

ÜBER DEN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN NACHWEIS DES POLYOMASTAMMES BB-T 2

D. BIERWOLF, A. GRAFFI und L. BAUMBACH

(Eingegangen am 27. Juli, 1960)

Bei unseren Bemühungen, das in unserem Laboratorium isolierte Virus der myeloischen Leukämie der Maus (Elektronenmikroskopischer Nachweis: HEINE, GRAFFI, BIERWOLF, HELMCKE, RANDT, 1957 und 1959; GRAFFI, HEINE, HELMCKE, BIERWOLF, RANDT, 1960) in der Gewebekultur zu züchten, trat bei der Beimpfung von trypsinierten Mäuseembryokulturen mit einer Gewebssuspension aus leukämischem Gewebe nach wenigen Tagen eine cytopathologische Veränderung der Embryonalzellen auf. Diese ließ sich durch zellfrei filtrierte Nährlösung solcher Kulturen serienweise weiter übertragen und stellte sich bei den Passagen mit Regelmäßigkeit 5—8 Tage nach der Beimpfung frisch ausgewachsener Mäuseembryokulturen ein (GRAFFI, GIMMY u. KRAUSE 1959). Zunächst wurde von uns eine Vermehrung des Leukämievirus als Ursache dieser Erscheinung vermutet. Die Verimpfung der zellfrei filtrierten Nährlösung solcher degenerativ veränderter Kulturen auf neugeborene Ratten, Goldhamster und Mäuse zeigte uns jedoch sehr bald, daß der cytopathogene Effekt nicht auf das Leukämievirus zurückzuführen, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit einem zweiten Agens zuzuschreiben ist. Es entstanden nämlich bei den im neugeborenen Zustand behandelten Tieren in hohem Prozentsatz die verschiedensten mesenchymalen Tumoren, wie Nieren-Sarkome, gut- und bösartige Knochentumoren, Lipome, Tumoren in der Parotisgegend, Fibrome etc., während Leukämien völlig fehlten (GRAFFI, GIMMY, KRAUSE, 1959; GIMMY, GRAFFI, KRAUSE, 1959). Damit hatten sich in unseren Versuchen Befunde ergeben, die in mehrfacher Beziehung zu den Resultaten von GROSS (1953) und von STEWART und EDDY (1958) mit dem Parotis-Tumor-Polyomavirus Parallelen zeigen, in deren Versuchen zellfreie Filtrate der lymphatischen Leukämie des AK-Inzuchtstammes der Maus außer Leukämien noch Parotis-Tumoren sowie vereinzelt subcutane Sarkome hervorzurufen vermögen. Erste Hinweise für das Vorhandensein zweier verschiedener Viren, von denen das eine die Leukämien und das andere die Parotis-Carcinome und -Sarkome bedingt, ergaben sich aus Versuchen von GROSS, indem er nachweisen konnte, daß des Leukämieagens sich bei bedeutend niedrigerer Tourenzahl sedimentieren läßt als das Parotistumoragens und daß es im Gegensatz zum Parotistumor-Faktor durch Äther

inaktivierbar ist. Bekanntlich konnte letzteres von STEWART und EDDY (1958) in der Gewebekultur auf Mäuseembryonalzellen zur Vermehrung gebracht werden, wobei es einen starken cytopathogenen Effekt erkennen ließ. Filtrate solcher Kulturen zeigten zuerst bei Mäusen und später bei Ratten und Hamstern eine starke onkogene Wirkung, wobei in den verschiedenen Organen Sarkome, Carcinome sowie gutartige Tumoren auftraten. Es ergab sich nun die Frage, ob das von uns aus virusbedingten myeloischen Leukämien der Maus isolierte polyvalente Geschwulstagens, dem wir die Bezeichnung BB—T 2-Virus gaben, mit dem Parotistumor-Polyomavirus von GROSS—STEWART und EDDY völlig identisch ist oder gewisse Unterschiede zwischen beiden bestehen. Eine der charakteristischen Eigenschaften des STEWART-EDDY'schen Polyomastammes ist dessen starke Haemagglutinationswirkung auf verschiedene Erythrocytenarten, z. B. des Meerschweinchens, des Frosches und der Blutgruppe O vom Menschen. In ausgedehnten Untersuchungen in unserem Laboratorium gemeinsam mit G. PASTERNAK konnte für unser BB—T 2-Virus diese haemagglutinierende Wirkung nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis für eine gewisse Unterschiedlichkeit beider Virusstämme ergab sich aus dem Spektrum der bei den verschiedenen Spezies auftretenden Tumoren, wobei für unseren Virusstamm die bei der Ratte und auch beim Kaninchen erzeugten Lipome und Liposarkome die von STEWART und EDDY nicht beobachtet wurden, charakteristisch zu sein scheinen. Aus diesen biologischen Daten ergab sich die Schlußfolgerung, daß es sich bei dem Polyomavirus von GROSS, STEWART und EDDY und unserem BB—T 2-Virus wahrscheinlich um zwei nahe verwandte Stämme der gleichen Virusfamilie handeln dürfte.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen dienten dem elektronenmikroskopischen Nachweis unseres BB—T 2-Virus. Es wurde damit die Absicht verbunden, auf Grund der morphologischen Struktur eine weitere Klassifizierung dieses Virus vorzunehmen und vor allem dessen verwandtschaftliche Beziehung zu dem GROSS—STEWART'schen Polyoma-Stamm weiter zu klären. Ein derartiger Versuch erschien umso aussichtsreicher, als es kürzlich zwei verschiedenen Arbeitskreisen gelang, das GROSS—STEWART'sche Polyma-Virus elektronenmikroskopisch im ultradünnen Schnitt nachzuweisen (BERNHARD, FEBVRE, CRAMER, 1959; BANFIELD, DAWE, BRINDLEY, 1959). Es handelt sich dabei um gleichförmig runde Partikel mit einem Durchmesser von 30—40 m μ , die hauptsächlich im Zellkern und später auch im Cytoplasma der Zellen anzutreffen sind.

