

Aus der Augenabteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Chefarzt: Dr. med. H. SCHMIDT) und dem Robert Koch-Institut Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. Gg. HENNEBERG)

Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkung von Trypsin bei der Keratitis dendritica (Herpes simplex) des menschlichen Auges*

Von

O. LIEGL

mit technischer Assistenz von

INGRID MELZER und JUTTA HAASE

Mit 4 Textabbildungen

Die erfolgreiche klinische Anwendung von hochgereinigtem Trypsin als Augenbad zur Behandlung oberflächlicher herpetischer Erkrankungen der Hornhaut warf eine Reihe von Fragen auf (LIEGL 1958). Es wurde ein proteolytischer Vorgang vermutet, also eine hydrolytische Spaltung des Viruseiweißes durch das Enzym in dem Sinne, daß das Virus der Adsorptionskraft, die Virusnucleinsäure ihres biologischen Schutzes und der Stabilisierung durch die Proteinkomponente beraubt wird. Die Infektiosität, d. h. die Fähigkeit zum Zellbefall würde dadurch nahezu oder völlig verloren gehen. Außerdem wurde angenommen, daß infizierte, in der Virusreproduktion befindliche, vermutlich leichter angreifbare Zellen eventuell bereits vor der Freigabe einer neuen Virusgeneration durch das Enzym zerstört werden und somit eine selektive Ausmerzung virusbefallener Zellen stattfindet. Zu erwägen war auch, ob durch Trypsin Receptorsubstanzen der Zellwand gesunder Epithelien abgebaut werden, wodurch die spezifische Bindung der Viren unmöglich würde.

Trypsin bietet für die Anwendung am Auge gegenüber anderen physikalischen oder chemischen Behandlungsmethoden beim oberflächlichen Herpes einen Vorteil: es schont gesundes Gewebe. Durch experimentelle Untersuchungen „in vitro“ sollten die klinischen Ergebnisse der Trypsinbehandlung erhärtet und aufgeklärt werden.

Die Feststellung, daß bestimmte Viren gegenüber proteolytischen Fermenten empfindlich sind, ist nicht neu. Man fand aber, daß eine Inaktivierung schon allein durch Adsorption des Enzyms an das Virus erfolgen kann ohne fermentative Abbauvorgänge. Die Komplexbildung, z. B. zwischen Tabakmosaikvirus und Trypsin (KLECZKOWSKI), ist

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, sei für die Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

reversibel und läßt sich durch Verdünnen oder andere Methoden wieder trennen. Nach SCHRAMM sind zahlreiche Viren gegen proteolytische Enzyme recht beständig. Diese Resistenz wird sogar zur Reinigung solcher Viren, z. B. zu ihrer Befreiung von Wirtseiweiß, ausgenützt (BAWDEN u. PIRIE, KALMANSON u. BRONFENBRENNER, HAAS u. a.). Mit Hilfe des Elektronenmikroskops erkannte man in jüngster Zeit, daß sich unter anderen bei Kuhpocken- und anderen Blatternviren (DAWSON u. McFARLANE, LÉPINE u. Mitarb., PETERS und NASEMANN u. a.) durch Fermenteinwirkung Verdauungsprozesse abspielen können. MERRILL erwog die Möglichkeit, Viren entsprechend ihrer Resistenz gegenüber Trypsin und anderen Enzymen zu klassifizieren.

Das Herpes simplex-Virus war nur selten Gegenstand solcher Untersuchungen. BUDDINGH u. Mitarb. (1953) gelang es, Herpes simplex-Virus aus den Faeces von Kindern mit primärer herpetischer Stomatitis zu isolieren. Man nahm deshalb an, daß es gegenüber proteolytischen Fermenten resistent sei. Um die gleiche Zeit berichtete AMOS, daß ihm weder mit Trypsin noch mit Pepsin eine Inaktivierung des Herpes simplex-Virus gelungen sei, wohl aber mit Phosphatase-Enzymen. Neuerdings fanden aber WILDY u. Mitarb. (1960) bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß sowohl durch Trypsineinwirkung als auch mit anderen Behandlungsmethoden eine beträchtliche Zunahme der leeren innenkörperfreien Virusmembranen erfolgt, womit eine Abnahme der Infektiosität einhergeht. Zuletzt berichteten GRESSER und ENDERS (1961) über ein Absinken der Infektiosität auf 0,01 % für menschliche Amnionzellen bereits nach 15 min langer Trypsineinwirkung bei drei Herpes simplex-Stämmen. Die Autoren erklären sich die gegensätzlichen Resultate zu AMOS durch die Annahme, daß es Herpes-Virusstämme mit unterschiedlicher Resistenz gegenüber tryptischen Fermenten gibt.

