

PROCEEDINGS OF THE
FOURTH INTERNATIONAL CONGRESS
OF BIOCHEMISTRY

VIENNA 1958

PROCEEDINGS OF THE
FOURTH INTERNATIONAL CONGRESS
OF BIOCHEMISTRY
VIENNA 1958

VOLUME VII
SYMPOSIUM VII

I.U.B.
SYMPOSIUM SERIES
Volume 9

PERGAMON PRESS LTD
4 and 5 Fitzroy Square, London W.1
PERGAMON PRESS INC.
122 East 55th Street, New York 22, N.Y.
P.O. Box 47715, Los Angeles, California
PERGAMON PRESS S.A.R.L.
24 Rue des Écoles, Paris V

First Published 1959

Copyright

©

1959

Pergamon Press Ltd.

Library of Congress Card No. 59-8791

Printed in Great Britain by J. W. Arrowsmith Ltd., Bristol

TITLES OF VOLUMES
IN THE PROCEEDINGS OF THE
FOURTH INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMISTRY

VOLUME I: SYMPOSIUM I
*Carbohydrate Chemistry of Substances of
Biological Interest*

VOLUME II: SYMPOSIUM II
Biochemistry of Wood

VOLUME III: SYMPOSIUM III
Biochemistry of the Central Nervous System

VOLUME IV: SYMPOSIUM IV
Biochemistry of Steroids

VOLUME V: SYMPOSIUM V
Biochemistry of Antibiotics

VOLUME VI: SYMPOSIUM VI
Biochemistry of Morphogenesis

VOLUME VII: SYMPOSIUM VII
Biochemistry of Viruses

VOLUME VIII: SYMPOSIUM VIII
Proteins

VOLUME IX: SYMPOSIUM IX
Physical Chemistry of High Polymers of Biological Interest

VOLUME X: SYMPOSIUM X
Blood Clotting Factors

VOLUME XI: SYMPOSIUM XI
Vitamin Metabolism

VOLUME XII: SYMPOSIUM XII
Biochemistry of Insects

VOLUME XIII
Colloquia on Topical Questions in Biochemistry

VOLUME XIV
Transactions of the Plenary Sessions

VOLUME XV
*Index to Symposia and Colloquia and Abstracts
of Sectional Papers*

FOREWORD

W. FRISCH-NIGGEMEYER

Medizinisch-Chemisches Institut der Universität, Vienna, Austria

In the opinion of the organizers of this congress, the biochemistry of viruses is of such importance that a symposium was dedicated to this branch. It is not that virology becomes a part of biochemistry. In fact, many a biologist would strongly object to this statement. However, it seems that in the development of virology, biochemistry plays an ever increasing role. Furthermore, the basic facts elicited by virologists are of fundamental importance for all biochemistry.

Although hardly anybody believes that viruses are the forms in which life once originated from inanimate matter, the opinion that viruses are somehow situated in a no-mans-land between life and non-life is still valid. Not long ago science was interested mainly in the differences between viruses and true organisms. Now the emphasis has shifted to the question of the differences between viruses and normal cell constituents. Especially in the case of viruses which do not cause the slightest sign of a disease, the problem—and even more the method of research—is a biochemical one. Both merge with the investigation of the uninfected cell. From the stages and conditions of virus production we get valuable information about normal protein synthesis, and in some respects, about abnormal protein synthesis, too. Thus, for the biochemist the virus is not always the deadly enemy who has to be fought under all circumstances—as it was for the bacteriologist of former days—but rather a tool, the usefulness of which depends on the ingenuity of the craftsman.

Even more important is the fact that viruses are examples of highly specific and at the same time relatively easily accessible nucleoproteins. Nowhere else are structure and function so intimately combined and interdependent. The importance of the nucleoproteins for the functioning of the organism as well as for the continuity of life in its specific forms is common knowledge. But here again it was the chemical attack, mounted in the field of virus research, which has yielded the most spectacular results. Until now, the task was to confirm the chemical structures and to explain from these the biological functions. But some results from recent studies in biochemical virology have raised the hope that one day we shall be able to alter the biological activity at will by using clear-cut organic reactions on the chemical substrates of heredity.

The papers presented in this symposium will no doubt serve as illustrations for what can be expected in the future.

