

Institut für Hirnforschung der Universität Zürich

## Virus-ähnliche Partikel im Zytoplasma von Nerven- und Gliazellen der Waldameise

Elektronenmikroskopische Untersuchungen<sup>1</sup>

Von

U. Steiger, H. E. Lamparter, C. Sandri und K. Akert

Mit 6 Abbildungen

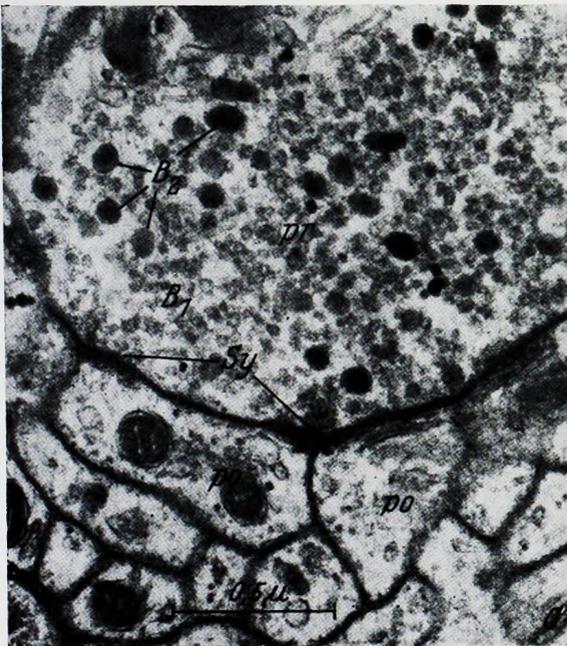
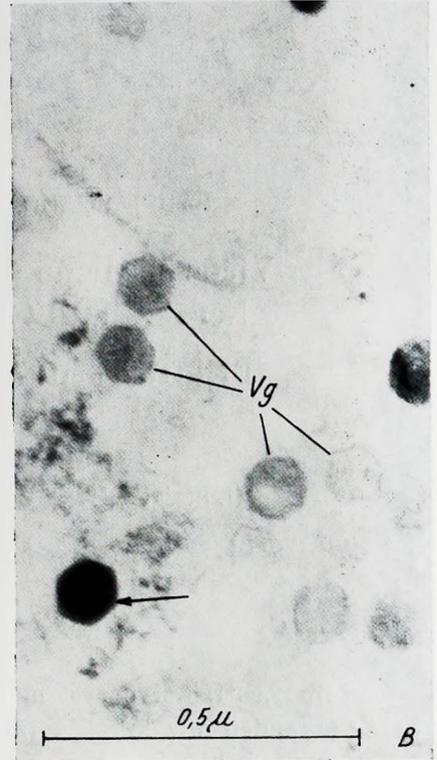
(Eingegangen am 6. August 1968)

Im Zentralnervensystem der Waldameisenspecies *Formica lugubris* Zett. fanden wir kürzlich im Zytoplasma der verschiedenen Zelltypen zwei unterschiedliche virusähnliche Partikel. Das kleinere Partikel wurde bisher nur in einem Fall festgestellt, während das größere bei mehreren Ameisenindividuen auftrat. Da nur gesund aussehende und sich normal verhaltende Ameisen für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen präpariert wurden und es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um Zufallsbefunde handelt, können wir vorläufig über die Bedeutung und mögliche Pathogenität der virusähnlichen Partikel für den Wirtsorganismus keine Aussagen machen.

### Material und Methoden

Es wurden Oberschlund- und Prothorakalganglien von Arbeiterinnen der Waldameisenspecies *Formica lugubris* Zett. im Elektronenmikroskop untersucht. Zur Verwendung gelangten Ameisen, die zum Teil direkt von natürlichen Standorten in Parpan und Walenstadtberg stammten, zum Teil aus Beständen, die im Laboratorium monatelang mit ihrem natürlichen Nestmaterial in Plastikkkästen gehalten wurden. Die zur Präparation benötigten Tiere wurden ohne spezielle Auslesekriterien aus den Nestern entnommen und zeigten keine groben Störungen im Verhalten. Die Entnahme der Oberschlund- und Prothorakalganglien erfolgte unter CO<sub>2</sub>-Narkose.

<sup>1</sup> Mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds für wissenschaftliche Forschung Nr. 3807 sowie der Hartmann-Müller-Stiftung für medizinische Forschung in Zürich.



Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden folgende Verfahren angewandt:

a) Kombinierte Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>-Fixation nach *Sabatini, Bensch* und *Barnett* (8) nach der bei uns gebräuchlichen Modifikation (11).

b) Gleich wie a), aber an Stelle von Glutaraldehyd Acrolein 10%. Dieses Verfahren hat sich zur Darstellung von Viruspartikeln besonders gut bewährt (6).

c) Fixation mit Glutaraldehyd oder Acrolein und darauffolgende Imprägnation mit 1% Phosphorwolframsäure (PTA) nach *Aghajanian* und *Bloom* (1).

Die nach den Fixationsverfahren a) und b) gewonnenen Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleihydroxyd kontrastiert. Die nach dem Verfahren c) erhaltenen Dünnschnitte wurden ohne Nachkontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht. Die photographischen Aufnahmen wurden mit einem Siemens Elmiskop I gemacht. Primärvergrößerungen 2500 × bis 67.000 ×.