Material und Methodik

Als Grundlage für die Vermehrung und Züchtung des Virus wurden Gewebekulturen von trypsiniertem Embryonalgewebe der Maus verwendet. Die Embryonen von trächtigen Weibchen des AB-Stammes wurden kurz vor dem Werfen (18—20. Tag der Embryonalentwicklung) steril aus dem Uterus entnommen und mechanisch fein zerkleinert. Diese Gewebestückchen wurden mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung (Difco) in PPS-Lösung aufgeschlossen, die erhaltene Zellsuspension mehrmals durch Zentrifugieren in PPSgewaschen und anschließend

in der Nährlösung (5 Teile Tyrode, 3 Teile Kälber- oder Pferdeserum und 1 Teil Hühnerembryonalextrakt, 250 i. E. Penicillin und 250 mg Streptomycin/ml) aufgeschwemmt mit einer Zellzahl von etwa 600 000—700 000 Zellen pro ml. Diese Zellsuspension wurde in Rouxflaschen oder Roller-Tubes ausgesät. Nach gutem Anwachsen der Zellen zu einem Monolayer-Rasen auf der Glasfläche wurden die Kulturen 2mal wöchentlich gefüttert und nach etwa 6—8 Tagen mit einer Gewebssuspension aus leukämischem Gewebe beim primären Ansatz oder mit virushaltiger Nährlösung schon infizierter Kulturen bei der passagenweisen Züchtung des Virus beimpft. Zum Zwecke der elektronenmikroskopischen Präparation wurden die Zellrasen am 6—8. Tage, also dem Zeitpunkt des deutlich sichtbaren cytopathogenen Effektes mit dem Spatel vorsichtig von der Glasfläche gelöst und die feinen zusammenhängenden Zellflächen direkt in 1%iger auf pH 7,2 gepufferter OsO₄ 2 Stunden fixiert. Die Entwässerung erfolgte in üblicher Weise mit Äthylalkohol 25%—100% unter eingeschalteter Kontrastierung mit PWS, und darauf die Einbettung in einem Gemisch von Methylmethacrylat (1 Teil) und Butylmethacrylat (3 Teile) unter Zusatz von 1% Dibenzoylperoxyd als Katalysator. Die Polymerisation wurde bei 56° C vorgenommen. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom nach Niklowitz angefertigt. Als Mikroskope standen das ÜM 100 von Siemens und das ÜM 60 von Siemens zur Verfügung. Herrn Prof. HELMCKE und seinen Mitarbeitern (Berlin-Dahlem) danken wir für die freundliche Überlassung der Elektronenmikroskope. Fr. A. RANDT möchten wir für ihre technische Assistenz danken.

Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, zeigt das von uns aufgefundene Virus in der Gewebekultur einen eindeutigen cytopathogenen Effekt, der sich bei Verwendung von Mäuseembryonalzellen erstmalig nach 4—5 Tagen erkennen läßt und nach einer Woche ein sehr ausgeprägtes Stadium erreicht. Lichtmikroskopisch äußert sich dieser Effekt in einer zunehmenden Abrundung der Zellen und Verlust der normalerweise schlanken Ausläufer, wie sie für Fibroblasten charakteristisch sind (Abb. 1a und 1b). Weiterhin verlieren die Zellen im nativen Zustand das optisch weitgehend homogene Aussehen des Cytoplasmas und werden zunehmend trübe und lichtbrechend durch das Auftreten von feineren und gröberen Granula und Schollen im Cytoplasma und Kern. Die Kernveränderungen können überwiegend als fortschreitende Pyknose angesehen werden, während die Prozesse im Cytoplasma zunächst wohl am besten in die Kategorie der trüben Schwellung einzuordnen sind. Schließlich kommt es zum fortschreitenden Zellzerfall, indem sich sowohl Zellkern als auch Cytoplasma in einzelne unregelmäßige Fragmente auflösen. Dieser Zellauflösung geht fast ausnahmslos ein Zerfall der Monolayer-Schicht in einzelne Stränge und dichtere Zellkonglomerate voraus, der dann eine Totalablösung der Zellen und eine freie Suspension derselben im Nährmedium folgt.

Es seien noch einige kurze Hinweise auf bestimmte cytologische Veränderungen der Zellen im mittleren Stadium dieses Degenerationsvorganges gegeben, die möglicherweise eine Aussage zur Virusvermehrung gestatten. (GRAFFI 1959.) Es handelt sich um teils stark lichtbrechende, chromophobe Einschlüsse, deren chemische Natur noch nicht näher definiert werden konnte, teils sind es cytologische Strukturen uncharakteristischer Gestalt, die Feulgenpositive Reaktion zeigen. Erstere lassen sich weder mit Fettfarbstoffen noch durch saure oder basische Farbstoffe imprägnieren, sie sind PAS-negativ und

