

CHEMISCHE EN STRUCTURELE EIGENSCHAPPEN VAN HET BRONSVLEKKENVIRUS VAN DE TOMAAT



Dit proefschrift met stellingen van Petrus Wilhelmus Leonardus Tas,
landbouwkundig ingenieur, geboren te Pijnacker op 25 augustus 1946,
is goedgekeurd door de promotor, dr.ir. J.P.H. van der Want, hoogleraar in
de virologie en de co-promotor, dr. D. Peters.

De rector magnificus van de Landbouwhogeschool
J.P.H. van der Want

Wageningen, april 1975

NA108201,629

P.W.L. Tas

Chemische en structurele eigenschappen van het bronsvlekkenvirus van de tomaat

With a summary: Chemical and structural properties of tomato spotted wilt virus.

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van

doctor in de landbouwwetenschappen,

op gezag van de rector magnificus, dr.ir. J.P.H. van der Want,

hoogleraar in de virologie,

in het openbaar te verdedigen

op dinsdag 10 juni 1975 des namiddags te vier uur

in de aula van de Landbouwhogeschool te Wageningen

LABORATORIUM VOOR VIROLOGIE, LANDBOUWHOGESCHOOL, WAGENINGEN, 1975

1511 = 104749 - 03

All nature is but art unknown to thee,
All chance, direction which thou canst not see;
All discord, harmony not understood.

Alexander Pope

1733

**BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN**

STELLINGEN

I

De gewoonte van diverse onderzoekers om de molecuulgewichten van hoog-moleculaire eiwitten op gels met 5 % acrylamide te bepalen volgens de methode van Weber en Osborn (1969) kan in het geval van glycoproteïnen tot aanzienlijke fouten aanleiding geven.

Weber, K. en Osborn, M. (1969). J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.

II

Het bronsvlekkenvirus van de tomaat bevat koolhydraat, dat afkomstig is van de waardplant.

III

Het is niet juist om overdracht door thripsen als criterium voor de identificatie van TSWV te gebruiken.

Best, R.J. (1968). Advan. Virus Res. 13, 65 - 146.

IV

Het ontbreken van een zichtbare reactie bij dubbele diffusie in agargel tussen antiserum tegen het bronsvlekkenvirus van de tomaat en sap van een niet geïnfecteerde waardplant kan niet gelden als bewijs voor de afwezigheid van waardantigeen in TSWV.

V

De resultaten van Lee et al. (1972) suggereren dat planten analogen van siaalzuur kunnen synthetiseren.

Lee, P.E., Boerjan, M. en Peters, D. (1972). Virology 50, 309 - 311.

VI

Het ontbreken van reliëf in vlakke landschappen versterkt de noodzaak tot het toepassen van een gevarieerde woningbouw om een te grote monotonie te vermijden.

VII

Het verdient aanbeveling om meer onderzoek te verrichten naar de bruikbaarheid van nematoden als indicatoren voor de verontreiniging van bodem- en oppervlaktewater.

VIII

Het begrip tumor is in de insectenpathologie onvoldoende gedefinieerd.

IX

Sociaal gezien verdient het aanbeveling om bij het roken van een sigaret diep te inhaleren; dit maakt dat de uitgeblazen rook minder schadelijk is voor de omgeving van de roker.

X

De gemiddelde leeftijdsverwachting van de vrouw zal negatief beïnvloed worden door de toenemende emancipatie.

Op dinsdag 10 juni 1975 te 16.00 uur zal in de aula van de Landbouwhogeschool, Generaal Foulkesweg 1a, Wageningen, de promotie van ir. P.W.L. Tas plaatsvinden.
De titel van het proefschrift luidt:

CHEMISCHE EN STRUCTURELE EIGENSCHAPPEN VAN HET BRONSVLEKKENVIRUS VAN DE TOMAAT

Het proefschrift is bewerkt onder leiding van de promotor, dr.ir. J.P.H. van der Want, hoogleraar in de virologie en de co-promotor, dr. D. Peters.

Uw aanwezigheid bij deze promotie zouden wij zeer op prijs stellen.

Receptie na afloop van de promotie in het klein-auditorium van het aula-gebouw.

De paranimfen Marleen Boerjan
Jan van den Hurk

Aan mijn ouders

VOORWOORD

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan eenieder, die op enigerlei wijze een bijdrage heeft geleverd bij het tot stand komen van dit proefschrift.

In de eerste plaats mijn ouders, die mij de gelegenheid hebben gegeven om te gaan studeren.

Veel dank ben ik ook verschuldigd aan prof.dr.ir. J.P.H. van der Want voor zijn voortdurende belangstelling en kritische discussies, en aan dr. D. Peters voor zijn stimulerende begeleiding tijdens het onderzoek en het op schrift stellen van de resultaten.

Veel dank gaat ook uit naar Marleen Boerjan voor de enorme inzet en het enthousiasme waarmee ze bij de diverse experimenten assisteerde en naar ir. Jan van den Hurk, die in het kader van zijn doctoraal studie de RNA experimenten op een voortreffelijke wijze ten uitvoer bracht en naar Miss Marit Moe, die een deel van de infectiositeitsproeven voor haar rekening nam.

Voorts dank ik ir. T.S. Ie en Joop Groenewegen voor hulp bij elektronenmicroscopische experimenten, Magda Usmany en Dick Lohuis voor het afdrucken van foto's, Karel Boekhorst voor de tekeningen, G. Eimers voor het fotografisch werk en Wout Rozeboom voor het moeiteloos oplossen van kleine probleempjes.

Voor de naar schatting 6000 *N. rustica* planten, die in de loop van het onderzoek gebruikt zijn ben ik Gijs Looyen, Han Speckmann en Nico Klarenbeek veel dank verschuldigd.

Het ITAL, met name ir. J. Stoutjesdijk ben ik dank verschuldigd voor de geboden faciliteiten voor het uitvoeren van de radioactiviteitsexperimenten.

Tenslotte dank ik dr. Andy Ziemięcki voor correctie van de Engelse tekst, de afdeling Tekstverwerking en met name mevrouw H.J. Treffers voor het typewerk en de heer A. Emmink (PUDOC) voor de uitvoering in offset.

