

Aus dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens und Halske A.-G. und der chemischen Abteilung der Forschungsanstalt Insel Riems bei Greifswald.

Die Entstehung von Tropismusänderungen am Beispiel der Umbildung des dermatropen zum neurotrophen Maul- und Klauenseuche-Virus.

Von

H. Ruska und C. Ruska-Menze.

Verimpft man das dermatrope MKS-Virus, insbesondere den B-Stamm, intracerebral auf Mäuse (*Nagel, Hofmann, Röhrer*), so vermehrt es sich im Mäusegehirn zunächst ohne pathogene Auswirkungen und bleibt rückübertragbar auf die Meerschweinchenplanta. Nach etwa 100—140 Passagen entwickelt sich langsam oder schneller zunehmend die Pathogenität für die Maus (Neurotropie), während die Pathogenität für das Meerschweinchen (Dermotropie) allmählich erlischt (187. bzw. 700. Passage). Werden die Passagen fortgeführt, wenn die Konzentration des Virus im Gehirn möglichst hoch ist, so entwickelt sich die Pathogenität schneller, d. h. in weniger Passagen als bei frühzeitiger Übertragung. Nach der großen Zahl der für die Entwicklung der Neurotropie erforderlichen Passagen und nach der Beständigkeit der eingetretenen Änderung scheint es uns möglich, das neurotrope Virus im Sinne der Genetik nicht als „Standortmodifikation“, sondern als Mutation des dermatropen Ausgangsstammes aufzufassen.*

Es entsteht nun die Frage, ob der neurotrope Stamm durch Selektion von Anfang an vorhandener neurotroper Virusmoleküle aus dem scheinbar rein dermatropen Stamm herausgezüchtet wurde, ob er durch zahlreiche gleichgerichtete Änderungen allmählich während der

* Über andere Virusarten und andere Deutungsversuche vgl. die Diskussion bei *R. Doerr*, Handbuch der Virusforschung II, 849 ff., Wien: Springer 1939.

Anpassungspassagen entstand, oder ob er sich auf eine einmalige Mutation eines einzigen Virusmoleküls zurückführen läßt.

Die erste Möglichkeit kann leicht ausgeschlossen werden, falls das Ausgangsvirus und die Mutante sich beide mit der gleichen Geschwindigkeit im Gehirn der Maus vermehren. Nehmen wir an, daß von Anfang an neurotrophe Virusteilchen (n) dem scheinbar rein dermatropen Virus (d) im Verhältnis $n : d$ ($n < d$) beigemischt sind, so könnte die n -Mutante bei gleicher Verdopplungsgeschwindigkeit herausgezüchtet werden, wenn minimale infektiöse Dosen (M. I. D.) übertragen würden und eine solche Dosis nur wenige Virusmoleküle enthielte. Bei den von Nagel, Hofmann und Röhrer durchgeführten „Anpassungen“ konnte es unter dieser Voraussetzung jedoch nicht zur Abtrennung reiner n -Mutanten kommen, da hohe Dosen überimpft wurden. Das gleiche gilt auch, falls eine n -Mutante, die sich ebenso schnell vermehrt wie der Ausgangsstamm, während der Passagen auftritt.

Die zweite Möglichkeit, daß in der gesamten, im infizierten Gehirn vorhandenen Virusmenge sich gleichzeitig eine allmähliche Umwandlung vollzieht, bei der an allen Virusteilchen und ihren Verdopplungsreihen die Dermotropie langsam ab- und die Neurotropie entsprechend zunimmt, wird meistens stillschweigend als Erklärung der beobachteten Erscheinungen angenommen. Der langsamen Entwicklung der Pathogenität für das Mäusehirn entspricht diese Auffassung am meisten. Sie widerspricht jedoch jeder biologischen Erfahrung auf dem Gebiet der Vererbungsvorgänge, da allen scheinbar allmählichen Umwandlungen in der Genetik tatsächlich einzelne oder wenige sprunghafte Veränderungen der Erbsubstanz zugrunde liegen, mit der hierin die Virussubstanz verglichen werden muß. Es ist daher unwahrscheinlich, daß zahlreiche gleichgerichtete, sich gleichzeitig entwickelnde Veränderungen aller Virusmoleküle der fortlaufenden Passagen eintreten, die zwischen reiner Dermotropie und reiner Neurotropie jede beliebige Abstufung annehmen können.

