

völligen „Durchsichtigkeit“ und Strukturlosigkeit von den nach der gegebenen Vorschrift hergestellten Filmen erfüllt werden.

5. Verfahren zur Scharfeinstellung kontrastarmer Objekte.

Die klare Darstellung feinsten organischer Teilchen, um die es sich bei der Aufnahme kleiner Virusarten handelt, verlangt außer einem Fehlen jeglicher Struktur der Trägerhaut eine so weit getriebene Dünne derselben über ein genügend großes Gesichtsfeld, daß ihre Massendicke nicht groß ist gegenüber der Massendicke der feinsten Objekte.



II 378/38.

Fig. 9. Kolloidales Gold zur Scharfeinstellung der Aggregate des Tabakmosaikvirus. el.opt. 20000 : 1. Gesamtvergr. 50000 : 1.

Nur dann kann der Elektronenstrahl, der ein Bild der Massenverteilung des Objekts gibt, diese Objekte mit Kontrast gegenüber dem Untergrund des Trägerfilms abbilden. Die auf dem Leuchtschirm scharf eingestellten Bilder sind bei der sehr großen Tiefenschärfe auf der um nur wenige Millimeter tiefer liegenden photographischen Platte ebenfalls scharf. Der Leuchtschirm gibt aber die im Strahlenbild bestehenden Intensitätsunterschiede weniger kontrastreich wieder als die Photoplatte. Diese Tatsache erschwert die genaue Scharfeinstellung, die auf bequeme Weise nur durch Beobachtung des sichtbaren Bildes mit dem Auge oder durch eine Lupe erfolgen kann. Die Helligkeit des Leucht-

schirms ist für die laufende Betrachtung und für die Scharfeinstellung durchaus genügend.

Ein einfaches Verfahren für die Scharfeinstellung des Bildes auf dem Leuchtschirm bei ungenügendem Kontrast des Objekts ist der Zusatz von Metallkolloidteilchen, die infolge ihrer größeren Dichte sehr viel besser zu sehen sind als gleichgroße Teilchen organischer Natur. Die dazu verwendeten Lösungen von kolloidalem Metall dürfen keine Schutzkolloide und keine Salze enthalten. Fig. 9 zeigt einen Film mit kolloidalen Goldteilchen von 20–40 m μ Durchmesser*; daneben erkennt man zarte, fadenförmige Gebilde, welche, wie in der folgenden Mitteilung ausführlich auseinandergesetzt wird, Tabakmosaikvirus darstellen. Damit hat sich die früher von uns ausgesprochene Vermutung, daß das Übermikroskop die bildliche Darstellung von lichtoptisch unsichtbarem Virus ermöglichen wird, in vollem Umfang bestätigt¹⁴.

Die übermikroskopische Untersuchung erscheint gleichzeitig als das empfindlichste Verfahren, um die Einheitlichkeit und den Reinheitsgrad von Viruspräparaten zu prüfen, da es bei einem Auflösungsvermögen von 10 m μ (Einzelteilgröße 5 m μ) noch Teilchen von der Größenordnung von 10^{-10} g darstellt, was vergleichsweise 5000 Kohlenstoffatomen entspricht.

Zusammenfassung.

Die Möglichkeiten der übermikroskopischen Betrachtung beliebiger Objekte werden aufgezeigt und die Forderungen besprochen, die man an Objektträger in der Übermikroskopie stellen muß. Die praktische Herstellung solcher Objektträger und ihre Behandlung beim Beschicken mit Objekten und beim Mikroskopieren wird beschrieben. Schließlich wird ein Verfahren angegeben, um eine Scharfeinstellung des Bildes bei kontrastarmen Objekten zu ermöglichen.

* Die verwendeten Goldsole waren Präparate der Firma Imhausen & Co., Witten a. d. Ruhr. Sie enthielten 66 mg metallisches Gold und 125 mg Elektrolyt im Liter, dagegen kein Schutzkolloid. G. A. KAUSCHE hat durch Dialyse bzw. Elektrodialyse gegen reines Wasser die Leitfähigkeit von $\kappa = 2,5 \cdot 10^{-8}$ Siemens/cm auf $\kappa = 1,5 \cdot 10^{-9}$ Siemens/cm gebracht

¹⁴ B. v. BORRIES, E. RUSKA u. H. RUSKA, Klin. Wschr. 1938, 921.

Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop.*

Von G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH u. H. RUSKA.

Ziel der Arbeit.

Der überraschende Befund STANLEYS^{1,2}, daß es sich bei dem „Erreger“ der Tabakmosaikkrankheit um einen hochmolekularen Eiweißkörper handelt, hat in den letzten Jahren zu Unter-

* Mitteilung aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft und dem Laboratorium für Elektronenoptik der Siemens & Halske A.G.

¹ W. M. STANLEY, Science (N. Y.) 81, 644 (1935).

² W. M. STANLEY, J. of biol. Chem. 115, 673 (1936).

suchungen über die vermutliche Form, die Teilchengröße der letzten infektiösen Einheit und das Molekulargewicht dieses Virusproteins geführt. An diesen Arbeiten haben entsprechend der bisherigen Beteiligung an der physiko-chemischen Seite des Problems der phytopathogenen Viren bis auf BECHHOLD und SCHLESINGER^{3,4} hauptsächlich

³ H. BECHHOLD u. M. SCHLESINGER, Biochem. Z. 236, 392 (1931).