## Resultate

### *Das größere Partikel*

Im Zentralnervensystem der Ameise wurden seit Einführung der Acrolein-Vorfixation in den fünf bisher untersuchten Fällen frei im Zytoplasma liegende Partikel mit mehr oder weniger ausgeprägten sechseckigen Konturen gefunden. Ihr Gesamtdurchmesser beträgt 120 bis 150 m $\mu$ . In Abb. 1 A erkennt man deutlich drei dieser Partikel. Bei den speziell daraufhin untersuchten Ameisenindividuen wurden derartige Partikel im Protoplasma aller innerhalb des Zentralnervensystems vorkommenden Zelltypen gefunden (Glia-, Perilemm- und Nervenzellen). Sie sind in wechselnder Anzahl vorhanden; im Durchschnitt etwa 1 Partikel pro 10  $\mu^2$ . Im elektronenmikroskopischen Schnittbild ist die sechseckige Kontur der Partikel sowohl nach Acrolein-Osmium-Fixation (Abb. 1 A) als auch nach PTA-Blockimprägnation (Abb. 1 B) deutlich erkennbar. Nach Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>-Fixation erscheinen diese Partikel eher rund-

Abb. 1. Einzelne virusähnliche Partikel des größeren Typs (Vg) in verschiedenen Zellen des ZNS.

A: Drei Partikel im Zytoplasma von Gliafortsätzen, welche Mikrotubuli (Mt) enthalten. Besonders die beiden benachbarten Partikel weisen andeutungsweise hexagonale Form auf. Das Zytoplasma enthält normale Ribosomenzahl (r) und unauffällige Mitochondrien (M). Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>; Primärvergrößerung: 22.000 ×.

B: Dieselben virusähnlichen Partikel (Vg) nach Glutaraldehyd-Fixation und Blockbehandlung mit PTA. Bei einigen ist die Sechseckform deutlich erkennbar. Beim dunklen, mit Pfeil bezeichneten Partikel ist die äußere Hülle erkennbar. Primärvergrößerung: 67.000 ×.

C: Synaptisches Gebiet (Sy) aus dem Neuropil des Oberschlundganglion. Das präsynaptische Areal (pr) zeigt zahlreiche helle synaptische Bläschen (B<sub>1</sub>) und mehrere größere synaptische Bläschen (B<sub>2</sub>) mit dunklem Kern, die einen Durchmesser von 80 m $\mu$  nicht überschreiten. Glutaraldehyd-OsO<sub>4</sub>-Fixation. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

D: Synaptisches Gebiet aus demselben Oberschlundganglion. Im präsynaptischen Endknopf (pr) sind viele synaptische Bläschen (B<sub>1</sub>), Mitochondrien (M) und Glycogenrana (eg) erkennbar. Synapsen (Sy) und postsynaptische Fasern (po). Beachtenswert ist das mit Pfeil bezeichnete, von einer „Membran“ umgebene Gebilde. Es paßt nach Form und Durchmesser (etwa 130 m $\mu$ ) in die Klasse der größeren Partikel und der großen „synaptischen“ Bläschen mit dunklem Kern. Die Entscheidung kann mitunter schwer sein. Fixation wie Abb. 1 C. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

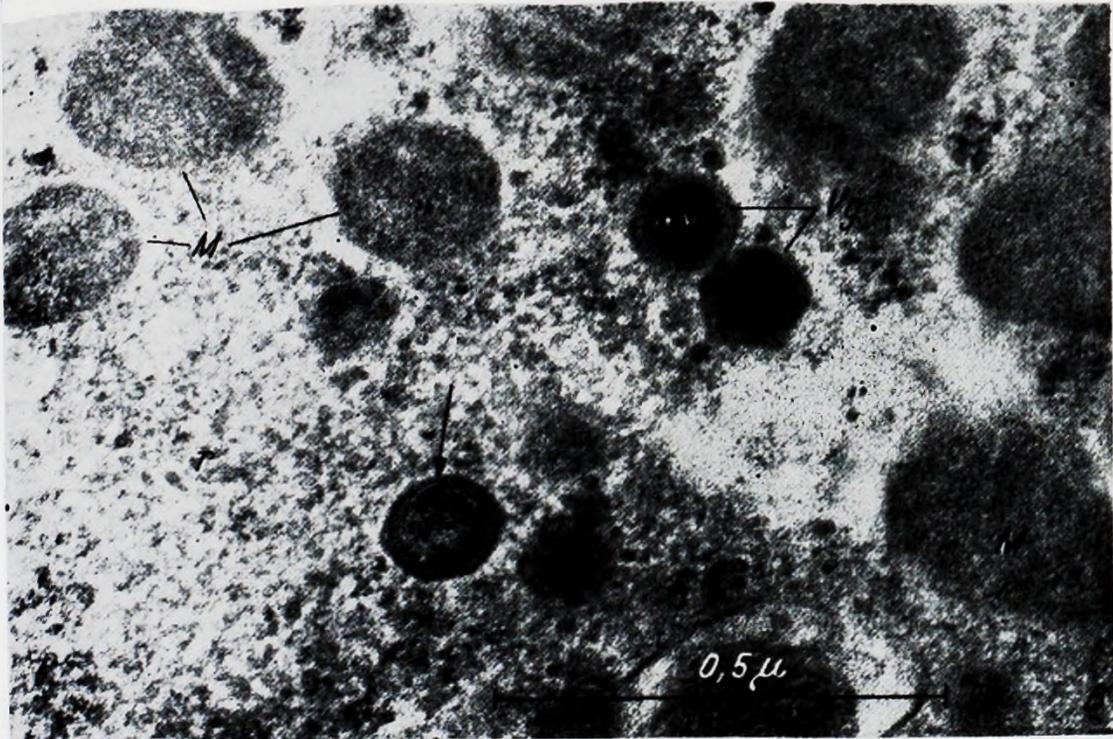
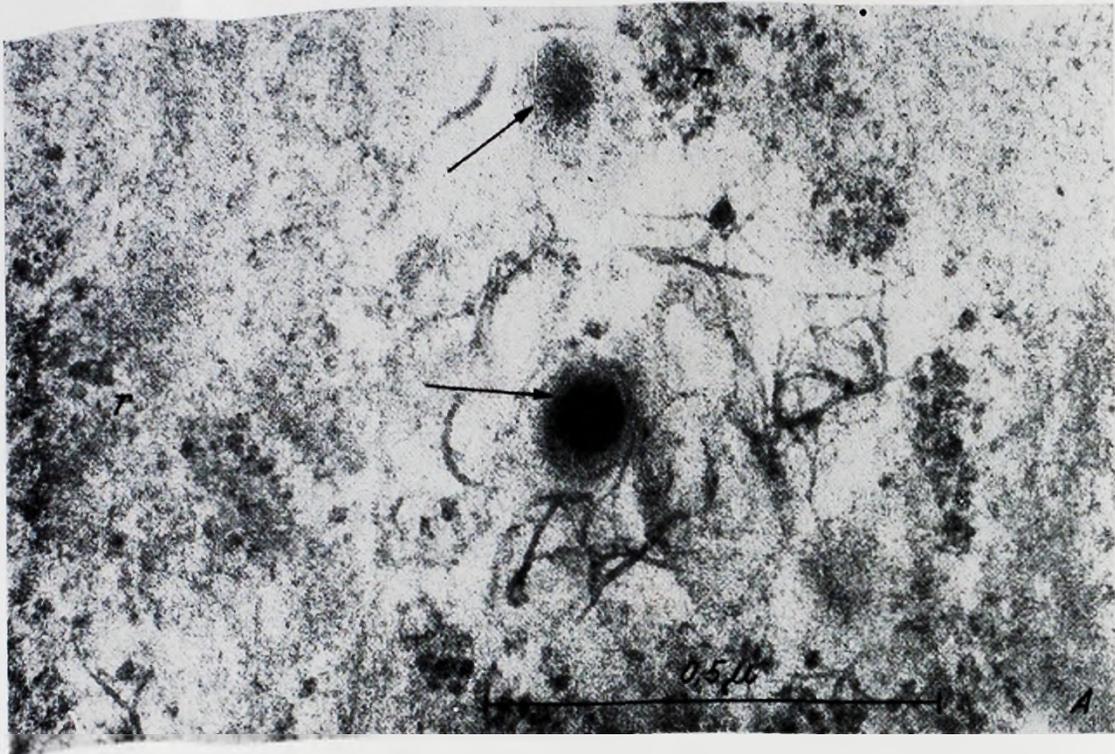


