

Aus dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A. G.
in der Chemischen Abteilung der früheren Reichsforschungsanstalt Insel Riems

Die Größe von Typhusbakteriophagen nach der Filtrationsendpunktbestimmung und dem elektronenmikroskopischen Bild¹⁾

Von H. Ruska und C. Menze (z. Zt. Leopoldshöhe/Lippe)

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 10. April 1945.)

Der elektronenmikroskopische Phagennachweis wird trotz der übereinstimmenden Befunde in deutschen und amerikanischen Arbeiten (l. c. in 2) noch nicht von allen Forschungsstellen als völlig gesichert betrachtet. Wenn wir davon absehen, daß vereinzelte Autoren Phagengrößen angeben, die weit unter jener der elektronenmikroskopisch sichtbaren Elemente liegen (siehe vorstehende Mitteilung), so dürfte ein wesentlicher Grund der uneinheitlichen Beurteilung darin liegen, daß das elektronenmikroskopische Bild statt runder oder stäbchenförmiger Makromoleküle Gebilde von auffallender morphologischer Differenzierung zeigt. Dieser Befund war für die Virusforschung ebenso überraschend wie seinerzeit der Nachweis der Molekülnatur der Pflanzenviren, demzufolge die Phagen in zunehmendem Maße als Proteine und nicht mehr als Organismen (d'Herelle) angesehen wurden.

Zur Identifizierung der elektronenmikroskopisch sichtbaren Phagen (d'Herellen) mit dem wirksamen Agens der Bakteriophagie schien es deshalb wichtig, die Größe der d'Herellen im elektronenmikroskopischen Bild mit der durch Ultrafiltration bestimmten Größe der Teilchen des lytischen Agens zu vergleichen.

Als Phagenstämme dienten die in der vorstehenden Arbeit verwendeten Typhusphagen 117, 128 und 174 von Sertic und Boulgakov, deren Größe uns nach Ultrafiltrationsversuchen mit 70—110, 20—30 und 8—12 μ angegeben wurde. Die eigenen Ultrafiltrationsgrößenbestimmungen wurden ebenso wie diejenigen Boulgakovs nach den Angaben von Elford³⁾ mit Gradocol-Membranen durchgeführt. Die mittleren Porendurchmesser wurden nach der Wasserdurchflußmethode bestimmt. Jeweils 10 bis 15 ccm des unverdünnten Lysats haben wir durch Membranen von 3,2 cm Durchmesser bei 1,0 Atü filtriert. Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden sowohl aus phagenhaltigen Bouillonkulturen und klaren Lysaten, als auch aus sterilen Flecken von Agarnährböden gewonnen.

¹⁾ Zweite Mitteilung zum Nachweis der Identität zwischen elektronenmikroskopisch beobachtbaren Phagenpartikeln (d'Herellen) und lytisch wirksamem Agens.

²⁾ H. Ruska, Kolloid-Z. (vorstehende Arbeit).

³⁾ W. J. Elford, Handbuch der Virusforschung (Wien 1938).

Die Ergebnisse der Ultrafiltration zeigen die Filtrationsendpunktkurven der Abb. 1. Abszisse = mittlerer Porendurchmesser in μ , Ordinate = Logarithmus der Lysineinheiten pro ccm (Bakteriophagentiter). Zur Ermittlung der

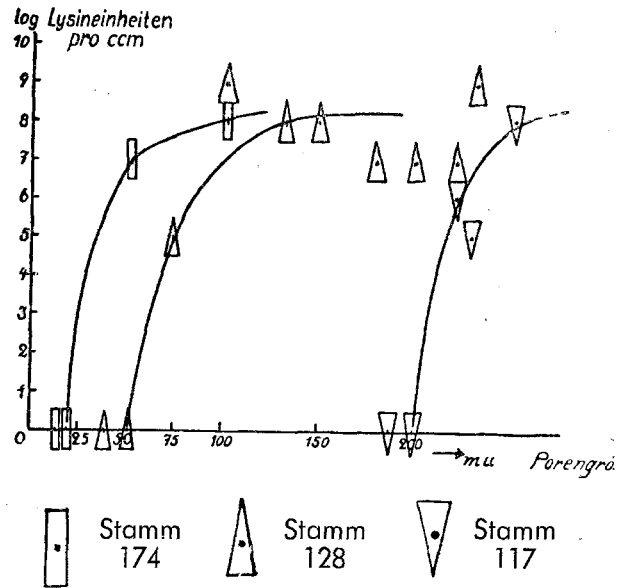


Abb. 1.

wirklichen Größe der filtrierten Teilchen sind nach Elford die Filtrationsendpunkte mit einem von der absoluten Porengröße abhängigen Faktor zu multiplizieren³⁾, woraus sich für die Porengrößen von 20, 52 und 200 μ die Größen der zurückgehaltenen Lysinteilchen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Sertic und Boulgakov zu 8,6, 24 und 130 μ ergeben.