⁴ H. BECHHOLD, Phytopath. Z. 6, 342 (1933).

amerikanische und englische Autoren mitgewirkt. Die Untersuchungen wurden mit dem röntgenographischen Verfahren nach DEBYE-SCHERRER, der Viskosimetrie und den Bestimmungen der Diffusionskonstanten, der Sedimentationskonstanten bzw. der Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerefeld hohtouriger Zentrifugen nach dem Verfahren von THE SVEDBERG durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten, obwohl in einigen Punkten noch widersprüchsvoll, rechtfertigen die Annahme, daß es sich bei diesen Viren um langgestreckte Moleküle von sehr hohem Molekulargewicht handeln muß.

Aus dem Wunsche heraus, möglichst voraussetzungsfrei zu arbeiten, haben wir geglaubt, in der übermikroskopischen Aufnahme von Makromolekülen ein Verfahren zu besitzen, das über die Form, Größe und Eigenschaften dieser Makromoleküle hypothesenfreie Aussagen liefern kann. Wir haben daher das Verfahren der Übermikroskopie^{5,6} auf die Sichtbarmachung von Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus angewandt, um mit den Ergebnissen unserer Arbeit mit in die Lösung des Problems der Form und Teilchengröße einzugreifen.

Bisheriger Stand der Kenntnis von Größe und Form des Tabakmosaikvirus-Moleküls.

Nach den Untersuchungen von WYCKOFF und COREY⁷ ergibt das Tabakmosaikvirus sowohl als Feuchtgel wie auch als kristallines Ultrazentrifugensediment Debye-Scherrer-Diagramme. Dieser Befund ist von BERNAL und FANKUCHEN⁸ bestätigt worden. Die Identitätsperiode beträgt nach diesen Autoren $22 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$. Die Reflexe lassen sich den Prismenebenen eines hexagonalen Gitters zuordnen, dessen Nebenachse eine Länge von 152 \AA aufweist.

Die experimentell gemessenen intermolekularen Abstände lassen den Schluß zu, daß in einem Trockengel von Tabakmosaikvirus stäbchenförmige Moleküle parallel gelagert sind. Ihr Querschnitt würde normal eine hexagonale Anordnung zur Längsachse darstellen, bei der der Achsenabstand der benachbarten Moleküle 152 \AA betragen würde. Ließ sich auf diesem Wege das maximale Ausmaß der kleineren Achse berechnen, so konnte im röntgenographischen Verfahren noch nichts über die Länge der Moleküle festgestellt werden. KRATKY und MARK⁹ deuten das bezüglich der Längsachse negative Ergebnis von BERNAL und FANKUCHEN⁸ so, daß es beim völligen Fehlen von durchlaufenden Schichtlinien und dem Fehlen von charakteristi-

schen Gruppen, welche die durch die Moleküllänge bedingte Periodizität hervorheben, möglich sei, daß die angewendeten Expositionszeiten nicht ausreichend gewesen seien, um die Schichtlinien zu erfassen. Immerhin kann als recht sicheres Ergebnis der röntgenographischen Untersuchungen festgestellt werden: das Virusmolekül ist ein regulär sechseckiges Stäbchen von $15 \text{ m}\mu$ Durchmesser.

Weitere Aussagen über die Form, insbesondere die Länge des Virusmoleküls sind also erst dann möglich, wenn das Molekulargewicht bekannt ist. Versuche, das Molekulargewicht aus der in einer hohtourigen Zentrifuge bestimmten *Sedimentationskonstanten* zu berechnen, sind öfters unternommen worden, wir wollen hier aber nur die neuesten Versuche von WYCKOFF^{10,11} und von NEURATH und SAUM¹² berücksichtigen. Die Berechnung gründet sich auf die Formel:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s}{(1 - V \cdot d) \cdot D}$$

M = Molekulargewicht; R = Gaskonstante in Erg; T = absol. Temperatur; s = Sedimentationskonstante; V = spez. Vol. des gelösten Teilchens; d = Dichte des Lösungsmittels; D = Diffusionskonstante.

Im Gegensatz zur alten STOCKESSchen Gleichung ist diese Formel nicht nur auf kugelförmige Teilchen anwendbar, da der Einfluß der Teilchenform in der Diffusionskonstanten zum Ausdruck kommt. Die Sedimentationskonstante s von homodispersen, nicht aggregiertem Tabakmosaikvirus ist von WYCKOFF zu $174 \cdot 10^{-13}$, die Diffusionskonstante D von NEURATH und SAUM zu $3 \cdot 10^{-18}$ bestimmt worden; aus diesen Werten ist ein Molekulargewicht von 54 Millionen zu berechnen. Das Virusmolekül wäre danach $15 \text{ m}\mu$ dick (s. o.) und $330 \text{ m}\mu$ lang.

Leider kann dieses Resultat nicht als durchaus gesichert gelten; zwei Einwände können nicht übergangen werden. Zunächst ein leicht zu beseitigender, experimenteller Natur: die Diffusionskonstante ist von NEURATH und SAUM¹² an einem 2 Monate alten teilweise aggregierten Virusmaterial gemessen worden und deshalb nicht völlig einwandfrei. Sodann ein weiterer Einwand gegen die theoretischen Grundlagen der Berechnung, dessen Bedeutung zunächst nicht zu klären ist. Sedimentationskonstante und Diffusionskonstante sind in ganz verschiedenen Schwerefeldern bestimmt worden (70000 g bzw. 1 g), ihre Vereinigung in einer Formel ist deshalb nur dann zulässig, wenn man Moleküledeformationen bzw. Molekülschwingungen in dem hohen Schwerefeld der Ultrazentrifuge ausschließt, eine Annahme, die zwar wahrscheinlich, aber nicht gesichert ist.