Abb. 2. Virusähnliche Partikel des größeren Typs (Vg) in morphologisch unterscheidbaren Zustandsformen:

A: Zwei Partikel (Pfeile) in einer Nervenzelle. In ihrer Umgebung ist das Zytoplasma aufgehellert und enthält fädige Strukturen. Dieses Feld ist von auffallend dichten Ribosomenhaufen (r) umgeben. Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

B: Im Zytoplasmabereich einer Perilemmzelle sind zwei Partikel mit homogen elektronendichten Kernen erkennbar. Das mit Pfeil bezeichnete Partikel zeigt dieselbe Gestalt; aber die unregelmäßige Dichte seines Kerns ist beachtenswert (Bildungsstadium?). Im Gegensatz zum Partikel in Abb. 2A ist es von einem dichtgelagerten Ribosomenhaufen umgeben. Fixation wie 2A. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

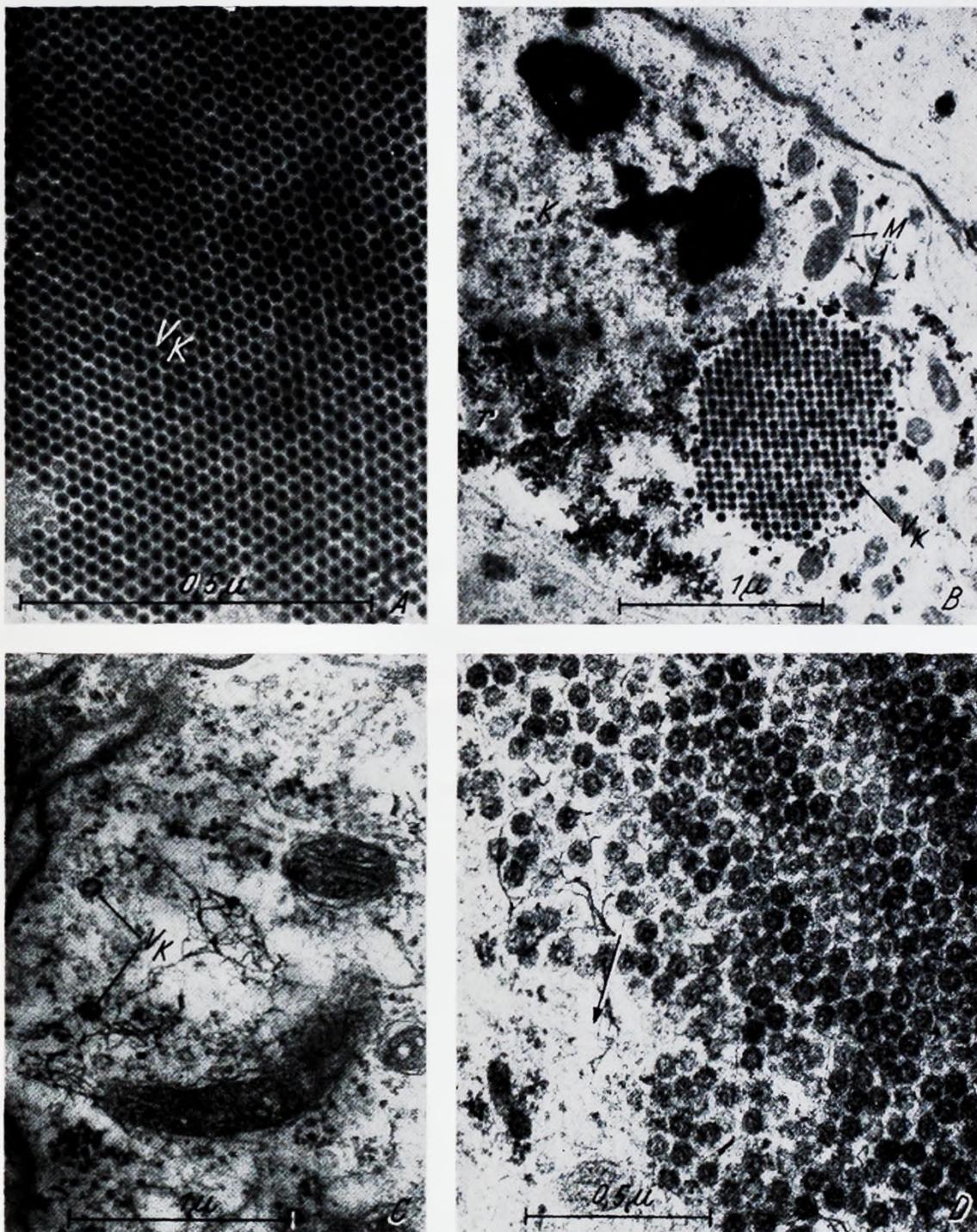


Abb. 3. Virusähnliche Partikel vom kleineren Typ (Vk) in Aggregatform.

A: Ausschnitt eines Aggregates in einer Fettkörperzelle, das ziemlich genau in einer Ebene geschnitten ist, da die dunklen Kerne der Partikel einen ungefähr konstanten Durchmesser zeigen. Man beachte die regelmäßige Anordnung der Partikel. Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>, Primärvergrößerung: 66.000 ×.

B: Zytoplasma einer Perilemmzelle. Man erkennt den Zellkern (K), einige Mitochondrien (M) und Ansammlungen von Ribosomen (r). Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>, Primärvergrößerung: 8000 ×.

C: Solitärformen des kleineren „Virustyps“ (Vk) in einer Nervenzelle. Der umgebende Zytoplasmabereich zeigt typische Aufhellungen und fädige Strukturen (vgl. Abb. 2 A, ähnliche Situation mit größerem Typ). Fixation wie in Abb. 3 A. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

D: Aggregatform der kleineren virusähnlichen Partikel bei etwas stärkerer Vergrößerung. Man beachte, daß hier im Gegensatz zu Abb. 3 A und 3 B die Kerne zum Teil fehlen, zum Teil unterschiedlichen Kontrast aufweisen. Die Partikel sind speziell in den Randgebieten locker angeordnet, zum Teil ist die kristalline Bildung schon angedeutet und dazwischen sind noch viele mittel- bis feinfädige Strukturen zu erkennen; am Rande sind dieselben prominenter (Pfeile). Fixation: wie in Abb. 3 A. Primärvergrößerung: 20.000 ×.

lich und sind wahrscheinlich von uns früher in Populationen von synaptischen Bläschen irrtümlicherweise als „dark cored vesicles“ identifiziert worden (Abb. 1C und 1D).

