255 (1969).

¹⁷ H. A. BLOUGH und D. E. M. LANSON, Virology 36, 286 (1968).

¹⁸ E. R. PFEFFERKORN und H. S. HUNTER, Virology 20, 446 (1963).

¹⁹ E. R. PFEFFERKORN und R. L. CLIFFORD, Virology 23, 217 (1964).

²⁰ J. H. STRAUSS, B. W. BURGE, E. R. PFEFFERKORN und J. E. DARNELL, Proc. natn. Acad. Sci., USA 59, 533 (1968).

²¹ J. H. STRAUSS, B. W. BURGE und J. E. DARNELL, J. molec. Biol. 47, 437 (1970).

²² B. W. BURGE und J. H. STRAUSS, J. molec. Biol. 47, 449 (1970).

²³ B. CARTWRIGHT und C. A. PEARCE, J. gen. Virol. 2, 207 (1968).

²⁴ J. LINDENMANN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 85 (1963).

²⁵ J. LINDENMANN, J. Immun. 92, 912 (1964).

²⁶ W. GERHARD, in Vorbereitung.

²⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

²⁸ F. SOKOL, E. KUWERT, T. J. WIKTOR, K. HUMMELER und H. KOPROWSKY, J. Virol. 2, 836 (1968).

²⁹ I. BIKEL und P. H. DUESBERG, J. Virol. 4, 388 (1969).

³⁰ R. D. BARRY und P. DAVIES, J. gen. Virol. 2, 59 (1968).

³¹ L. HOYLE, Virology Monographs 4, 38 (1968).

³² D. W. KINGSBURY und R. W. DARLINGTON, J. Virol. 2, 248 (1968).

³³ D. F. SUMMERS, J. V. MAIZEL und J. E. DARNELL, Proc. natn. Acad. Sci., USA 54, 505 (1965).

³⁴ A. JOSS, S. S. GANDHI, A. J. HAY und D. C. BURKE, J. Virol. 4, 816 (1969).

³⁵ L. A. CALIGUIRI, H.-D. KLENK und P. W. CHOPPIN, Virology 39, 460 (1969).

³⁶ R. R. WAGNER, T. A. SCHNAITMAN und R. M. SNYDER, J. Virol. 3, 395 (1969).

³⁷ C. Y. KANG und L. PREVEC, J. Virol. 3, 404 (1969).

³⁸ M. J. EVANS und D. W. KINGSBURY, Virology 37, 597 (1969).

³⁹ E. A. HASLAM, I. M. CHEYNE und D. O. WHITE, Virology 39, 118 (1969).

⁴⁰ G. C. SCHILD, H. G. PEREIRA und C. H. SCHETTLER, Nature Lond. 222, 1299 (1969).

⁴¹ A. P. KENDAL und C. R. MADELEY, Biochem. biophys. Acta 185, 163 (1969).

⁴² G. C. SCHILD und H. G. PEREIRA, J. gen. Virol. 4, 355 (1969).

⁴³ J. L. SCHULMAN und E. D. KILBOURNE, Proc. natn. Acad. Sci., USA 63, 326 (1969).

den^{29, 44}. Bei den H-Komponenten handelt es sich wenigstens um zwei Polypeptide, wobei P₆ (WSA und MEL) gleich, P₉ (WSA) bzw. P₁₀ (MEL) ungleich wandern (nicht abgebildet). N wurde nicht mit Sicherheit identifiziert. Sie kann als P₁₀ (WSA) bzw. P₁₁ (MEL) vermutet werden. Beide wandern gleich weit und weisen ein M auf, das grössenordnungsmässig den Angaben der Literatur^{34, 36, 44} entspricht. Die Molekulargewichte der Hauptkomponenten betragen ($\pm 2-3\%$): H (P₆) 68 000, RNP (P₇) 56 000, N (P₁₀) 25 000.

Es sind vor allem immunologische Argumente, die zeigen, dass bestimmte tierische RNA-Viren in der Lage sind, Wirtsmaterial in ihre Hülle zu übernehmen. So erwirbt z.B. der an EAT adaptierte Influenzastamm WSA die Eigenschaft, Mäuse gegen EAT zu immunisieren. Mit der SDS-PAGE wurden Proteinbestände von WSA untersucht, das auf verschiedenen Wirten gewachsen war (Allantoisflüssigkeit des bebrüteten Hühnereis, EAT im Aszites der Maus und in vitro). Da mit dieser empfindlichen Methode keine Unterschiede gefunden wurden, ist wahrscheinlich, dass die festgestellten wirtsbedingten biologischen Unterschiede nicht durch Inkorporation von Wirtspolypeptiden erklärt werden können. Vielmehr dürfte es sich um den Einbau von Lipoiden und Zuckern handeln.

Summary. Evidence is mainly indirect that certain animal RNA viruses integrate host material into their envelope. For example, influenza adapted to Ehrlich ascites tumor is immunogenic against the tumor cells in mice. However, even in polyacrylamide, it was impossible to find significant differences in protein composition of influenza WSA grown in different hosts, whereas differences between strains could easily be detected. The conclusion is that host protein integration is improbable.