Eigene Untersuchungen

Die Einwirkung von Trypsin auf das Herpes simplex-Virus

Die Bestimmung des Infektiositätstiters von Suspensionen des Herpes simplex-Virus erfolgte durch Feststellung des ID 50-Endpunktes auf der Chorioallantois-membran des Hühnerembryos, berechnet nach der Methode von REED und MUENCH. Die Suspensionen wurden in verschiedenen Phasen des Virusentwicklungscyclus auf der Chorioallantois-membran (CAM) durch Verreibung der frisch geernteten, gewaschenen, im Infektionsbereich ausgeschnittenen Membran in sterilem Seesand und anschließende Verdünnung mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur und p_H 7 auf 1:10 (im Bedarfsfall auf 1:3) gewonnen. Auf eine CAM (etwa 0,3 g) kamen also in der Regel 2,7 ml physiologische Kochsalzlösung. Nach dem Absetzen wurde der Überstand zur Verimpfung bzw. zur Herstellung von geometrischen Verdünnungsreihen (mit physiologischer NaCl-Lösung) zwecks Verimpfung genommen. Verwendet wurde der im Robert Koch-Institut vor Jahren aus einem Eczema herpeticatum isolierte, an

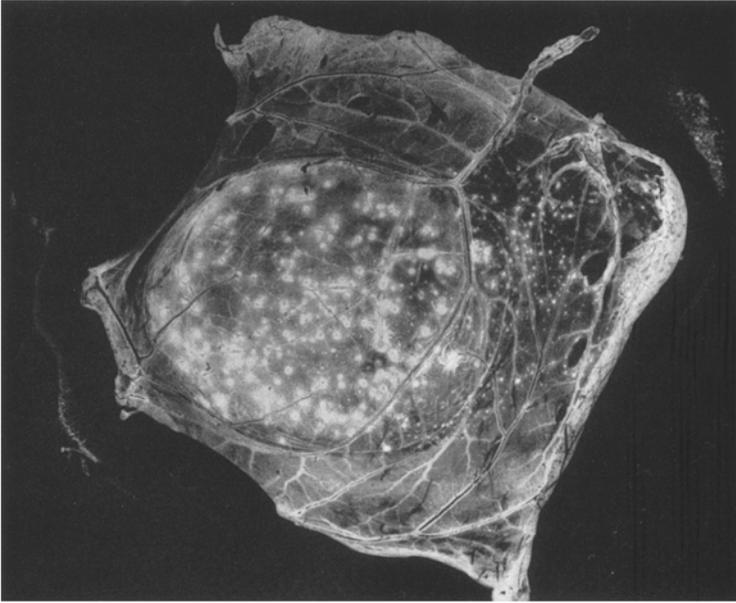


Abb. 1. Herpes simplex-Herdchen (Stamm 53/II 54) auf der Chorioallantoismembran; der rechten Seite unspezifische Reaktionen

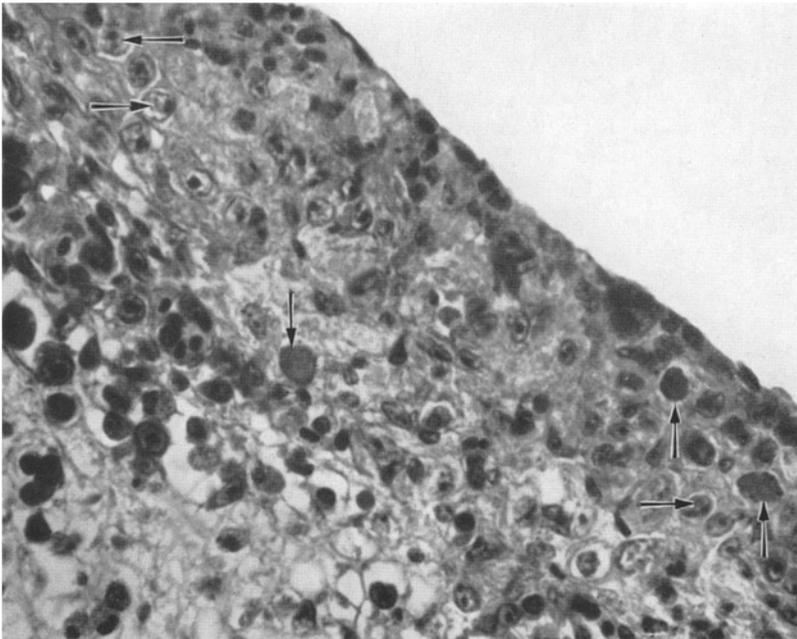


Abb. 2. Ausschnitt aus einem Herpes simplex-Herdchen auf der Chorioallantoismembran nach H E-Färbung bei starker Vergrößerung: Zellkerne mit abgrenzbaren Einschlusskörperchen (↔) sowie Zellkerne, die mit Einschlüssen vollkommen ausgefüllt sind ↑

die CAM des Hühnerembryos adaptierte Virusstamm 53/II 54. Die Ausgangssuspensionen stammten von virusinfizierten, mit Herpesherdchen übersäten, bei -70°C aufbewahrten Vorratsmembranen. Die 11 Tage alten, bebrüteten Eier wurden mit je 0,1 ml des Inoculums beimpft und bei 35°C zum Titrieren und zur Gewinnung von Vorratsmembranen 48 Std lang, sonst je nach Plan von 0 bis zu 72 Std lang, nachbebrütet.