INHOUD

| | |
|---|----|
| Gebruikte afkortingen en begrippen | 4 |
| 1. Inleiding | 6 |
| 2. Materiaal en methoden | 8 |
| 2.1. Virus | 8 |
| 2.2. Plantemateriaal | 8 |
| 2.3. Infectiositeitstoetsing | 9 |
| 2.4. Zuivering van het virus | 9 |
| 2.5. Bereiding van nucleïnezuur | 10 |
| 2.6. Zuivering van polysacchariden uit niet geïnfecteerde <i>N. rustica</i> -planten | 11 |
| 2.7. Bereiding van een antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde <i>N. rustica</i> | 11 |
| 2.8. Bereiding van antisera tegen TSWV | 12 |
| 2.9. Verzadiging van TSWV-antiserum | 13 |
| 2.9.1. Verzadiging van TSWV-antiserum met polysacchariden uit <i>N. rustica</i> | 14 |
| 2.9.2. Verzadiging van TSWV-antiserum met <i>N. rustica</i> -sap | 14 |
| 2.9.3. Verzadiging van TSWV-antiserum met gedenatureerd virus | 14 |
| 2.9.4. Verzadiging van TSWV-antiserum met intact virus | 15 |
| 2.10. De dubbele agardiffusie-methode | 15 |
| 2.11. Serologie van gedenatureerde viruseiwitten in polyacrylamidegels | 15 |
| 2.12. Extractie van TSWV met chloroform-methanol | 15 |
| 2.13. Afbraak van eiwit met SDS en ME en carboxymethylering met joodaceetamide | 16 |
| 2.14. Elektroforese in polyacrylamidegel | 16 |
| 2.14.1. Elektroforese van eiwit | 16 |
| 2.14.2. Labeling van TSWV met ^{125}J | 17 |
| 2.14.3. Elektroforese van nucleïnezuur | 18 |
| 2.14.4. Incubatie met RNase en DNase | 19 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.15. | Elektronenmicroscopie van virus | 19 |
| 2.16. | Elektronenmicroscopie van een aantal sedimenten, die geïsoleerd werden | 20 |
| 2.17. | Chemicaliën | 20 |
| 3. | Zuivering van het bronsvlekkenvirus van de tomaat | 22 |
| 3.1. | Concentratie van het virus in <i>N. rustica</i> op bepaalde tijdstippen na inoculatie | 24 |
| 3.2. | Infectiositeit van TSWV in perssap van <i>N. rustica</i> | 30 |
| 3.3. | Zuivering van het virus uit <i>N. rustica</i> | 30 |
| 3.4. | Infectiositeit van gezuiverd TSWV | 43 |
| 3.5. | Elektronenmicroscopie van gezuiverd TSWV | 44 |
| 3.6. | Conclusies | 47 |
| 4. | Serologisch onderzoek aan gezuiverd TSWV | 49 |
| 4.1. | Verschil in werkzaamheid van antiserum 1 en 2 | 49 |
| 4.2. | Verzadiging van TSWV-antiserum met <i>N. rustica</i> -sap | 52 |
| 4.3. | Verzadiging van TSWV-antiserum met polysacchariden | 54 |
| 4.4. | Verzadiging van TSWV-antiserum met gedenateerd virus | 55 |
| 4.5. | Verzadiging van TSWV-antiserum met intact virus | 57 |
| 4.6. | Reactie van antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde <i>N. rustica</i> met TSWV | 58 |
| 4.7. | Conclusie | 59 |
| 5. | Een analyse van de eiwitten van TSWV | 61 |
| 5.1. | Afbraak van TSWV en scheiding van de eiwitcomponenten door elektroforese in polyacrylamidegel | 62 |
| 5.2. | Detectie van glycoproteïnen | 66 |
| 5.2.1. | Kleuring met PAS-reagens | 67 |
| 5.2.2. | Analyse van een chloroform-methanol extract uit TSWV | 70 |
| 5.3. | Schatting van de molecuulgewichten van de eiwitten | 71 |
| 5.4. | Topografie van de eiwitten van TSWV | 75 |
| 5.4.1. | Eliminatie van stoffen die de werking van lactoperoxydase remmen | 76 |
| 5.4.2. | Fragmentatie van TSWV | 78 |
| 5.4.3. | Labeling van TSWV met ¹²⁵ J | 79 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.4.4. | Bepaling van de relatieve incorporatie van ^{125}J in de diverse eiwitten van TSWV | 83 |
| 5.4.5. | Gevoeligheid van de eiwitten van TSWV voor proteolyse | 86 |
| 5.5. | Conclusie | 86 |
| 6. | Enkele eigenschappen van het nucleïnezuur van gezuiverd TSWV | 88 |
| 6.1. | Extractie van het nucleïnezuur | 88 |
| 6.2. | Karakterisering van het nucleïnezuur | 88 |
| 6.2.1. | Infectiositeit | 88 |
| 6.2.2. | Elektroforese in polyacrylamidegel | 89 |
| 6.2.3. | Incubatie met RNase en DNase | 91 |
| 6.2.4. | Differentiële precipitatie met zout | 93 |
| 6.2.5. | Resistentie tegen verhitting | 94 |
| 6.2.6. | Eigenschappen van het materiaal corresponderend met piek 5 | 95 |
| 6.2.7. | Elektroforetisch gedrag | 97 |
| 6.2.8. | Bepaling van de molecuulgewichten op polyacrylamidegel | 97 |
| 6.3. | Conclusie | 98 |
| 7. | Een eerste karakterisering van infectieus ribonucleoproteïne | 101 |
| 7.1. | Fragmentatie van TSWV met NP-40 | 101 |
| 7.2. | Gedeeltelijke zuivering van infectieus ribonucleoproteïne op een gradiënt | 102 |
| 7.3. | Karakterisering van infectieus ribonucleoproteïne | 102 |
| 7.4. | Conclusie | 105 |
| 8. | Algemene discussie | 106 |
| 9. | Samenvatting | 111 |
| 10. | Summary | 114 |
| 11. | Literatuur | 117 |
| | Curriculum vitae | 121 |

GEBRUIKTE AFKORTINGEN EN BEGRIPPEN

| | |
|------------------|--|
| D | Dalton |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| cpm | Tikken per minuut |
| CPMV | Cowpea-mozafiekvirus |
| CT DNA | Kalfthymus-DNA |
| ds CPMV-RNA | Dubbelstrengig CPMV-RNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| E ₂₆₀ | Optische dichtheid bij 260 nm |
| E ₄₁₂ | Optische dichtheid bij 412 nm |
| EDTA | Ethyleendiaminetetra-azijnzuur |
| 125 _J | Jodium 125 |
| mCi | Millicurie |
| ME | Mercaptoëthanol |
| NP-40 | Nonidet P 40 |
| OD | Optische dichtheid |
| PAS | Perjoodzuur en Schiffs' reagens |
| PBS | Phosphate buffered saline, oplossing van 12,7 g Na ₂ HPO ₄ , 13,6 g KH ₂ PO ₄ en 8,5 g NaCl per liter |
| PEG | Polyethyleenglycol |
| PTA | Fosforwolfraamzuur |
| RNA | Ribonucleïnezuur |
| RNA _B | RNA uit de bodem-component van CPMV |
| RNA _M | RNA uit de midden-component van CPMV |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Toeren per minuut |
| S | Sedimentatiecoëfficiënt in Svedberg eenheden |
| SDS | Natriumlaurylsulfaat |
| SSC | Standard saline citrate, oplossing van 0,15 M NaCl en 0,015 M Na-citraat, pH 7,2 |
| ss CPMV-RNA | Enkelstrengig CPMV-RNA |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine |

| | |
|------|--|
| TCA | Trichloorazijnzuur |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethaan |
| TSWV | Tomato spotted wilt virus, bronsvlekkenvirus van de tomaat |

INLEIDING

Het bronsvlekkenvirus van de tomaat (TSWV) is een virus, dat voorkomt in gematigde en subtropische gebieden over de gehele wereld. Het virus heeft een zeer uitgebreide waardplantenreeks; 166 plantesoorten behorend tot 34 families bleken er vatbaar voor te zijn (Best, 1968). Diverse synoniemen zijn gebruikt voor het virus zoals Krommek-virus, *Lycopersicum*-virus 3, "Pineapple yellow spot virus", "Tomato bronze leaf virus" en "Vira cabeça"-virus (Ie, 1970).

Best en Katekar (1964) toonden aan dat het virus lipiden bevatte. In de daaropvolgende jaren werd aan de hand van ultradunne coupes van geïnfecteerd blad en van negatief gecontrasteerde deeltjes duidelijk dat het virus een membraan bevatte (Best en Palk, 1964; Ie, 1964; Van Kammen et al., 1966). Ondanks het feit, dat er diverse zuiveringsmethoden voor het virus zijn gepubliceerd (Black et al., 1963; Best en Palk, 1964; Martin, 1964; Van Kammen et al., 1966; Best, 1968; Gumpf en Weathers, 1972; Tsakiridis en Gooding, 1972; Joubert et al., 1974; en Paliwal, 1974) is weinig onderzoek verricht naar de samenstelling van eiwit en nucleïnezuur in het virus en naar de aard en eigenschappen van de membraan.

Onlangs echter hebben Mohamed et al. (1973) de eiwitsamenstelling van TSWV gepubliceerd. Zij vonden drie "hoofdeiwitten" met molecuulgewichten van 84.000, 50.000 en 29.000 D en een eiwit met een molecuulgewicht van 220.000 D, dat in geringe hoeveelheid voorkwam. De drie "hoofdeiwitten" waren geglycosyleerd. Na behandeling van het virus met NP-40 werd een sferisch subdeeltje, dat in geringe mate infectieus was uit het virus geïsoleerd. Dit sferische deeltje bevatte de eiwitten met de molecuulgewichten 29.000 en 220.000 D en slechts geringe hoeveelheden van de overige eiwitten.

Gegevens over het nucleïnezuur van het virus zijn uiterst summier. Van Kammen et al. (1966) en Best (1968) concludeerden op basis van hun experimenten dat het nucleïnezuur van TSWV RNA is. Best (1968) gaf verder als basensamenstelling: guanine 38%, adenine 35%, cytosine 9% en uracil 19%.