Im folgenden sollte deshalb geprüft werden, ob es möglich ist, die Umwandlung des Tropismus aus einer einzigen Veränderung eines einzigen Virusteilchens so abzuleiten, daß die beobachtete allmähliche Anpassung aus einer Mischung der Ursprungsformen und der Mutante zwangsläufig erfolgt und schließlich die Mutante rein erhalten wird. Wir nehmen deshalb an, daß an einem einzigen Virusteilchen bei der Züchtung im Gehirn durch Mutation pathogene Eigenschaften auftreten und daß *zugleich* dessen Vermehrungsgeschwindigkeit um einen bestimmten Prozentsatz steigt. Diese Annahme wird nahegelegt, da der Virustiter, den man bei den Passagen im Mäusegehirn beobachtet hat, mit der Entwicklung der reinen Neurotropie höher wird als bei der symptomlosen Infektion mit dem dermatropen Stamm. Vielleicht ist die

Pathogenität der Mutante selbst nur durch die Überschreitung einer bestimmten Vermehrungsgeschwindigkeit zustande gekommen.

Um anschaulich zu bleiben, wird zunächst ein konkretes Beispiel konstruiert.

Die Vermehrungsgeschwindigkeit betrachten wir vereinfachend als logarithmisch. *O. Menze* hat zwar gezeigt, daß die Vermehrung wie beim Polio-myelitis-Virus der Maus (*Gard*) rascher als logarithmisch erfolgt, für das Grundsätzliche der hier durchzuführenden Betrachtung ist dies jedoch nicht von Belang. In 24 Stunden = 1440 Minuten sollen aus einer übertragenen MID 10^4 bzw. aus $10^{0+z} 10^{4+z}$ MID werden. Es haben dann in der Zeit von 24 Stunden x Verdopplungen stattgefunden, die sich aus $10^4 = 2^x$ zu $x = \frac{4 \cdot \log 10}{\log 2} \approx 13,3$ ergeben. Die Verdopplung der MID erfolgte also in Abständen von $\frac{1440}{13,3} = 108$ Minuten.

Tritt nun bei einer beliebigen Passage des d -Stammes im Mäusehirn plötzlich eine pathogene n -Mutante auf, und ist die Verdopplungsgeschwindigkeit der n -Mutante um etwa 10% höher (also verdoppelt sie sich in Abständen von 97 Minuten), so entwickelt sich von Passage zu Passage ein wechselndes Verhältnis von $d:n$, das von der Zeit der Hirnpassagen abhängig ist.

Wir entwickeln das Verhältnis $d:n$ fortlaufend zunächst für 24stündige und dann für 48stündige Passagen. Die Mutation sei sofort nach der Impfung mit $10^2 d$ -MID eingetreten; an diesem Zeitpunkt sind $10^2 d$ -MID und $10^0 n$ -MID ($d:n = 100:1$) vorhanden. Dann liegt 24 Stunden später bei Übertragung der ersten 24-Stunden-Passage nach der Mutation das Verhältnis $d:n$ bei

$$10 \cdot 2^{\frac{24 \cdot 60}{168}} : 10^0 \cdot 2^{\frac{24 \cdot 60}{97}} = 100:2,82,$$

bei Übertragung der zweiten Passage liegt es bei

$$10^2 \cdot 2^{\frac{24 \cdot 60}{108}} : 2,82 \cdot 2^{\frac{24 \cdot 60}{97}} = 100:7,95 \text{ usw.}$$

Bezeichnen wir das Verhältnis nach der ersten Passage als $100:n_1$, nach der zweiten als $100:n_2$, nach der m . als $100:n_m$ usw., so gilt für die 24-Stunden-Passage

$$100:n_m = 10^2 \cdot 2^{13,3} : n_{m-1} \cdot 2^{14,8}$$

und

$$n_m = \frac{n_{m-1} \cdot 2^{14,8}}{2^{13,3}} = n_{m-1} \cdot 2,82.$$

Bezeichnen wir ferner die Passagezeiten als T und die Verdopplungszeiten der beiden Varianten als t_d und t_n ($t_d > t_n$), so wird allgemein ausgedrückt

$$n_m = \frac{n_{m-1} \cdot 2^{\frac{T}{t_n}}}{2^{\frac{T}{t_d}}} = n_{m-1} \cdot 2^{\frac{T}{t_n} - \frac{T}{t_d}}$$

oder

$$n_m = n_{m-1} \cdot 2^{\frac{T(t_d - t_n)}{t_d \cdot t_n}}$$

d. h. die Zahl der mutierten minimalen infektiösen Dosen steigt in jeder Passage mit einer Potenz von 2, die der Passagenzeit und der Differenz der