Die virusähnlichen Partikel bestehen aus einem mehr oder weniger elektronendichten Kern und aus einer äußeren Hülle. Bei stärkeren Vergrößerungen zeigt die Hülle eine geschichtete Struktur von etwa 10  $\mu$  Dicke, ähnlich einer „unit membrane“. Der Kern ist meist durch einen feinen hellen Hof deutlich von der Hülle abgesetzt (Abb. 2A, 2B). Bemerkenswert ist die durch PTA-Behandlung bewirkte Differenzierung der Viruspartikel in imprägnierbare und nicht imprägnierbare Formen (Abb. 1A, 1B). Die imprägnierbaren sind ähnlich dargestellt wie nach Acrolein-OsO<sub>4</sub> Fixation.

Abb. 2A zeigt einen Zytoplasmabereich einer Nervenzelle, in welchem zwei Partikel liegen. Dabei fällt auf, daß in ihrer unmittelbaren Umgebung das Zytoplasma aufgehellert und mit fädigen Strukturen angereichert ist. Am Rand dieser Zone liegen gruppenweise freie Ribosomen. Abb. 2B zeigt einen ähnlichen Ausschnitt, wobei hier die Viruspartikel durch unterschiedliche Intensität der Kerndichte gekennzeichnet sind. Ferner fehlen die fädigen Strukturen; dafür liegen die Partikel in einer dichten Masse von Ribosomen, die von auffallend vielen Mitochondrien umringt ist.

#### *Das kleinere Partikel*

Der kleinere Typ ist charakterisiert durch Partikel von einem Gesamtdurchmesser von 60 bis 70  $\mu$ . Wir haben diese bis jetzt nur in einem Falle, in Nerven-, Glia- und Fettkörperzellen des Prothorakalganglions gefunden. Dabei waren die Partikel sehr reichlich und in verschiedenen morphologischen Varianten zu finden (Abb. 3A bis D, 4A, 5A und 6A). Besonders in Fettkörperzellen (Abb. 3A, 3B) gruppieren sie sich zu ansehnlichen, bis mehrere  $\mu$  im Durchmesser erreichenden kristalloiden Aggregaten.

Am häufigsten zeigen diese Partikel in verschiedenen Schnittrichtungen eine runde Form mit einem maximalen Außendurchmesser von etwa 60 bis 70  $\mu$ . Bei starker Vergrößerung kann man auch bei diesen Partikeln einen dunklen Kern und eine durch einen hellen Hof deutlich abgesetzte „Hülle“ von etwa 10  $\mu$  Dicke erkennen. Der rundliche dunkle Kern hat einen Durchmesser von 10 bis 45  $\mu$ . Eine weniger häufige Form besteht aus kernlosen Partikeln. Abb. 3C zeigt einige leere „Hüllen“ innerhalb eines fädigen Gerüsts. In Abb. 3D liegen viele „leere“ und einige „volle“ Hüllen neben fädigen Strukturen. Diese treten immer mehr in den Hintergrund und die Partikel gruppieren sich zu regelmäßig geordneten, kristalloiden Aggregaten von 1 bis 2  $\mu$  Durchmesser (Abb. 3A).