In Vorversuchen wurde gefunden, daß geringe pH-Schwankungen um den Neutralpunkt während der Versuchsprozeduren keine besondere Beeinflussung der Infektiosität mit sich bringen. Es konnte festgestellt werden, daß auch zeh-

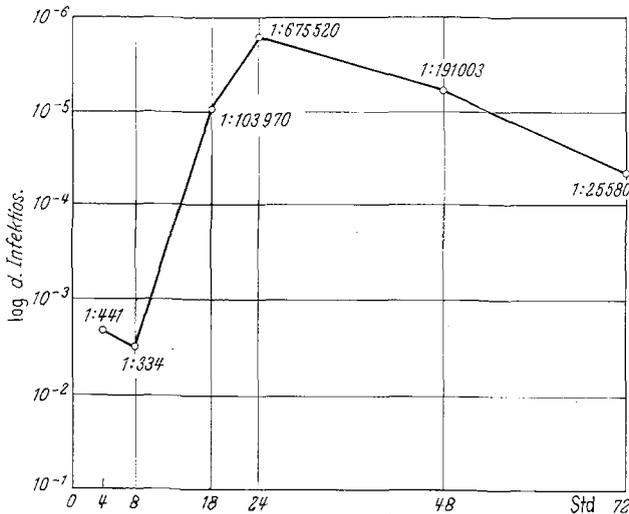


Abb. 3. Wachstumskurve des Herpes simplex-Virus (53/II 54) auf der Chorioallantois-membran

maliges Waschen der frisch geernteten, virusinfizierten Membranen gegenüber einmaligem Waschen praktisch keine wesentlich weitere Reinigung von „freien“ Viruspartikeln ergibt. Quantitativ zeigte sich auch, daß eine Temperatur von 37°C bei einer Versuchsdauer bis zu 60 min keinen Titerabfall durch thermische Inaktivierung bewirkt. Nach KAPLAN tritt der Titersturz bei 37°C durch thermische Inaktivierung beim Herpes simplex-Virus erst nach 6—8 Std ein. Auch Sojabohneninhibitor hat in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Infektiosität.

Von den Ausgangssuspensionen bzw. dem Stammvirus wurde in Stichproben der Infektiositätstiter bestimmt. Das Wachstum des Herpes simplex-Virus auf der CAM wurde durch Bestimmung der Infektiosität der in Gruppen zu verschiedenen Zeiten der Entwicklungsphasen geernteten Membranen verfolgt. Die gewonnene Titerkurve gleicht etwa den Wachstumskurven, die andere Autoren, wie SCOTT u. Mitarb., WILDY u. a. (Übersicht bei STOKER) erhalten haben. Nach einer Latenzperiode (Eklipse) von etwa 8 Std (abhängig unter anderem von der Menge des Einsatzvirus) folgt ein steiler, logarithmischer Anstieg der Infektiosität bis zur 18. Std, der bis zur 24. Std noch zunimmt, um bis zur 72. Std wieder flacher abzufallen (Abb. 3). Daß innerhalb der Latenzperiode überhaupt Infektiositätskontrollen positiv werden, beruht wahrscheinlich auf nicht adsorbiertem bzw. noch nicht in die Zellen eingedrungenem Einsatzvirus.

Das aus entsprechend diesen Entwicklungsphasen geernteten Membranen erhaltene Virusmaterial wurde nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (Faktor 2, Verdünnungsflüssigkeit physiologische NaCl-Lösung) mit $\frac{1}{2}$ %iger Trypsinlösung (Trypure Novo in physiologischer NaCl-Lösung bei pH 7) 1:5 weiter verdünnt und jede Verdünnungsstufe im Wasserbad bei 37° C 60 min lang der Fermentwirkung ausgesetzt. Die Enzymwirkung wurde durch Sojabohneninhibitor (Novo, Kopenhagen) nach KUNTZ gestoppt, indem jede Verdünnungsstufe noch einmal mit $\frac{1}{2}$ %iger Inhibitorlösung 1:2 verdünnt wurde. Die aus den trypsinbehandelten Suspensionen gewonnenen Titerwerte der Infektiosität sind zum Vergleich neben denjenigen der unbehandelten Suspensionen in Tabelle 1 aufgeführt. Es ergibt sich ein hochgradiger Titerabfall der Infektiosität durch die Trypsineinwirkung im Verlauf des ganzen Virusentwicklungszyclus.

