

Prüfung zweier verschiedener wirtsinduzierter Modifikationen des Phagen λ auf Kooperation

H. STEIGER und R. W. KAPLAN

Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt a. M.
(Z. Naturforsch. 20 b, 715—716 [1965]; eingeg. am 23. Februar 1965)

Phage λ grown on the Serratia-strain HY or CN shows differently low efficiency of plating (EOP) on strain EQ due to host induced modification. When EQ is infected with one λ -type alone the EOP increases with increasing multiplicity. This "cooperation" of the intracellular phages may be due to competition for the restricting cell component (e. g. enzyme). Mixed infection with both λ -types does not result in an additional increase of the EOP as would be expected if "cooperation" between the different modifications occurred. This indicates that the EQ-cells contain different restricting cell components each specifically attacking one phage type independently of the other one.

Der temperierte Phage λ von Serratia marc. zeigt¹ mit den Wirtsstämmen HY, CN und EQ in unterschiedlichem Maße die Erscheinung der wirtsinduzierten Modifikation (HIM). Sie äußert sich als \pm niedere Effektivität der Plaquebildung (EOP) bei Plattierung des in dem einen Stamm vermehrten Phagen auf einen anderen Stamm. Nach den Arbeiten verschiedener Autoren²⁻⁴ ist das Phagenom (DNS) der Träger dieser Modifikation; die DNS der nicht zur Entwicklung kommenden (restringierten) Phagenpartikel wird nach der Injektion in die Wirtszelle, wahrscheinlich enzymatisch, zerstört². Im folgenden wurde geprüft, ob zwei verschieden wirtsmodifizierte λ -Phagen bei Mischinfektion von Zellen eines dritten Wirts unabhängig voneinander restringiert werden oder sich gegenseitig beeinflussen, z. B. durch „Kooperation“ eine höhere Vermehrungs-

chance (EOP) erhalten, als wenn jede Sorte allein infiziert.

Hierzu wurden λ -Phagen in den beiden modifizierenden Wirtsstämmen HY bzw. CN vermehrt (λ ·HY bzw. λ ·CN) und dann Zellen des Stammes EQ infiziert, der beide λ -Sorten verschieden stark restringiert. Neben Mischinfektionen (jeder Phage mit mittlerer Multiplizität $m=5$) wurden EQ-Zellen mit gleicher sowie höherer ($m=10$) und niederer Multiplizität ($m=0,05$) mit jeder Phagensorte allein infiziert und auf EQ plattiert. Ferner wurden die Phagen ohne Präadsorption, also mit $m \ll 1$, auf EQ getitert, und schließlich λ ·HY, λ ·CN und λ ·EQ nach Präadsorption ($m=5$) an ihre jeweiligen (sie nicht restringierenden) Vermehrungswirte auf diesen plattiert. Zur Infektion und Plattierung dienten stationäre (15 Stdn. Bouillonkultur), zentrifugierte und in Puffersaline resuspendierte Zellen (Titer 10^8 /ml); nach der Präadsorptionszeit von 15 min bei 30° waren $> 90\%$ der Phagen adsorbiert.

Die Ergebnisse (Tab.) zeigen zunächst, daß bei Infektion mit jeder Phagensorte allein der Anteil lytisch reagierender (Plaques bildender) unter den infizierten Zellen mit der Infektionsmultiplizität m ansteigt. Bei $m=0,05$ entspricht dieser Anteil etwa der EOP bei Titerung ohne Präadsorption, was wegen des Vorwiegens von Ein-Partikel-Infektionen in beiden Fällen zu erwarten ist. Mit zunehmender höherer Multiplizität ($m=5$ und 10) steigt die Lysishäufigkeit unter den infizierten stark über diesen Wert, und zwar mit $m=5$ bei λ ·CN auf das 50-fache, bei λ ·HY auf das ca. 10-fache. Ein analoger Multiplizitätseffekt ist auch für die Phagen λ und ϵ^{15} beschrieben worden^{5,6}. Der Effekt beruht nicht etwa auf einer Verschiebung des Anteils der Lysen zu ungunsten der Lysogenisierungen;

Adsorptionsbakterien	Phagentyp	Infektionsmultiplizität m	Anteil Lysen (Plaques) pro infizierte Zelle	Vergleichswerte*	EOP bei Titerung ohne Präadsorption
EQ	λ ·HY	0,05	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$
EQ	λ ·HY	5	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	
EQ	λ ·HY	10	$(4,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	
EQ	λ ·CN	0,05	$(7,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$
EQ	λ ·CN	5	$(3,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	
EQ	λ ·CN	10	$(7,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-4}$	
EQ	λ ·HY + λ ·CN	5 + 5	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	
HY	λ ·HY	5	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$		1
CN	λ ·CN	5	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$		1
EQ	λ ·EQ	5	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$		1

Tab. 1. Ergebnisse der Versuche.