Vergleichen wir hiermit die elektronenmikroskopischen Abb. 2 und 3 und vermessen die darauf sichtbaren d'Herellen, welche wir nach jahrelangen Erfahrungen mit den Phagen identifizieren, so ergibt sich für den Stamm 117 die Größe des kugel- bis diplokokkenförmigen Hauptteils zu 40 × 60 μ , die des stäbchenförmigen Fortsatzes zu 60 bis 120 × 10 μ . Für den Stamm 128, der eine morphologische Gliederung nicht erkennen läßt, ergeben sich Durchmesser von etwa 30—40 μ . Beim Stamm 174 waren keine Partikel elektronenmikroskopisch zu finden, die wir mit Sicherheit als Phagen ansprechen

konnten. Dieses negative Ergebnis ist damit zu erklären, daß die kleinsten Phagen neben den aus dem Kulturmedium und von zerfallenden Bakterien stammenden Substanzen nicht sichtbar sind. Die elektronenmikroskopischen Befunde stehen daher in befriedigender Überein-

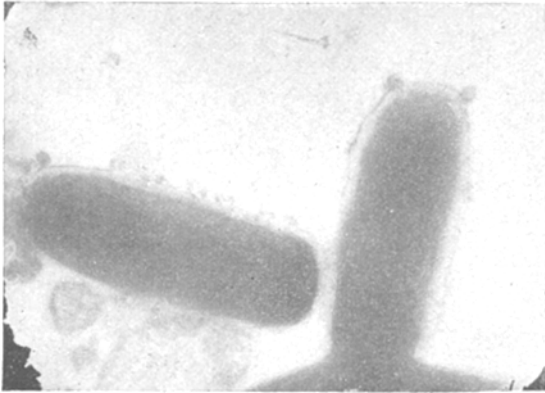


Abb. 2. Stamm 128 el. opt. 21 000: 1.

stimmung mit den Filtrationsversuchen. Die ungewöhnlich große Abmessung der Gesamtlänge der Phagen des Stammes 117 von teilweise über 200 $\mu\mu$ wirkt sich für die Ultrafiltration nicht begrenzend aus, da sie nur eine Dimension be-

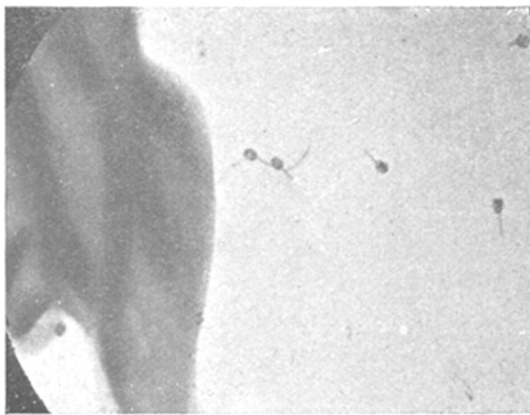


Abb. 3. Stamm 117 el. opt. 28 000: 1.

trifft. Die Filtrationsversuche sind in hohem Maße beweisend für die Identität zwischen den sichtbaren Partikeln und dem wirksamen Agens der Bakteriophagie.

Die Tatsache, daß wir bei den großen Phagen (Abb. 2) Gebilde vor uns haben, die mit einem verschieden langen Fortsatz versehen sind, der bei der Einwirkung auf die Bakterienzelle als Haftstiel wirkt und daß außerdem die Hauptteile in Dichte und feinerer Form verschieden ausgebildet sind⁴⁾, ist, wie erwähnt, schwer damit

vereinbar, die Phagen als Nukleoproteinmoleküle aufzufassen. Es könnte sein, daß auch die mittleren (Abb. 3) und kleinsten, nicht abgebildeten Phagenpartikel einen solchen Fortsatz besitzen, der schon bei den mittleren Phagen wegen seiner zu geringen Dicke elektronenmikroskopisch unsichtbar bleibt. Jedenfalls besteht in Anbetracht der Gleichartigkeit der Erscheinungen der Bakteriophagie bei der Einwirkung verschieden großer Phagenstämme kein Grund zu der Annahme, daß außer nach der Größe, auch dem Wesen nach verschiedene Agentien vorliegen.