Tabelle 1. *Inaktivierung des Herpes simplex-Virus durch Trypsin in verschiedenen Phasen seiner Entwicklung auf der Chorioallantoismembran.* Bestimmung der ID 50; die Werte sind in der Regel das arithmetische Mittel mehrerer Titrationsen

Titer des Ausgangsmaterials 1:44790			
Zeit nach Beimpfung der CAM	Titer ohne Trypsinbehandlung	Titer nach Trypsinbehandlung	Inaktivierung durch Trypsin
nach 4 Std	1: 441	0	Eklipse
nach 8 Std	1: 334	0	Eklipse
nach 18 Std	1:103970	1:16900	83,7%
nach 24 Std	1:675520	1: 4614	99,4%
nach 48 Std	1:191003	1: 8372	95,6%
nach 72 Std	1: 25580	1: 1103	95,7%

Qualitative Untersuchungen durch Schätzen der Herpesherdchen (+, ++, +++) auf der beimpften CAM ließen erkennen, daß die Zeitspanne der Trypsineinwirkung auf das Inoculum nicht unwichtig ist. So ergaben, insbesondere bei schwächeren Viruskonzentrationen des Materials, nach 30 und 60 min langer Trypsineinwirkung die Infektiositätsbestimmungen weniger Herpesherdchen als nach nur 10 bzw. 20 min langer Fermentwirkung.

Eine Trypsinbehandlung von in der Latenzperiode gewonnenen Suspensionen auch nur von 10 min Dauer hat die Infektiosität von Resten des Einsaatvirus ausgelöscht. Mit dem beginnenden Anstieg der Infektiosität nach der Eklipse durch die neue Virusgeneration, z. B. 9 Std nach der Infektion, reicht eine nur 10 min dauernde Trypsineinwirkung zur völligen Inaktivierung der Viruspopulation bereits nicht mehr aus.

Die Einwirkung von Trypsin auf die infizierte Zelle

Zur Klärung der Frage, ob durch Trypsin auch eine selektive Ausmerzungen virusinfizierter Zellen erfolgt, eventuell bereits vor der Freigabe einer neuen Virusgeneration, wurden die Entwicklungsphasen des Herpes simplex-Virus an permanenten menschlichen Amnionzellen (FI-Zellen) beobachtet. Zu verschiedenen Zeiten der Virusentwicklung wurden aus den infizierten Zellkulturen mittels Versene Zellsuspensionen gewonnen, von denen im einen Fall ohne, im anderen Fall nach Trypsinbehandlung durch Eosinfärbung und nachfolgende Auszählung in der Zählkammer die Relation von toten und lebenden Zellen ermittelt wurde.

Diese Versuche wurden mit dem aus den USA stammenden, in Zellkulturen gut züchtbaren Herpes simplex-Virus H4 ausgeführt. Der aus einer Affennierenzellkultur übernommene Virusstamm wurde in sechs Passagen auf menschliche Fl-Zellen adaptiert. Das Material von Kulturflaschen der fünften und sechsten Passage wurde dann zur Herstellung des Virusantigens verwandt. Drei Tage alte Fl-Einschichtkulturen in Vierkantflaschen mit dicht zugewachsenem Zellrasen wurden nach Entfernung des Anzüchtungsmediums für $1\frac{1}{2}$ Std bei 35° C mit 5 ml des Infektionsmaterials beschickt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Kulturen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen mit 10 ml Parker-Medium versetzt und bei 35° C gehalten. Bis zur 24. Std nach der Infektion wurde stündlich einem Teil der Kulturen jeweils 1 ml frisches Parker-Medium hinzugefügt, mit dem alten Medium vermischt, danach 1 ml dem Kulturmedium entnommen, einer zweiten in der gleichen Entwicklungsstufe sich befindenden Kultur hinzugegeben und von dieser wieder 1 ml des Kulturmediums entnommen, der dann bei -20° C in Ampullen eingefroren wurde. Auf diese Weise sollte gleichzeitig der Antigenverlust durch die stündlichen Entnahmen etwas ausgeglichen werden.

Die infizierten Kulturen wurden jede Stunde im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollkulturen auf mikroskopische Zellveränderungen hin beobachtet. Der cytopathogene Effekt (CPE) macht sich durch Abrundung, optisches Dichterwerden, Zusammenklumpen zu Nestern und schließliches Abheben der Zellen von der Unterlage bemerkbar. Der CPE kann gelegentlich als spontane Ablösung der gesamten Kultur von der Unterlage, gleich einer Membran, auftreten. Ein beginnender CPE durch Verstärkung der Zellgranulation und beginnende Abrundung der Zellen in Nestern konnte zum Teil bereits von der 9. Std an nach der Infektion beobachtet werden (abhängig von der Infektiosität des Antigens und der Beschaffenheit der Kultur). In der 14. Std post infectionem war der CPE in allen Kulturen deutlich erkennbar. Er verstärkte sich weiter, so daß in der 26. Std nach der Infektion alle Kulturen stark aufgelockert waren und fast nur noch Rundzellen zeigten, die zum Teil in kleinen Verbänden abschwammen.