Een van de gevolgen van de beperkte informatie over dit virus is dat het cryptogram van TSWV, dat een belangrijke sleutel levert tot classificatie, nog niet volledig is. In dit cryptogram (R/* : */* : S/S : S/Th; Ie, 1970) ontbreken

de gegevens over het enkel of dubbelstrengig karakter van het RNA, het molecuulgewicht van het nucleïnezuur en het percentage nucleïnezuur.

De doelstelling van dit onderzoek was dan ook om meer gegevens over eiwit en nucleïnezuur van het virus te verzamelen teneinde met behulp van de verkregen informatie een model te ontwikkelen, dat als uitgangspunt voor verder onderzoek kan dienen. Een bijkomend aspect is dat een membraanvirus zoals TSWV de mogelijkheid biedt tot de studie van een relatief eenvoudig membraansysteem, dat in tegenstelling tot cellulaire membraansystemen ook veel zuiverder geïsoleerd kan worden.

Om het gunstigste tijdstip van het oogsten van virusziek blad te kunnen bepalen werd de virusverdeling in *N. rustica* op een aantal tijdstippen na inoculatie bestudeerd. De gebruikte zuiveringsprocedure voor isolatie van TSWV uit *N. rustica* werd ter discussie gesteld (Hoofdstuk 3). Tegen het gezuiverde virus werden antisera bereid. Dit leidde tot een onderzoek naar de antigene samenstelling van TSWV en de ontdekking van waardantigeen in gezuiverd TSWV (Hoofdstuk 4). Met behulp van elektroforese in polyacrylamidegel werden aantal en molecuulgewichten van de viruseiwitten bepaald en tevens werd nagegaan welke eiwitten covalent gebonden koolhydraten bevatten. Uit de labeling van ongefragmenteerd virus met ^{125}J onder invloed van lactoperoxydase en H_2O_2 werd de lokalisatie van de diverse eiwitten in het virusdeeltje bepaald (Hoofdstuk 5).

Het nucleïnezuur van TSWV werd geïsoleerd met behulp van fenol-SDS en geanalyseerd op polyacrylamidegel. Het nucleïnezuur bleek in segmenten aanwezig te zijn. De aard van het nucleïnezuur werd bepaald uit de gevoeligheid voor RNase en DNase, het gedrag in 2 M LiCl, de gevoeligheid voor verhitting op 100°C en de mobiliteit in gels met toenemend percentage acrylamide. De molecuulgewichten van de RNA-segmenten werden zowel onder niet-denaturerende als denaturerende omstandigheden bepaald (Hoofdstuk 6).

Door dissociatie van de membraan van het virus met NP-40 kwam een infectieus ribonucleoproteïne vrij, dat door centrifugering op een gradiënt van andere virusfragmenten werd gescheiden. Door analyse van dit ribonucleoproteïne op polyacrylamidegel werd nagegaan welke eiwitten hiermee geassocieerd waren (Hoofdstuk 7).

Met de verkregen resultaten werd, mede aan de hand van wat bekend is bij andere membraanvirussen, een voorlopig model van het virus samengesteld.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Virus

Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van twee TSWV-isolaten, die resp. TSWV-S en TSWV-PD genoemd werden. TSWV-S werd verkregen door een isolaat van TSWV dat door Ir. Ie was verstrekt, op *Nicotiana glutinosa* over te brengen. Hierop werden twee typen lesies verkregen nl. vage gele vlekken en zich uitbreidende necrotische lesies. Door een necrotische lesie uit te ponsen en als inoculum te gebruiken kon na herhaalde passages tenslotte virus verkregen worden dat uitsluitend necrotische lesies gaf op *N. glutinosa*. Dit virus werd aangeduid als TSWV-S.

TSWV-PD was afkomstig uit een zieke *Amaryllis*-plant van de Plantenziektenkundige Dienst. Dit isolaat was verkregen door het sap van de betrokken *Amaryllis*-plant te inoculeren op *N. rustica*. Op *N. glutinosa* gaf dit isolaat uitsluitend necrotische lesies. Beide virusisolaten werden in stand gehouden in zowel *N. rustica* als *Tropaeolum majus*. TSWV-PD werd gebruikt voor onderzoek van het nucleïnezuur van het virus. Al het overige onderzoek werd verricht met TSWV-S.

2.2. Plantemateriaal

Het virus werd vermeerderd in *N. rustica*. Gebruik werd gemaakt van twee *N. rustica*-variëteiten. Een variëteit was op het Laboratorium voor Virologie aanwezig. De andere werd verstrekt door Dr. L.M. Black. Deze verschilde van de eerste door een meer gedrongen groeiwijze, kortere bladstelen en grotere bladeren (Van der Want et al., 1975).

De planten werden uit zaad opgekweekt bij een temperatuur van 21-24°C en een relatieve vochtigheid van 60-90%. Na 10 dagen werden de plantjes verspeend en na 20-25 dagen werden ze overgebracht in potten met een inhoud van 2 l. Ongeveer een week later werd het laatste volgroeide blad en de bladeren daaronder geïnoculeerd met TSWV uit een systemisch geïnfecteerd blad van *N. rustica* of met TSWV uit *T. majus*.

De systemisch geïnfecteerde bladeren werden doorgaans 12-14 dagen na inoculatie geogst. In geval de geïnoculeerde bladeren een vrij hevige reactie, nl. veel lokale lesies, vertoonden werden deze na 5-6 dagen geogst en eveneens gebruikt voor zuivering van TSWV.

Gedurende de zomermaanden bestond de belichting uitsluitend uit daglicht. In de wintermaanden werd gedurende 16 uur extra belicht met HPI/T-lampen van 400 Watt.

De gebruikte grond was een mengsel van 10% stalmest, 25% "finn peat" (ST 400), 20-40% turfstrooisel en 25% bladaarde. De pH van de grond was 5,6-5,7.

2.3. Infectiositeitstoetsing

De infectiositeit van gezuiverde en onzuivere TSWV-preparaten werd bepaald op afgesneden bladeren van *Petunia hybrida* cv. Pink Beauty. Deze bladeren werden na inoculatie op vochtig filtreerpapier in petrischalen bij 18°C onder continue belichting geïncubeerd. Binnen 48 uur waren de lesies meestal zichtbaar. Na 3 dagen werden ze geteld. Voor een nauwkeuriger vergelijking van de infectiositeit van twee monsters werden deze op bladhelften van hetzelfde blad uitgestreken. De variatie in vatbaarheid ten aanzien van infectie tussen linker en rechter bladhelft was nl. minder dan tussen bladeren onderling.

2.4. Zuivering van het virus

Alle behandelingen werden uitgevoerd in de koude kamer of in ijs, en met gekoelde centrifuges. De zuivering van het virus is weergegeven in Schema 3.1 (Hoofdstuk 3). In de gevallen waarin van de zone-rotor B XIV in de MSE 50 centrifuge gebruik gemaakt werd, werd na supernatant 4 verder gewerkt volgens Schema 3.2.

Centrifugeren bij laag toerental vond plaats in een Servall-centrifuge van het type SS-1 of RC-2. Bij het opwerken van grote hoeveelheden blad bv. hoeveelheden van 200 gram werd 10 min bij 8000 rpm gecentrifugeerd in de MSE 18-centrifuge met de 6x250 ml rotor.

Concentrering van supernatant 1 en 2 vond plaats in de R 30-rotor van de Spinco-L-ultracentrifuge. In geval van grote volumina werd gebruik gemaakt van de 6x250 ml rotor van de MSE 18-centrifuge (1,5 uur bij 12.000 rpm). De gradiënt-centrifugeringen werden uitgevoerd met een SW 25-rotor van een Spinco-L-ultracentrifuge.

De hoeveelheid antiserum die in de zuiveringsprocedure toegevoegd werd, was afhankelijk van de werkzaamheid van het desbetreffende antiserum en de mate waarin het virus verontreinigd was. Was het viruspreparaat na antiserumbehandeling nog wat groenig dan werd nogmaals antiserum toegevoegd en opnieuw geïncubeerd. Bij zeer verontreinigde preparaten werd gedurende de nacht met antiserum geïncubeerd.

