

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt am Main

Morphologische Befunde an fixierten und unfixierten Influenzavirus-Elementarkörperchen

K. Reuss, I. C. Plescher, D. Hülser und K. Herzberg¹

Mit 3 Tafeln

Eingegangen am 6. September 1966

In vielen Publikationen ist auf die Polymorphie des Influenzavirus hingewiesen worden. Neben mehr oder weniger sphärischen Partikeln von 80 bis 100 μ Durchmesser wurden größere Formen beschrieben und abgebildet, deren Gestalt zum Teil erheblich von der runden Form abwich. Außerdem wurden bei einigen Stämmen Filamente gefunden, die oft am Ende eine kugelige Verdickung aufwiesen (ARCHETTI et al.; CHOPPIN; CHOPPIN et al.; CRUICKSHANK; HORNE et al.). STEFANOV und GRAF veröffentlichten Abbildungen von Riesenpartikeln mit Einschnürungen und Vorwölbungen, die sie für echte Sprossungsvorgänge halten². Besonders groß war die Polymorphie in Präparationen, die überwiegend inkomplettes Influenzavirus enthielten (BARRY et al.; BIRCH-ANDERSEN et al.; MOORE et al.; MORGAN et al.). ARCHETTI et al. betonten die leichte Deformierbarkeit des Influenzavirus. CHOPPIN et al. hatten bereits 1961 darauf hingewiesen, daß nach Fixierung mit Formalindampf der Pleomorphismus weit weniger ausgeprägt sei. Wir sahen uns deshalb veranlaßt, den Einfluß der Fixierung auf die Morphologie der Influenza-Elementarkörper zu untersuchen.

Material und Methoden

Influenzavirusstämme

Die folgenden Stämme wurden untersucht: A₂Asia (Singapore)-Normal-Stamm der 128.-136. Bruteipassage und der aus diesem Stamm abgeleitete Letal-Stamm mit hoher Mäusevirulenz (76.-85. Bruteipassage) (HERZBERG, REUSS und DAHN). Weiter untersuchten wir die eiadaptierten Laborstämme A₁FM₁, B Stockholm und B Johannesburg. Der A₂-Stamm Hannover war erst 1965 isoliert worden und hatte nur wenige Bruteipassagen hinter sich²).

Zur Passage wurde virushaltige Allantoisflüssigkeit in der Verdünnung 10⁻⁴ (1000 bis 10000 EID₅₀) in die Allantoishöhle neun Tage vorbebrüteter Huhnereier injiziert. Die Eier wurden 48 Std. bei 35,5°C nachbebrütet, die Embryonen durch Aufenthalt bei 4°C über

¹ Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte die Arbeit durch Forschungsgeräte.

² Vgl. die Einwände gegen diese Deutung in der soeben veröffentlichten Arbeit von J. P. STEVENSON and F. BIDDLE „Pleomorphism of Influenza Virus Particles under the Electron Microscope“. In „Nature“ 212, 619 (1966).

³ Wir danken Herrn Obermeidzinalrat Dr. Wohlrab, Hannover, für die freundliche Überlassung des Stammes.

Nacht abgetötet, die frisch gewonnenen Allantoisflüssigkeiten sofort im Hämagglutinationstest geprüft, Flüssigkeiten mit Titern zwischen 1:2560 und 1:10000 vereinigt und 30 min bei etwa 6500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment zur elektronenmikroskopischen Untersuchung je nach Menge entweder in einem Tropfen zurückgelaufener Allantoisflüssigkeit oder in 0,1–0,5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 aufgenommen.

Negativkontrastierung

Die fixierten oder unfixierten Virussuspensionen wurden je nach Virusgehalt mit der 5–10fachen Menge einer 3%igen Phosphorwolframsäure-Lösung (PWS) in Aq. dest. (pH mit KOH auf 6,3–6,5 eingestellt) mit einem Zusatz von 0,1% Rinderserumalbumin gemischt und anschließend mit einem Vaponefrin-Nebulizer auf Objektblenden aufgesprüht (Pt-Au-Siebenlochblenden mit Formvar als Trägerfolie).

Aufnahmen

Die Aufnahmen wurden mit einem Elmiskop I (Siemens & Halske) bei 80 kV mit Feinstrahlkondensator und 8000 bis 40000facher Vergrößerung hergestellt.

Fixierung

Zur Fixierung diente Osmiumtetroxyd (E. Merck, Darmstadt). Das virushaltige Sediment wurde in 0,1 ml gepufferter Kochsalzlösung aufgenommen, 0,1 ml 1%ige OsO₄-Lösung in gepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 zugefügt und nach 1–3 min mit PWS gemischt und auf Blenden gesprüht.