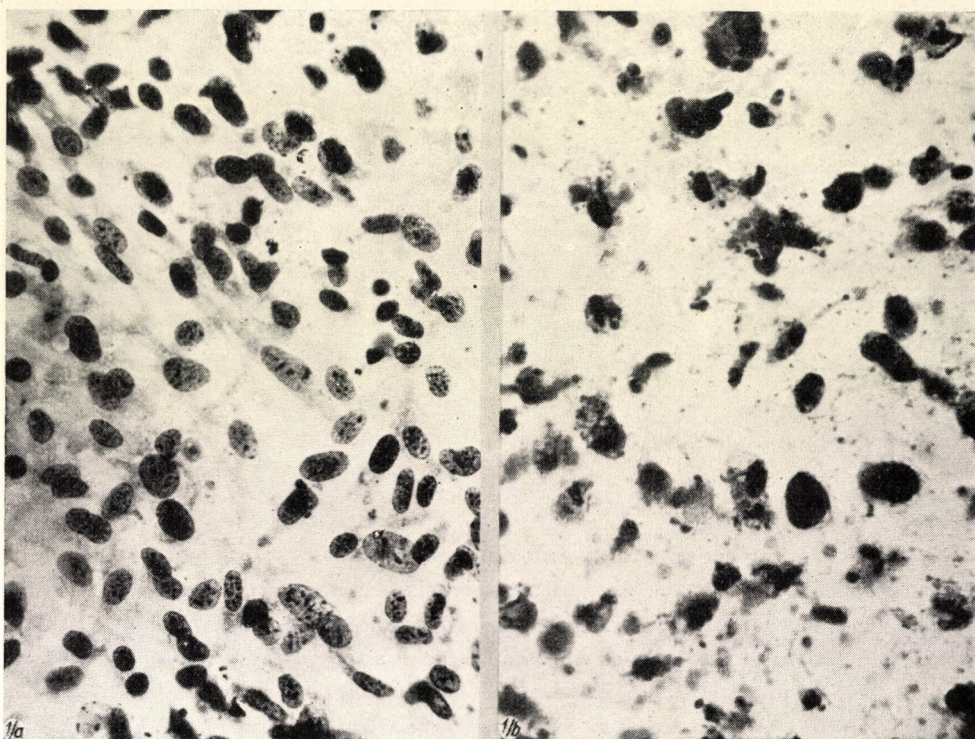


Abb. 1a. Normale Mäuseembryonalkultur
 1b. Kultur mit cytopathogenem Effekt
 Färbung: May-Grünwald-Giemsä

im elektronenmikroskopischen Bild bis auf ein feines Netzwerk optisch leer. Bei einer dritten Form von Einschlüssen im Cytoplasma handelt es sich um ovale bis runde vakuolenartige Höhlen mit einem zentralen Binnenkörper, der sich bei Giemsa-Färbung stark imprägniert und einen hohen Grad von Osmiophilie aufweist (Abb. 2). Die kausalen Beziehungen dieser 3 Einschlußtypen zur Viruswirkung und Virusvermehrung muß als weitgehend ungeklärt angesehen werden. Bei den Feulgen-positiven Einschlüssen handelt es sich wohl in erster Linie um Ansammlungen von Virus im Cytoplasma, was sich vor allem beim Studium der elektronenmikroskopischen Befunde ergibt (Abb. 4). Bei den beiden anderen Einschlußtypen ist an Produkte zu denken, die in der sich degenerativ verändernden Zelle entstehen.

Anhand dieser cytologischen Veränderungen, die nach der Virusinfektion auftreten und schon mit dem Lichtmikroskop gut zu erkennen sind, läßt sich das Studium des cytopathologischen Prozesses und damit der Viruswirkung auf die Zelle gut ablesen und zu den elektronenmikroskopischen Befunden in Beziehung setzen.

Unser Hauptanliegen bei den elektronenmikroskopischen Studien war der Nachweis und die nähere Charakterisierung des cytopathogenen und im Tierversuch onkogenen Virus. Nachdem in den ersten 4 Tagen nach der Infektion, wo also lichtmikroskopisch keine eindeutigen Veränderungen nachweisbar sind, keine sicheren Virusbefunde zu erheben waren, wurde hauptsächlich das Stadium des ausgesprochen cytopathologischen Erscheinungsbildes für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen herangezogen. Dies war zwischen

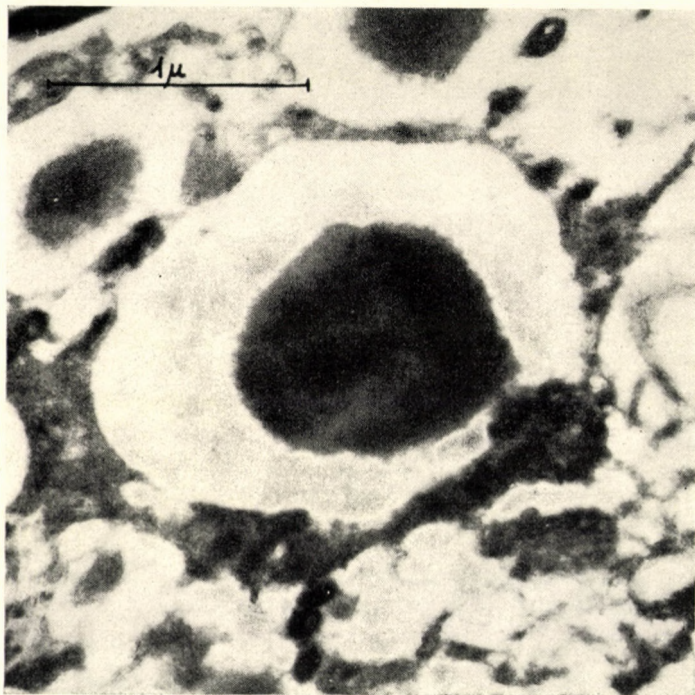


Abb. 2. Stark osmiophiler, cytoplasmatischer Einschluss in einer Zelle aus einer mit BB—T 2-Virus infizierten Gewebekultur. 1 : 45 000

dem 6—8. Tag post infectionem der Fall. Spätere Stadien waren meist wegen zu starker Degeneration der Zellen nicht mehr verwertbar.

Zunächst wandten wir uns der allgemeinen Topographie des Virus in der Zelle zu. Als ein für dieses Virus sehr charakteristisches Bild wurde seine äußerst starke Anreicherung im Zellkern nachgewiesen (Abb. 3). In vielen Zellen ist der Kern prall mit kleinen runden, ca. 30—40 m μ großen Partikeln angefüllt. Eingelagert in die Virusmasse sind, vor allem auch an der Peripherie des Zellkernes, osmiophile, dichte Massen von wechselnder Gestalt, bei denen es sich vorwiegend um das pyknotische Chromatin handeln dürfte (Kernwandhyperchro-

masie degenerativen Ursprungs). Außerdem finden sich mehr oder weniger im Zentrum des virusgefüllten Zellkerns meist etwas weniger dichte Reste des Nukleolus. Mit der Virusproduktion im Zellkern geht also eine degenerative Kernveränderung parallel.