Bij gebruik van de zone-rotor was de inpompsnelheid van de eerste gradiënt ongeveer 22 ml per min. De gradiënt werd dan in ongeveer 30 min in de rotor gevormd. Vervolgens werd de virussuspensie waaraan 7% suiker was toegevoegd op de gradiënt gebracht en hierop kwam ongeveer 100 ml buffer. Na centrifugering werd de gradiënt uitgepompt met een 40% (^w/w) suikeroplossing.

Tijdens in- en uitpompen van de gradiënt was de snelheid van de rotor 3000 rpm. De tweede gradiënt werd uitgepompt met een 60% (^w/w) suikeroplossing. De optische dichtheid van de uitgepompte gradiënt werd gemeten bij 254 nm met behulp van een Uvicord optical unit (type 4701 A) gekoppeld aan een recorder.

2.5. Bereiding van nucleïnezuur

Sedimenten van gezuiverd virus werden opgelost in 0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,001 M Na₂EDTA, pH 7,6, waaraan 1% SDS toegevoegd was. Gedurende 10 min werd krachtig geroerd bij kamertemperatuur en na afkoelen tot 4°C werd een gelijk volume met buffer verzadigd fenol, dat 0,1% 8-hydroxychinoline bevatte, toegevoegd. Na 10 min roeren bij 4°C werd de waterfase van de fenolfase gescheiden door een centrifugering van 15 min bij 3000 rpm in een tafelcentrifuge in de koude kamer. Aan de fenolfase werd 1/3 volume buffer toegevoegd; de waterfase, die na 10 min roeren en afcentrifugeren bij bovengenoemde snelheid werd verkregen, werd gecombineerd met de reeds eerder verkregen waterfase. De gecombineerde waterfasen werden driemaal uitgetrokken met 1/3 volume met buffer verzadigd fenol. Daarna werd het nucleïnezuur neergeslagen met 2,5 volume ethanol en een paar druppels 3 M Na-acetaat, pH 5,5. De precipitatie werd voltooid door dit mengsel gedurende een nacht bij -20°C te bewaren. Het sediment, dat werd verkregen door centrifugering bij 3000 rpm gedurende 15 min in een tafelcentrifuge, werd driemaal uitgewassen met 70% ethanol die 0,1 M Na-acetaat bevatte. Het nucleïnezuur werd bewaard in ethanol of in 1xSSC bij -20°C.

2.6. Zuivering van polysacchariden uit niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten

Blad van *N. rustica* (20 g) werd gemalen in een Waring Blendor met 40 ml 0,1 M Tris-HCl buffer, pH 7,2. Het homogenaat werd door kaasdoek geperst en 20 min bij 10.000 g gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd 15 min bij 100°C verhit om eiwitten te denatureren. De uitgevlokte eiwitten werden door filtratie of door centrifugering bij laag toerental verwijderd. Het extract werd drooggevroren en daarna in 10 ml bidest opgenomen. De polysacchariden werden nu geprecipiteerd door 15 ml aceton toe te voegen. Het precipitaat werd door 10 min centrifugeren bij 5.000 g neergeslagen en opgelost in 1,5 ml bidest. Hieraan werd een gelijk volume 25% TCA toegevoegd. Het neerslag werd afgecentrifugeerd en de polysacchariden werden geprecipiteerd door 30 ml aceton toe te voegen. Het sediment werd opgenomen in gedestilleerd water en gedurende 48 uur bij 4°C tegen verschillende wisselingen van gedestilleerd water gedialyseerd. Een eventueel precipitaat, dat tijdens de dialyse ontstond werd door centrifugering bij laag toerental verwijderd. De hierboven beschreven methode is in grote lijnen identiek met de methode van Willers et al. (1964).

2.7. Bereiding van een antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde *N. rustica*

Niet geïnfecteerd *N. rustica*-blad werd met 4 volumina 0,1 M Tris buffer, pH 8,0, gedurende 30 sec bij laag toerental in een Waring Blendor gemalen. Vervolgens werden de grove bestanddelen door een centrifugering verwijderd (10 min, 10.000 g). De supernatant werd gecentrifugeerd bij hoog toerental (30 min, 25.000 rpm) en het sediment geresuspendeerd in 2,5 of 4 ml 0,01 M Tris, pH 8,0. Deze suspensie werd gebruikt voor immunisatie van een konijn volgens Schema 2.1.

Schema 2.1 Injectieschema voor bereiding van een antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde *N. rustica*-bladeren

| No. injectie | dag | antigeen-oplossing | plaats van injectie |
|--------------|-----|---|------------------------------------|
| 1 | 0 | extract van 2,5 g blad in 4 ml | onder de huid |
| 2 | 10 | extract van 5 g blad in 2,5 ml gemengd met 2,5 ml Freund's "adjuvant incomplete" | intramusculair en onder de huid |
| 3 | 20 | extract van 10 g blad in 2,5 ml gemengd met 2,5 ml Freund's "adjuvant incomplete" | intramusculair en onder de huid |

Ongeveer 10 dagen na de laatste injectie werd 20-60 ml bloed afgetapt. Vervolgens werd wekelijks bloed afgenomen tot de titer duidelijk daalde, waarna het konijn nog eens geïnjecteerd werd met een antigeen-oplossing die identiek was aan die van de derde injectie (Schema 2.1).

2.8. Bereiding van antisera tegen TSWV

In totaal werden vijf antisera bereid nl. vier in konijnen en een in een geit.

Volgens het immunisatieschema 2.2 werden 3 konijnen gefimmuniseerd met TSWV. Ongeveer 10 dagen na de laatste injectie werd voor de eerste keer bloed afgetapt en voorts wekelijks. De titers van de antisera, die door middel van dubbele diffusie in agargel werden bepaald, liepen nogal uiteen. De hoogste titer, die met dit schema bereikt werd, was 32. Dit antiserum wordt aangeduid als antiserum 1. De twee overige antisera hadden elk een titer van 2, hetgeen zeer laag genoemd kan worden, en werden niet gebruikt.

Schema 2.2 Immunisatie via onderhuidse en intramusculaire injectie van TSWV in konijnen

| No. injectie | dag | antigeen-oplossing | plaats van injectie |
|--------------|-----|--|------------------------------------|
| 1 | 0 | 1 ml TSWV + 1 ml bidest | onder de huid |
| 2 | 10 | 2 ml TSWV + 2 ml Freund's "adjuvant incomplete" | intramusculair en onder de huid |
| 3 | 20 | 2 ml TSWV + 2 ml Freund's "adjuvant incomplete" | intramusculair en onder de huid |

Schema 2.3 Immunisatie van een konijn met TSWV via injectie in de voetkussentjes gevolgd door een "booster"-injectie in de oorader

| No. injectie | dag | antigeen-oplossing | plaats van injectie |
|--------------|-----|---|-------------------------------------|
| 1 | 0 | 0,15 ml virus gemengd met 0,15 ml Freund's "adjuvant complete" | voetkussentje linker achterpoot |
| 2 | 10 | 0,15 ml virus gemengd met 0,15 ml Freund's "adjuvant complete" | voetkussentje rechter achterpoot |
| 3 | 52 | 0,1 ml virus | intraveneus |
| 4 | 94 | 0,1 ml virus | intraveneus |

Schema 2.4 Immunisatie van een geit met TSWV door injectie in de nekspier

| No. injectie | dag | antigeen-oplossing | plaats van injectie |
|--------------|-----|--|---------------------|
| 1 | 0 | 2 ml virus + 8 ml PBS + 466 mg Na-alginaat ^a | in de nekspier |
| 2 | 15 | idem 1 | " |
| 3 | 55 | 2,5 ml virus + 7,5 ml PBS + 466 mg Na-alginaat | " |

^a Na-alginaat werd zeer langzaam aan 10 ml van de virusbevattende oplossing toegevoegd. Na toevoeging van deze stof had men een dikke gelei-achtige massa, die ingespoten werd.

Volgens schema 2.3 werd een konijn geïmmuniseerd. De hierbij gevolgde methode was afkomstig van Dr. Ziemiecki. Deze methode leverde een vrij goed antiserum op. Na de 3^e inspuiting was de titer 128 bij immunodiffusie in agargel. Dit antiserum wordt aangeduid als antiserum 2.