OsO₄-Fixierung in hypertonischer Lösung

In 12,5 ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit wurde 1 g NaCl gelöst (= 8%) und anschließend 30 min bei etwa 6500 g zentrifugiert, das Sediment in etwa 0,1 ml Überstand aufgenommen und wie oben mit OsO₄ fixiert.

Bedampfung

Von jeder Präparation wurden einige mit dem Virus-PWS-Gemisch besprühte Blenden nach Lufttrocknen kurz in Aq. dest. bzw. bei unfixiertem Virus in 0,15 m Ammoniumacetat gewaschen und mit Pt-Ir unter einem Winkel von 20° bedampft.

Ergebnisse

In den Abbildungen 1 und 2 haben wir eine PWS-kontrastierte unfixierte Präparation einer OsO₄-fixierten vom gleichen Ausgangsmaterial gegenübergestellt. Im unfixierten Präparat finden sich zahlreiche deformierte Influenzaviruspartikel, die man als Hörnchenformen, Hantelformen etc. bezeichnen kann. Manche Partikel zeigen kleine Protrusionen, andere erscheinen länglich verformt. Im Gegensatz dazu sind im fixierten Präparat alle Partikel annähernd rund.

In den Ausschnittvergrößerungen (Abb. 3 und 4) sind die für Myxoviren charakteristischen Borsten (Spikes) in beiden Präparationen deutlich zu erkennen. In bedampften Präparaten waren die unfixierten kleinen Elementarkörper mehr oder weniger abgeflacht (Abb. 5), während sie nach Fixierung kugelförmiger blieben (Abb. 6). Große Partikel waren aber auch in fixiertem Zustand flach. Sie wurden in unfixierten Präparaten häufig zu charakteristischen Ringformen mit Randwulst deformiert. Von diesem Wulst können mehr oder weniger lange Protrusionen ausgehen (Abb. 7 und 8). Im bedampften Präparat (Abb. 9) ist deutlich zu erkennen, daß der Wulst und die Ausläufer relativ hoch sind, das Zentrum dagegen eingesunken ist. Alle diese Deformationen waren nach OsO₄-Fixierung nicht nachzuweisen. Auch große Partikel waren mehr oder weniger rund und zeigten vor allem keinen Randwulst und keine Ausläufer. Kleine Partikel waren manchmal noch etwas hantelförmig verformt, zeigten dann aber meist Membrandefekte an der Stelle der Einziehung.

Unterbrechungen des Borstensaums waren an deformierten Partikeln in unfixierten Präparaten häufig zu erkennen. So zeigen zwei der kleinen Partikel auf Abbildung 3 Ausläufer, die nur an der Spitze kleine, spikebesetzte Kappen tragen. Hier ist offenbar Inhalt aus dem Elementarkörper ausgepreßt worden, wobei ein kleines Stück der borstenbesetzten Membran abriß. Das größere Gebilde oben in Abbildung 3 zeigt eine Protrusion mit vollständigem Borstenbesatz, hingegen ist die Besetzung mit Oberflächenprojektionen auf der rechten Hälfte dieses Körpers nicht vollständig, so daß man eine Überdehnung der Membran an dieser Stelle annehmen kann. Kleine Defekte des Borstenbesatzes finden sich auch an den meisten großen, stark deformierten Partikeln in unfixierten Präparaten, von denen zwei Beispiele in Abbildung 7 und 8 dargestellt sind. Die defekten Stellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Wurden die Elementarkörper in Allantoisflüssigkeit mit 8% NaCl zentrifugiert und das Sediment in dieser hypertonen Lösung fixiert, so fanden sich starke Deformierungen. Große Partikel hatten lange Ausläufer. Die Borstensäume waren nicht gut erhalten, aber erkennbar (Abb. 10). Formen mit ausgeprägtem Randwulst entstanden nicht. Im bedampften Bild zeigte sich aber, daß die Ausläufer verschieden hoch waren (Abb. 11).

Verformte Elementarkörper und Randwulstformen fanden wir bei allen untersuchten Influenzavirusstämmen (s. Material und Methoden). Große, besonders leicht verformbare Partikel waren in verschiedenen Eipassagen des gleichen Stammes verschieden häufig. Filamente mit oder ohne Bulbus wurden in allen Stämmen nur vereinzelt gefunden. Auf ihre Form hatte die Fixierung keinen Einfluß. Gelegentlich fanden wir in fixierten Präparaten eine Kette von kleinen runden Partikeln oder ein Filamentstück mit einigen kleinen Partikeln am Ende, deren Durchmesser dem des Filaments entsprach.