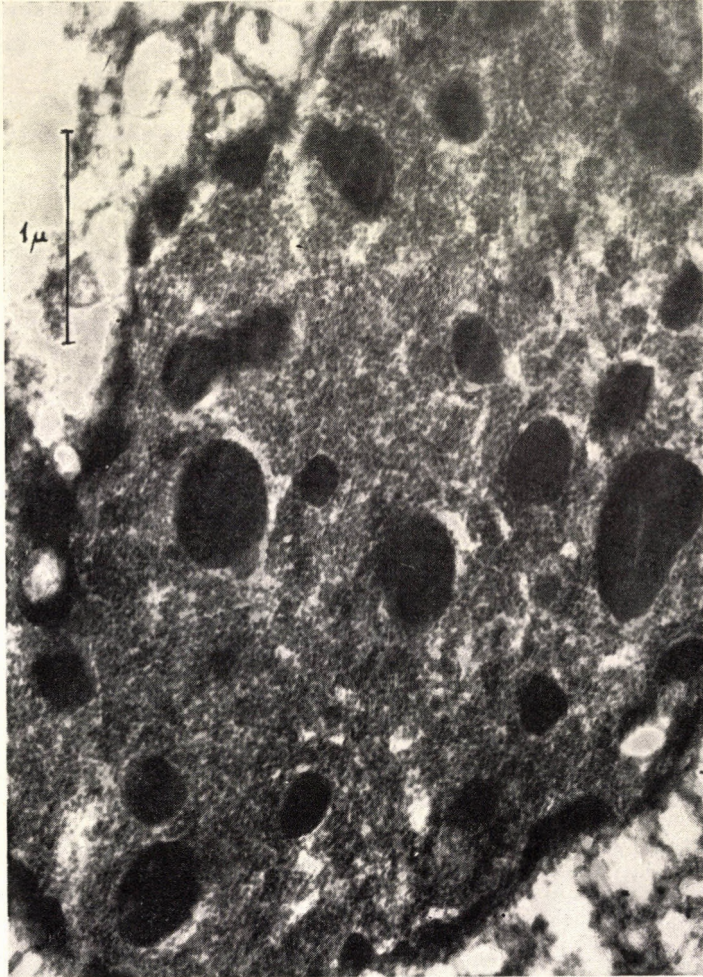


Abb. 3. Mit Viruspartikeln prall gefüllter Zellkern. Herdweise Verdichtung des Chromatins.
1 : 36 800

Außer im Zellkern werden die gleichen Viruspartikel auch im Cytoplasma der Zellen angetroffen, wenn auch nicht so regelmäßig, in geringerer Zahl und mit einer gewissen zeitlichen Verschiebung gegenüber dem Auftreten im Kern. Es kann also angenommen werden, daß das cytoplasmatische Virus zum großen

Teil aus dem Kern stammt und durch Aufreißen der Kernmembran in das Cytoplasma ausgetreten ist, wenn auch eine primäre Virusvermehrung im Cytoplasma nicht ganz ausgeschlossen werden kann. In diesem Sinne sprechen vor allem cytoplasmatische Virushaufen, die in relativ größerer Entfernung von der Kernmembran liegen (Abb. 4). Die Haufenform ist die häufigste Virusanordnung im Cytoplasma, zuweilen kann aber auch eine diffuse Verteilung über das Cytoplasma vorliegen. Eine besondere Virusanordnung innerhalb des

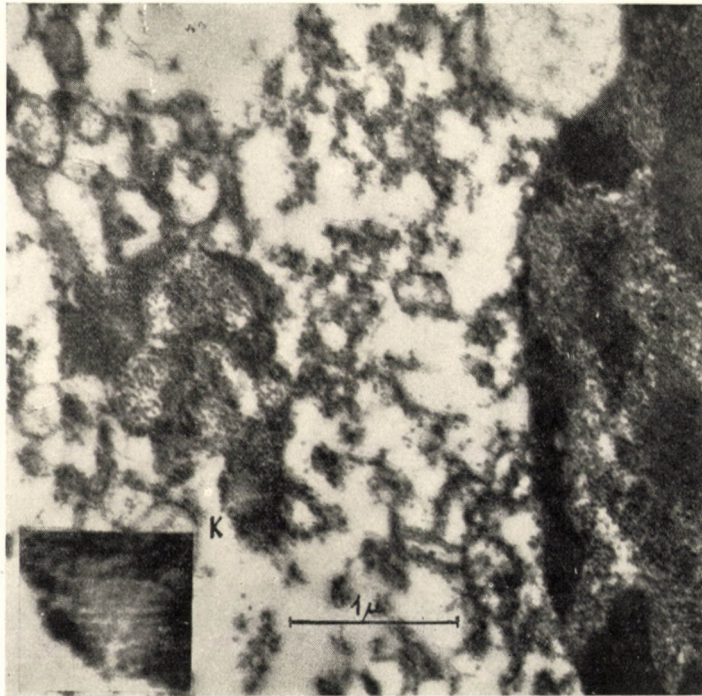


Abb. 4. Virusansammlungen im Kern (rechts) und im Cytoplasma (links). Bei K kristalline Anordnung der Partikel (siehe auch Ausschnitt).
1 : 28 800, Ausschnitt 1 : 72 000

Cytoplasmas ist in der Abb. 5 wiedergegeben. Es handelt sich um vakuolenartige Gebilde, die wahrscheinlich mit Flüssigkeit gefüllt sind und im Inneren Virusteilchen in beträchtlicher Zahl enthalten. Vor allem an der Wand dieser Vakuolen scheinen sich die stark aggregierenden Viruselemente in einfacher oder doppelter Schicht anzuordnen. Ähnliche Bildungen werden von BANFIELD und Mitarb. (1959) beim Polyoma beschrieben.