LIST OF AUTHORS
LISTE DES AUTEURS
AUTORENVERZEICHNIS

ALLISON, J. L.	Department of Biophysics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania
BAUER, D. J.	Wellcome Laboratories of Tropical Medicine, London, England
BEARD, DOROTHY	Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina
BEARD, J. W.	Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina
BEAUDREAU, G. S.	Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina
BECKER, C.	Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina
BENDET, I. J.	Department of Biophysics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania
BERGOLD, G. H.	Insect Pathology Laboratory, Saulte Sainte Marie, Ontario, Canada
BLÁŠKOVIČ, D.	Institute of Virology, Czechoslovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia
BONAR, R. A.	Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina
BRADLEY, P. L.	Wellcome Laboratories of Tropical Medicine, London, England
BRODA, E.	I. Chemisches Institut der Universität, Wien, Österreich
COMMONER, BARRY	The Henry Shaw School of Botany, Washington University, St. Louis, Missouri
DUNN, D. B.	Agricultural Research Council Virus Research Unit, Moltano Institute, Cambridge, England
EPSTEIN, H. T.	Brandeis University, Waltham, Massachusetts
FRAENKEL-CONPAT, H.	Virus Laboratory, The University of California, Berkeley, California
FRISCH-NIGGEMEYER, W.	Medizinisch-Chemisches Institut der Universität, Wien, Österreich
GIERER, A.	Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Deutschland
GINOZA, W.	University of California, Los Angeles, California
GORDON, M. P.	Virus Laboratory, University of California, Berkeley, California
HÁNA, L.	Institute for Virology, Czechoslovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia

X LIST OF AUTHORS LISTE DES AUTEURS AUTORENVERZEICHNIS

HOYLE, L.	Public Health Laboratory, Northampton, England
JOKLIK, W. K.	Department of Microbiology, Australian National University, Canberra, Australia
KLUG, A.	Department of Physics, Birkbeck College, London, England
KNIGHT, C. A.	Department of Biochemistry and Virus Laboratory, University of California, Berkeley, California
KOZLOFF, L. M.	Department of Biochemistry, University of Chicago, Chicago, Illinois
LAUČIKOVÁ, O.	Virologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava, Tschechoslowakei
LAUFFER, M. A.	Department of Biophysics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania
MILLER, H. K.	General Medical Research Laboratory, Veterans Administration Hospital, Bronx 68, New York
MUNDY, K. W.	Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, Deutschland
PIRIE, N. W.	Rothamsted Experimental Station, Harpenden, England
RANDERATH, K.	Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
RUTIKAY-NEDECKY, G.	Institute of Virology, Czechoslovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia
RYŽKOV, V. L.	Institut für Mikrobiologie der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau, UdSSR
SCHRAMM, GERHARD	Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Deutschland
SCHWERDT, C. E.	Department of Medical Microbiology, Stanford University, Stanford, California
SINGER, B.	Virus Laboratory, The University of California, Berkeley, California
SMITH, J. D.	Agricultural Research Council Virus Research Unit, Moltano Institute, Cambridge, England
SOKOL, F.	Institute of Virology, Czechoslovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia
STAEHELIN, M.	Virus Laboratory, University of California, Berkeley, California
STENT, G. S.	Virus Laboratory, University of California, Berkeley, California
TAKAHASHI, W. N.	University of California, Berkeley, California
VOLKIN, E.	Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee
WATANABE, I.	Department of Biophysics and Biochemistry, University of Tokyo, Tokyo, Japan
WECKER, E.	Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Deutschland