Eine weitere, zunächst sehr elegant erscheinende Methode, um zu Daten über Form und Größe des Virusmoleküls zu kommen, ist von FRAMPTON und

⁵ E. RUSKA, Z. Physik 87, 580 (1934).

⁶ B. v. BORRIES u. E. RUSKA, Wiss. Veröff. Siemens 17, 99 (1938).

⁷ RALPH WYCKOFF u. R. B. COREY, J. of biol. Chem. 116, 51 (1936).

⁸ J. S. BERNAL u. FANKUCHEN, Nature (Lond.) 139, 923 (1937).

⁹ O. KRATKY u. H. MARK, Anwendung physikalischer Methoden zur Erforschung von Naturstoffen, in Fortschr. Chemie-organ. Naturstoffe. Wien: Julius Springer 1938.

¹⁰ R. WYCKOFF, J. of biol. Chem. 121, 219 (1937).

¹¹ R. WYCKOFF, J. of biol. Chem. 124, 585 (1938).

¹² NEURATH u. SAUM, J. of biol. Chem. 126, 435 (1938).

NEURATH¹³ und von LAUFFER^{14, 15} benutzt worden. Aus Messungen der *Viskosität* von sehr verdünnten Viruslösungen ist mit Hilfe der KUHNschen Formel

$$\frac{\eta}{\eta_0} - 1 = g \cdot \left(2,5 + \frac{1}{16} \left(\frac{b}{a} \right)^2 \right)$$

(η = Viskosität der Lösung; η_0 = Viskosität des Lösungsmittels; g = Konzentration der Lösung in Vol.-%; b = lange Achse; a = kurze Achse des gelösten Teilchens)

das Verhältnis von langer zu kurzer Achse des angenommenen Stäbchenmoleküls berechnet worden. Das unmittelbare Ergebnis dieser Berechnungsweise war ein Achsenverhältnis von 35 : 1. Schließt man diesen Wert an den bisher sichersten röntgenographisch gemessenen Wert von 152 Å für die kurze Achse an, so erhält das Virusmolekül Ausmaße von 15 m μ mal 530 m μ und ein Molekulargewicht von rund 83 Millionen.

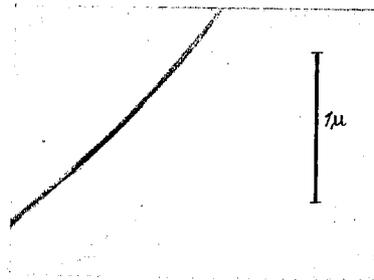
Es bestehen aber doch recht große theoretische Bedenken gegen eine Berechnung der Teilchenform aus Viskositätsmessungen mit Hilfe der KUHNschen Gleichung. Der Einfluß, den die Ladung und die Hydratation der Teilchen auf die Viskosität haben, wird in dieser Formel überhaupt nicht berücksichtigt, eine Fehlerquelle, die bei einem lyophilen Kolloid wie dem Tabakmosaikvirus sicher erheblich ist. Man kann nun natürlich, wie dies LAUFFER notgedrungen tut, diese Fehlerquelle als kompensiert betrachten durch eine andere, in entgegengesetzter Richtung wirkende Fehlerquelle, nämlich die Orientierung der Teilchen während der Viskositätsmessungen. Diese Annahme ist aber willkürlich gemacht und bedeutet den Verzicht auf eine wirklich quantitative Auswertung der experimentell gefundenen Werte. Wir können daher die aus Viskositätsmessungen abgeleiteten Befunde über die Form der Virusteilchen nicht für zuverlässig halten. Das gleiche gilt besonders, wenn es sich wie hier um fadenförmige Teilchen handelt, von den Größenbestimmungen durch Ultrafilter nach ELFORD VON THORNBERRY¹⁶.

Angesichts dieser widersprechenden Angaben über Form und Molekulargewicht haben wir uns entschlossen, über die Ergebnisse zu berichten, die die Untersuchung des Tabakmosaikvirus im Übermikroskop bisher gebracht hat.

Die Virusgelstrukturen.

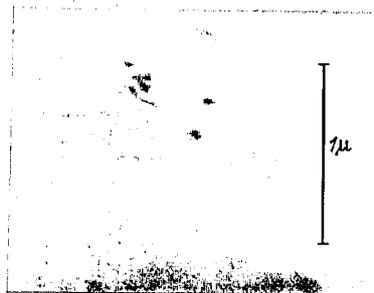
Die theoretischen und praktischen Grundlagen der Übermikroskopie sind von B. v. BORRIES und E. RUSKA bereits abgehandelt worden. Literaturangaben befinden sich in der vorhergehenden Arbeit dieses Heftes¹⁷. H. RUSKA¹⁸ hat im gleichen

Heft das Wesentlichste über die Untersuchungs- und Präparationstechnik für die Übermikroskopie zusammengestellt. Hinsichtlich der Reindarstellungsverfahren von Tabakmosaik und Kartoffel-X-Virus verweisen wir auf die Arbeit von PFANKUCH und KAUSCHE¹⁹. Auf den Kollodium- oder Zaponlackfilmen trägt man mit einer sterilen Platinöse einen Tropfen der wässrigen Viruslösung auf (s. a. H. RUSKA¹⁸, Fig. 4, ds. Heft); der dann darauf eintrocknet. Nach dem Auftrocknen ergibt sich die Situation von Fig. 1e (bei H. RUSKA¹⁸ ds. Heft), d. h. die Virus- und evtl. beigemischten Gold-



II 261/38.