Volgens Schema 2.4 werd een geit geïmmuniseerd. Bloed werd afgenomen uit de halsader. De titer van dit antiserum was 2. Dit antiserum werd niet verder gebruikt.

2.9. Verzadiging van TSWV-antiserum

TSWV-antiserum werd verzadigd met resp. *N. rustica*-sap (2.9.2) of met polysacchariden uit *N. rustica*-sap (2.9.1) om een specifiek antiserum tegen het virus te verkrijgen.

Verzadiging van TSWV-antiserum met gedenatureerd TSWV (2.9.3) had tot doel aan te tonen dat aldus verzadigd antiserum nog duidelijk reageert met niet gedenatureerd virus.

Verzadiging van TSWV-antiserum met intact virus (2.9.4) was gebaseerd op de gedachte dat op deze wijze een specifiek antiserum tegen een eventueel aanwezige, intern in het virus gelokaliseerde, antigene determinant verkregen kon worden.

2.9.1. Verzadiging van TSWV-antiserum met polysacchariden uit *N. rustica*

Polysacchariden werden uit niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten gezuiverd volgens de methode beschreven onder 2.6. Door bepaalde quanta drooggevroren polysacchariden toe te voegen aan de antisera en vervolgens te toetsen tegen *N. rustica*-sap met behulp van immunodiffusie in agargel, kon nagegaan worden hoeveel minimaal toegevoegd moest worden om een bepaald serum te verzadigen met polysacchariden.

Teneinde de γ -globulinen tegen polysacchariden weg te nemen, werden de sera een uur bij 37°C geïncubeerd met een hoeveelheid polysacchariden die tweemaal groter was dan de hoeveelheid minimaal nodig om het serum te verzadigen. Deze suspensie werd gedurende de nacht bij 2°C bewaard. Het eventueel gevormde precipitaat werd door middel van centrifugering bij laag toerental verwijderd.

2.9.2. Verzadiging van TSWV-antiserum met *N. rustica*-sap

Blad van niet geïnfecteerde *N. rustica* werd met 0,1 M Tris-HCl, pH 8, in een mortier met stamper fijn gemaakt. Het sap werd door kaasdoek geperst. Grove bestanddelen werden verwijderd door 10 min bij 10.000 g te centrifugeren. De fijne bestanddelen werden geconcentreerd door het supernatant gedurende 30 min bij 25.000 rpm in de R 30-rotor van een Spinco-L-ultracentrifuge te centrifugeren. Het sediment, dat afkomstig was van 10 g bladmateriaal, werd zorgvuldig geresuspendeerd in 1 ml onbehandeld TSWV-antiserum. Dit mengsel werd vervolgens 1 uur bij 37°C geïncubeerd en gedurende de nacht bij 2°C bewaard. Het plantemateriaal en het eventueel gevormde precipitaat werden verwijderd door de suspensie 30 min bij 30.000 rpm in een R 40-rotor van een Spinco-L-ultracentrifuge te centrifugeren.

2.9.3. Verzadiging van TSWV-antiserum met gedenatureerd virus

TSWV werd gedenatureerd met 1% SDS en 1% ME en vervolgens bij 2°C gedialyseerd tegen 0,01 M Tris, pH 8. Het gedenatureerde TSWV werd over 4 buisjes verdeeld in hoeveelheden van 0,1; 0,2; 0,4 en 0,8 ml en dan drooggevroren. Vervolgens werd aan deze buisjes 0,1 ml TSWV-antiserum toegevoegd. Dit mengsel werd 1 uur bij 37°C geïncubeerd en vervolgens een nacht bij 2°C bewaard. De precipitaten konden vanwege de kleine volumina niet verwijderd worden.

2.9.4. Verzadiging van TSWV-antiserum met intact virus

De viruszone uit een tweede suikergradiënt werd tot 15 ml aangevuld en in hoeveelheden van 1, 2, 4 en 8 ml verdeeld. Het virus werd daarna geconcentreerd in de R 40-rotor van een Spinco-L-ultracentrifuge. De virussedimenten werden opgelost in 0,1 ml TSWV-antiserum 2. Deze suspensies werden eerst een uur bij 37°C en vervolgens een nacht bij 2°C geïncubeerd. De precipitaten werden niet verwijderd.

2.10. De dubbele agargeldiffusie-methode

Het virus en de diverse antisera werden volgens de dubbele agargeldiffusie-methode getoetst op schone en vetvrije voorwerpglasjes. Voor dit doel werden oplossingen van 1% agar of agarose in 0,05 M Tris-HCl buffer pH 8,0, waaraan 0,05% Na-azide was toegevoegd, bereid door verwarming in een kokend waterbad. Na afkoelen tot ongeveer 40-50°C werd 2,5 ml op de voorwerpglasjes gepipetteerd. Na stolling van de agar resp. agarose werden de voorwerpglasjes op glazen staafjes in petrischalen geplaatst, waarin een hoge luchtvochtigheid in stand gehouden werd door de aanwezigheid van vochtig filtreerpapier.

2.11. Serologie van gedenatureerde viruseiwitten in polyacrylamidegels

Na scheiding van de gedenatureerde viruseiwitten door middel van elektroforese in polyacrylamidegel werd deze gel in de lengte doorgesneden en met de platte kant op een voorwerpglas met 1% agar(ose) gelegd. Op een afstand van 5 mm van de gel werden sleuven van 1 mm in de agar(ose)laag gemaakt evenwijdig aan de gel. Deze sleuven werden gevuld met het te toetsen antiserum. De voorwerpglazen werden daarna in petrischalen met vochtig filtreerpapier geïncubeerd. De precipitatie ontwikkelde zich in 1-2 dagen bij kamertemperatuur.

2.12. Extractie van TSWV met chloroform-methanol

Om de lipiden uit het virus te extraheren werd een volume virussuspensie gemengd met 30 volumina van een chloroform-methanol (2:1) mengsel. Na 5 min krachtig schudden in een scheidrecther, werd het mengsel een nacht bij 2°C bewaard. Hierna werd 1/3 volume methanol toegevoegd en de oplossing bij laag toerental afgedraaid. Het sediment werd nu gewassen met een chloroform-methanol (1:1) mengsel. Beide extracten werden gecombineerd en het volume werd gereduceerd

in een filmverdamer. Dit extract zal aangeduid worden als het chloroform - methanol extract van TSWV. De hier beschreven methode is in grote lijnen identiek met de methode van Gahmberg en Hakomori (1973).

2.13. Afbraak van eiwit met SDS en ME en carboxymethylering met joodaceetamide

TSWV werd afgebroken door aan 3 volumina virus 1 volume 4% SDS + 4% ME in 0,01 M Na-fosfaatbuffer, pH 7, toe te voegen.

Deze oplossing werd een uur bij 37°C geïncubeerd. Vervolgens werd het gereduceerde eiwit door toevoeging van joodaceetamide tot een eindconcentratie van 0,3 M gecarboxymethyleerd gedurende een uur bij 37°C. De reactie werd gestopt door een overmaat ME toe te voegen. De zouten werden geëlimineerd door het reactiemengsel gedurende een nacht bij kamertemperatuur tegen 0,01 M Na-fosfaatbuffer, dat 0,1% SDS bevatte te dialyseren.

2.14. Elektroforese in polyacrylamidegel

2.14.1. Elektroforese van eiwit

In experimenten ter bepaling van molecuulgewichten van viruseiwitten werden geherkristalliseerd acrylamide en bisacrylamide gebruikt. Herkristallisatie werd uitgevoerd volgens de methode van Shepherd (1966). Voor de overige experimenten werden acrylamide en bisacrylamide meestal niet geherkristalliseerd.

Voor elektroforese van de eiwitten werden glazen of perspex buisjes (65x6 mm) gebruikt. De buisjes werden verticaal in een rekje geplaatst en aan de onderzijde afgesloten met parafilm. De bereiding van de gels was volgens Weber en Osborn (1969). Na het inpipetteren van de acryloplanning werd hierbovenop met behulp van een uitgetrokken pasteurpipet een laagje van ca. 5 mm gedemineraliseerd water gebracht om op deze wijze een scherp grensvlak te verkrijgen.