Histologische Untersuchungen wurden an herpesinfizierten Deckglaskulturen vorgenommen, die nach Lufttrocknung und Methanolfixierung mit Giemsa-Lösung gefärbt waren. Um die 9. Std nach der Infektion schienen gegenüber den negativen Kontrollkulturen Zellen mit einem rosa Hof um das Kernkörperchen vermehrt zu sein. 12 Std post infectionem waren in den Zellkernen, meist um den Nucleolus, Einschlußkörperchen gut erkennbar. Die Zahl der Zellen mit Einschlußkörperchen sowie die Menge der Einschlußkörperchen in den einzelnen Zellen nahm im weiteren Verlauf der Virusentwicklung noch zu und erreichte um die 20. Std post infectionem ihren Höhepunkt. Später wurde die Beurteilung immer schwieriger, weil immer mehr Zellen infolge des CPE vor der Fixierung bereits abgeschwommen waren.

Die, wie oben beschrieben, zu verschiedenen Zeiten der Virusentwicklung abgenommenen, bei -20° C eingefroren gewesenen Medium-

proben wurden nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:50, 1:100 usw.) mit Parker-Medium in 2 Tage alten bei 37° C angezüchteten Schrägröhrchenkulturen von Fl-Zellen austitriert. Das Anzüchtungsmedium der Schrägröhrchenkulturen wurde verworfen, und jeweils zwei Röhrchen wurden mit 1 ml einer Verdünnungsstufe beschickt. Die Feststellung der Grenzverdünnung, die noch einen CPE ergab, erfolgte in der 17. bzw. 24. und 40. Std der Nachbebrütung bei 35° C. Ein rascher und steiler Titeranstieg im Medium trat um die 18. Std nach der Infektion ein.



Abb. 4. Einschlusskörperchen in den Zellkernen von Fl-Zellen, 20 Std nach der Infektion mit Herpes simplex-Virus (H4); Deckglaskultur, HE-Färbung

Die zur Eosinfärbung hergestellten Zellsuspensionen wurden in verschiedenen Zeiten der Virusentwicklung durch Ablösung infizierter Schrägröhrchenkulturen von Fl-Zellen und nicht infizierter Kontrollkulturen mit Versene gewonnen. Nach einer Versene-Einwirkung von 10—15 min Dauer bei 37° C ließen sich die Kulturen vom Glasboden mit der Pipette abspülen und wurden dann für 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment von infizierten, wie von nicht infizierten Kulturen in 1 ml 0,5% iger Trypsinlösung bzw. in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Alle Suspensionen wurden dann 1 Std unter der Einwirkung von Trypsin bzw. physiologischer NaCl-Lösung bei 37° C gehalten. Die trypsinierten Suspensionen wurden danach zur Inaktivierung des Ferments 1:2 mit 0,5% igem Sojabohneninhibitor versetzt. Nach dem Abzentrifugieren, 10 min lang bei 1000 U/min, wurden die Zellsedimente

in je 1 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und wieder suspendiert. Jeweils 0,5 ml der vier verschiedenen Gruppen von Zellsuspensionen wurden durch Zugabe eines Tropfens einer 10%igen Eosinlösung gefärbt und in der Zählkammer (BÜRCKER/TÜRK) ausgezählt. Abgestorbene und verletzte Zellen färben sich sogleich rot an, während lebende Zellen ungefärbt bleiben bzw. ein zart grügelbes Aussehen haben. Nach der Färbung muß die Auszählung umgehend erfolgen, weil unter anderem infolge Austrocknung der Suspension in der Zählkammer sich nach 12—15 min weitere vorher farblos gewesene Zellen anfärben. Die zum Teil größeren Differenzen der Auszählungswerte in der Tabelle 2 zwischen den einzelnen Erntezeiten, die aber entsprechende Zellsuspensionen ziemlich gleichmäßig betreffen, beruhen auf solchen methodischen Momenten. Ausgezählt wurden jeweils 50 Zellen und das Verhältnis von den gefärbten zu den ungefärbten Zellen auf 100 umgerechnet. Tabelle 2 zeigt, daß Trypsin offenbar keinen stärkeren Einfluß auf den Untergang virusinfizierter Zellen im Verhältnis zu nichtinfizierten Vergleichszellen hat.