Fig. 1. Kollodiumfilm mit destilliertem Wasser beschickt. el.opt. 20000:1.



II 258/38.

Fig. 2. Kollodiumfilm mit niedermolekularem Eiweiß beschickt. el.opt. 23000:1.

teilchen haften am Trägerfilm. Bei hochkonzentrierten Viruslösungen bildet sich nach dem Eintrocknen ein mehr oder weniger zusammenhängender Viruseiweißfilm, bei niedrigen Konzentrationen haften dagegen die Einzelteilchen isoliert an dem Kollodiumträgerfilm an.

Fig. 1 zeigt einen solchen reinen Kollodiumfilm mit reinem Wasser beschickt. Es ist keinerlei Eigenstruktur erkennbar. An dem sichtbaren Rand links oben auf dem Bild ist der Film eingerissen und aufgerollt. In Fig. 2 bringen wir ein Bild von einem Film, auf dem nach Beschickung mit reinem Wasser und Kontrollaufnahme im Übermikroskop zusätzlich niedermolekulares Eiweiß

¹³ C. FRAMPTON u. J. NEURATH, Science (N. Y.) 87, 468 (1938).

¹⁴ M. LAUFFER, Science (N. Y.) 87, 469 (1938).

¹⁵ M. LAUFFER, J. of biol. Chem. 126, 443 (1938).

¹⁶ H. H. THORNBERRY, Phytopathol. 25, 601 (1935).

¹⁷ v. BORRIES u. E. RUSKA, Naturwiss. 27, 281 (1939).

¹⁸ H. RUSKA, Naturwiss. 27, 287 (1939).

¹⁹ E. PFANKUCH u. G. A. KAUSCHE, Biochem. Z. 299, 334 (1938).

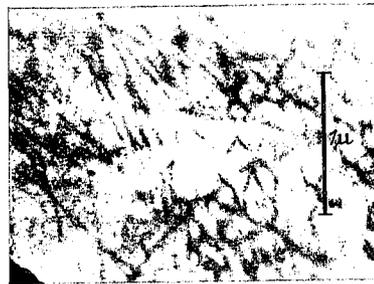
(Pseudoglobulin und Albumin) aus Pferdeserum aufgetragen wurde. Auch hier ist keine Einzelstruktur bei der angewendeten Vergrößerung von 23 000fach sichtbar geworden. Man sieht höchstens eine schwachwolkige Masse, die den Eiweißfilm auf dem Kollodiumfilm darstellt. Trägt man nun auf einen solchen mit niedermolekularem Eiweiß zuvor beschickten Film noch nachträglich TM-Virus auf, dann wird eine Struktur von ganz bestimmter Anordnung sichtbar (Fig. 3). Ähnliche, aber im einzelnen doch wieder abweichende Strukturbilder erhält man, wenn Viruslösungen von TM- und Kartoffel-X-Virus auf reine, d. h. vorher nicht mit Wasser oder Eiweiß beschickte Filme in genügend hoher Konzentration zum Eintrocknen gebracht werden (Fig. 4—7).

Hinsichtlich der präparativen Ausgangssituation ist folgendes zu beachten: Die von uns benutzten hochgereinigten Viruslösungen waren sicherlich völlig frei von niedermolekularem Eiweiß. Der nach der Dialyse noch vorhandene Salzrest betrug, bezogen auf Trockensubstanz, noch nicht 0,01%. Die Leitfähigkeiten der Lösungen lagen bei $\kappa = 1,5 \times 10^{-5}$ S/cm. Im Sinne der Phasenlehre stellen die verwendeten Präparate also dispersoide Systeme dar, in denen das Dispersionsmittel reines Wasser, die disperse Phase reines Viruseiweiß ist. Dieses Suspensoid müßte vom *kolloidchemischen* Standpunkt aus als inhomogen bezeichnet werden, weil das System im ganzen von der Inhomogenität der Grenzflächen der fadenförmigen Moleküle beherrscht wird. Da innerhalb bestimmter Konzentrationsgrenzen in den Viruslösungen ein molekularer Verteilungszustand herrscht, bei dem allerdings den einzelnen Molekülen kolloider Charakter zugesprochen werden muß, resultiert, daß die disperse Phase unserer Lösungen aus kolloiden Makromolekülen besteht. Solange eine molekulare Lösung des Virusproteins vorliegt, können wir also, wie bei jeder anderen molekularen Lösung vom rein *chemischen* Standpunkt aus mit einer völligen Homogenität der Viruslösung rechnen.

Bei der Überführung solcher Lösungen in den Gelzustand müssen die Makromoleküle dann eine bestimmte Lage zueinander einnehmen, wenn ihre Form stäbchen- oder fadenartig ist. Die Lage kann nach den Regeln der Strukturlehre bei Trockengelen mit Fadenmolekülen nur die eines Gerüst- oder Netzwerkes mit vorzüglich linearer Aggregation der Moleküle sein.