Stark deformierte große Formen kamen nicht nur in Passagen mit etwa 1000–10000 EID₅₀ vor, sondern auch in der Allantoisflüssigkeit eines mit einer Grenzverdünnung (10⁻⁹) geimpften Bruteies. Die Zugehörigkeit der großen Partikel zum Formenkreis des Influenzavirus wurde durch das Vorhandensein der typischen Spikes und durch die elektronenmikroskopisch nachgewiesene Agglutinierbarkeit durch spezifisches Antiserum bewiesen. Sie fanden sich auch in Präparationen, die durch Adsorption an Hühnererythrocyten und nachfolgende Elution gereinigt worden waren.

Versuche, auch mit Formalin eine gleichwertige Fixierung zu erreichen, führten zu keinem befriedigenden Ergebnis. Selbst bei Variierung der Formalinkonzentration bis 20% und der Zeit von 10 min bis 4,5 Std. waren noch polymorphe Viruspartikel zu sehen. Längere Formalinfixierung bewirkte eine Schädigung der Elementarkörperchen.

Diskussion

Bei allen untersuchten Stämmen sahen wir in unfixierten Präparaten eine wechselnde Zahl von großen, stark verformten Partikeln, die wir wegen der Übereinstimmung mit den Abbildungen von inkomplettem Influenzavirus (BARRY et al.; MOORE et al.; MORGAN et al.; u. a.) für inkomplette Formen halten. Sie wiesen den für die Myxovirusarten typischen Borstenbesatz auf, wurden durch spezifisches Antiserum ebenso agglutiniert wie komplettes Virus und fanden sich noch nach Reinigung durch Adsorption an Erythrocyten und Elution. Inkomplette Formen werden nach v. MAGNUS auch bei Verimpfung von stark verdünntem Virus gebildet, wenn auch in weit gerin-

gerer Menge als in Passagen mit unverdünntem Virus. Wir fanden sie noch bei Infektion mit einer Grenzverdünnung von 10^{-9} . Stammunterschiede haben wir im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht.

Die bizarre Gestalt, die manche inkomplette Viruspartikel in unfixierten Präparaten zeigten, ließ uns anfangs an eine Verunreinigung unserer Influenzavirusstämme mit Mykoplasmen denken, eine Möglichkeit, die aufgrund der Hinweise von HAYFLICK in Gewebekulturen und Bruteiern in Betracht kommen konnte. Dieser Verdacht ließ sich durch den negativen Ausfall von Kulturverfahren und durch elektronenmikroskopische Vergleiche entkräften (siehe die nachfolgende Arbeit über die Morphologie der Mykoplasmen).

Parallel zu unseren Untersuchungen an Mykoplasmen haben wir nun der Influenzavirus-haltigen Flüssigkeit vor dem Aufbringen auf die Objektblenden Fixierungsmittel zugesetzt. Nach Fixierung mit Formalin in verschiedenen Konzentrationen und verschieden langer Einwirkungszeit traten noch verformte Partikel auf. Wir nahmen deshalb OsO_4 in isotoner Kochsalzlösung und sahen, daß damit alle Viruspartikel, komplette und inkomplette, angenähert rund blieben. Sie zeigten nicht mehr den in unfixierten Präparaten häufig beobachteten Randwulst und auch keine Fortsätze. Bei Fixierungszeiten von nur 1–3 min war der Borstenbesatz fast ebenso gut darstellbar wie in unfixierten Präparaten. Längere Fixierung führte zu einer gewissen Schädigung. MOORE et al. fixierten Suspensionen von inkomplettem Influenzavirus in Aq. dest. mit OsO_4 -Dampf und sahen keinen Unterschied zu unfixierten Präparaten. Dieser Befund zeigt, daß auch hypotone Lösungen zu Deformierungen führen (siehe nachfolgende Arbeit).

Unsere Ergebnisse erfuhren durch Versuche von BONAR und Mitarb. mit einem aviären Myeloblastosevirus, das in unfixierten Präparaten polymorph, nach Fixierung dagegen rund war, eine Ergänzung. Diese Autoren zeigten, daß die Deformierungen im wesentlichen durch das Trocknen der Elementarkörperchen in einer beim Trocknen sich konzentrierenden Salzlösung verursacht wurden. Der Einfluß einer stark hypertonen Lösung auf Influenzaviruspartikel wird aus unseren Abbildungen 10 und 11 deutlich. Über ähnliche Ergebnisse mit Newcastle-Disease-Virus berichteten bereits BANG und SHARP et al.