CONTENTS

Biosynthese des Tabakmosaikvirus	1
GERHARD SCHRAMM	
The Structural Basis of the Activity of Tobacco Mosaic Virus	9
H. FRAENKEL-CONRAT and B. SINGER	
The Biochemical Basis of Tobacco Mosaic Virus Infectivity	17
BARRY COMMONER	
Biochemische Bedingungen der Vermehrung der Viren	31
V. L. RYŽKOV	
The Properties of Fragments of Tobacco Mosaic Virus	45
N. W. PIRIE	
Die Eigenschaften der infektiösen Einheit des Tabakmosaikvirus	58
A. GEIRER	
Erzeugung von Mutanten des Tabakmosaikvirus durch chemische Veränderung seiner Nukleinsäure <i>in vitro</i>	62
K. W. MUNDY and A. GIER	
The Structure of the Infectious Ribonucleic Acid of Tobacco Mosaic Virus	66
W. GINOZA	
<i>Discussion</i>	69
The Occurrence of Methylated Purines in Nucleic Acids: Their Distri- bution in Cell and Virus Nucleic Acids	72
D. B. DUNN and J. D. SMITH	
Chemistry of some Virus Variants	80
C. A. KNIGHT	
Electrophoretic Experiments on the Nucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus	85
W. H. TAKAHASHI	
Biological Effects of 5-Fluorouracil on Tobacco Mosaic Virus	87
M. STAHELIN and M. P. GORDON	
<i>Discussion</i>	89
The Characteristic Polarographic Effect of Tobacco Mosaic Virus	90
GABRIEL RUTKAY-NEDECKÝ	
Structure and Chemistry of Insect Viruses	95
G. H. BERGOLD	
<i>Discussion</i>	98
Biochemistry of the Avian Leukemia Viruses	99
J. W. BEARD, R. A. BONAR, G. S. BEAUDREAU, C. BECKER and DOROTHY BEARD	
<i>Discussion</i>	117

	<i>page</i>
The Nucleic Acid of the Influenza Virus L. HOYLE	119
The Properties of Purified Polioviruses CARLTON E. SCHWÉRDt	130
The Kinetics of Xanthine Oxidase Formation in Neurotropic Virus Infections D. J. BAUER and P. L. BRADLEY	142
Ergebnisse mit Ribonukleinsäure aus tierpathogenen Viren E. WECKER	147
The Relationship between the g-Antigens of some Myxoviruses D. BLÁŠKOVIČ and F. ŠPKOL	152
Ein Spaltprodukt des Virus-Hämagglutination-Inhibitors aus Chorion-allantois-Membranen O. LAUČIKOVA	156
Some Properties of Haemagglutination Inhibitor Against Influenza C Virus LADISLAV HÁNA	160
The Nucleic Acids of Influenza Virus H. K. MILLER	162
Inactivation of Viruses MAX A. LAUFFER	167
<i>Discussion</i>	183
Some Reactions During Bacteriophage Invasion LLOYD M. KOZLOFF	185
<i>Discussion</i>	199
A Mechanism for Replication and Genetic Recombination of the DNA of Bacterial Viruses GUNTHER S. STENT	200
Ribonucleic Acid Turnover in Phage Infection E. VOLKIN	212
Some Evidence for the Localization of Virus Replication H. T. EPSTEIN	225
Protein Synthesis in Phage Infected <i>E. coli</i> I. WATANABE	228
Some Aspects of the Effect of Infection of HeLa Cells with Vaccinia Virus on the Metabolism of RNA W. K. JOKLIK	233
Concluding Remarks by the Chairman of the Last Session N. W. PIRIE	237
Biochemie der Viren. Ein Bericht über Symposium VII E. BRODA	240

BIOSYNTHESE DES TABAKMOSEIKVIRUS

GERHARD SCHRAMM

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Deutschland

Die Aufklärung des Verlaufs einer Virusinfektion kann von zwei Seiten her in Angriff genommen werden, einmal von der Untersuchung des Aufbaus des Virusteilchens selbst und zum anderen vom Verhalten der Wirtszelle her. Beide Arbeitsrichtungen müssen sich gegenseitig ergänzen, denn es zeigt sich immer wieder, dass der Erkenntnis der biologischen und genetischen Phänomene bei der Virusvermehrung Grenzen gesetzt sind, wenn nicht die Morphologie und die chemische Zusammensetzung des Erregers genau bekannt sind.