Wir glauben nach dem morphologischen Befund die Struktur des Phagen nicht als molekular, sondern als organisiert ansprechen zu müssen. Allerdings gäbe es eine Möglichkeit, den Aufbau der großen Phagen als Molekülaufbau zu deuten. Wir müßten dazu die Vorstellung verlassen, daß alle Makromoleküle — wie Virusmoleküle, andere hochmolekulare Proteine, Zellulose, Glykogen usw. — aus lauter gleichen, kleineren, sich regelmäßig wiederholenden Grundmolekülen bestehen und annehmen, daß durch die Weiterentwicklung der einfachen funktionellen Gruppen organischer Moleküle, über die prosthetischen Gruppen von Farbstoff- und Fermentmolekülen im Virusmolekül schließlich prosthetische Gruppen entwickelt sind, die selbst schon die Ausdehnung eines Makromoleküls besitzen. Speziell beim Phagen würde die prosthetische Makrogruppe als Fortsatz einem noch größeren Trägermolekül ansitzen und die Verbindung mit der lysosensiblen Bakterienzelle aufnehmen. Damit würden wir aber die Vorstellungen, die bisher über Makromoleküle bestehen, in einem Umfang erweitern, der auch noch durch andere Gründe gerechtfertigt sein müßte. Wir können uns zu der angeführten Deutung nicht entschließen, weil wir nie in das Innere der Bakterienzellen eingedrungene Phagen beobachten konnten. Wir sind deshalb der Auffassung, daß die Bildung des „Phagenmoleküls“ nicht im Zellinnern stattfindet. Vielmehr sprechen alle Beobachtungen dafür, daß der Phage mit dem Haftstiel auf der Zellmembran sitzend oder diese damit durchdringend sich ektoparasitisch vermehrt⁴⁾.

Für unsere Auffassung, daß die Bakteriophagen Gebilde mit einer höheren Komplikation der Struktur sind, als sie in makromolekularen Stoffen nach Art pflanzlicher Virusproteine vorliegt, können auch Befunde von Wollman und Lacassagne (l. c. in 2) herangezogen werden. Bei der Inaktivierung von Phagen durch Röntgenstrahlen errechneten Wollman und Lacassagne Durchmesser des Treffbereiches, aus der nach dem Eintreffercharakter verlaufenden Inaktivierung, die bei kleinen Phagen gut, bei

⁴⁾ H. Ruska, *Erg. Hyg.* 25, 437 (1944).

zunehmender Größe wesentlich schlechter mit der durch Filtration und Zentrifugierung bestimmten Phagengröße übereinstimmen. Und zwar bleibt die mit der statistischen Ultramikrometrie gemessene Größe hinter der wirklichen Größe erheblich zurück. Zimmer (l. c. in 2) hat für die fehlende Übereinstimmung zwei Erklärungen erörtert:

1. daß die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Ionisation im Phagen inaktivierend wirkt, nicht bei allen Phagenstämmen = 1 ist und

2. daß das Treffvolumen nicht die der Berechnung zugrunde gelegte Kugelform besitzt.

Für die großen Phagen trifft die zweite Annahme zu, wenn wir den ganzen Phagen als „Trefferzentrum“ betrachten. Die erste Annahme trifft nicht nur dann zu, wenn Ionisationen innerhalb des Trefferzentrums unwirksam bleiben, woran Zimmer wohl in erster Linie dachte, sondern auch dann, wenn sie außerhalb des Trefferzentrums, aber doch noch innerhalb des Phagen liegen.

Wir möchten deshalb in dem kleinen errechneten Trefferzentrum bei großen Phagen einen Hinweis dafür erblicken, daß das Trefferzentrum nicht mit dem ganzen Phagen identisch ist, sondern wie z. B. bei Bakterien nur mit einem verhältnismäßig kleinen Teil des Gesamtvolumens. Wir betrachten die Differenz in der Größenbestimmung der großen Phagen durch Ultrafilter und Elektronenmikroskop einerseits und statistischer Ultramikrometrie andererseits als eine Bestätigung der aus dem elektronenmikroskopischen Bild unmittelbar abgelesenen Ungleichwertigkeit der einzelnen Phagenteile

und als einen Beweis für die nichtmolekulare Struktur der als Phagen bezeichneten biologischen Wirkungseinheiten.