Schließlich ist das Virus oft in beträchtlichen Massen außerhalb der Zellen anzutreffen. Es muß zunächst offenbleiben, ob es in das extrazelluläre Medium von noch intakten, virushaltigen Zellen ausgeschleust wird oder durch

Zelluntergang in die Flüssigkeit übertritt. Die starke Neigung des Virus zur Aggregation zeigt sich auch extrazellulär, indem im elektronenmikroskopischen Bild die verschiedensten Girlandenformen und ringartigen Strukturen (Abb. 6), die aus einzelnen Viruselementen zusammengesetzt sind, angetroffen werden.

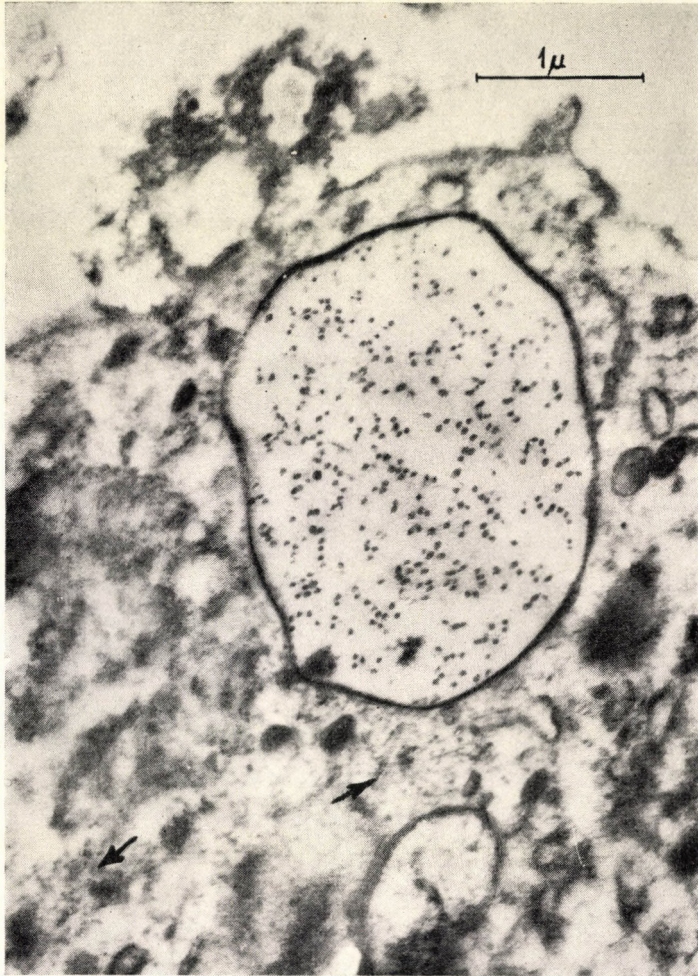


Abb. 5. Virusansammlung in einer cytoplasmatischen Vakuole und diffuse Verteilung im Cytoplasma (siehe Pfeile)
1 : 28 800

Diese besondere Haftfähigkeit der Partikel untereinander drückt sich auch im Zellkern, im Cytoplasma und im extrazellulären Raum in der Bildung von regelrechten Viruskristallen aus (Abb. 4), wobei allerdings noch offenbleiben muß, ob diese Erscheinung nicht unmittelbar mit der Virusvermehrung in Zusammenhang steht.

Wie bereits gesagt, handelt es sich bei den Viruspartikeln um kleine runde Elemente von 30—40 m μ Durchmesser. Eine besondere Feinstruktur im Sinne von Membranen und Nukleoiden, wie bei anderen onkogenen Viren (Leukämie, Milchfaktor) konnten wir bis jetzt nicht eindeutig nachweisen. Allerdings

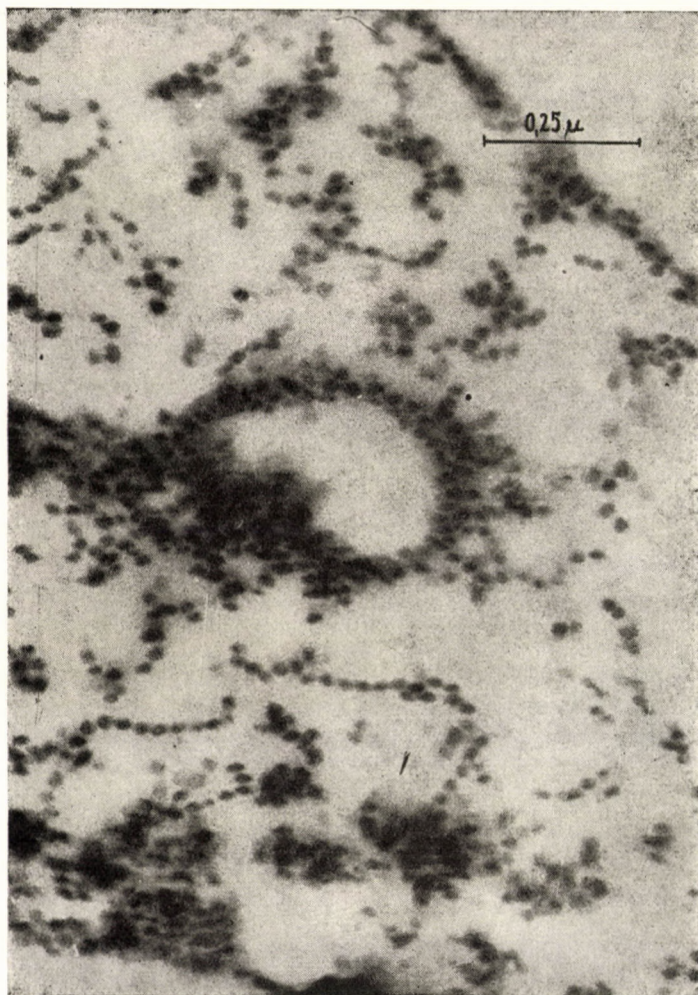


Abb. 6. Extrazelluläre Virusanhäufung und Ausbildung von »Girlanden- und Ringstrukturen«
1 : 110 000

zeigen einige wenige Partikel eine zentrale, leichte Aufhellung, die jedoch auch ein Kunstprodukt oder eine Degenerationserscheinung darstellen könnte. Man gewinnt also den Eindruck, daß es sich bei den Partikeln um ein »nacktes« Virus (OBERLING) handelt, wie z. B. beim Virus des Shope—Papilloms des