STRUKTUR DES TABAKMOSEIKVIRUS

Die Struktur des Tabakmosaikvirus (TMV) ist weitgehend analysiert, während unsere Kenntnisse über sein Verhalten in der Wirtszelle noch recht unvollkommen sind. Dies hat seinen Grund darin, dass das Virus selbst leicht in grösseren Mengen zugänglich ist, während die biologischen Methoden zu seinem Nachweis denjenigen unterlegen sind, die bei den Bakteriophagen und tierpathogenen Viren angewandt werden. Im Vergleich zu den Bakteriophagen und den grösseren tierpathogenen Viren zeichnet sich das TMV durch eine einfache Struktur mit einem hohen Grad an innerer Ordnung aus. Wir finden im Virus nur zwei Komponenten, ein einheitlich zusammengesetztes Protein und Ribonucleinsäure (RNS), die in bestimmter Weise einander zugeordnet sind. Schon frühzeitig gelang es, das Protein in nativem Zustand von der RNS abzutrennen und das abgelöste Protein wieder zu nicht-infektiösen Partikeln zu vereinen, die den ursprünglichen Viren in Grösse und Gestalt sehr ähnlich sind.¹ Nach der chemischen Untersuchung besteht das Protein aus Peptidketten, die aus etwa 150 Aminosäuren zusammengesetzt sind und ein Molekulargewicht von rund 16 500 besitzen.² Die röntgenographischen Untersuchungen von Watson und insbesondere von R. Franklin² zeigten, dass diese Untereinheiten in Form einer Schraube mit der Ganghöhe 23 Å angeordnet sind, so dass ein Proteinhohlzylinder entsteht. Vergleichende Untersuchungen an dem reaggregierten Protein-Teilchen und dem Virus selbst ergaben, dass die RNS an der Innenwand des Hohlzylinders

angelagert ist, wobei sie den durch das Protein vorgegebenen Windungen folgt. Dieses Strukturmodell konnte vor allem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Nach teilweiser Entfernung des Proteins wird der im Innern liegende RNS-Faden sichtbar. Er erscheint auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als kompakter Docht, dies ist jedoch nur durch die Schrumpfung während des Eintrocknens vorgetäuscht. Im intakten Virus stellt die RNS eine Spirale dar, die einen Hohlraum umfasst. Dieser zentrale Hohlraum konnte durch Anfüllen mit Kontrastmitteln sichtbar gemacht werden.^{3,4} In Ultradünnschnitten von orientierten TMV-Präparaten konnten durch bestimmte Kontrastmittel Protein bzw. RNS angefärbt werden, worauf dann die optisch leere Zone im Innern sowohl an Längs- als auch an Querschnitten sichtbar wird.⁴

ÜBER DIE INFEKTIOSE RIBONUCLEINSÄURE DES TMV

Schon frühzeitig wurde vermutet, dass sich das Virus nicht als solches vermehrt, sondern dass vorher eine Aufspaltung in kleinere Einheiten stattfinden muss.⁵ Über die Art dieser Aufspaltung gaben nun zunächst wieder Untersuchungen am Virusteilchen selbst Aufschluss. Gierer und Schramm⁶ gelang es durch Behandlung mit Phenol und Fraenkel-Conrat *et al.*⁷ durch Behandlung mit Dodecylsulfat unter Denaturierung des Proteins den Nucleinsäurekern im intakten Zustand zu isolieren. Durch eine Reihe von Experimenten⁶ konnte bewiesen werden, dass die Protein-freie RNS für sich infektiös und in der Lage ist, die Bildung des spezifischen Virusproteins in der Wirtszelle zu induzieren. Damit war die entscheidende Rolle der RNS bei der Virussyntese erkannt und eine Reihe weiterer Untersuchungen über die Biosynthese des TMV möglich gemacht.

Bevor wir uns diesen zuwenden, soll zunächst die Struktur der infektiösen RNS selbst betrachtet werden. Legt man für das TMV ein Molgewicht von rund $40 \cdot 10^6$ zugrunde und nimmt man einen RNS-Gehalt von 5,6% an, so ergibt sich für den gesamten RNS-Kern ein Partikelgewicht von rund $2,3 \cdot 10^6$. Aus den Untersuchungen von Gierer⁸ ergab sich weiterhin, dass die infektiöse Komponente tatsächlich ein Molgewicht dieser Grösse besitzt. Allerdings gelingt es nicht, diese in vollkommen homogener Form darzustellen. Sie ist stets von gewissen niedermolekularen Anteilen begleitet, so dass das mittlere Molgewicht der RNS aus TMV etwas niedriger, bei rund $1 \cdot 10^6$ liegt. Differentielle Ultrazentrifugationen ergaben, dass diese niedermolekularen Anteile keine Infektiosität besitzen.