* Zu erwartende Lysishäufigkeiten bei Annahme der Infektion gleichartiger Zellen mit seltenen „ungewöhnlichen“ Phagen.

¹ H. STEIGER u. R. W. KAPLAN, Z. allg. Mikrobiol. 4, 367 [1964].

² D. DUSOIX u. W. ARBER, J. molecular Biol. 5, 37 [1962].

³ S. HATTMAN u. T. FUKASAWA, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 297 [1963].

⁴ A. SHEDLOVSKY u. S. BRENNER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 300 [1963].

⁵ K. PAIGEN u. H. WEINFELD, Virology 19, 565 [1963].

⁶ H. UETAKE, S. TOYAMA u. S. HAGIWARA, Virology 22, 202 [1964].

denn ein spezieller Versuch zur Bestimmung der Häufigkeit der Lysogenisierungen von λ -CN in EQ bei $m=5$ und 10 ergab, daß diese erheblich unter 10^{-3} liegen muß.

Die Überwindung der Restriktion (welche zu phagenproduktiver Lysis führt) in einem kleinen Anteil der Infektionen wird i. a. durch die Annahme erklärt, daß ein entsprechend kleiner Teil der Zellen in einem „ungewöhnlichen“ Zustand ist, der keine Restriktion bewirkt⁷. Dann sollte jedoch der Anteil Lysen unter den Infizierten gleich der Häufigkeit solcher ungewöhnlicher Zellen unter den Infizierten sein und somit unabhängig von m ; dies trifft nicht zu. Nimmt man als Alternative an, daß die Phagenpopulation einen kleinen Teil (k) Partikel enthält, die sich auch in restringierenden Zellen entwickeln können (Restriktionsbrecher), so sollten die Lysen unter den infizierten Zellen nach $km/(1-e^{-m})$ für $km \ll 1$ mit m ansteigen. Die danach zu erwartenden Werte sind in der vorletzten Spalte der Tabelle eingetragen. Im Vergleich zu ihnen steigen die gefundenen Lysis-Häufigkeiten deutlich stärker an, bei λ -CN z. B. auf einen 10-fach höheren Wert als den dann zu erwartenden. Auch diese Annahme erklärt also die Beobachtungen nicht; es muß ein zusätzlicher Effekt der Multiplizität mitwirken. Dieser besteht darin, daß die intra-

zellulären Phagen Genome bei der Überwindung der Restriktion sich irgendwie gegenseitig „unterstützen“ (Kooperation). Das könnte vielleicht auf dem mit m zunehmenden Wettbewerb um die (wenigen) Molekel des Restriktionsenzym beruhen⁶.

Die gefundene Lysishäufigkeit bei der *Mischinfektion* ($3,3 \cdot 10^{-3}$) zeigt nun gegenüber der von λ -CN allein ($3,5 \cdot 10^{-3}$) wie auch von λ -HY allein ($1,1 \cdot 10^{-4}$) keinerlei Anstieg trotz höherer Gesamtmultiplizität ($m=5+5$). Die in der Zelle zugleich vorhandenen λ -HY-Phagen sind also ohne merkbare Wirkung auf die Überwindung der Restriktion durch die λ -CN-Phagen. Somit geschieht eine Kooperation nur zwischen gleichen Modifikationstypen, nicht jedoch zwischen *verschieden* modifizierten Phagen Genomen, und zwar weder eine allgemeine Kooperation noch speziell eine hinsichtlich des Multiplizitäts-Effektes. Falls die Restriktion auf enzymatischer Zerstörung der Phagen-DNS beruht und der Multiplizitäts-Effekt auf Wettbewerb um die Enzymmolekel, so zeigen die Befunde bei Mischinfektion, daß die EQ-Zelle anscheinend für jeden der beiden Modifikations-Typen λ -CN und λ -HY ein besonderes Enzym besitzt, so daß immer nur eine Phagensorte um das für sie allein spezifische Enzym kompetiert.