Nachdem diese Auffassung von H. Ruska anlässlich der Arbeitstagung über Elektronenmikroskopie am 24./25. Nov. 1944 in Berlin vorgetragen worden war, fanden wir, daß C. R. Holweck im Juli 1941 in einem nicht veröffentlichten Vortrag in Bordeaux eine ähnliche Deutung gegeben hat. P. Bonét-Maury⁵⁾ schreibt darüber, daß die mit der Phagengröße wachsende Diskrepanz zwischen Trefferzentrum und wirklicher Größe als das Erscheinen einer allmählichen Organisation betrachtet werden könnte. Die Bakteriophagen würden so die Verbindung herstellen zwischen den großen kristallisierbaren Virusmolekülen und organisierten Mikroben.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß der Vergleich zwischen Filtrationsexperiment und elektronenmikroskopischem Bild die Identität zwischen lytisch wirksamen Agens und sichtbaren Phagenteilchen (d'Herellen) bestätigt. Die Formen der großen Phagenteilchen und die Ergebnisse der statistischen Ultramikrometrie sprechen für einen Aufbau von einer höheren Komplikation, als er in den makromolekularen Virusproteinen der Pflanzen vorliegt.

Frau M. Gethmann danken die Verfasser für ihre experimentelle Hilfe. Dem Präsidenten der Forschungsanstalt Insel Riems, Herrn Prof. Dr. Dr. O. Waldmann sind wir für die gastliche Aufnahme, die das Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G. in der Forschungsanstalt gefunden hatte, sehr zu Dank verpflichtet.

⁵⁾ In „Les ultravirus des maladies animales“, herausgegeben von C. Levaditi, P. Lépine et S. Verge, (Paris 1943).

Verfahren zur Kennzeichnung photographischer Gelatine

Von Hans Ammann-Braß, Fribourg (Schweiz)

Mit 4 Abbildungen im Text und 15 Tafeln

(Eingegangen am 27. Febr. 1948.)

Inhaltsübersicht: 0. Einleitung. — I. Zielsetzung. II. Grundlagen. — Entwicklung des neuen Verfahrens. 1. Die Reifung. Physikalische Reifung. Chemische Reifung. 2. Die photographische Gelatine. 3. Die Gelatineprüfung. — III. Durchführung des neuen Prüfverfahrens und Auswertung. 1. Die Reihenuntersuchungen. 2. Die Trübungsmessung. Zeiss-Pulfrich-Nephelometer. Photozellen-Trübungsmesser. Zusammenhang zwischen Skalenablesung und Trübung. 3. Die Auswertung der Meßergebnisse. Die graphische Darstellung (Darstellung in der Ebene). Die räumliche Darstellung. — IV. Ergebnisse. A. Die Gelatine-Standard-Prüfung. 0. Die Verfahrenstechnik. 1. Ungemischte Gelatinen (Konzentration 0,5–10% G/V). 2. Ungemischte Gelatinen (Konzentration 0,1–1% G/V) Der zeitliche Verlauf der Trübungsänderung. — Abhängigkeit der Trübung von der Gelatinekonzentration. — Abhängigkeit der Trübung von der Reifungsdauer. — Die Bildung der Trübungsminima. — Darstellung der Trübungsfläche. — Raummodelle photographischer Gelatinen. — Einteilung der Gela-

tinen in Gruppen. 3. Gemischte Gelatinen (Konzentration 0,5–10% G/V). — B. Abweichungen von der Standard-Prüfung. 0. Standard-Prüfung. 1. Änderung der Misch- und Reifungstemperatur. — Gelatine W 2415. 2. Austausch der Kationen bzw. Anionen in der zur Prüfung verwendeten Chloridstammllösung. — Gelatine W 2415. 3. Änderung des Chloridüberschusses. — Gelatine W 2415. — Die Abhängigkeit der Trübung von der Gelatinekonzentration und der Reifungsdauer bei gegebenem Chloridüberschuß. — Die Abhängigkeit der Trübung vom Chloridüberschuß und der Reifungsdauer bei gegebener Gelatinekonzentration. — Vergleich der Gelatinen W 2415 und K 1941 i. 4. Änderung der AgCl-Konzentration. — Gelatine W 2415. — C. Wirkung von Gelatinezusätzen. I. Inertisation durch Waschen der Gelatine. — Die Jodazidreaktion nach Feigl. 2. Zusatz von Ammoniumthiosulfat. 3. Zusatz von Thiosamin. 4. Zusatz von Cystin. D. Reproduzierbarkeit des Verfahrens. — V. Schlußfolgerungen. Der Mechanismus der Minima-bildung. Ausblick. — Literaturangaben.