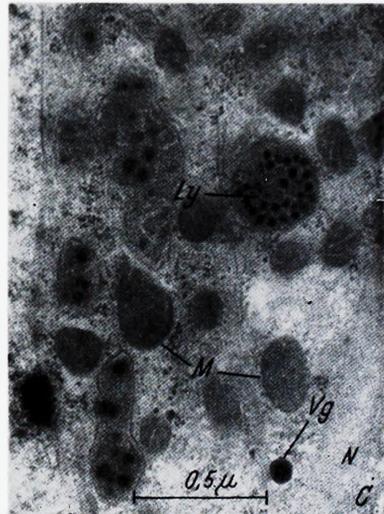
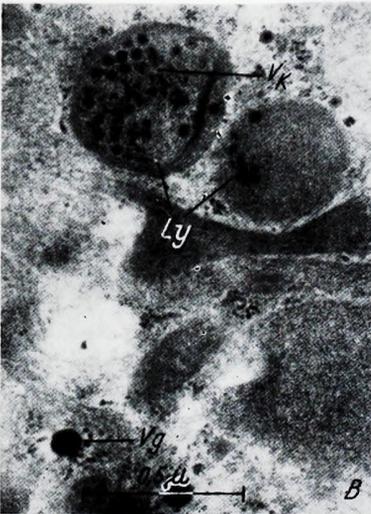
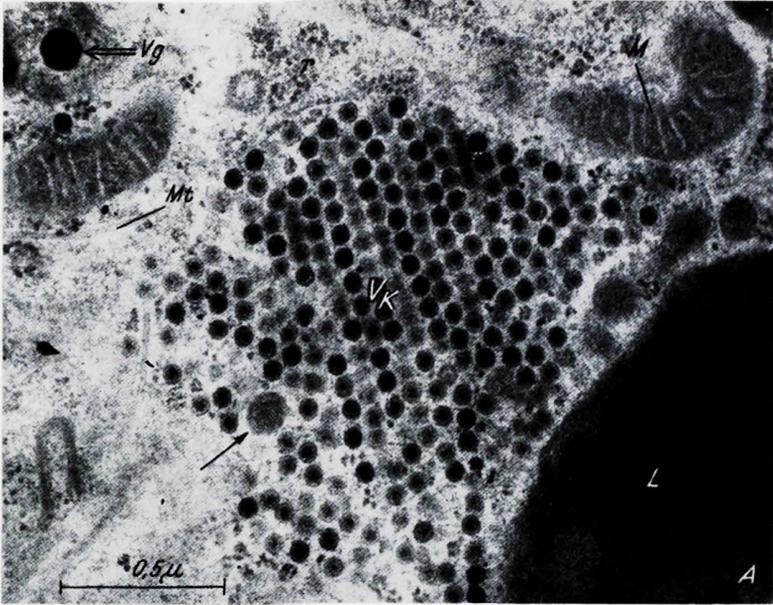


Abb. 4. Nebeneinander von großen und kleinen virusähnlichen Partikeln, Einschluß in lysosomenartige „dense bodies“. Ausschnitt aus dem Zytoplasma einer Faserhüllgliazelle.

A: Man erkennt eine ansehnliche Gruppe von virusähnlichen Partikeln des kleineren Typs (Vg). Der Doppelpfeil weist auf ein Partikel des größeren Typs (Vg). Der einfache Pfeil vermutlich auf einen ebensolchen, der weniger stark imprägniert erscheint. M: Mitochondrien, r: Ribosomen, L: Lakune, Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>, Primärvergrößerung: 22.000 ×.

B: In diesem Zytoplasmabereich erkennt man zwei frei liegende größere virusähnliche Partikel (Vg) im linken unteren Bildausschnitt. Ferner sieht man zwei lysosomenähnliche Gebilde (Ly), welche kleinere, virusähnliche Partikel (Vg) und möglicherweise bereits fragmentierte Partikel enthalten. Fixation: wie in Abb. 4A, Primärvergrößerung: 22.000 ×.

C: Dieser Ausschnitt einer Perilemmzelle zeigt ein weiteres lysosomenähnliches Gebilde, welches kleinere virusähnliche Partikel (Vg) enthält, ferner sieht man ein größeres virusähnliches Partikel (M), mehrere Mitochondrien (M); am Rande ist ein Stück Neural-lamelle (N) sichtbar. Fixation: wie in Abb. 4A, Primärvergrößerung: 22.000 ×.