Kaninchens. Neben den runden, ziemlich gleichförmigen Viruspartikeln findet man jedoch im Zellkern fadenförmige Elemente gleichen Durchmessers und gleicher Elektronendichte, die eine Länge von durchschnittlich $300\text{ m}\mu$ aufweisen können und manchmal die Anzeichen einer angedeuteten Segmentierung

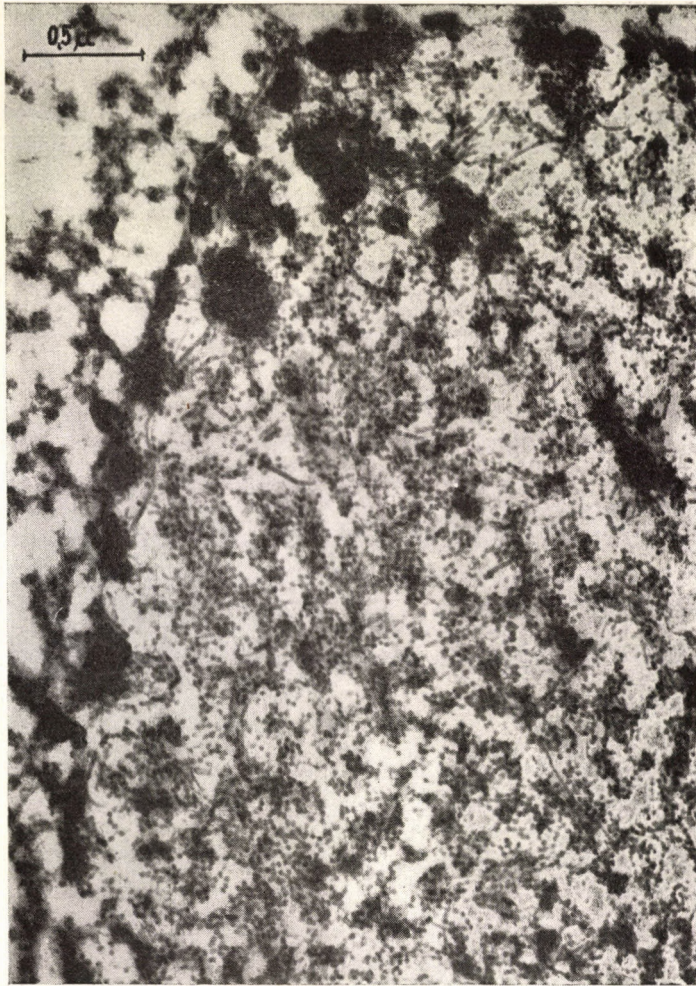


Abb. 7. Ausschnitt aus einem mit Virus gefüllten Zellkern. Ausbildung von Fadenstrukturen und Verdichtung des Chromatins an der Kernmembran.

1 : 40 000

erkennen lassen (Abb. 7). Es ist nicht zu klären gewesen, ob aus diesen fadenförmigen Elementen durch Abschnürungs- oder Segmentierungsvorgänge runde Partikel entstehen. Auffällig ist, daß diese Fäden oft in Gruppen gehäuft vorkommen. Auch die Beziehung dieser kompakteren Fäden zur perlschnur-

artigen Anordnung von Einzelpartikeln im Cytoplasma und außerhalb der Zelle (Abb. 6) ist ungeklärt. Eventuell ist diese Anordnung jedoch auf das schon erwähnte Aggregationsphänomen zurückzuführen. Auch BERNHARD und Mitarb. (1959) beschreiben für das GROSS—STEWART'sche Polyoma-Virus die

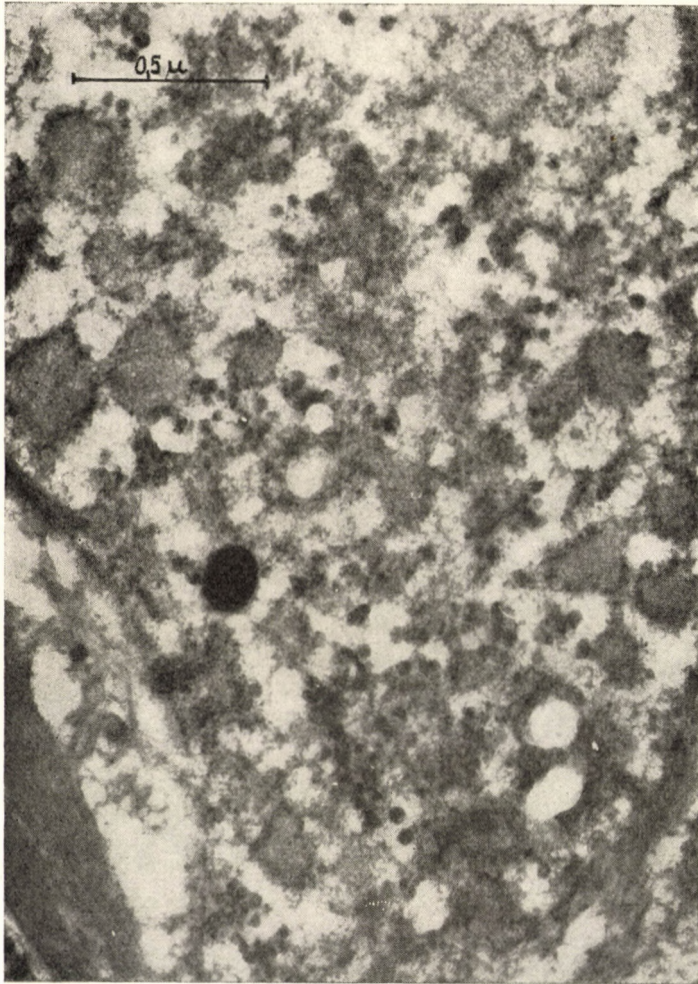


Abb. 8. Virusverdächtige Partikel im Cytoplasma einer Parotistumorzelle.
1 : 64 000