Nach Watson und Crick besteht die DNS aus zwei umeinander gewundenen Nucleotidketten. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Tabakmosaikvirus-Ribonucleinsäure (TMV-RNS) sprechen

dafür, dass sie nur aus einer einzigen Nucleotid-Kette aufgebaut ist. So zeigte die Analyse der Purin- und Pyrimidin-Nucleotide der TMV-RNS, dass kein äquimolares Verhältnis von Purin zu Pyrimidin vorliegt und dass auch das Verhältnis der 6-Amino- zu den 6-Ketobasen von 1 verschieden ist. Damit entfällt eine wichtige Voraussetzung für ein Zweistrang-Modell nach Art der Desoxyribonucleinsäure (DNS). Weiterhin wird die TMV-RNS im Gegensatz zur DNS schon bei verhältnismässig geringen Salzkonzentrationen, z.B. 1 M NaCl-Lösung, ausgefällt. Die Verteilung der Ladungen an der Oberfläche muss also eine andere sein als bei der DNS. Ein Einstrang-Modell würde die leichte Aggregierbarkeit gut erklären. Ausserdem besitzt die TMV-RNS eine geringere Viskosität als eine DNS gleichen Molgewichts. Auch andere physikalische Messungen sprechen dafür, dass das RNS-Molekül flexibler ist als die DNS. Diese geringe Starrheit spricht ebenfalls gegen das Zweistrang-Modell.

Entscheidend sind vor allem folgende Tatsachen. (1) Die TMV-RNS besteht aus rund 6000 Nucleotiden, sie durchläuft in 130 Windungen mit einem Radius (Abstand der P-Atome vom Zentrum) von 40 Å den Protein-Hohlzylinder. Selbst wenn man einen maximalen Abstand von 7,4 Å von Nucleotid zu Nucleotid annimmt, wäre ein Zweistrang-Modell nicht lang genug, um das Virus in seiner gesamten Länge zu durchlaufen. (2) Bei einem Einstrang-Modell führt jede Spaltung einer Phosphatbrücke zu einer Verkürzung des Moleküls. Bei einem Mehrstrang-Modell ist dies nicht der Fall, da die Bruchstücke durch die benachbarte Kette zusammengehalten werden. Gierer⁸ untersuchte die Änderung der Viskosität der RNS beim Abbau mit Ribonuclease. Die Resultate sprechen eindeutig für ein Einstrang-Modell und sind signifikant verschieden von denen, die bei einem Zweistrang-Modell zu erwarten wären. Weitere Einzelheiten sind dem Vortrag von A. Gierer auf dieser Tagung zu entnehmen.

Nach der Darstellung der infektiösen RNS aus TMV lag es nahe, den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung zu untersuchen. Von Gierer⁸ wurde geprüft, ob durch Abbau der RNS mit Ribonuclease sich kleinere Einheiten finden lassen, die noch infektiös sind. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich, dass sehr wenige, wahrscheinlich eine einzige Spaltung genügen, um die Infektiosität zu zerstören. Demnach ist nur der intakte Nucleinsäuestrang biologisch aktiv. In gleichem Sinne sprechen auch unveröffentlichte Versuche von Schuster und Schramm.⁹ Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf TMV-RNS werden die Aminogruppen der Purine und Pyrimidine in Hydroxylgruppen umgewandelt, ohne dass dabei die Molekülgrösse reduziert wird. Es zeigte sich, dass die Umwandlung von wenigen (im Durchschnitt von 2 Nucleotiden) genügt, um die Vermehrungsfähigkeit der gesamten RNS zu

unterbinden. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass jedes einzelne Nucleotid für die Übertragung der genetischen Information erforderlich ist. Dieses Ergebnis ist nicht selbstverständlich, da bei einem Vergleich der Zahl der Nucleotide in der RNS-Kette mit der Zahl der Aminosäuren in der Peptidkette, die unter der Kontrolle der RNS aufgebaut wird, etwa 40 Nucleotide auf eine Aminosäure kommen. Es werden also verhältnismässig viele Nucleotide benötigt, um den Einbau einer Aminosäure in die Peptidkette zu lenken. Nach neueren Ergebnissen über die Bipsynthese der Zellproteine scheint jedoch diese Zahl recht plausibel (siehe unten).