Tabelle 2. Tote, mit Eosin angefärbte Zellen in Prozentzahlen in Zellsuspensionen herpesinfizierter und nichtinfizierter Fl-Zellkulturen nach Behandlung mit Trypsin- bzw. NaCl-Lösung

Stunden post infectionem	Tote Zellen in Prozent			
	herpesinfizierte Zellsuspensionen		nichtinfizierte Zellsuspensionen	
	nach 60 min Trypsinbehandlung	nach 60 min NaCl- Behandlung	nach 60 min Trypsinbehandlung	nach 60 min NaCl- Behandlung
4	22	26	18	28
9	64	26	40	30
12	9	18	15	23
16	68	30	88	56
20	22	20		16
24	36	41	44	40

Zum gleichen Schluß gelangt man auch bei folgender Versuchsanordnung: Eine Reihe von Fl-Zellkulturen in Vierkantflaschen, von denen die Hälfte mit Herpes simplex-Virus (H4) infiziert war und sich kurz nach der zweistündigen Adsorptionszeit noch sicher in der Eklipse befand, wurde nach Entfernung des Überstandes 1 Std lang mit 0,5%iger Trypsinlösung bei 37° C behandelt. Die aus den Zellrasen hervorgegangenen Zellsuspensionen wurden nach dem Inaktivieren des Trypsins durch eine äquivalente Menge Sojabohneninhibitor zentrifugiert (10 min lang bei 1000 U/min) und jedes Zellsediment in Hanks-Lösung je 20% Kälberserum aufgenommen, in Vierkantflaschen eingesät und bei 37° C nachbebrütet. Die nichtinfizierten Zellsuspensionen hatten

nach 2 Tagen bereits wieder einen normalen, dichten Zellrasen entwickelt. Von den infizierten Zellsuspensionen befand sich 16 Std nach der Einsaat zwar der größte Teil der Zellen an der Glaswand, die meisten Zellen waren aber abgerundet als Ausdruck des cytopathogenen Effektes, der durch die trotz Trypsineinwirkung erfolgte intracelluläre Virusentwicklung bedingt war. Die infizierten Kulturen zeigten keine normale Zellvermehrung. Am 2. Tag nach der Einsaat war das Bild ähnlich, nur war etwa die Hälfte der Zellen in das Medium übergegangen.

Ließ man Trypsin 24 Std lang einwirken, so ergaben infizierte wie nichtinfizierte Zellkulturen einander ähnlich aussehende Zellsuspensionen. Bei einer Kontrolle nach 72 Std langer Fermenteinwirkung bestanden infizierte und nichtinfizierte Suspensionen nur noch aus Zelltrümmern.

Die Einwirkung von Trypsin auf Receptorsubstanzen der Zellwand

Zur Feststellung, ob durch Trypsin die Zellwand so verändert wird, daß eine spezifische Bindung des Virus erschwert bzw. unmöglich ist, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zwei FI-Zellkulturen in Vierkantflaschen wurden mit Versene abgelöst und jede für sich 10 min lang bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellsediment der einen Flasche wurde in 5 ml 0,5%iger Trypsinlösung suspendiert und 1 Std lang bei 37° C gehalten. Das Zellsediment der anderen Flasche wurde in 5 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und ebenfalls 1 Std lang bei 37° C gehalten. Durch Zugabe von 5 ml 0,5%iger Sojabohneninhibitorlösung wurde anschließend die Trypsinwirkung abgebrochen. Auch die trypsinfreie Zellsuspension erhielt die gleiche Menge Sojabohneninhibitor zugesetzt. Nach 10 min langem Zentrifugieren bei 1000 U/min erfolgte die Aufnahme der Zellsedimente in je 5 ml Infektionsmaterial (Herpes simplex-Virus H4). Nach einer Adsorptionszeit von 1½ Std bei 35° C wurde wieder 10 min lang bei 1000 U/min zentrifugiert, mit 5 ml Parker-Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und das Sediment in je 10 ml Parker-Medium aufgenommen. Jede Suspension wurde dann in eine sterile, zur Vermeidung des Festsetzens der Zellen an der Glaswand ausparaffinierte Vierkantflasche gegeben und, um das in die Zellen penetrierte Virus zur Entwicklung zu bringen, für 24 Std bei 35° C gehalten. Danach wurden die beiden Suspensionen bei -20° C eingefroren.

Die Titration erfolgte auf 2 Tage alten Schrägröhrchenkulturen von FI-Zellen, die mit Hanks-Lösung/20% Kälberserum angezüchtet waren. Von den beiden auf ihre Infektiosität zu prüfenden, vor ihrer Virusinfektion das eine Mal mit Trypsin, das andere Mal nur mit physiologischer NaCl-Lösung vorbehandelten Suspensionen wurde je eine Verdünnungsreihe mit Parker-Medium hergestellt (1:10, 1:50, 1:100, 1:500 usw.). Von jeder Verdünnung wurden vier Röhrchen beschickt.

Die Ablesung erfolgte nach 17, 23 und 45 Std Nachbebrütung bei 35° C. Bei einer Vorbehandlung der Zellen mit Trypsin ließ sich die ID 50 nicht mehr berechnen, sie war praktisch gleich 0; selbst bei der schwachen Verdünnung 1:10 zeigte 45 Std post infectionem nur eine Röhrenkultur einen CPE. Fand keine Trypsinvorbehandlung statt, so lag die ID 50 bei einer Ablesung nach 23 Std um die Verdünnungsstufe 1:59, nach 45 Std um 1:560. Der Versuch wurde noch viermal wiederholt, wobei die Menge des Sojabohneninhibitors noch erhöht wurde (auf 7,5 ml), um sicher kein Trypsin im Überschuß zu haben. Bei stärkerem Einsaatmaterial lagen die resultierenden Titerwerte entsprechend höher bei Trypsinvorbehandlung der Zellen jedoch mindestens um das 10 bis 20fache (und mehr) niedriger als ohne Trypsinvorbehandlung.