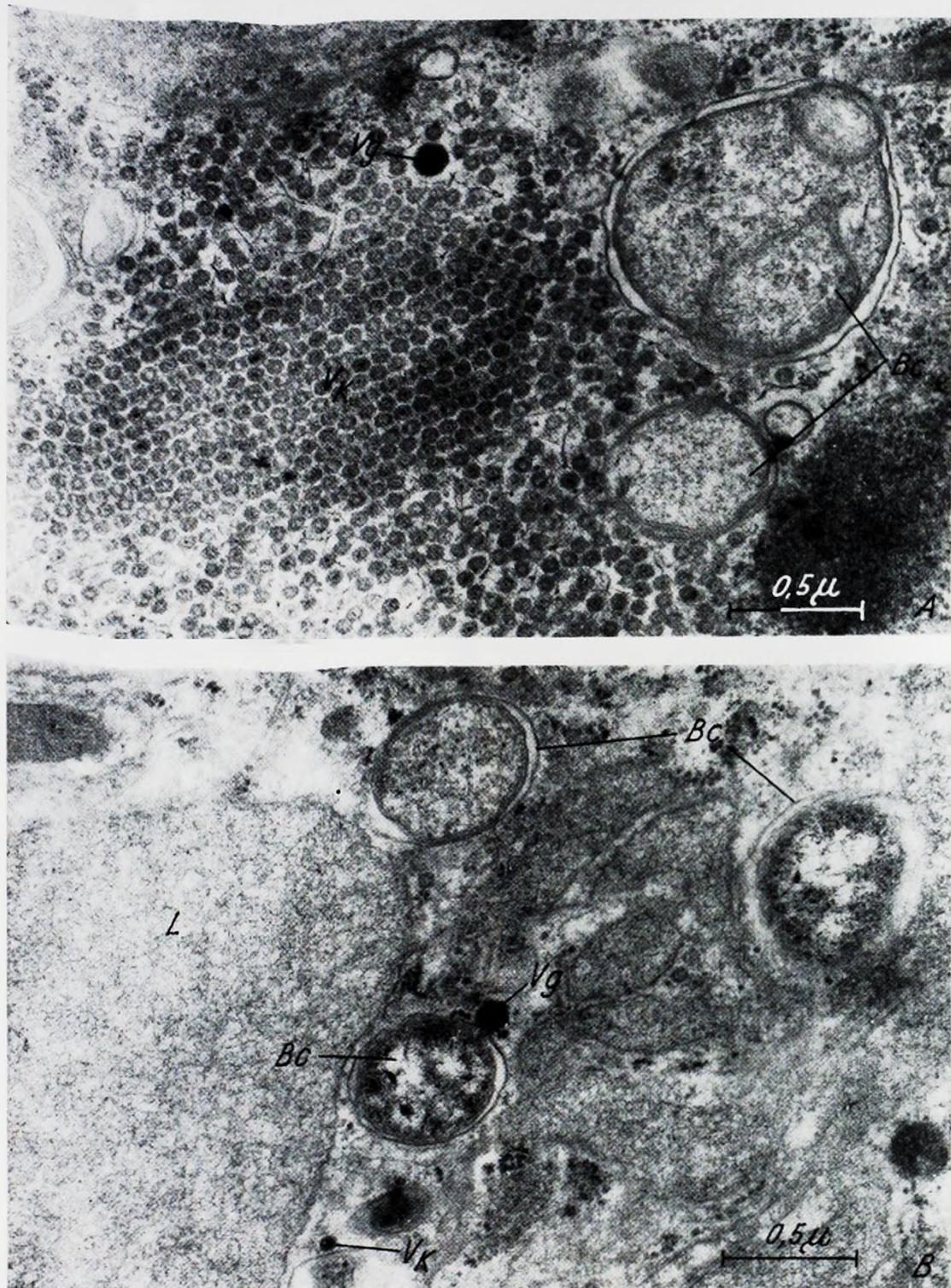


Abb. 5. Nebeneinander von „Bakterien“ und „Viren“.

A: Der Zytoplasmabereich einer Fettkörperzelle zeigt einen starken Befall mit kleinen virusähnlichen Partikeln (Vg) und ferner mit einem größeren Partikel (Vg). Beachtenswert sind die beiden „Bakterien“ (Bc), von denen eines in Teilung begriffen ist. Die „Bakterien“ sind fast ganz von den kleinen Partikeln umgeben. Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

B: „Bakterium“ (Bc) und direkt angelagerter größerer virusähnlicher Partikel (Vg) im Zytoplasma einer Gliazelle. Ferner ist ein kleineres virusähnliches Partikel (Vg) erkennbar. r: Ribosomen, L: Lakune. Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