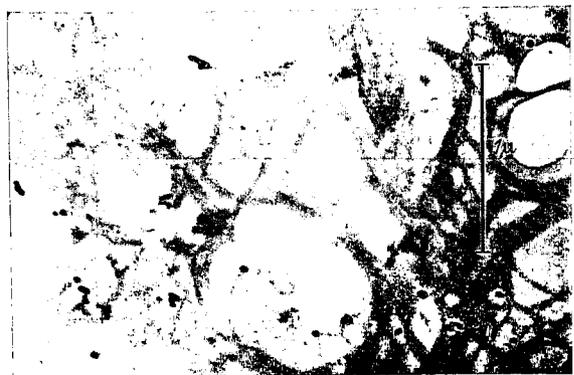
Wenn eine Virussollösung über den hochkonzentrierten Zustand in eine Gellösung und daraus über den Grenzkonzentrationszustand in ein Gel durch Entziehung des Lösungsmittels und Hydratationswassers übergeführt wird, dann könnten sich nach Maßgabe der Schnelligkeit und des Ausmaßes der Dehydratation allmählich die physikalischen Eigenschaften der Moleküle beim Überschreiten der Grenzkonzentration ändern, indem Störungen in der Struktur der langen Moleküle auftreten. Indessen haben BAWDEN, PIRIE,

BERNAL und FANKUCHEN²⁰ mit indirekten Methoden sowohl an feuchten als auch trocknen Gelen Faserstruktur nachweisen können. TAKAHASHI und



II 263/38.

Fig. 3. Kollodiumfilm mit niedermolekularem Eiweiß und Tabakmosaikvirus beschickt. el.opt. 19000:1.



II 678/38.

Fig. 4. Kartoffel-X-Virus (Gelstruktur, Fäden und breite Balken). el.opt. 25000:1.



II 671/38.

Fig. 5. Tabakmosaikvirus mit großen Anhäufungen von kolloidalem Gold. (Gelstruktur, Fäden und Balken.) el.opt. 25000:1.

RAWLINS²¹ haben auch in Viruslösungen mittels der Feststellung der Strömungsdoppelbrechung stäbchenförmige Gestalt der gelösten Teilchen

²⁰ F. C. BAWDEN, N. W. PIRIE, J. D. BERNAL u. I. FANKUCHEN, Nature (Lond.) 138, 1051 (1936).

²¹ W. N. TAKAHASHI u. T. E. RAWLINS, Science (N. Y.) 85, 103 (1937).

wahrscheinlich gemacht. Da auch Lösungen, Feucht- und Trockengele und die ausgefallten Kristalle in ihrem röntgenographischen Verhalten sich übereinstimmend zeigten^{7,8}, müssen wir annehmen, daß beim Eintrocknungsprozeß auf dem Trägerfilm eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Moleküle nicht in dem Sinne eintritt, daß die grundsätzliche Struktur und damit die elementaren Dimensionen sich ändern. Die



II 672/38.

Fig. 6. Tabakmosaikvirus (Gelstruktur, vorwiegend Einzelfäden). el.opt. 25000:1.



II 378/38.

Fig. 7. Tabakmosaikvirus (links unten zwei Einzelfäden). el.opt. 20000:1.

sichtbargemachte submikroskopische Struktur der Viruseiweißgele mußte also der Form der Moleküle entsprechen.

Bei hinreichend hoch konzentrierten Viruslösungen entsteht demnach während der aus untersuchungstechnischen Gründen notwendigen Eintrocknung ein formbeständiges Trockengel, das die Fig. 4—7 als festes Gelgerüst zeigen. Dieses Gel ist im physikalisch-chemischen und im mikroskopischen Sinne als homogen zu bezeichnen, weil die einzelnen Faserstränge keine Diskontinuitäten mehr erkennen lassen. Das Ausmaß der Aneinanderlagerung der langgestreckten Moleküle scheint von der Schnelligkeit des Eintrocknungsprozesses abhängig zu sein. Die Bänder und Balken sind längenmäßig schwer zu messen, weil sie gegenseitig miteinander verflochten sind. Man kann dagegen Breiten von 16 und 45, 90 und 120 bis zu 160 $m\mu$ feststellen. Die Differenzen in den Schwärzungsintensitäten an einzelnen Stellen sind aus

ihrem sich kreuzenden Verlauf als räumliche Über-einanderlagerungen zu erkennen (Fig. 4, Kartoffel-X-Virus). Auch dort, wo Parallellagerung besteht, ist mit Über-einanderlagerungen zu rechnen. Die Breiten der aus lateral aggregierten Molekülfäden bestehenden Bänder brauchen deshalb nicht unbedingt Vielfache der Fadenbreite des Moleküls zu sein.

Hier taucht das Problem auf, ob die abgebildeten Gelgerüste einphasige oder zweiphasige Gele darstellen, bei welchen letzteren die Fadenmoleküle in bestimmten Gebieten zu Bündeln und geordneten Gitterbereichen zusammentreten. Nach GERNGROSS, HERRMANN und Mitarbeitern^{22, 23} und FREY-WYSSLING²⁴ ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung kristalliner Bereiche um so größer, je länger die Molekülketten parallel miteinander verlaufen. Dieser Hinweis hat seinen Grund darin, daß wir uns bei den hier erstmalig sichtbar gemachten Strukturen fragen müssen, ob wir es noch mit Aggregationen von molekularen Ausmaßen oder bereits mit kristallinen Bildungen zu tun haben, wie sie im Prinzip für den mikroskopischen Bereich beim TM-Virus erstmalig von STANLEY^{1, 2} und später von BAWDEN und PIRIE^{25, 26} bzw. PFANKUCH und KAUSCHE¹⁹ nachgewiesen und gefärbt (KAUSCHE^{27, 28}) werden konnten.