UNTERSUCHUNGEN AN ANDEREN RIBONUCLEINSÄUREN

Mit der von Gierer und Schramm⁶ entwickelten Methode wurden auch bei verschiedenen tierpathogenen Virusarten infektiöse Ribonucleinsäuren gewonnen, z.B. aus dem Virus der Poliomyelitis,^{10,11} aus dem Virus der Mengo-Encephalitis,¹² dem Oststamm^{13,14} und dem Weststamm¹⁵ der Amerikanischen Pferdeencephalitis und dem Theiler-Virus.¹⁶ In allen diesen Fällen hatte die infektiöse RNS ein Molegewicht von etwa $2 \cdot 10^6$. Weiterhin wurde RNS aus normalen Lebermikrosomen gewonnen. Auch hier ergab sich für die Hauptkomponente das gleiche Molegewicht (siehe Vortrag Gierer). Von Frisch-Niggemeyer¹⁷ wurde schon früher darauf hingewiesen, dass der absolute Gehalt verschiedener tier- und pflanzenpathogener Viren an RNS weitgehend übereinstimmt und ebenfalls auf ein Partikelgewicht von $2 \cdot 10^6$ führt. Svedberg¹⁸ hat auf die Tatsache aufmerksam gemacht, dass die Molegewichte vieler Proteine in der Grössenordnung von 17 000 liegen oder einfache Multiple davon sind. Ob hierin ein innerer Zusammenhang zwischen Eiweiss- und RNS-Struktur zum Ausdruck kommt, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

FUNKTION DER RNS BEI DER VIRUSVERMEHRUNG

Es war zu vermuten, dass beim natürlichen Infektionsprozess zunächst die im Innern des Virus liegende RNS in Freiheit gesetzt wird. Falls diese Freisetzung langsam verläuft, sollte die Virusbildung schneller in Gang kommen, wenn man direkt mit der freien RNS infiziert. Dies ist tatsächlich der Fall. Siegel *et al.*¹⁹ studierten die Vermehrung des TMV in *Nicotiana glutinosa* mit Hilfe einer indirekten Methode. Sie bestimmten die Abtötung der infektiösen Zentren durch UV-Licht während der Infektion. Etwa 5 Stdn nach der Infektion stieg die Überlebensrate steil an. Es wird angenommen, dass zu diesem Zeitpunkt auch die Virusvermehrung einsetzt. Mit der gleichen Methode untersuchten die Autoren auch den Infektionsverlauf mit der freien Virus-RNS und fanden eine erhebliche Verkürzung der Latenzzeit. Schramm und Engler²⁰ konnten an

Nicotiana glutinosa den Anstieg der Viruskonzentration auf direktem Wege mit Hilfe eines empfindlichen biologischen Tests nachweisen. Eine wichtige Voraussetzung hierfür war, dass nach der Infektion die äusserlich anhaftenden Virusteilchen, die nicht am Infektionsprozess teilnehmen, durch Waschen mit Antiserum vollständig entfernt werden. Ein steiler Anstieg der Konzentration an Virusteilchen setzte bei dieser Wirtspflanze nach einer Latenzperiode von 30 Stdn ein. Vor dieser Zeit konnte intaktes Virus nicht festgestellt werden. Die Grenze der Nachweisbarkeit lag bei etwa 10 Virusteilchen je Dosis. Wahrscheinlich liegen also auch die eingedrungenen Virusteilchen nicht mehr in der ursprünglichen Form vor, wie dies auch bei Infektionen mit Bacteriophagen oder tierpathogenen Viren beobachtet wurde. Bei Wiederholung des Versuchs mit freier RNS aus TMV wurde die Bildung des fertigen Virus bereits nach 20 Stdn beobachtet. Die Virusvermehrung erfolgte von diesem Zeitpunkt ab mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Infektion mit intaktem Virus. Die Verkürzung der Latenzperiode um 10 Stdn entspricht also wahrscheinlich der Zeit, die zur Freisetzung der RNS aus der Proteinhülle benötigt wird. Bei diesen Experimenten erfolgte die Extraktion des Virus mit Phosphatpuffer. Hierbei werden die freie RNS und Nucleinsäure-reiche Vorstufen des Virus nicht erfasst, da sie durch die Ribonucleasen zerstört werden. Um eventuell vorhandene Virus-RNS nachzuweisen, wurden daher die infizierten Pflanzen in bestimmten Zeiträumen mit Phenol extrahiert, da hierbei die RNS nicht zerstört wird. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen, doch sprechen die bisherigen Befunde dafür, dass die Zunahme der infektiösen RNS tatsächlich früher erfolgt als die Bildung des intakten Virus. Man kann vermuten, dass die Proteinsynthese erst einen grösseren Umfang annimmt, wenn genügend RNS gebildet ist. Während der Latenzzeit steht noch nicht genügend Protein zur Verfügung, um die RNS-Moleküle einzuhüllen und zu fertigen Virusteilchen zu ergänzen. Diese Ergebnisse dürften auch für Untersuchungen über die Biosynthese der Zellproteine von Bedeutung sein.