Um festzustellen, daß die im Gegensatz zur Kontrolle reduzierte Virusausbeute nach Vorbehandlung der zu infizierenden Zellen mit Trypsin nicht am Ende ausschließlich auf einer Verlangsamung der Virusreproduktion auf Grund einer eventuell allgemeinen Zellschädigung durch die Trypsineinwirkung beruht (ein Moment, das KAPLAN zur Diskussion gestellt hat), wurde auch der Infektiositätstiter des Residualvirus nach der 1½stündigen Adsorptionszeit im Überstand der anschließend zentrifugierten Zellsuspension bestimmt. Bei gleichem Einsaatmaterial lag nach Bindung durch trypsinvorbehandelte Zellen die ID 50 des Residualvirus um die Verdünnungsstufe 1:11181 (Ablesung von Schrägröhrenkulturen 45 Std post infectionem), nach Bindung durch die Kontrollen um die Verdünnungsstufe 1:1447. Dieses Ergebnis erlaubt den Schluß, daß die spezifische Bindungsfähigkeit der Zellen kurz nach ihrer Trypsinvorbehandlung für das Herpes simplex-Virus deutlich herabgesetzt ist.

Diskussion

Trypsin inaktiviert in 0,5%iger Lösung bei Körpertemperatur das Herpes simplex-Virus in hohem Grade, so bald es im Verlauf seiner Entwicklungsphasen der Enzymwirkung ausgesetzt wird. Bei diesem Vorgang handelt es sich um eine Proteolyse, denn er kann durch Sojabohneninhibitor abgebrochen werden. Nach KUNITZ und GREEN blockiert der Sojabohneninhibitor nur die proteolytische Fähigkeit des Trypsins. Wie CHENG an anderen Viren, so konnten wir am Herpes simplex-Virus beobachten, daß ein Gemisch von Trypsin und Sojabohneninhibitor zu gleichen Teilen (das letztere aus Sicherheitsgründen etwas im Überschuß) keinen Einfluß mehr auf die Infektiosität hat. Unter dem Einfluß von Trypsin fiel nach einstündiger Einwirkungszeit bei 37° C der ID 50 Endpunkt einer Virussuspension (Stamm 53/II 54) auf der Chorioallantoismembran von 1:9382700 auf 1:17275. Unter

dem Einfluß des Trypsin-Sojabohneninhibitor-Gemisches blieb bei den gleichen Bedingungen der ID 50-Endpunkt praktisch unverändert hoch (1:8585600). Für einen proteolytischen Vorgang bei der Inaktivierung des Herpes simplex-Virus sprechen auch die elektronenmikroskopischen Beobachtungen von WILDY u. Mitarb.

Auf die in der Virusreproduktion befindliche Zelle scheint Trypsin keine andere Wirkung als auf eine nichtinfizierte Zelle zu haben. Eine selektive Ausmerzung virusinfizierter, insbesondere latent infizierter, vitaler Zellen findet demnach nicht statt.

Die Zellwand wird durch Trypsin in reversibler Weise offenbar durch den Abbau von Receptorsubstanzen so verändert, daß unmittelbar nach dem Aufhören der Enzymwirkung die Fähigkeit zur Bindung von Herpes simplex-Virus deutlich herabgesetzt ist.

Diese experimentellen Ergebnisse stützen die klinischen Erfahrungen bei der Anwendung des Trypsins zur Behandlung oberflächlicher herpetischer Erkrankungen des Auges. Bei weitgehender Schonung des gesunden Gewebes fällt das Herpes simplex-Virus in hohem Maße der proteolytischen Inaktivierung, d. h. der Reduktion seiner Adsorptionskraft anheim. Da sie nicht 100%ig ist, muß die lokale Trypsinanwendung bei der Behandlung des Auges mehrmals erfolgen. Die Herabsetzung der Bindungsfähigkeit der Zellen für das Virus und damit die Verminderung ihrer Infizierbarkeit und die Auflösung und Abräumung von Zelldetritus, entstanden im Gefolge des durch die Virusinfektion hervorgerufenen cytopathogenen Effektes, sind weitere therapeutische Wirkungsmomente des Enzyms. Weil keine selektive Ausmerzung vitaler, aber latent infizierter Zellen stattfindet, können auch nach einer Trypsinbehandlung gelegentlich im klinischen Verlauf Rezidive herpetischer Effloreszenzen auftreten.