Die Einwirkung einer hypertonen Lösung auf Viruspartikel in Suspension führte in unseren Versuchen nicht zur Ausbildung von Randwülsten: diese Form entsteht offenbar nur, wenn eine hypertone Lösung auf Elementarkörper einwirkt, die auf einer Unterlage liegen. Die elastische Membran der Influenzaviruspartikel bleibt bei geringeren Deformierungen intakt, bei Einwirkung stärkerer Kräfte wird sie überdehnt, wodurch die regelmäßige Anordnung der Spikes auf der Oberfläche verändert wird (Abb. 8). Reißt die Membran ein, so erkennt man entweder eine Unterbrechung des Borstensaums (Abb. 7 und 8) oder sogar den Austritt von Inhalt (Abb. 3¹). Andererseits kann es aber auch zur Abschnürung von runden Partikeln kommen, an deren Borstensaum kein Defekt zu erkennen ist (Abb. 7).

Randwulstformen entstehen nach unseren Beobachtungen nur aus den auch in Schnittpräparaten relativ leer erscheinenden inkompletten Partikeln (MORGAN, HSU und ROSE), die in fixierten und bedampften Präparaten stark

¹ Ähnliche Abbildungen wurden während der Drucklegung dieser Arbeit von STEVENSON und BIDDLE (Nature 212, 619–621 (1966)) veröffentlicht, aber anders gedeutet.

abgeflacht sind. Komplette Elementarkörperchen mit einem widerstandsfähigeren Nukleoid werden nicht in dieser Weise verformt. Diese Deutung entspricht im wesentlichen derjenigen, die BONAR et al. gegeben haben.

Der Fixierungsversuch in hypertonischer Lösung zeigt, daß die Fixierung stark deformierter Partikel mit langen Ausläufern möglich ist und daß sie sich nicht etwa unter dem Einfluß des Osmiumtetroxyds abrunden. Wir meinen deshalb, daß die nach Fixierung in isotonem Milieu gefundenen runden Formen dem wahren Bild der Influenzaviruspartikel am nächsten kommen. Daß darüber hinaus Filamente mit oder ohne Bulbus als echte Influenzavirus-Formen anzusehen sind, wird durch unsere Versuche bestätigt.

Zusammenfassung

Fixiert man Influenzavirus aus Allantoisflüssigkeit, bevor es auf Objektblenden gesprayed wird, mit OsO_4 , so bleiben die Viruspartikel annähernd sphärisch. Partikel mit Ausstülpungen („Knospen“) oder Hantel- und Hörnchenformen, wie sie vielfach abgebildet worden sind, traten dann nicht mehr auf, während filamentöse Virusformen erhalten blieben. Wir nehmen an, daß die vielgestaltigen Formen aus unfixierten Elementarkörperchen entstehen, die in salzhaltiger Lösung auf der Blende antrocknen. Als besonders stark verformbar erwiesen sich große inkomplette Partikel.

Abstract

Morphological investigations on fixed and unfixed influenza virus particles

K. Reuss, C. Plescher, D. Hülser and K. Herzberg

The gross morphology of OsO_4 -fixed and unfixed influenza virus particles was investigated in negatively stained and in Pt-shadowed preparations. Unfixed particles appeared highly pleomorphic: small elementary bodies showed elongated and dumb-bell forms; large, presumably incomplete particles revealed irregular outlines. Often they had a characteristic ring form with a center of lower density and protrusions of different length. In contrast with this pleomorphism, all particles in OsO_4 -fixed preparations showed more or less circular outlines. The small particles were roughly spherical, while the larger ones appeared rather flat. Highly distorted particles could be produced artificially by suspending the virus in hypertonic salt solution. The authors conclude that the distortion of unfixed virus particles is caused by the drying of the virus suspension in a salt-containing medium. True filaments were observed both in fixed and unfixed preparations.

Observations morphologiques de corpuscules élémentaires fixés ou non fixés sur des virus de la grippe

Hallazgos morfológicos en corpúsculos elementales de virus de la Influenza fijados y no fijados

Schrifttum

- ARCHETTI, I. and BOCCIARELLI, D. S.: On the structure of filamentous forms of influenza virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 11, 599–606 (1962).
 BANG, F. B.: Formation of filamentous forms of newcastle disease virus in hypertonic concentration of sodium chloride. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 50–52 (1949).
 BONAR, R. A., HEINE, U., BEARD, D. and BEARD, J. W.: Virus of avian myeloblastosis (BAI strain A). XXIII. Morphology of virus and comparison with strain R (Erythroblastosis). *J. Nat. Cancer Inst.* 30, 949–997 (1963).
 BARRY, R. D., WATERSON, A. P. and HORNE, R. W.: Incomplete forms of influenza virus. *Z. Naturforsch.* 17b, 749–750 (1962).