ORT DER VIRUSSYNTHESE

Offen bleibt die Frage, an welchen Zellelementen die Synthese der RNS bzw. des Proteins vor sich geht. Zum Nachweis der virusspezifischen Antigene in der Zelle hat sich im Fall der tierpathogenen Viren die Methode von Coons sehr bewährt.²¹ Hierbei werden die zu untersuchenden Gewebe mit Virusantikörpern behandelt, die durch Kupplung mit Fluorescein-Derivaten markiert sind. Die Orte der Zelle, die Virusantigen enthalten, binden in spezifischer Weise den Antikörper und lassen sich im Fluoreszenz-Mikroskop leicht nachweisen. Die Anwendung dieser Technik auf Pflanzengewebe bietet gewisse Schwierigkeiten, da die

Zellmembranen im Gegensatz zu tierischen Zellen für den Antikörper nicht durchlässig sind. Unter Vermeidung der Artefakt-Bildung durch Fixation gelang es Röttger und Schramm²², aus infiziertem Tabakgewebe Gefrierschnitte herzustellen, die gut mit fluoreszierenden Antikörpern reagierten. Da die Nucleinsäure nicht antigen ist, kann bei diesen Versuchen über den Ort der RNS-Synthese nichts ausgesagt werden. Es konnten jedoch gewisse Aufschlüsse über die Bildung des Virusproteins in den Zellen und über die Ausbreitung des Virus im Pflanzengewebe gewonnen werden. Nach den Versuchen, die sich noch im Gang befinden, scheinen die Zellkerne und die Chloroplasten an der Bildung des Virusproteins nicht beteiligt zu sein. Bestimmte Bestandteile des Plasmas zeigen dagegen eine starke Fluoreszenz. Weitere Versuche werden nötig sein, um die primäre Bildungsstätte des Virusproteins aufzufinden.

Aus den bisherigen Beobachtungen lässt sich ein vorläufiges Bild über den Vorgang der Virussynthese ableiten. Nach Eintritt des Virusteilchens in die Zelle wird die Proteinhülle abgestreift. Die freiwerdende RNS muss anschliessend an bestimmte Zellstrukturen gebunden werden, damit sie gegen die Einwirkung der in der Zelle vorhandenen Ribonucleasen geschützt ist. (Die geringere Infektiosität der freien RNS gegenüber dem kompletten Virus erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass ein grosser Teil der RNS bei der Wanderung durch die Zelle zerstört wird.) Die Strukturen, an die sich die Nucleinsäuren in der Zelle anhaften, sind noch nicht bekannt. Versuche von Zech²³ sprechen dafür, dass die Nucleinsäure-Vermehrung im Kern beginnt. Die Nucleinsäure könnte von hier aus in das Plasma abwandern und dort die Bildung des spezifischen Virusproteins veranlassen. Es entsteht zunächst eine grössere Anzahl von RNS-Molekülen; bevor genügend Protein vorhanden ist, damit vollständige Virusteilchen gebildet werden können. Die Pflanzenzellen sind untereinander durch Plasmastränge, die Plasmodesmen, verbunden. Die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle erfolgt durch diese Plasma-
brücken. Es ist wahrscheinlich, dass die Transportform nicht das komplette Virus, sondern RNS, bzw. RNS-reiche Vorstufen sind.