Bei einem Hydrogel werden seit NÄGELI und SCHWENDENER (1877) und später AMBRONN und FREY (1926) und SCHMIDT (1934) die kristallinen Bereiche als Micelle bezeichnet. Nach der Auffassung von NÄGELI können die Micelle eines Gels bei dessen Lösung den micellaren Charakter behalten. Nach STAUDINGER (1932) gehen dagegen die Hochpolymeren nicht als kristalline Teilchen, sondern als einzelne Fadenmoleküle in Lösung. Die Micelle sind nach SIGNER (1933) an sich optisch anisotrop, und diese Eigenschaft bleibt auch bei den isolierten Molekülen erhalten. Da feststeht, daß Lösungen von TM-Virus Strömungsdoppelbrechung zeigen, erhebt sich die Frage, ob das gelöste Virus in einem übermolekularen kristallinen Zustand vorkommt oder ob der monomolekulare Verteilungszustand der primäre ist. Wir glauben bei den von uns verwendeten Lösungen das letztere annehmen zu können und hätten an denjenigen Stellen auf unseren Figuren, wo die gemessenen Dimensionen den theoretisch zu fordernden Molekularbreiten entsprechen, von einem Molekulargerüst zu spre-

²² GERNGROSS, HERRMANN u. ABITZ, Biochem. Z. 228, 409 (1930).

²³ GERNGROSS, HERRMANN u. LINDEMANN, Kolloid-Z. 60, 276 (1932).

²⁴ A. FREY-WYSSLING, Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin: Bornträger-Verlag 1938.

²⁵ F. C. BAWDEN u. N. W. PIRIE, Brit. J. exper. Path. 18, 275 (1937).

²⁶ F. C. BAWDEN u. N. W. PIRIE, Proc. roy. Soc. Lond. B 274 (1937).

²⁷ G. A. KAUSCHE, Naturwiss. 26, 741 (1938).

²⁸ G. A. KAUSCHE, Mitt. d. biol. Reichsanst. 1939, im Druck.

chen (Fig. 6). Diejenigen Bezirke, in denen es zu einer mächtigen Aggregation parallel gelagerter Moleküle gekommen ist, tragen offensichtlich übermolekularen Charakter (Fig. 4). Wir haben also die Gerüstbildungen als ein Gemisch von molekularen und kristallinen Bereichen anzusehen, wobei wir die Frage nach den Ausmaßen eines Moleküls hier noch offen lassen. Der auffallende Umstand, daß gleich breite Virusaggregate nadelartig starr, oder auch bandartig geschwungen sein können, ist möglicherweise so zu deuten, daß in einem Falle die Molekülenden der nebeneinander liegenden Virusteile an der gleichen Stelle des Querschnittes liegen und im anderen Falle gegeneinander versetzt sind.

In Fig. 7 sind Aggregationen in der Längs- und in der Seitenrichtung sichtbar und daneben noch einzelne stäbchenförmige Gebilde, deren Dimensionen bei $330 \times 15 \mu$ liegen. Die Breite der Bänder schwankt zwischen 100 und 15μ .

Das Virusmolekül.

Bei Verwendung von Viruskonzentrationen von 10^{-5} g Virusprotein je Kubikzentimeter gelingt es, beim Eintrocknen die Virusteilchen einzeln fixiert zu erhalten. In Fig. 8 ist der Trägerfilm in der einen Richtung stark gefaltet. Senkrecht bzw. schräg zu dieser Faltenbildung sind Virusfäden zu sehen, die durch die Fältelung der Folie zerknittert und in ihrem Verlauf unregelmäßig geworden sind. Die Länge der Einzelfäden ist dadurch nicht genau bestimmbar. Ihre Breite dürfte bei $10-25 \mu$ liegen. Die Fäden weisen deutlich knotenartige Verdickungen auf, die dadurch zustande kommen, daß die aufgetrockneten Fäden eine spätere Faltung des Trägerfilms mitmachen. In Fig. 9 wurden 14 der fadenartigen Gebilde einzeln vermessen und ihre Längen maximal zu 1800μ und minimal zu 300μ bestimmt. Die Schwankungen in der Länge betragen also etwa das 6fache, die Durchmesser liegen zwischen 10 und 20μ . Alle Einzelteilchen liegen mehr oder weniger getrennt voneinander. Es fällt auf, daß sie in der Länge zwar verschieden, im Durchmesser jedoch fast einheitlich sind. Die Dimension der eingestreuten kolloidalen Goldteilchen liegt bei $20-30 \mu$. Fig. 10 zeigt bei hoher Verdünnung mehrere Stäbchen, deren Ausdehnungen bei 1200 bzw. 300μ in der Längsrichtung und 20 bzw. 15μ in der Querrichtung liegen. Das gabelförmige Stäbchen im Bild dürfte aus zwei Einzelstäbchen bestehen, die halb schräg zu- und übereinander liegen. Fig. 11 weist ebenfalls fadenartige langgestreckte Einzelteilchen auf, deren Ausmaße sich zwischen maximal 900μ und minimal 300μ für die lange Achse, bei $15-20 \mu$ für die kleine Achse halten. Alle Stäbchen liegen getrennt voneinander. In Fig. 12 sind bei sehr hoher Virusverdünnung nur mehr 2 Fäden zu sehen, deren einer völlig freiliegt und etwa $850 \times 15 \mu$ mißt.