- BIRCH-ANDERSEN, A. and PAUCKER, K.: Studies on the structure of influenza virus. II. Ultrathin sections of infectious and noninfectious particles. *Viol.* **8**, 21–40 (1959).
- CHOPPIN, P. W.: On the emergence of influenza virus filaments from host cells. *Viol.* **21**, 278–281 (1963).
- CHOPPIN, P. W., MURPHY, J. S. and STOECKENIUS, W.: The surface structure of influenza virus filaments. *Viol.* **13**, 548–550 (1961).
- CHOPPIN, P. W. and TAMM, I.: Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A₂ virus strains. *J. exp. Med.* **112**, 895–920 (1960).
- CRUICKSHANK, J. G.: "The structure of myxoviruses and its biological significance" in *Ciba Foundation Symp. on Cellular Biology of Myxovirus Infections*, ed. WOLSTENHOLME, G. E. W. and KNIGHT, J.: J. A. Churchill Ltd., London 1964, p. 5–21.
- HAYFLICK, L.: Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas Rep. Biol. Med.* **23** Suppl. **1**, 285–303 (1965).
- HERZBERG, K., REUSS, K. und DAHN, R.: Die Bedeutung der Antigen-Wahl (Allantois-Letal-Antigen) und der Prüfungsverfahren (direkter Mäuseschutzversuch) für Untersuchungen über Influenza-Immunität. *Z. Hyg.* **149**, 497–524 (1964).
- HORNE, R. W., WATERSON, A. P., WILDY, P. and FARNHAM, A. E.: The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques. *Viol.* **11**, 79–98 (1960).
- MAGNUS, v. P.: Incomplete forms of influenza virus. *Advances Virus Res.* **2**, 59–79 (1954).
- MOORE, D. H., DAVIES, M. C., LEVINE, S. and ENGLERT, M. E.: Correlation of structure with infectivity of influenza virus. *Viol.* **17**, 470–479 (1962).
- MORGAN, C., HSU, K. C. and ROSE, H. M.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VII. Incomplete influenza virus. *J. exp. Med.* **116**, 553–564 (1962).
- SHARP, D. G., ECKERT, E. A., BEARD, D. and BEARD, J. W.: Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leucosis and a comparison with the agent of newcastle disease. *J. Bact.* **63**, 151–161 (1952).
- STEFANOV, S. B. and GRAF, I. A.: Electron microscopic signs of budding in particles of the influenza virus. *Zh. Obschei Biol.* **25**, 75–77 (1964). Engl. Übersetzung: *Fed. Proc.* **24** II, T 271 bis T 272 (1965).