Verdopplungszeiten des Ausgangsvirus und der Mutante proportional und dem Produkt der Verdopplungszeiten umgekehrt proportional ist. Der

Faktor $f = 2 \frac{T(t_d - t_n)}{t_d \cdot t_n}$ mit dem n_{m-1} für jede Passage multipliziert werden muß, ist für jeden gleichbleibenden Versuch konstant. Tabelle 1 gibt die für 24- und 48stündige Passagen berechneten Werte wieder.

Geht man für die Berechnung jedes Wertes von n_0 aus, so ist

$$n_m = n_0 \cdot 2^{\frac{T(t_d - t_n)}{t_d \cdot t_n} \cdot m}.$$

Vereinfachend läßt sich auch schreiben

$$n_m = n_0 \cdot 2^{m P \Delta},$$

wobei P die Zahl der Virusverdopplungen des Ausgangsstammes pro Passage ist und Δ ($\Delta \ll 1$) die auf 1 bezogene Zunahme der Verdopplungszahl der neurotropen Mutante.

Tabelle 1. Entwicklung des Verhältnisses dermatrope zu neurotrophe Mutante in fortlaufenden Passagen für $t_d = 108$ und $t_n = 97$ Minuten.

| Zeit in Tagen | 24-Stunden-Reihe | | 48-Stunden-Reihe | |
|------------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | $T = 1440$ | $f = 2,82$ | $T = 2880$ | $f = 8,13$ |
| | Passage Nr. | $d : n$ am Ende der Passage | Passage Nr. | $d : n$ am Ende der Passage |
| 0 | . | 100 : 1 | | 100 : 1 |
| 1 | 1 | 100 : 2,82 | | |
| 2 | 2 | 100 : 7,95 | 1 | 100 : 8,13 |
| 3 | 3 | 100 : 22,42 | | |
| 4 | 4 | 100 : 63,2 | 2 | 100 : 66,1 |
| 5 | 5 | 100 : 178,2 | | |
| 6 | 6 | 100 : 502,5 | 3 | 100 : 537,4 |
| 7 | 7 | 100 : 1417 | | |
| 8 | 8 | 100 : 3996 | 4 | 100 : 4369 |
| 9 | 9 | 100 : 11269 | | |
| 10 | 10 | 100 : 31779 | 5 | 100 : 35520 |

Es ergibt sich aus der Tabelle, daß wir mit der Annahme einer einzigen Mutation an einem Virusteilchen das scheinbar allmähliche Anwachsen des Neurotropismus und die Abnahme des Dermotropismus sowie das (pro Passage gerechnet) schnellere Ansteigen des Neurotropismus bei längeren Passagezeiten erklären können.

Der Eintritt der Mutation sei zufällig bzw. von der Mutationsrate des Ausgangsstammes abhängig. Daß die Neurotropie sich gerade im Mäusegehirn, nicht aber im Gehirn von Meerschweinchen und Rind entwickeln kann, hängt damit zusammen, daß sich das Virus auch nur im Mäusegehirn zu vermehren imstande ist; warum letzteres aber der

Fall ist, bleibt vorläufig unserer Kenntnis entzogen. Wenn nun eine geeignete Mutante aufgetreten ist, entwickelt sich die Neurotropie zwangsläufig in Abhängigkeit von der Passagezeit, der Größe der übertragenen Dosis und der Größe der Verdopplungszeiten. Beide Viruskomponenten sind in dem von uns angenommenen Fall nach wenigen Passagen in gleicher Stärke vorhanden, und nach weiteren Passagen tritt die ursprüngliche Komponente rasch zurück. Wenn sie nur noch einen kleinen Bruchteil (z. B. 10^{-3}) der gesamten Virusmenge ausmacht und z. B. 10^2 M. I. D. auf wenige Tiere übertragen werden, geht sie bei der weiteren Passage verloren. Der durch Selektion rein gezüchtete Stamm ist dann ausschließlich neurotrop. Rücküberträgt man das Gemisch der *d*-Form und der *n*-Mutante auf Meer-schweinchenplanten, so ist denkbar, daß sich unter diesen Bedingungen die *d*-Form schneller (oder ausschließlich?) verdoppelt und nach einigen (9 nach *Röhler*) Passagen wieder in reiner Form gewonnen werden kann. Die gleichen Überlegungen gelten auch, falls eine sich schneller vermehrende *n*-Mutante von Anfang an der *d*-Form beigemischt ist.