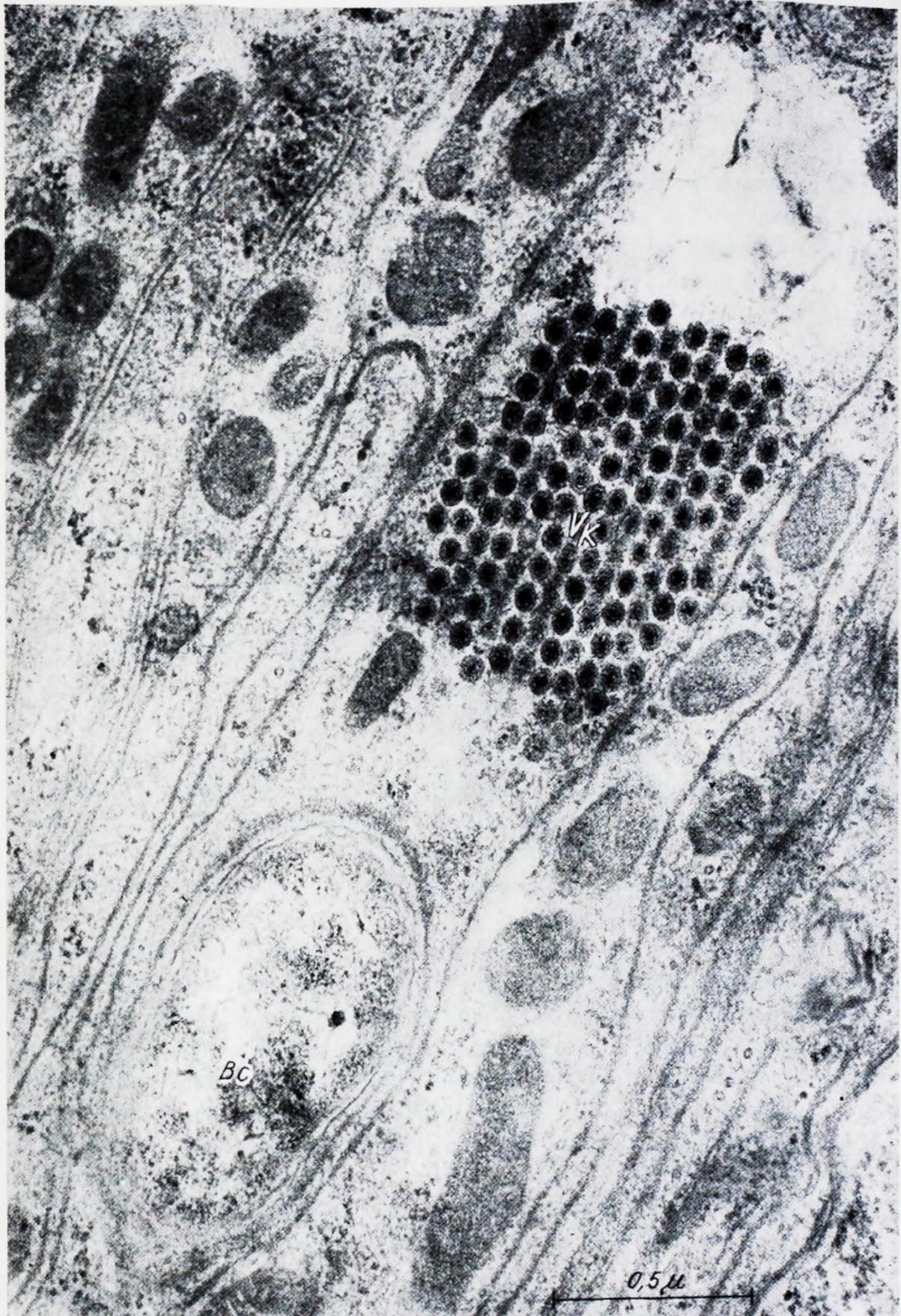


Abb. 6. Nebeneinander von virusähnlichen Partikeln (Vk) und „Bakterien“ (Bc) innerhalb eines Gliazellfortsatzes aus dem Prothorakalganglion einer Waldameise. Die virusähnlichen Partikeln sind im oberen Bildrand von einem stark gelichteten Zytoplasmahof umgeben.  
Fixation: Acrolein-OsO<sub>4</sub>. Primärvergrößerung: 22.000 ×.

Meist liegen die Partikel frei im Zytoplasma. Eine Ausnahme dazu bildet Abb. 3B, wo ein kleines Aggregat von einer Membran umgeben zu sein scheint. Nicht selten findet man Partikel in lysosomenähnlichen „dense bodies“ (Abb. 4B und C). Diese Körperchen werden von einer einfachen Membran umgrenzt und enthalten ein feinkörniges Material von mittlerer Dichte und nicht selten myelinähnliche Membranfiguren. Die virusähnlichen Partikel vom kleinen Typ sind darin in unregelmäßiger Anordnung und teilweise fragmentiert (Abb. 4B) anzutreffen.

Größere und kleinere Partikel kommen auch gleichzeitig in derselben Zelle vor. Abb. 4A zeigt einen Ausschnitt aus dem Zytoplasma einer Gliazelle mit reichlich kleinen Partikeln und mindestens einer gut ausgebildeten, größeren sechseckigen Form. Denselben Befund zeigen Abb. 4B und 4C. Dies bedeutet, daß zwei offensichtlich verschiedene „Viren“ in derselben Zelle vorliegen können.

Spezielle Beachtung verdient auch das Nebeneinander von „Bakterien“<sup>2</sup> und „Viren“. Abb. 5 und 6 zeigen im Zytoplasma von jeweils ein- und derselben Zelle neben den üblichen Zellorganellen beide Arten von virusähnlichem Partikel und Bakterien. Wir haben dieses unmittelbare Nebeneinander der verschiedenen „Mikroorganismen“ mehrmals beobachten können, aber niemals waren Anzeichen einer gegenseitigen Beeinflussung vorhanden.

### Diskussion

Der größere Typ zeigt einen Maximaldurchmesser von etwa 150  $\mu$  und oft eine deutlich hexagonale Form; er wurde in Form von solitären Partikeln und nicht von Aggregaten angetroffen und erweist sich dem von *Smith* (9, 10) beschriebenen *Tipula-iridescent-Virus* sehr ähnlich, sowohl in der Form als auch in der Größe. Auch der Befall des Zytoplasmas ist beiden Formen gemeinsam.

Die kleineren Partikel wurden bisher nur im Prothorakalganglion und im umliegenden Fettkörpergewebe eines einzigen Ameisenindividuums gefunden. Sie haben einen Durchmesser von 60 bis 70  $\mu$  und sind mit Bezug auf Dimension und Gestalt den von *Grace* und *Mercer* (3) bei Motten beschriebenen sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch, indem diese nur im Kern und jene nur im Zytoplasma vorkommen. Im Gegensatz zum größeren Partikel bildet das kleinere ausgedehnte kristalloide Aggregate. Aus dem Vorkommen der kleineren virusähnlichen Partikel in lysosomenähnlichen Gebilden glauben wir auf die Möglichkeit einer zellulären Abwehrreaktion schließen zu können.

<sup>2</sup> Bei diesen „Bakterien“ handelt es sich um die bereits früher mitgeteilte Form (5, 12) eines mycoplasma- oder rickettsien-ähnlichen Mikroorganismus von ovaler Form und stark variierendem Längsdurchmesser von etwa 0,25 bis 1,5  $\mu$ .

Kürzlich fanden *Philpot et al.* (7) ähnliche Viruspartikel im Fettkörper und im Zentralnervensystem von *Drosophila melanogaster*. Trotzdem ausgedehnte Aggregate den Kern dieser Zellen belegten, waren die Tiere anscheinend normal (Mortalitätsrate). Dies ist erstaunlich, stimmt jedoch mit unseren Erfahrungen überein.