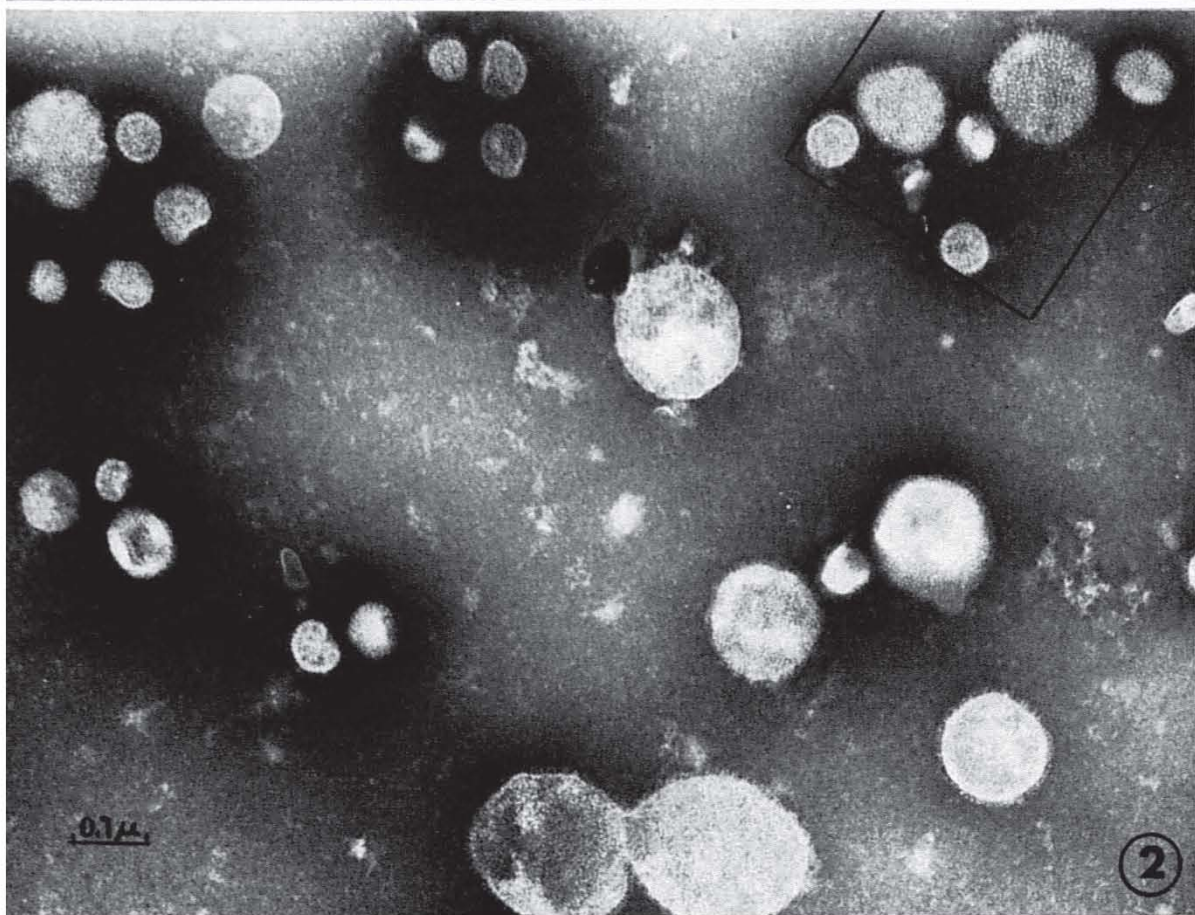
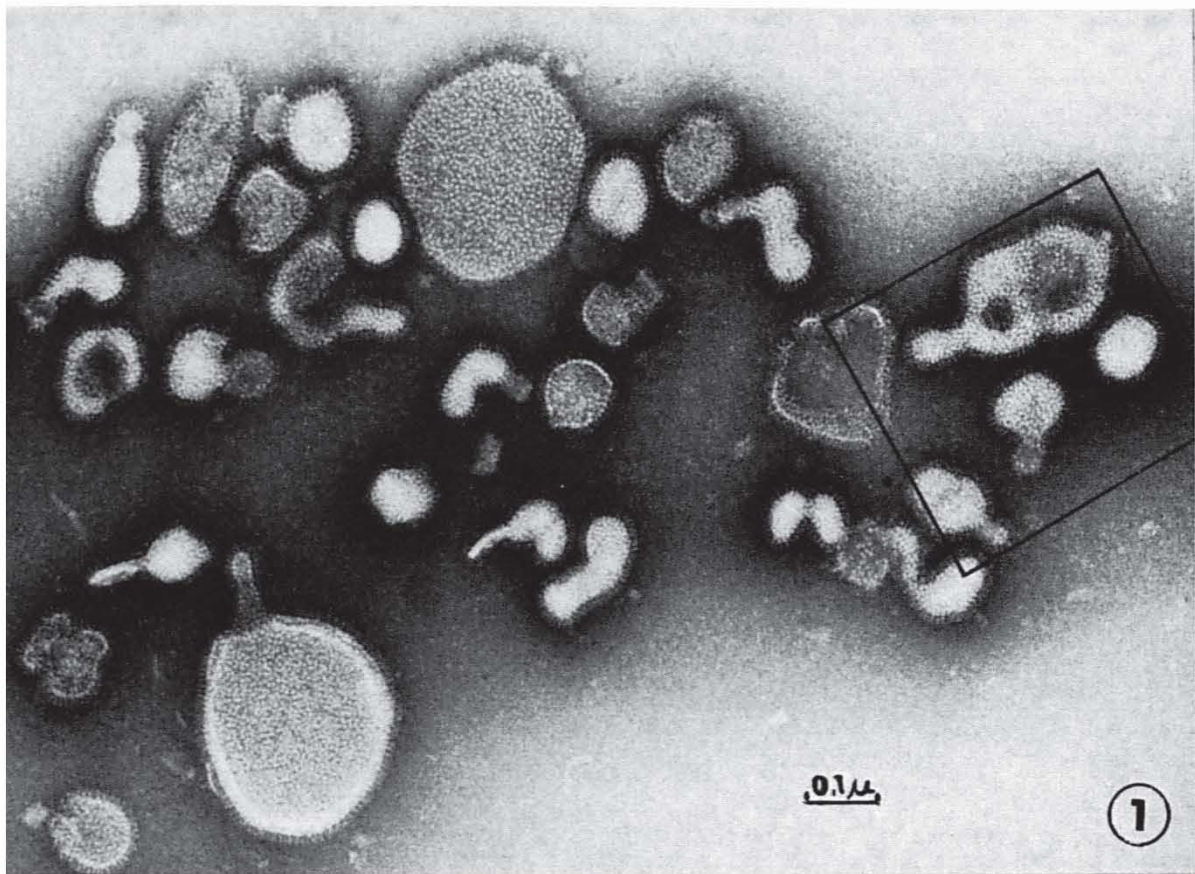
Prof. Dr. K. Herzberg und Dr. K. Reuss, 6 Frankfurt am Main, Paul Ehrlich-Straße 40

Tafel I

A₂Asia-Letalstamm, PWS-kontrastiert, Vergrößerung 70000.