H. KOBLET

Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität, Gloriastrasse 32, CH-8006 Zürich (Schweiz), 16. Juni 1970.

⁴⁴ W. G. LAVER, J. molec. Biol. 9, 109 (1964).

Reinigung von F-Antigen¹

1968 beschrieben FRAVI und LINDENMANN^{2, 3} einen präzipitierenden Antikörper, der durch Immunisierung von Inzuchtmäusen mit Leberextrakten andersstämmiger Inzuchtmäuse gewonnen wird (Tabelle). Gleichstämmiges Antigen induziert zwar keinen Antikörper, doch reagiert einmal gebildeter Antikörper mit gleichstämmigem Antigen und imponiert als Autoantikörper. Das Antigen, im folgenden F-Antigen genannt, findet sich in Lebern und Nieren sämtlicher Mäuse und vieler anderer Säuger. Die Situation erscheint vor allem aus folgendem Grund paradox: gemäss Tabelle lassen sich Stämme B und D durch keinen Extrakt immunisieren, so dass man vorerst annimmt, B und D enthielten alle möglichen Determinanten und seien deswegen refraktär. Wäre das der Fall, so müssten B und D sowohl A wie auch C immunisieren. Das ist nicht der Fall.

Wir stellten uns die Aufgabe, F-Antigen einer Stoffklasse zuzuordnen, zu isolieren und vielleicht zu identifizieren, um etwas über Immunogenität und Reaktivität aussagen zu können. Wir berichten im folgenden über die Isolierung und einige Eigenschaften des F-Antigens. Biologische Funktion und Ursache des paradoxen immunogenen Verhaltens sind noch nicht bekannt.

Material und Methoden. F-Antigen wurde semiquantitativ durch Verdünnungsreihen nach Ouchterlony bestimmt; Antikörperquelle ist Mäuseaszites. Eine Einheit von F-Antigen entspricht der Konzentration, die eine noch eben sichtbare Präzipitationslinie ergibt. Unter «Aktivität» wird also im folgenden immer nur immunologische Reagibilität verstanden. Protein wurde nach LOWRY⁴, Zucker mit der Anthronmethode⁵ bestimmt. F-Antigen wurde aus Lebern folgender Spezies gereinigt: Maus (A, Balb/c, C57, CBA, C₃H, DBA), Schwein.

Allgemeines. F-Antigen findet sich bei der Zellfraktionierung ausschliesslich im Zytosol. Es ist am stabilsten im pH-Bereich 7,5–8,5. Mit steigender Reinheit nimmt die Empfindlichkeit gegen Einfrieren und Auftauen sowie Lyophilisieren zu. Die Stabilität bei 40 °C ist vermindert. EtSH⁶ wirkt stabilisierend. F-Antigen ist chloroformbeständig; es fällt in einem breiten Bereich zwischen 40% und 80% (NH₄)₂SO₄-Sättigung bei 4 °C und pH 7

aus. Es wird weder durch RNA'ase noch DNA'ase⁶, wohl aber durch Pronase, Trypsin und Chymotrypsin innerhalb von 60 Min völlig inaktiviert. Bei der Elektrofokussierung⁷ erscheinen Aktivitäten zwischen pH 6,5 und 7 an verschiedenen Stellen.

Reinigungsgang. Rohhomogenate von Lebern (Schere, Turmix, Potter, Dounce) werden von allen partikulären Elementen befreit. Die lösliche Phase wird gegen Puffer A

Induktion von Antikörpern durch F-Antigen in Abhängigkeit vom Stamm

F-Antigen im Extrakt vom Stamm		A	B	C	D
Stamm, reagierend mit Anti-F (+), oder nicht reagierend (—)	A	—	—	+	+
	B	—	—	—	—
	C	+	+	—	—
	D	—	—	—	—

A = A; B = Balb/c, C57Bl6; C = CBA, C₃H; D = DBA.

¹ Arbeit mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 5254.3). Herrn Dr. H. MOSIMANN danke ich für die Hilfe bei der analytischen Ultrazentrifugation, Frl. U. KOHLER für Mitarbeit und Herstellung der Skizzen.

² G. FRAVI und J. LINDENMANN, Nature, Lond. 218, 141 (1968).

³ G. FRAVI, Pathol. Microbiol. 31, 257 (1968).

⁴ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁵ J. H. ROE, J. biol. Chem. 212, 335 (1955).

⁶ Abkürzungen und Bezugsquellen: EtSH, Beta-Mercaptoethanol (Fluka); CM-Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose (Whatman); DEAE-Zellulose, Diaethylaminoethyl-Zellulose (Whatman); DNA'ase, Desoxyribonuklease (Calbiochem); RNA'ase, Ribonuklease (Calbiochem); SDS, NaLaurylsulfat (Serva); PAGE, Polyacrylamidgel-Elektrophorese.