Na polymeriseren werden de gels in een Acrylophor elektroforese-apparaat geplaatst. De beide compartimenten van de Acrylophor werden gevuld met 0,01 M Na-fosfaatbuffer, pH 7, waaraan 0,1% SDS was toegevoegd. Vervolgens werd de te onderzoeken eiwitsuspensie, waaraan 5% suiker of glycerine en 50 µg broomfenolblauw was toegevoegd, voorzichtig bovenop de gels gebracht. De gels werden gedurende 2,5-3 uur geëlektroforeerd bij een stroomsterkte van 8 mA/gel. Na elektroforese werden de gels onder water met behulp van een injectienaald voor-

zichtig uit de buisjes verwijderd. De positie van de broomfenolblauwband werd gemerkt met Oostindische inkt.

Het eiwit werd op de gels gelokaliseerd door kleuring met 0,2% coomassie brilliant blue in een mengsel van methanol, azijnzuur en water (45,4 : 9,2 : 45,4) gedurende 30 min. Gels werden ontkleurd in 7% azijnzuur.

De glycoproteïnen werden gedetecteerd volgens de methode van Zacharius et al. (1969). Eventuele achtergrondskleuring werd verwijderd door de gels in 15% azijnzuur te incuberen.

Voor de bepaling van de molecuulgewichten van de TSWV-eiwitten werd gebruik gemaakt van de volgende eiwitten van bekend molecuulgewicht: cytochroom c (11.700 D), ribonuclease A (13.700 D), TMV-eiwit (17.400 D), trypsine (23.300 D), carboxypeptidase A (34.600 D), ovalbumine (43.000 D), katalase (60.000 D), runderserumalbumine (68.000 D) en fosforylase a (94.000 D). De molecuulgewichten zijn ontleend aan Weber en Osborn (1969) en Dunker en Rueckert (1969).

De relatieve mobiliteit van de eiwitten werd berekend door de afstand afgelegd door de eiwitten te delen door de afstand afgelegd door de broomfenolblauwband.

De patronen van de met coomassie brilliant blue gekleurde gels werden vastgelegd door de optische dichtheid te bepalen met een densitometer met een spleetbreedte van 0,05 cm (Photovolt model 520-A) gekoppeld aan een lin/log recorder (Photovolt model 43 Varicord).

2.14.2. Labeling van TSWV met ^{125}J

Teneinde het virus met ^{125}J te labelen werd 0,2 ml virussuspensie met 0,05 M Na-fosfaatbuffer, pH 7,2, aangevuld tot een volume van 2 ml, waarna 20 μl 0,1 mM KJ, 25 μl 0,25 mM H_2O_2 en de gewenste hoeveelheid ^{125}J werden toegevoegd. De reactiemengsels werden nu op kamertemperatuur gebracht en de reactie werd gestart door 25 μl lactoperoxydase ($E_{280} = 0,125$; $E_{412} = 0,075$) aan elk reactiemengsel toe te voegen. Na 2 min werd nog eens 25 μl H_2O_2 (0,25 mM) toegevoegd. Na 4 min werd wederom 25 μl lactoperoxydase (zelfde conc.) toegevoegd, gevolgd door 25 μl H_2O_2 (0,25 mM) na resp. 6 en 8 min. Na 10 min werd de reactie gestopt door de buizen in ijs te plaatsen.

Het gelabelde intacte virus werd geconcentreerd door centrifugering bij 38.000 rpm in een SW 39-rotor van een Spinco-L-ultracentrifuge. De met NP-40 afgebroken preparaten werden geconcentreerd door 2 volumina ijskoude ethanol gevolgd door een centrifugering bij laag toerental. In geval van lage concentratie van NP-40 (bv. 0,05%) werd het eiwit ook wel met een gelijk volume 25% TCA neergeslagen. De verkregen sedimenten werden op de gebruikelijke wijze met SDS, 2-ME en joodaceetamide afgebroken en gedurende een nacht gedialyseerd tegen 0,01 M Na-fosfaatbuffer, pH 7, dat 0,1% SDS bevatte. Na dialyse werden de eiwitten geëlektroforeerd op 7,5% polyacrylamidegels bij een stroomsterkte van 8 mA/gel gedurende ongeveer 2,5 uur. Na het beëindigen van de elektroforese werden de radioactieve gels in plakjes van 1 mm gesneden met behulp van een "Mickle gel slicer", de overige gels werden gekleurd met coomassie brilliant blue.

De radioactieve gels werden na elektroforese bevroren door toevoeging van vast CO₂ of door de gels in de diepvrieskast te plaatsen. Na bevriezen werden met een "gel slicer" plakjes van 1 mm gesneden. De plakjes werden in telbuisjes gebracht en de radioactiviteit werd bepaald in een "single channel" γ -spectrometer (Philips).

2.14.3. Elektroforese van nucleïnezuur

Voor de elektroforese van het nucleïnezuur van het virus werden geherkristalliseerd acrylamide en bisacrylamide gebruikt (2.14.1).

Het nucleïnezuur werd geëlektroforeerd zowel volgens de methode van Loening en Ingle (1967) als volgens de methode van Reijnders et al. (1973).

Voor een gedetailleerde beschrijving van de bereiding van de gels wordt verwezen naar Assink (1973). Gels werden in glazen buisjes (65x6 mm) gemaakt. Polymerisatie vond plaats bij 37°C gedurende 30 min. Hierna liet men de gels nog een nacht bij kamertemperatuur staan. Meestal werden de gels dan 12-16 uur voorgezwollen in elektroforesebuffer, waardoor de gels ongeveer 10% langer werden. Voor gebruik werden de boven en onderkant van de gel, die vaak afwijkende eigenschappen hebben, weggesneden. De lengte van de gel werd op 5,5 cm gebracht.

Bij elektroforese van nucleïnezuur volgens de methode van Loening en Ingle (1967) werden de gels gepreëlektroforeerd bij een stroomsterkte van 4 mA/gel in 0,036 M Tris-H₃PO₄, 0,03 M NaH₂PO₄·2H₂O, 0,001 M EDTA, pH 7,7, 0,1% SDS elektro-

foreseebuffer gedurende 1 uur bij 4°C. Hierna werd de elektroforesebuffer ververst. Vervolgens werd het nucleïnezuur, waaraan glycerine tot een concentratie van 5% was toegevoegd, bovenop de gels gebracht. De gels werden nu gedurende 3-4 uur bij een stroomsterkte van 4 mA/gel geëlektroforeerd.

Voor elektroforese onder denaturerende condities wordt verwezen naar Reijnders et al. (1973).

Na beëindiging van de elektroforese liet men de gels eerst enkele uren in water staan en vervolgens een nacht in 0,01% (^w/v) toluïdine blue 0 in 40% methanol. De gels werden vervolgens ontkleurd in water of in 1% azijnzuur en in het donker bewaard. In een aantal gevallen werd met 0,005% "Stains all" in 50% formamide volgens Dahlberg et al. (1969) gekleurd.

De nucleïnezuur patronen werden vastgelegd door de verdeling van de optische dichtheid bij 260 nm over de gel te bepalen met behulp van een Beckman DU-spectrofotometer voorzien van een Gilford 2410 Lineair Transport, een ERA attachment en een lin/log recorder (Beckman model 1005).

2.14.4. Incubatie met RNase en DNase

Na elektroforese van het virus-nucleïnezuur werden de gels 16 uur gewassen in 2xSSC. Hierna werden de gels geïncubeerd met 25 units/ml RNase T₁ en 25 µg/ml RNase A in 2xSSC bij kamertemperatuur. Per gel werd 15 ml van dit medium gebruikt. De verdeling van de optische dichtheid bij 260 nm over de gel werd zowel voor als na incubatie bepaald. In sommige gevallen werd na incubatie met RNase gekleurd met toluïdine blue 0.

Om de gevoeligheid van het virus-nucleïnezuur voor DNase te bepalen werden de gels gewassen in 2xSSC, waaraan 5 mM MgCl₂ was toegevoegd. De gels werden geïncubeerd met 5 µg/ml DNase 1 in hetzelfde medium (15 ml/gel).