ZUSAMMENHANG MIT DER BIOSYNTHESE DER ZELLPROTEINE

Das Ziel unserer Untersuchungen besteht darin, unsere bisherigen Kenntnisse über die Biosynthese des TMV mit den neueren Erkenntnissen über die Biosynthese der normalen Proteine zu vereinen. Durch Untersuchungen über den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in bestimmte Zellfraktionen wurden namentlich in den Arbeitskreisen von Zamecnik und Lipmann²⁴ sehr wichtige Ergebnisse erzielt. So wurde u.a. festgestellt, dass die Aminosäuren vor dem Einbau an spezifische Polyribonucleotide (s-RNS) gebunden werden. Es ist bemerkenswert,

dass diese s-RNS ein Molegewicht besitzt, das 30-40 Nucleotiden entspricht. Wie oben erwähnt wurde, ist das Verhältnis der Nucleotide in der TMV-RNS zur Anzahl der Aminosäuren in der zugehörigen Peptidkette gerade von derselben Grösse. Bei der Vermehrung der normalen Proteine ist also pro Aminosäure die gleiche Anzahl von Nucleotiden erforderlich wie bei der TMV-Vermehrung. Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, dass die eingedrungene Virus-RNS in die niedermolekularen s-RNS-Fractionen aufgespalten wird, denn in diesem Fall sollten auch Bruchstücke der Virus-RNS wirksam sein. Es ist vielmehr zu vermuten, dass die Virus-RNS als Matrize wirkt, auf der sich die kurzen s-RNS-Stücke spezifisch anlagern, die in jeder Zelle vorhanden sind. Diese Hypothese würde, auch einige andere Befunde erklären. Es scheint demnach die Hoffnung berechtigt, dass die Untersuchungen über die Biosynthese der Viren auch dazu beitragen werden, die Biosynthese der normalen Proteine verständlicher zu machen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. G. SCHRAMM; *Naturwissenschaften* 31, 94 (1943); *Z. Naturf.* 2b, 250 (1947).
2. Literaturzusammenstellung siehe bei G. SCHRAMM; *Ann. Rev. Biochem.* (1958).
3. H. E. HUXLEY; *Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy* S.260, New York, Academic Press, 1957.
4. H. FERNANDEZ-MORAN und G. SCHRAMM; *Z. Naturf.* 13b, 67 (1958).
5. H. FRIEDRICH-FREKSA, G. MELCHERS und G. SCHRAMM; *Biol. Zbh* 65, 187 (1946).
6. A. GIERER und G. SCHRAMM; *Z. Naturf.* 11b, 138 (1956); *Nature (Lond.)* 177, 702 (1956).
7. H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER und R. C. WILLIAMS; *Biochim. Biophys. Acta* 25, 87 (1957).
8. A. GIERER; *Nature (Lond.)* 179, 1297 (1957).
9. H. SCHUSTER und G. SCHRAMM. Unveröffentlicht.
10. J. S. COLTER, H. H. BIRD, A. W. MOYER und R. A. BROWN; *Virology* 4, 522 (1957).
11. G. KOCH, H. E. ALEXANDER, I. M. MOUNTAIN, K. SPRUNT und O. VANDAMME; *Virology* 5, 172 (1958).
12. J. S. COLTER, H. H. BIRD und R. A. BROWN; *Nature (Lond.)* 179, 859 (1957).
13. E. WECKER und W. SCHÄFER; *Z. Naturf.* 12b, 415 (1957).
14. E. WECKER; *Z. Naturf.* Im Druck.
15. E. WECKER; *Virology*. In Vorbereitung.
16. R. M. FRANKLIN und E. WECKER; *Virology*. In Vorbereitung.
17. W. FRISCH-NIGGEMEYER; *Nature (Lond.)* 178, 307 (1956).
18. TH. SVEDBERG und K. O. PEDERSEN; *Die Ultrazentrifuge*, Steinkopf, Dresden, 1940.
19. A. SIEGEL, W. GINOZA und S. G. WILDMAN; *Virology* 3, 554 (1957).
20. G. SCHRAMM und R. ENGLER; *Nature (Lond.)* 181, 916 (1958).

21. P. M. BREITENFELD und W. SCHÄFER; *Virology* 4, 328 (1957).
22. B. RÖTTGER und G. SCHRAMM. Unveröffentlicht.
23. H. ZECH und L. VOGT-KÖHNE; *Naturwissenschaften* 42, 327 (1955).
24. P. C. ZAMECNIK und F. LIPMANN; In: Symp. Amino Acid Activation; *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 67 (1958).