Abb. 1. unfixiert.

Abb. 2. OsO₄-fixiert. Ausschnitte s. Abbildung 3 und 4.

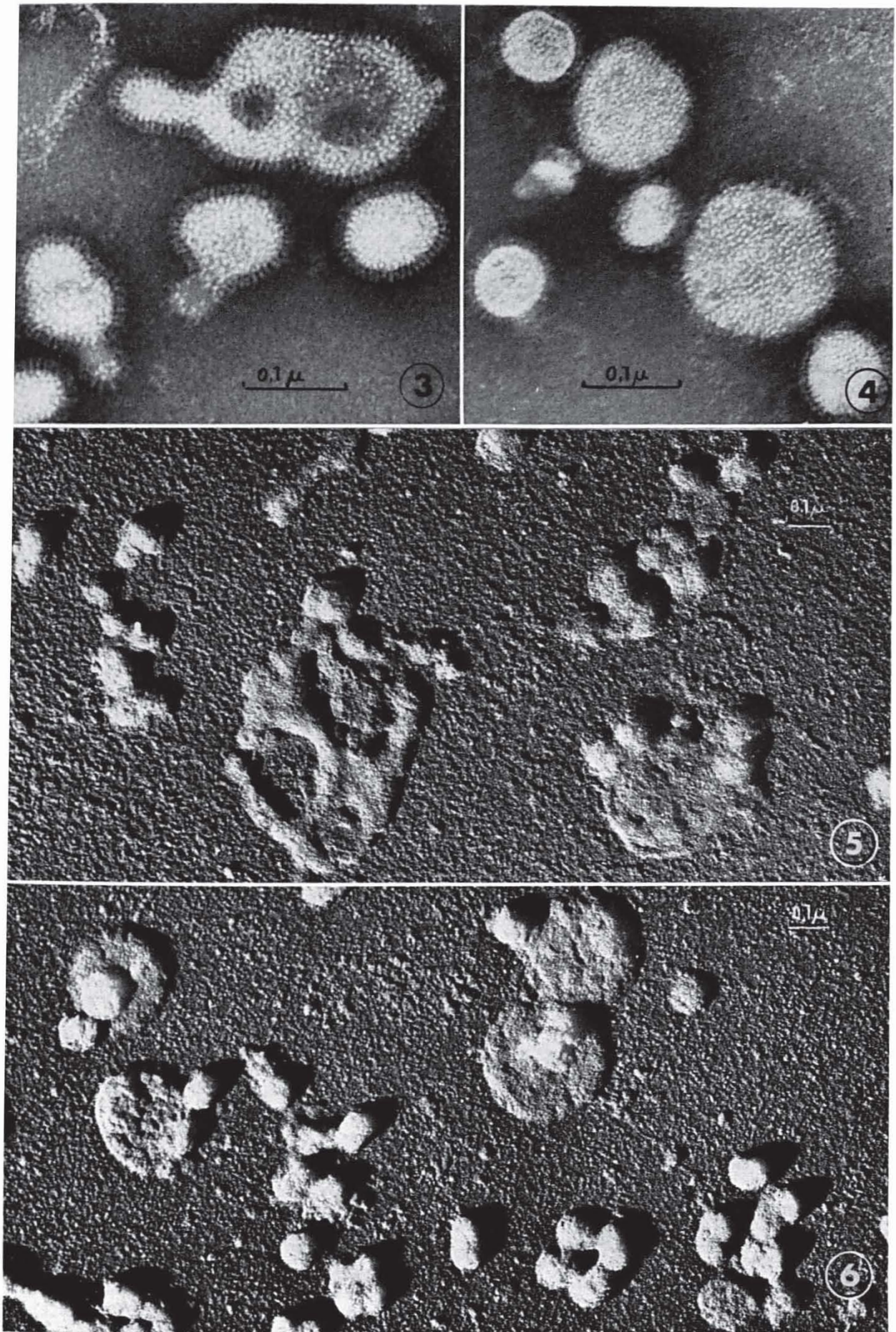


Tafel I

Tafel II

A₂Asia-Letalstamm

- Abb. 3. unfixiert, Ausschnitt aus Abbildung 1, Vergrößerung 140 000.
Abb. 4. OsO₄-fixiert, Ausschnitt aus Abbildung 2, Vergrößerung 130 000.
Abb. 5. unfixiert, schräg bedampft, Vergrößerung 55 0000.
Abb. 6. OsO₄-fixiert, schräg bedampft, Vergrößerung 55 000.