2.15. Elektronenmicroscopie van virus

Het virus werd gefixeerd met een gelijk volume 5% glutaraaldehyde in bidest. Van de gefixeerde oplossing werd een druppel op een formvarvlies gebracht, dat met koolstof was versterkt. Na 1 min werd de overmaat vloeistof afgezogen met

een stukje filtreerpapier. Men liet de vloeistof vervolgens indrogen waarna men de objectdrager ongeveer 2 min omgekeerd op een wateroppervlak liet drijven om de glutaaraldehyde te verwijderen. Na wassen werd het preparaat gecontrasteerd met 2% PTA pH 6 of met een vers bereide, gefiltreerde oplossing van 1% uranylformiaat in bidest. Preparaten werden bekeken in een Siemens Elmiskop 1 of 101.

2.16. Elektronenmicroscopie van een aantal sedimenten, die geïsoleerd werden

De sedimenten werden gedurende ca. 24 uur in de koelkast in 1% OsO₄, dat in 0,025 M fosfaatbuffer pH 7,4 was opgelost, gefixeerd. Na fixatie werd het materiaal gewassen met dezelfde buffer en ontwaterd in stappen van 50-70-96% ethanol (ca. 10 min/stap) en in ethanol absoluut (2x10 min en 1x20 min).

Na deze behandeling werd ingebed in geprepolymeriseerd methacrylaat (butyl/methylester, 4:1). De coupes werden vervaardigd op een LKB-ultramicrotoom en gekleurd met uranylacetaat en loodcitraat volgens Reynolds (1963).

2.17. Chemicaliën

Acrylamide, Koch-Light, Labs. Ltd.

Alcian Blau, George T. Gurr

Bis, N, N-methylenebisacrylamide, Koch-Light, Labs. Ltd.

Bromelain, from pineapple, grade II, Sigma

Carboxypeptidase A, type II, 2xcrystallized, from bovine pancreas

Catalase, from beef liver, Sigma

Coomassie brilliant blue G-250, Serva, Heidelberg

Cytochrom c, Calbiochem, Los Angeles

DNA, type 1, from calf thymus, Sigma

DNase I, Sigma

DTT, Cleland's reagent, Calbiochem

Ovalbumin, Difco Labs Inc, Detroit

Fetuin (Spiro method), Grand Island Biological Co, Grand Island, New York

Galactose oxidase, from Polyporus circinatus, Type I, Sigma

Lactoperoxidase, from milk, 40-50 units/mg solid, Sigma

Nonidet P 40, Shell, kindly supplied

Peroxidase, horseradish, type VI, Sigma

Phosphorylase a, from rabbit muscle, Sigma

RNase A, type 1-A, 5xcrystallized from bovine pancreas, Sigma

RNase T₁, grade III, from *Aspergillus oryzae*, Sigma

Bovine serum albumin, fraction V, Sigma

Schiff reagent, Feulgen stain, George T. Gurr

Stains all, Serva, Heidelberg

Trypsin, 2 x crystallized from bovine pancreas, Sigma

¹²⁵J, carrier free, in NaOH solution pH 8-11, free from reducing agents,
80-140 mCi/ml, The Radiochemical Centre, Amersham, England.

Alle overige chemicaliën waren afkomstig van Merck, Darmstadt of van BDH,
Chemicals Ltd.

3. ZUIVERING VAN HET BRONSVLEKKENVIRUS VAN DE TOMAAT

Na 1960 zijn verschillende zuiveringsprocedures voor TSWV ontwikkeld (Black et al., 1963; Best en Palk, 1964; Martin, 1964; Van Kammen et al., 1966; Best, 1968; Gumpf en Weathers, 1972; Tsakiridis en Gooding, 1972; Joubert et al., 1974; en Paliwal, 1974).

Hoewel diverse auteurs getracht hebben om reeds gepubliceerde zuiveringsmethoden te gebruiken, waren hun daarmee bereikte resultaten meestal van dien aard dat ze zich genoodzaakt voelden nieuwe procedures te ontwerpen (Tsakiridis en Gooding, 1972; Joubert et al., 1974; en Paliwal, 1974).

Het basisschema van alle gepubliceerde zuiveringsprocedures bestaat uit differentiële centrifugeringen gevolgd door een zonecentrifugering. Voor de specifieke verwijdering van de nog resterende fragmenten van de waardplant zijn verschillende methoden in gebruik zoals precipitatie met calcium-glycerolfosfaat (Martin, 1964), evenwichtscentrifugering (Black et al., 1963), extractie met Freon 114 (Tsakiridis en Gooding, 1972), kolomchromatografie, precipitatie met PEG en zone-elektroforese (Joubert et al., 1974).

De zuiveringsprocedures zijn in twee groepen in te delen op grond van de keuze van de fractie voor verdere zuivering van het virus na centrifugering van het bladhomogenaat bij laag toerental. Best en Palk (1964), Best (1968), Joubert et al. (1974) en Paliwal (1974) zuiveren TSWV uitgaande van de supernatant, terwijl Black et al. (1963), Martin (1964), Van Kammen et al. (1966), Tsakiridis en Gooding (1972) en Gumpf en Weathers (1972) zuiveren uit het sediment.

Gezien de sedimentatie-constante van het virus, nl. ca. 524 *S* (Best, 1968) mogen we aannemen dat afzonderlijke virusdeeltjes niet sedimenteren als bij laag toerental wordt gecentrifugeerd. Het feit dat diverse auteurs uit het sediment zuiveren kan daarom alleen verklaard worden door aggregatie van virusdeeltjes aan elkaar ofwel associatie van virusdeeltjes aan snel sedimenterende celfragmenten van de waardplant. Bij elektronenmicroscopisch onderzoek van ultradunne coupes van met TSWV geïnfecteerd blad bleek het virus vaak in zogenaamde clusters in de cisternae van het endoplasmatisch reticulum voor te komen (Ie, 1964; Milne en De Zoeten, 1967; Milne, 1970; en Paliwal, 1974).

Mogelijk is er een verband tussen deze clusters en het snelle sedimenteren van het virus in sommige zuiveringsprocedures. Vergelijking van de resultaten van de diverse auteurs wordt bemoeilijkt, zo niet onmogelijk, door het gebruik van verschillende virusisolaten en waardplanten, welke elk op zich de waargenomen verschillen zouden kunnen verklaren.

Het feit dat TSWV een membraan heeft (Best en Palk, 1964; Ie, 1964; Van Kammen et al., 1966; en Paliwal, 1974), drukt zijn stempel op de gehele zuiveringsprocedure. Dit impliceert nl., dat slechts milde zuiveringsmethoden toegepast kunnen worden gebaseerd op sedimentatiesnelheid, dichtheid, lading, specifieke adsorptie of specifieke precipitatie.

Verder dient bij de zuivering rekening gehouden te worden met het feit dat het virus buitengewoon instabiel is. In ruw sap bij 2°C verliest het virus zijn infectiositeit in een tijdsbestek van 4 uur en wordt het in 10 min geïnactiveerd bij 46°C (Best, 1968).

Bij de zuivering van een virus wordt de uiteindelijke opbrengst behalve door de gevolgde zuiveringsprocedure mede beïnvloed door o.a. het virusisolaat, de waardplant, de wijze van inoculeren, type en ouderdom van de infectie etc. (Brakke, 1967).

Aan een aantal van deze aspecten werd in dit onderzoek aandacht besteed. Zo werden behalve *Nicotiana rustica* ook andere waardplanten van het virus o.a. *Pisum sativum*, *Nicotiana glutinosa*, *Sonchus oleraceus* en *Cucumis sativus* onderzocht op hun hoedanigheid om TSWV te vermeerderen. Uit de diverse op het laboratorium in stand gehouden virusisolaten werd een keuze gemaakt op grond van virusopbrengst in *N. rustica*.