Die bisher nicht berücksichtigte Beobachtung, daß die Dermotropie oft noch lange bestehen bleibt, wenn die Neurotropie schon voll entwickelt ist, daß also die Zunahme der Neurotropie nicht in einem festen Verhältnis zur Abnahme der Dermotropie steht, kann dadurch gedeutet werden, daß die Zahl p der in einer M. I. D. vorhandenen Virusteilchen bei beiden Varianten von Fall zu Fall verschieden ist. Entspricht das Verschwinden der *d*-Komponente annähernd dem vollen Wirksamwerden der *n*-Komponente, so könnte z. B. $p_d = p_n$ sein (Fall *Röhler*). Bleibt die *n*-Komponente lange erhalten, so ist $p_d < p_n$ (Fall *Hofmann*). Mit dieser Betrachtung glauben wir, das allmähliche Anpassen eines Virus an das Gehirn auf eine möglicherweise zugrunde liegende einmalige Mutation bzw. auf den Ausgang von einem einzigen Virusteilchen zurückgeführt zu haben. Der ganze Vorgang ist dann ein vollendetes Beispiel für die Entstehung oder das Vorliegen einer Mutation mit größerem Selektionswert und der sich daraus ergebenden Verdrängung der Ursprungsform.

Unsere Hypothese könnte durch eine Reihe von Untersuchungen geprüft werden. Wenn die Bildung der *n*-Mutante bzw. ihre pathogene Auswirkung rein zufällig bei 100—140 Passagen auftrat, so müßte sich bei gleichzeitiger paralleler Durchführung von über 100 Passagenreihen in einzelnen Fällen die Neurotropie schon sofort oder sehr früh zeigen. Von Vaccine und ihrer Umwandlung in Neurovaccine ist ein solches ungleichartiges Verhalten bekannt, zur Beurteilung der Verhältnisse beim MKS-Virus reichen die veröffentlichten Versuchsreihen nicht aus. Ein gleichmäßiges Auftreten der Neurotropie nach gleichen

Passagezahlen könnte dafür sprechen, daß schon im Ausgangsmaterial neurotrope Virusteilchen vorhanden sind. Ferner könnte für die Frage, ob eine Mutation vorliegt, die Temperaturabhängigkeit untersucht werden und die Möglichkeit, die Mutationsrate durch Bestrahlungsversuche am Tier vor und nach der Infektion und am Virus in vitro zu erhöhen. Aus äußeren Gründen sind uns solche Versuche zur Zeit nicht möglich, doch glauben wir, daß unsere vor 2 Jahren erörterte Auffassung auch ohne diese Prüfung zunächst mehr Wahrscheinlichkeit für sich hat als die lamarekistisch anmutende Annahme einer allmählichen, gleichzeitigen Umwandlung des gesamten, im infizierten Gehirn vorhandenen Virusmaterials.

Zusammenfassung.

Die scheinbar allmähliche Änderung des Tropismus wird am Beispiel der Umwandlung des dermatropen zum neurotrophen Maul- und Klauenseuche-Virus auf den Ursprung von einem einzelnen Virusteilchen zurückgeführt, dessen Verdopplungsgeschwindigkeit gegenüber dem Ausgangsmaterial zugenommen hat.

Herrn Prof. Dr. O. Waldmann, der uns in der Forschungsanstalt Insel Riems aufgenommen hatte, sind wir für die dort gegebenen Arbeitsmöglichkeiten sehr zu Dank verpflichtet.

Schrifttum.

- ¹ Nagel, H. C.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 1937, 624. — ² Hofmann, W.: Zbl. Bakter. usw. I O. 148, 69 (1941). — ³ Röhrer, H.: Z. Inf.Hyg. Haustiere 60, 338 (1944). — ⁴ Menze, C.: Dr.-Dissertation (unveröffentlicht). — ⁵ Gard, S.: Purification of Poliomyelitis Viruses, Upsala 1943.