Die Fig. 7-12 haben also gemeinsam, daß sie faden- bzw. stäbchenförmige Einzelteilchen aufweisen, die in ihrer Länge stark variieren, hinsicht-

lich ihrer Breiten aber recht gleichmäßig sind. Angesichts dieser Tatsache ergab sich die Frage, ob diese distinkten Einzelteilchen als die Moleküle des TM-Virus bzw. als vorwiegend in der Längsrichtung aggregierte Moleküle oder aber schon als



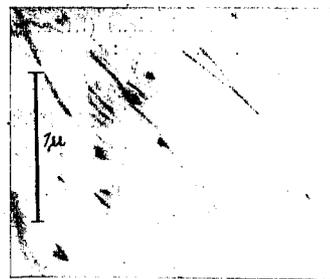
II 366/38.

Fig. 8. Tabakmosaikvirus (geknickte Fäden auf gefaltetem Film). el.opt. 20000:1.



II 374/38.

Fig. 9. Tabakmosaikvirus (Einzelfäden, Parallel- und Queraggregate). el.opt. 20000:1.



II 221/38.

Fig. 10. Tabakmosaikvirus (gabelförmig gelagerte Stäbchen). el.opt. 20000:1.

übermolekulare Gebilde anzusprechen sind. Die Deutung der Befunde hat aus dem Vergleich derjenigen Zahlen, die aus den indirekten Methoden gewonnen sind, mit den auf diesen Bildern meßbaren Größen unter Berücksichtigung des Auf-

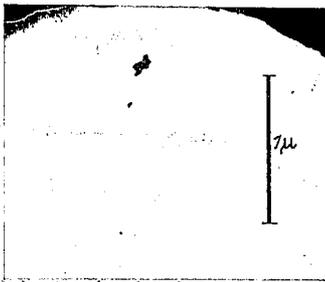
lösungsvermögens und der Abbildungstreu des Übermikroskopes zu erfolgen.

Die Breite der Teilchen haben wir aus der schärfsten der Aufnahmen, der Fig. 7, zu messen versucht. Das Auflösungsvermögen für diese Aufnahmen beträgt etwa 7–8 μ . Man kann also von vornherein nicht hoffen, die Breite der Teilchen auf einige wenige μ genau bestimmen zu können. Dennoch haben wir den an der linken



II 371/38.

Fig. 11. Tabakmosaikvirus (Einzelfäden).
el.opt. 20000 : 1.



II 372/38.

Fig. 12. Tabakmosaikvirus (Einzelfäden).
el.opt. 20000 : 1.

Seite des Bildes liegenden Einzelfäden an 3 Stellen einer Schwärzungsmessung unterzogen*. Das Ergebnis ist in Fig. 13 dargestellt.

Nach den Ausführungen der voranstehenden Arbeit von v. BORRIES und RUSKA¹⁷ ist eine Bestimmung der Breite kleiner Partikel möglich aus der Breite des Schwärzungstales an der Stelle, wo sich zwischen kleinster und größter Schwärzung die mittlere Schwärzung befindet. Man erkennt, daß die Breite des Teilchens bei etwa 15 μ liegen muß.

Die Längenabmessungen der Einzelfäden wurden unmittelbar durch Anlegen eines Meßstabes bestimmt. Besonders häufig treten Längen von etwa 300 μ auf. Kürzere Stücke wurden nur

* Herrn Dr. H. BOBE sind wir für die lebenswürdige Durchführung dieser Messung sehr zu Dank verpflichtet.

vereinzelt gefunden (Abb. 9 u. 11). Die längeren Fäden sind meistens Vielfache von etwa 300 μ , gelegentlich aber auch Vielfache von etwa 150 μ . Es ist uns daher nicht möglich, endgültiges darüber auszusagen, ob das Tabakmosaikvirusmolekül etwa 150 oder etwa 300 μ lang ist. Aus dem plötzlichen Absturz der Kurve der Häufigkeitsverteilung bei der Länge von etwa 300 μ möchten wir aber diesem Wert den Vorzug geben. Die Klärung dieser Frage soll einer weiteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Wir glauben, daß wir mit den genannten Werten von 15 μ Dicke und 300 bzw. 150 μ Länge an

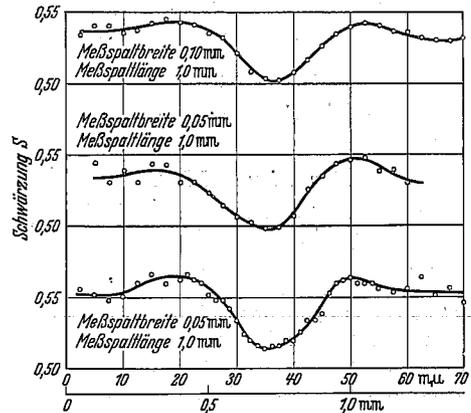


Fig. 13. Schwärzungsverlauf der Originalplatte von Fig. 7 quer zum einzelnen Virusmolekül links unten an drei verschiedenen Stellen gemessen. An der Abszissenachse sind die Entfernungen auf der Platte (mm) und die mit der Vergrößerung von etwa 20000 auf das Objekt umgerechneten Strecken (μ) eingetragen.