⁷ G. BERTANI u. J. J. WEIGLE, J. Bacteriol. **65**, 113 [1953].

Sterische Wirkungen von Actinomycin D

V. M. ZHDANOV

Institut für die Virusforschung Moskau, UdSSR

(Z. Naturforsch. **20 b**, 716–717 [1965]; eingegangen am 15. April 1965)

Actinomycin D, das mit Zweifadenstrukturen der DNS¹ und RNS² reagiert, hemmt die DNS-abhängige Synthese der RNS und die Replikation der zweifadenförmigen RNS. Bei der Untersuchung der Actinomycinwirkung auf Influenza- und ähnliche Viren sind verschiedenartige Resultate erzielt worden. Während die Entwicklung der Influenzaviren und der klassischen Geflügelpestviren (KPV) in Gegenwart niedriger Konzentrationen des Antibiotikums gehemmt wird^{3,4}, üben selbst hohe Konzentrationen keine Hemmwirkung auf die Entwicklung des Virus der Newcastle disease (NDV) aus⁴. Aus diesen Ergebnissen schließen die erwähnten Autoren^{3,4}, daß, im Gegensatz zu der Synthese der NDV-RNS, die Synthese der Virus-RNS bei Influenzavirus und KPV von der Zell-DNS abhängig sei.

Im vorliegenden soll über eine vergleichende Untersuchung der Wirkung von Actinomycin-D auf Influenza-

und Parainfluenzaviren berichtet werden. Wegen ihrer verschiedenartigen Topographie der Synthese der Nuclein- und Proteinkomponenten wurden die Viren KPV (Stamm Weinbridge), Sendai (Stamm 960) und NDV (Stamm 605) ausgewählt. Beim Sendaivirus werden RNS und S-Antigen im Nucleolus synthetisiert^{5,6}, beim KPV im Zellkern⁷ und beim NDV im Zellplasma⁸, während V-Antigen bei allen drei Virusarten im Zellplasma gebildet wird. Die Entwicklung aller drei Viren wurde in primären, trypsinisierten Hühnerembryonalzellen untersucht. In den Kern- und Plasmafraktionen der infizierten Zellen (ID_{50} pro Zelle) wurden über einen Zeitraum von 12 Std. die RNS-Synthese mittels ¹⁴C-Uridin, S-Antigen mit der Komplexbindungs-Reaktion, V-Antigen mittels Hämagglutinin-Reaktion sowie der Infektionstiter durch Hühnerembryonen-Titration bestimmt. Actinomycin-D wurde in Konzentrationen von 0,1 bis 10 γ /ml gleichzeitig mit dem Virus den Gewebekulturen hinzugefügt. Als Kontrollen dienten virusinfizierte Kulturen ohne Actinomycin sowie nicht infizierte, aber mit Actinomycin behandelte Kulturen. Zwecks Vermeidung einer photodynamischen Wirkung des Actinomycins wurden die Kulturen im Dunkeln gezüchtet.

¹ E. REICH, R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN u. E. L. TATUM, Science [Washington] **134**, 556 [1961].

² P. J. GOMATOS u. I. TAMM, Proc. nat. Acad. Sci. USA **49**, 407 [1963].

³ R. D. BARRY, D. R. YVES u. J. G. CRUICKSHANK, Nature [London] **194**, 1139 [1962].

⁴ R. ROTT u. C. SCHOLTISSEK, Z. Naturforsch. **19 b**, 316 [1964].

⁵ A. G. BUKRINSKAYA u. V. M. ZHDANOV, Nature [London] **200**, 4909 [1963].

⁶ V. M. ZHDANOV, N. B. AZADOVA u. L. V. URUVAYEV, J. Immunology, in press.

⁷ P. M. BREITENFELD u. W. SCHÄFER, Virology **4**, 327 [1957].

⁸ J. M. REDA, R. ROTT u. W. SCHÄFER, Virology **22**, 422 [1964].