im Kern vorkommenden Fadenstrukturen und diskutieren ihren eventuellen Zusammenhang mit der Virusbildung.

Eine wichtige Frage geht dahin, welche kausalen und genetischen Beziehungen zwischen den strukturierten Bestandteilen des Zellkerns (Chroma-

tin und Nukleolen) und dem Virus bestehen. Generell kann gesagt werden, daß mit zunehmender Anhäufung von Viruspartikeln im Zellkern eine Veränderung der typischen Kernstruktur einhergeht. Anfangs liegen nur einzelne Viruspartikel und die genannten Fäden in der granulär-netzigen Grundsubstanz des Kerns verstreut und Chromatinbrocken und Nukleolus zeigen noch die typische Struktur. Mit zunehmender Virusvermehrung verschwindet jedoch die charakteristisch strukturierte Grundsubstanz und der gesamte Raum des Kernes wird nur von Viruspartikeln, einigen Fäden und pyknotischem Chromatin- und Nukleolusmaterial eingenommen, wobei die Zwischenräume zwischen den genannten Strukturen jetzt elektronenoptisch völlig leer sind. Durch die starke herdweise Verdichtung des Kerninhaltes während der Pyknose ist zunächst noch nicht zu entscheiden, ob auch Kernmaterial unmittelbar in die Viruselemente umgewandelt wird.

Der Virusnachweis in der Gewebekultur war zum Zeitpunkt des eindeutigen Auftretens des cytopathogenen Effektes ein konstantes Phänomen und konnte für eine große Zahl von verschiedenen Zellen aus dem gleichen Präparat erbracht werden. Es ergab sich nun die wichtige Frage, ob auch in den durch das Virus *in vivo* erzeugten Tumoren Viruselemente elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können. An einer großen Zahl von mesenchymalen Tumoren des Goldhamsters und der Ratte ist uns bis jetzt der Nachweis noch nicht gelungen. Diese Beobachtung stimmt auch mit dem biologischen Test überein, indem aus den Tumoren nur ausnahmsweise über die Gewebekultur eine Reisolierung möglich war. Die direkten Filtrate aus den Tumoren haben im Tierversuch selten onkogene Wirkung gezeigt.

Schließlich wurden von uns noch durch BB—T 2-Virus aus der Gewebekultur erzeugte Parotistumoren bei der Maus im Feinschnitt untersucht. Diese Tumoren unterscheiden sich von den meisten Ratten- und Hamstertumoren durch eine wesentlich längere Latenzzeit. Als vorläufiger Befund konnten in einem Falle eines Parotistumors der Maus virusverdächtige Partikel, die an das BB—T 2-Virus aus der Gewebekultur erinnern, nachgewiesen werden. Die Größe der Partikel liegt mit 40—50 μ etwas über der des BB—T 2-Virus in der Kultur. Die Partikel sind im Cytoplasma der Zellen lokalisiert (Abb. 8).

Diskussion

Auf Grund der dargelegten Befunde glauben wir berechtigt zu sein, die aufgefundenen Viruselemente als das BB—T 2-Virus anzusprechen. Vor allem spricht auch die Parallelität zwischen dem cytopathogenen Effekt und den morphologischen Virusbefunden und ebenso die hochgradige onkogene Wirksamkeit der Nährlösungen solcher Gewebekulturen für diese Tatsache. Wie in der Einleitung bereits hervorgehoben, ist das Polyoma-Virus von STEWART und

EDDY sowie einige andere Polyoma-Stämme vor einiger Zeit von verschiedenen Autoren (BERNHARD und Mitarb., 1959; DOURMASHKIN und NEGRONI, 1959; BANFIELD, DAWE, BRINDLEY, 1959; DMOCHOWSKI, GREY, MAGEE, 1959) elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden. Beim Vergleich unserer Befunde mit denen dieser Autoren findet sich eine gute Übereinstimmung, die sowohl in Bezug auf die Lokalisation, als auch auf Größe und Form der Viruselemente besteht. Dadurch ergibt sich ein weiterer Hinweis für die Zugehörigkeit unseres Virus-Stammes zur Gruppe der Polyoma-Viren. Auch unsere Befunde zeigen, daß es sich bei dieser Virusfamilie mit ausgeprägt vielseitiger onkogener Wirksamkeit um eine von den meisten onkogenen Viren morphologisch abweichende Klasse handelt. Als Besonderheiten sind zu nennen: Die Kleinheit des Virus, das Fehlen einer spezifischen, elektronenmikroskopisch faßbaren Feinstruktur und vor allem auch die hauptsächliche Lokalisation im Zellkern. Es ist in dieser Hinsicht am besten mit dem Shope-Papillom-Virus des Kaninchens zu vergleichen. Bekanntlich sind die meisten übrigen onkogenen Viren, vor allem die Leukämie- und Mamma-Carcinom erzeugenden Viren der Maus, sowie die Viren der Hühnerleukämien mindestens doppelt so groß und besitzen durchweg Nukleide und begrenzende Membranen, mit denen zuweilen eine Polymorphie verbunden ist.