der unteren Grenze der Ausmaße der intakten Elementarteilchen angekommen sind. Die ausgemessenen Dimensionen an den kleinsten dieser Gebilde entsprechen bezüglich der Dicke den röntgenographisch erzielten Ergebnissen; bezüglich der Länge entspricht das Ergebnis von 300 μ etwa dem mit der Ultrazentrifuge ermittelten. Bei einem spez. Gewicht von 1,35 und der plausiblen Annahme, nämlich, daß es sich um Stäbchen mit sechseckigem Querschnitt handelt, errechnen wir bei der gemessenen Längsachse von rund 300 bzw. 150 μ und einem Durchmesser von etwa 15 μ ein Molekulargewicht von 48 bzw. 24 Millionen, während sich aus den zu Anfang genannten Zentrifugenversuchen ein Molekulargewicht von 54 Millionen ergab.

Wir müssen die stäbchen- oder fadenförmigen Gebilde des genannten Dimensionsbereiches für die Moleküle des Tabakmosaikvirus halten und sehen die Vielfachen davon als lineare bzw. laterale Aggregationen an. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß die beobachteten Teilchen von 150 μ Länge dem Tabakmosaikvirusmolekül mit der Sedimentationskonstante $174 \cdot 10^{-13}$ und die Teilchen von 300 μ Länge dem Virus mit Sedimentationskonstanten $202 \cdot 10^{-13}$ zuzuschreiben sind. Bei

entsprechenden Unterschieden in den Diffusionskonstanten wären die angeführten Differenzen in den Sedimentationskonstanten groß genug, um sie als Folge einer linearen Dimerisation des Virusmoleküls von $15 \times 150 \mu$ ansehen zu können. Daß dieses Molekül sehr leicht in das Aggregat mit der höheren Sedimentationskonstante übergeht, ist von WYCKOFF²⁹ mit Hilfe der Ultrazentrifugentechnik gezeigt worden, ebenso daß dieses Aggregat eine ganz besonders bevorzugte Stellung gegenüber den möglichen höheren Aggregationsstufen einnimmt.

Unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 48 bzw. 24 Millionen sind die hin und wieder zu beobachtenden kleineren kugel- oder kurzstäbchenförmigen Gebilde als Bruchstücke der Virusmoleküle anzusehen. Wir können unsere Annahme, daß es sich bei den Stäbchen von rund 300 bzw. $150 \times 15 \mu$ tatsächlich um die Moleküle des TM-Virus handelt, noch durch andere Argumente stützen. Das mit Hilfe der Sedimentationskonstanten bestimmte Molekulargewicht resultiert aus Ultrazentrifugenversuchen mit scharfer Sedimentationsgrenze. Die aussedimentierten Viruspartikeln müssen also homodispers sein, oder mindestens eine scharfe untere Grenze der Teilchengröße besitzen. Es gelingt, mit chemischen Agentien diese Molekülgrößen zu zerschlagen; jedoch hat sich gezeigt, daß die Bruchstücke dann nicht mehr pathogen aktiv sind. *Damit ist erwiesen, daß die Infektiosität an ein Mindestmaß der Einzelteilchen gebunden ist.* Wir haben im übrigen Grund zur Annahme, daß zwischen der pathogenen Aktivität und den Ausmaßen der infektiösen Einheiten bestimmte rechnerisch definierbare Beziehungen bestehen. Diese weisen darauf hin, daß homodisperse Virulösungen mit dem Molekulargewicht

²⁹ R. W. G. WYCKOFF, J. of biol. chem. 121, 219; 122, 239 (1937).

von etwa 48 bzw. 24 Millionen und unseren Beobachtungen nach von der Teilchengröße 300 bzw. $150 \times 15 \mu$ das Höchstmaß an pathogener Aktivität aufweisen.

Zusammenfassung.

1. Es wird die Möglichkeit aufgezeigt, im Übermikroskop Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus sichtbar und abbildbar zu machen.
2. Die präparative Ausgangssituation wird geschildert. Durch das Austrocknen des Virussols entsteht auf dem Trägerfilm ein Trockengel mit gerichteter Struktur.
3. Bei hinreichend hoch verdünnten Virussolen gelingt es, die laterale Aggregation zu Bändern zu verhindern, so daß die Stäbchen oder Fäden isoliert voneinander auftrocknen.
4. Die ausgemessenen Dimensionen an den kleinsten der Gebilde entsprechen denjenigen, die auf Grund der Röntgenographie und Ultrazentrifugation ermittelt worden sind.
5. Wir halten die stäbchen- oder fadenförmigen Gebilde des Dimensionsbereiches von rund 300 μ bzw. rund 150μ Länge und rund 15μ Durchmesser für die Moleküle des TM-Virus und sehen die Vielfachen davon als lineare bzw. laterale Aggregationen an.
6. Im Sinne der submikroskopischen Morphologie konnte zum erstenmal an einem Eiweiß-trockengel die Faserstruktur für den micellaren bis molekularen Bereich sichtbar gemacht und abgebildet werden.
7. Wir haben die bisher hypothetische und nur mittels indirekter Methoden nachgewiesene Aggregation der TM-Virusmoleküle direkt sichtbar gemacht und sie als eine überraschend leicht, zunächst in linearer Verkettung eintretende Reaktion festgestellt, die sich kontinuierlich fortsetzt bis zur Bildung von lichtmikroskopisch und dann weiter von makroskopisch sichtbaren Kristallen.