Tafel II

Tafel III

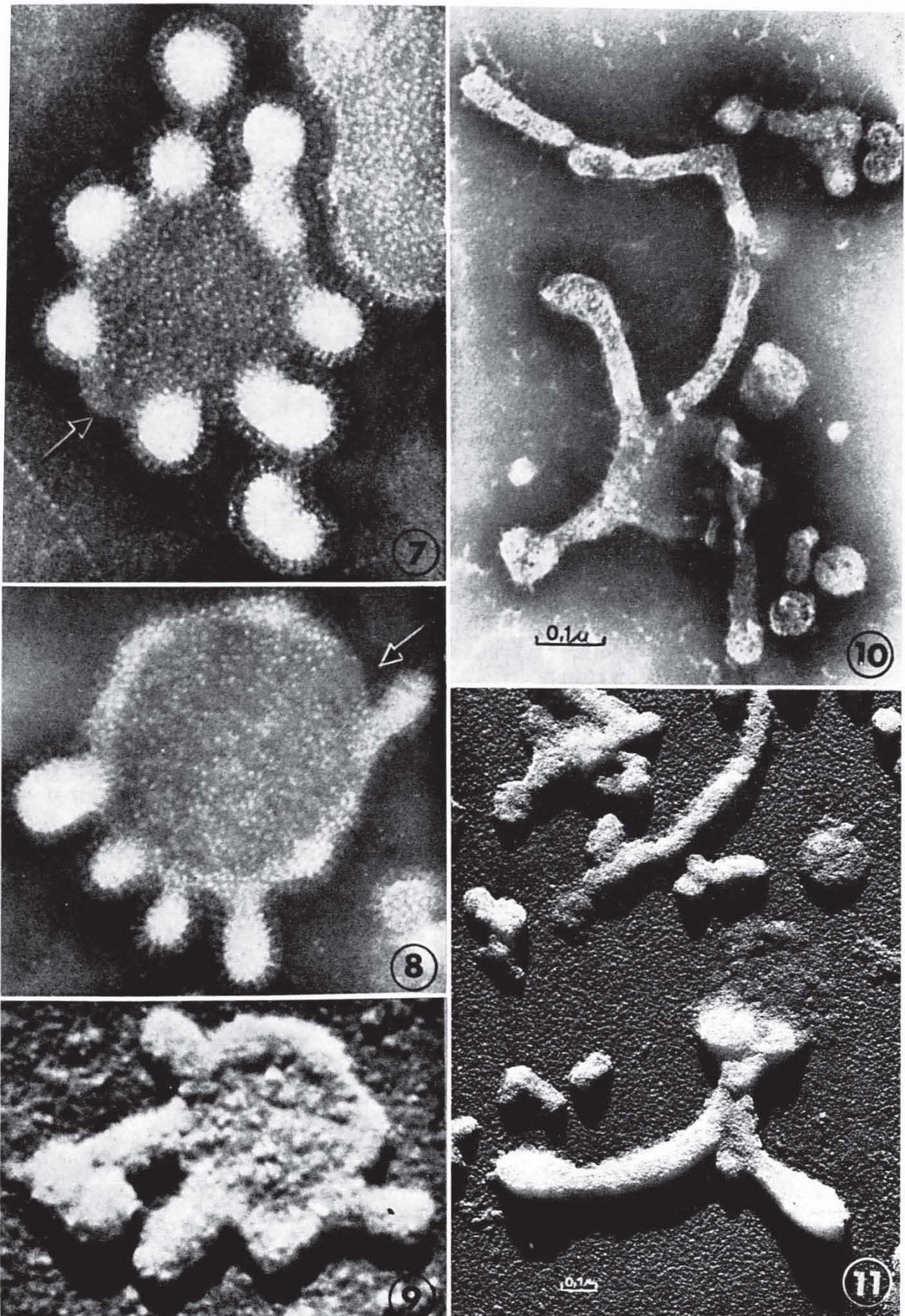
Abb. 7. A₂-Hannover, unfixiert, PWS-kontrastiert, Vergrößerung 180 000 (Pfeil: Membrandefekt).

Abb. 8. A₂Asia-Letalstamm, unfixiert, PWS-kontrastiert, Vergr. 160 000 (Pfeil: Membrandefekt).

Abb. 9. A₂Asia-Letalstamm, unfixiert, schräg bedampft, Vergrößerung 120 000.

Abb. 10. A₂Asia-Letalstamm, in hypertoner Lösung fixiert, PWS-kontrastiert, OsO₄-fixiert, Vergrößerung 85 000.

Abb. 11. wie Abbildung 10, schräg bedampft, Vergrößerung 50 000.



Tafel III