Ein besonders nennenswerter Umstand ist das seltene Vorkommen, bzw. völlige Fehlen der Partikel in den erzeugten Tumoren mit Ausnahme einiger Parotistumoren (DOURMASHKIN und NEGRONI, 1959) und Nierensarkome (HOWATSON und Mitarb., 1960). Das zwingt zu der Annahme, daß innerhalb der ausgebildeten Tumorzellen das Virus nicht in Form von Elementarpartikeln, also nicht in strukturiertem Zustand vorliegt, sondern möglicherweise als maskiertes Virus, eventuell als Nukleinsäure oder Nukleoproteid in einer Bindung an den genetischen Nukleinsäure-reproduzierenden Apparat der Zelle. Dieses Problem ist von ganz besonderem Interesse und dürfte einen wichtigen Schlüssel zur Klärung der Wirkungsweise onkogener Viren beim Malignisierungsprozeß in sich bergen.

Zusammenfassung

Es wird über die elektronenmikroskopische Charakterisierung eines Virus, das aus leukämischem Gewebe der myeloischen Leukämie der Maus in der Gewebekultur isoliert wurde, berichtet. Das Virus muß in die Familie des Polyoma-Virus eingeordnet werden und unterscheidet sich wesentlich (Wirkungsweise und Morphologie) vom Leukämievirus. In der Gewebekultur erzeugt es nach 5—8 Tagen auf Monolayerkulturen vom Mäuseembryo einen cytopathogenen Effekt, der sich passagenweise übertragen läßt.

Elektronenmikroskopisch wurden in erster Linie im Zellkern, sowie auch im Cytoplasma und im extrazellulären Raum Viruspartikel von 30—40 m μ Durchmesser und gleichförmiger Gestalt ohne Innenstruktur nachgewiesen. Es werden die Lokalisation in der Zelle, die Anordnung der Partikel, sowie deren mögliche Entstehungsweise näher besprochen.

LITERATUR

1. BANFIELD, W. G.—DAWE, C. J.—BRINDLEY, D. C. (1959): *J. Nat. Cancer Inst.* 23, 5, 1123. — 2. BERNHARD, W.—FEBVRE, H. L.—CRAMER, R. (1959): *Compt. rend.* 249, 483—485. — 3. EDDY, B. E.—STEWART, S. E.—BERKELEY, W. (1958): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 4, 848. — 4. DMOCHOWSKI, L.—GREY, C. E.—MAGEE, L. A. (1959): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102, 3, 575. — 5. DOURMASHKIN, R. R.—NEGRONI, G. (1959): *Experim. Cell Res.* 18, 573—600. — 6. GRAFFI, A. (1950): *Berliner Symposium über Cancerogenese. Akad. Verl., Berlin.* 323. — 7. GRAFFI, A.—GIMMY, J.—KRAUSE, L. (1959): *Naturwiss.* 46, 9, 330. — 8. GRAFFI, A.—HEINE, U.—HELMCKE, J. G.—BIERWOLF, D.—RANDT, A. (1960): *Klin. Wschr.* 38, 6, 254. — 9. GIMMY, J.—GRAFFI, A.—KRAUSE, L. (1959): *Acta biol. et med. germ.* 3, 5, 509. — 10. GROSS, L. (1953): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 414. — 11. HEINE, U.—GRAFFI, A.—HELMCKE, J. G.—RANDT, A. (1957): *Naturwiss.* 44, 449. — 12. HEINE, U.—GRAFFI, A.—BIERWOLF, D.—HELMCKE, J. G.—RANDT, A. (1959): *Acta biol. et med. germ.* 3, 9, 608. — 13. HOWATSON, A. F.—MC CULLOCH, E. A.—ALMEIDA, E. A.—SIMINOVITCH, L.—AXELRAD, A. A.—HAM, A. W. (1960): *J. Nat. Canc. Inst.* 24, 5, 1131. — 14. STEWART, S. E.—EDDY, B. E.—GOCHENOUR, A. M.—BORGESE, N. G.—GRUBBS, G. E. (1957): *Virology* 3, 380—400.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММА ВИРУСА
ПОЛИОМЫ ВВ—Т 2

Д. БИРВОЛЬФ, А. ГРАФФИ и Л. БАУМБАХ

Авторы дают электронномикроскопическую характеристику вируса, изолированного из лейкемической ткани при миелоидной лейкемии мышей. Вирус следует отнести к семейству виросов полиомы и он существенно отличается (в отношении действия и морфологии) от вируса лейкемии. Он вызывает в тканевых культурах по истечении 5—8 дней на мономолекулярных культурах зародыша мышей цитопатогенный эффект, передаваемый от одного пассажа к другому.

В электронном микроскопе были выявлены в первую очередь в клеточном ядре, но и в цитоплазме и в внеклеточном пространстве вирусные частицы с диаметром в 30—40 мк, однородной формы без внутренней структуры. Подробно обсуждаются локализация в клетке и распределение этих частиц, как и их предположительный способ возникновения.

ELECTRON-MICROSCOPIC DEMONSTRATION OF THE POLYOMA STRAIN BB—T2

D. BIERWOLF, A. GRAFFI and L. BAUMBACH

The electron-microscopic determination of a virus isolated from explanted mouse myeloid leucaemia tissue is described. The virus belongs to the polyomavirus family and is both in effect and morphology fundamentally different from the virus of leucaemia. After 5 to 8 days in mouse embryo monolayer cultures the virus produces a cytopathogenic effect which can be passaged.

Electron-microscopy revealed, chiefly in the nucleus but also in the cytoplasm and the extracellular space, uniform viral particles 30 to 40 m μ in diameter. Cellular localization, arrangement and the presumable origin of the particles are discussed in detail.

Dr. D. BIERWOLF

Prof. Dr. A. GRAFFI

Dr. L. BAUMBACH

} Berlin-Buch, Lindenberger Weg 70., D. D. R