Zusammenfassung

Anhand experimenteller Studien „in vitro“ wurde die therapeutische Wirkung des Trypsins bei der Keratitis dendritica des menschlichen Auges (Herpes simplex der Hornhaut) aufzuklären versucht. Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym das Herpes simplex-Virus in seinen verschiedenen Entwicklungsphasen, beobachtet an der Chorioallantois-membran des Hühnerembryos, durch Proteolyse in hohem Maße inaktiviert.

Auf die sich in der Virusreproduktion befindende, vitale Zelle, studiert an permanenten, menschlichen Amnion-(F1-)Zellen, scheint Trypsin keine spezielle Wirkung auszuüben. Eine selektive Ausmerzung solcher virusinfizierter Zellen scheint durch Trypsin nicht stattzufinden.

Trypsin baut Receptorsubstanzen in der Wand normaler Zellen ab, wodurch ihre Fähigkeit zur Bindung des Herpes simplex-Virus wenigstens zeitlich begrenzt herabgesetzt wird.

Detritus von Zellen, die durch den cytopathogenen Effekt zugrundegegangen sind, wird durch Trypsin, angewandt als Augenbad, aufgelöst wenigstens zeitlich und abgeräumt.

Literatur

- AMOS, H.: The inactivation of herpes simplex virus by phosphatase enzymes. *J. exp. Med.* **98**, 365 (1953).
- BAWDEN, F. C., and N. W. PIRIE: The isolation and some properties of liquid crystalline substances from solanaceous plants infected with three strains of tobacco mosaic virus. *Proc. roy. Soc. B* **123**, 274 (1937).
- BUDDINGH, G. J., D. I. SCHRUM, J. C. LANIER and D. J. GUIDRY: Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics* **11**, 595 (1953).
- CHENG, P.: The Inactivation of group B arthropod-borne animal viruses by proteases. *Virology* **6**, 129 (1958).
- DAWSON, I. M., and A. S. MCFARLANE: Structure of an animal virus. *Nature (Lond.)* **161**, 464 (1948).
- GREEN, N. M.: Competition among trypsin inhibitors. *J. biol. Chem.* **205**, 535 (1953).
- GRESSER, I., and J. F. ENDERS: The effect of trypsin on representative myxoviruses. *Virology* **13**, 420 (1961).
- HAAS, R.: Zur Wirkung eiweißspaltender Fermente auf Rickettsien und Viren der Psittacosis—Lymphogranuloma inguinale—Gruppe. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* **135**, 566 (1952).
- KALMANSON, G. M., and J. BRONFENBRENNER: Restoration of activity of neutralized biologic agents by removal of the antibody with papain. *J. Immunol.* **47**, 387 (1943).
- KAPLAN, A. S.: A study of the herpes simplex virus — rabbit kidney cell system by the plaque technique. *Virology* **4**, 435 (1957).
- KLECZKOWSKI, A.: Combination of potato virus X and tobacco mosaic virus with pepsin and trypsin. *Biochem J.* **38**, 160 (1944).
- KUNITZ, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. gen. Physiol.* **30**, 291 (1947).
- LÉPINE, P., P. ATANASIU et O. CROISSANT: Sur la structure du virus de la variole aviare. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **228**, 1068 (1949).
- LIEGL, O.: Trypsinbehandlung in der Ophthalmologie. *Klin. Mbl. Augenheilk.* **132**, 486 (1958).
- MERRILL, M. H.: Effect of purified enzymes on viruses and gram negative bacteria. *J. exp. Med.* **64**, 19 (1936).
- PETERS, D., u. TH. NASEMANN: Enzymatisch-morphologische Untersuchungen am Vaccinevirus. *Naturwissenschaften* **39**, 306 (1952).
- REED, L. J., and H. MUENCH: A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Amer. J. Hyg.* **27**, 493 (1938).
- RIES, E., u. M. GERSCH: Die Zelldifferenzierung und Zellspezialisierung während der Embryonalentwicklung von *Aplysia limacina* L. Zugleich ein Beitrag zu Problemen der vitalen Färbung. *Estratto dalle Pubbl. Staz. zool. Napoli* **15**, Fasc. 2 (1936).

- SCHRAMM, G.: Biochemie der Viren. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- SCOTT, T. F. McN., L. L. CORIELL, H. BLANK and ALAN GRAY: The growth curve of the virus of herpes simplex on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen's egg. *J. Immunol.* **71**, 134 (1953).
- STOKER, M. G. P.: Growth studies with herpes virus. In: Virus growth and variation; ninth symposium of the society for general microbiology held at the senate house, University of London, April 1959. Cambridge: Cambridge University Press 1959.
- WILDY, P.: The growth of herpes simplex virus. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **32**, 605 (1954).
- W. C. RUSSELL and R. W. HOME: The morphology of herpes virus. *Virology* **12**, 204 (1960).

Dr. med. OTMAR LIEGL,
Oberarzt der Augenabteilung des Städtischen Krankenhauses Neukölln,
Berlin-Buckow 2, Rudower Str. 56