Von Interesse ist ferner die Tatsache, daß in ein und derselben Zelle zwei verschiedene Viren nebeneinander vorkommen können. Nach *Huger* (4) kann wohl ein Insekt mit zwei verschiedenen Viren infiziert werden, aber in ein und derselben Zelle soll nur ein Virus angehen können. Er beruft sich dabei auf *Bird* (2), der hinsichtlich einer Infektion von Larven von *Choristoneura fumiferana* mit für sie pathogenen Viren vom „granulosis-“ und „nuclear polyhedrosis“-Typ wörtlich schreibt: „The two viruses compete for cells to infect, and apparently they do not develop in one and the same cell. However, adjacent cells frequently are infected by the different viruses.“ Zahlreiche Beobachtungen aus dem vorliegenden Material sprechen dafür, daß auch bei Insekten Doppelinfektionen ein und derselben Zelle vorkommen.

### Zusammenfassung

Im Zentralnervensystem von anscheinend normalen Arbeiterinnen der Waldameisenart *Formica lugubris* Zett. wurden virusähnliche Partikel gefunden. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops wurden zwei Typen unterschieden:

1. Ein großes Partikel von 120 bis 150  $\mu$  Durchmesser und hexagonaler Kontur, welches in verschiedenen morphologischen Zustandsformen, aber immer im Zytoplasma von Nerven-, Glia- und Fettkörperzellen vorkommt.

2. Ein kleineres Partikel von rundlicher Form und einem Durchmesser von 60 bis 70  $\mu$ , welches ebenfalls das Zytoplasma der erwähnten Zellarten befällt. Der erste Typ wurde bei allen untersuchten Tieren — aber immer nur in geringer Zahl und in Solitärform festgestellt, während der zweite Typ nur bei einem einzigen Tier, aber in Form von ausgedehnten kristalloiden Aggregaten angetroffen wurde. Die beiden Typen können zusammen in einer einzigen Zelle, und in nächster Nachbarschaft von rickettsien- oder mycoplasma-ähnlichen Mikroorganismen vorkommen. Der erste Typ hat eine auffallende Ähnlichkeit mit Iridescent-Viren, während beim zweiten Typ eine Zuordnung noch offensteht. Ihre Bedeutung für den Wirtsorganismus und ihre allfällige Verbreitung im Tier- oder Pflanzenbereich ist nicht bekannt.

### Summary

Virus-like particles have been found in the central nervous system of normally appearing imagos (workers) of the common wood ant (*Formica lugubris* Zett.). Two types of particles could be identified in the cytoplasm

of nervous, glial and fat body cells with the aid of an electronmicroscope: The first type has a hexagonal profile and a size of 120–150 m $\mu$  in diameter; the second type is spherical and 60–70 m $\mu$  in diameter. While the former occurred in all specimens in solitary form and small number, the latter was found only in one specimen but in extensive cristalloid aggregates. Both types of particles may occur simultaneously in the cytoplasm of the same cell and even in combination with a rickettsia- or mycoplasma-like microorganism. The first type is morphologically similar to iridescent virus, while the second type could not yet be related to any known form. The significance of these particles for the host organism and their distribution in other animals and in plants is unknown.

### Verdankung

Herr Prof. Dr. G. Benz, Institut für Entomologie der Eidgen. Techn. Hochschule in Zürich hat uns in Fragen der Bildinterpretation und der einschlägigen Literatur geholfen. Wir möchten ihm auch an dieser Stelle für die geduldige Beratung unseren besten Dank abstellen.

### Literatur

1. *Aghajanian, G. K., and F. E. Bloom*: The formation of synaptic junctions in developing rat brain: A quantitative electron microscope study. *Brain Res.* **6**, 716–727 (1967).
2. *Bird, F. T.*: Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. *J. Insect Path.* **1**, 406–430 (1959).
3. *Grace, T. D. C., and E. H. Mercer*: A new virus of the saturniid *Antheraea eucalypti* Scott. *J. Invertebr. Path.* **7**, 241–244 (1965).
4. *Huger, A.*: Granuloses of insects. In: *Insect Pathology* (Ed.: *E. A. Steinhaus*) **1**, 531–575. New York and London: Acad. Press. 1963.
5. *Lamparter, H. E.*: Intrazelluläre symbiontische Bakterien im Zentralnervensystem der Ameise. *Z. Zellforsch.* **81**, 1–11 (1967).
6. *Mayor, H. D., and L. E. Jordan*: Acrolein — a fine structure fixative for viral cytochemistry. *J. cell. Biol.* **18**, 207–213 (1963).
7. *Philpot, D. E., J. Weibel, H. Atlan, and J. Miguel*: Virus-like particles in the fat body and nervous tissue of *Drosophila melanogaster* (1968, in press).
8. *Sabatini, D. D., K. Bensch, and R. J. Barnett*: The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. cell. Biol.* **17**, 19–58 (1963).
9. *Smith, K. M.*: The cytoplasmic virus diseases. In: *Insect Pathology* (Ed.: *E. A. Steinhaus*), **1**, 457–497. New York and London: Acad. Press. 1963.
10. *Smith, K. M.*: *Insect Virology*. New York and London: Acad. Press. 1967.
11. *Steiger, U.*: Über den Feinbau des Neuropils im Corpus pedunculatum der Waldameise. *Z. Zellforsch.* **81**, 511–536 (1967).
12. *Steiger, U.*: Intrazelluläre Mikroorganismen bei der Waldameise im Ei-, Larven- und Puppenstadium. *Acta trop.* (Basel), **25**, 263–266 (1968).

Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. K. Akert, Institut für Hirnforschung der Universität Zürich, August Forel-Straße 1, CH-8008 Zürich.