Aangezien Black (1955) vermeldt dat de virusconcentratie in *N. rustica* achtereenvolgens toe- en afneemt, werd aandacht besteed aan de virusvermeerdering in *N. rustica* om op grond van de hieruit verkregen gegevens het juiste tijdstip van oogsten te kunnen bepalen (3.1). Gegevens over de infectiositeit van het virus in ruw perssap staan vermeld in 3.2. De zuivering van het virus uit *N. rustica* wordt besproken in 3.3, de infectiositeit en de morfologie van gezuiverd TSWV in resp. 3.4 en 3.5.

3.1. Concentratie van het virus in *N. rustica* op bepaalde tijdstippen na inoculatie

Bij deze proef werd uitgegaan van de veronderstelling dat er tijdens de vermeerdering van TSWV in *N. rustica* een constante relatie is tussen infectiositeit en virusconcentratie. Om in ieder geval variaties tussen de planten zoveel mogelijk uit te sluiten werden uit een groot aantal *N. rustica*-planten exemplaren van dezelfde grootte en habitus geselecteerd. Deze planten werden vervolgens verder opgekweekt onder geconditioneerde omstandigheden in Sherer-kasten tot het tijdstip van inoculatie. Van de te inoculeren planten werd steeds een bepaald blad of werden bepaalde bladeren geïnoculeerd. De bladeren werden daartoe genummerd te beginnen bij het onderste blad. Resp. 6, 9, 12 en 16 dagen na inoculatie werden de bladeren en internodiën met buffer in een mortier fijngemaakt en uitgeperst; vervolgens werd het sap geïnoculeerd op 4 bladhelften van *P. hybrida*. De resterende andere bladhelften werden gebruikt voor toetsing van de infectiositeit van het sap uit een overeenkomstig gedeelte van een duplo plant (Tabel 3.1) ofwel uit een overeenkomstig gedeelte van een plant, die op een andere wijze was behandeld (Tabel 3.2).

Er werden 2 proeven uitgevoerd en wel de eerste proef in september (Tabel 3.1) en de tweede in februari (Tabel 3.2). De infectiositeit van het sap uit diverse delen van de plant resp. 6, 9, 12 en 16 dagen na inoculatie van blad 8 met TSWV is opgenomen in Tabel 3.1. Uit deze tabel blijkt, dat na 6 dagen virus aanwezig is in blad 11 en in de wortels. In bladeren en internodiën boven blad 11, welke dan nog zeer klein zijn, werd geen infectiositeit gevonden.

Tussen 6 en 9 dagen vindt een aanzienlijke virusvermeerdering plaats getuige de sterk verhoogde infectiositeit op dag 9 in de systemisch zieke bladeren, de internodiën en de wortels. De gehele top is dan systemisch ziek. Daarna neemt de infectiositeit van de topbladeren nog toe terwijl deze in de rest van de plant vrijwel constant blijft. Wat verder opvalt in deze tabel is dat blad 9 niet of matig geïnfecteerd wordt. Uit het verloop van de infectiositeit blijkt verder dat deze in de internodiën langzamer toeneemt dan in de bladeren en over het algemeen lager blijft.

De verdeling van de infectiositeit in planten, die resp. op blad 7 en 8 en op blad 8 en 9 werden geïnoculeerd, werd 6, 9, 12 en 16 dagen na inoculatie bepaald (Tabel 3.2). De opbouw van de infectiositeit geschiedt nu langzamer dan in

september (Tabel 3.1). De grootste virusvermeerdering vindt pas vrij laat plaats, nl. in de periode van 12-16 dagen na inoculatie in tegenstelling tot 6-9 dagen in september. Er is 6 dagen na inoculatie nog geen virus aantoonbaar behalve in de geïnoculeerde bladeren. Na 9 dagen vertonen de topbladeren symptomen hoewel nog geen infectiositeit gevonden wordt. De symptoomvorming gaat hier dus vooraf aan een aantoonbare virusvermeerdering. Blad 9 wordt na inoculatie van blad 7 en 8 niet geïnfecteerd en vertoont ook geen symptomen in het verdere verloop van het infectieproces. Inoculeren van blad 8 en 9 is in vergelijking met inoculeren van blad 7 en 8 gunstiger gezien de snellere opbouw van de infectiositeit (vergelijk hiervoor de virusverdeling en de mate van infectiositeit van resp. plant 3 met 4, en plant 5 met 6). De maximaal te bereiken virusconcentratie is mogelijk dezelfde ongeacht of nu blad 7 en 8, of blad 8 en 9 geïnoculeerd waren, gezien de infectiositeit van plant 7 en 8 op de 16^e dag na inoculatie.

De hier gebruikte lokale-lesietoets, die ter meting van de infectiositeit werd gebruikt, pretendeert geenszins een exacte schatting van de virusconcentratie te geven. Het feit dat niet beschikt kon worden over een oplossing van TSWV met een bekende concentratie aan virus maakt het onmogelijk om te corrigeren voor variaties in de vatbaarheid van de *Petunia*-bladeren. Verder zou o.a. elk monster van blad en internodium in verdunningen geïnoculeerd moeten worden om tot een juiste schatting van de virusconcentratie te komen. Voorts is het moeilijk om te corrigeren voor aggregatie van virusdeeltjes en het voorkomen van clusters. Ondanks deze beperkingen kunnen we toch wel enkele algemene tendensen in bovenbeschreven proeven onderkennen. Zo hangt het tijdstip van oogsten nauw samen met het seizoen. In de zomer kan veel vroeger geoogst worden dan in de winter, aangezien in de winter de virusvermeerdering langzamer is. Een goede indicatie voor infectie vormen de symptomen. Bladeren die geen symptomen vertonen bevatten over het algemeen geen virus. Wel bestaat het gevaar, dat de bovenste topbladeren op het moment van oogsten nog nauwelijks virus bevatten (vooral in de winter). Een fluctuerend verloop van de infectiositeit zoals gevonden door Black (1955) kon over de door ons onderzochte periode van 16 dagen niet geconstateerd worden.

Tabel 3.1 Verdeling van de infectiositeit in *Nicotiana rustica* in september resp. 6, 9, 12 en 16 dagen na inoculatie van blad 8

| | 6 dagen | | | | 9 dagen | | | |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------|--------|---------|--------------------|---------|--------|
| | plant 1 | | plant 2 | | plant 3 | | plant 4 | |
| | sympt. ^a | lesies ^b | sympt. | lesies | sympt. | lesies | sympt. | lesies |
| top | | | | | | | | |
| blad 12 | | 0 ^c | 0 | | nv | 132 | nv | 110 |
| internodium 11-12 | | | | | | | | |
| blad 11 | nv | 13 | nv | 14 | nv | + 300 ^d | nv | + 325 |
| internodium 10-11 | | 0 | | 1 | | + 275 | | + 175 |
| blad 10 | nv | 3 | nv | 100 | nv | + 250 | nv | + 275 |
| internodium 9-10 | | 0 | | 1 | | + 300 | | + 275 |
| blad 9 | | 0 | | 0 | | 0 | | 131 |
| internodium 8-9 | | 0 | | 13 | | + 275 | | + 275 |
| blad 8 | | + 200 | | + 225 | vl | + 325 | vl | + 375 |
| internodium 7-8 | | 1 | | 1 | | + 350 | | + 375 |
| stengeldeel | | | | | | | | |
| beneden blad 7 | | 0 | | 1 | | 120 | | 103 |
| wortels | | 8 | | 14 | | + 200 | | + 200 |

^a symptomen op *N. rustica*: nv = nerfvergeling, vl = gele vlekken, d = deformatie, geen symptomen wanneer niets wordt vermeld.

^b het gemiddelde aantal vlekken op 4 halve bladeren van *P. hybrida* (blad/buffer = 1:2^w/w). De ene serie bladhelften werd gebruikt voor toetsing van plant 1 en de andere serie voor de toetsing van een overeenkomstig gedeelte van plant 2 etc.

| 12 dagen | | | | 16 dagen | | | |
|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| plant 5 | | plant 6 | | plant 7 | | plant 8 | |
| sympt. lesies | | sympt. lesies | | sympt. lesies | | sympt. lesies | |
| nv | + 275 | | + 225 | nv | + 225 | nv | + 175 |
| nv | + 425 | nv | + 425 | nv+d | + 275 | nv | + 325 |
| | + 325 | | | | + 300 | | + 225 |
| nv | + 350 | nv | + 375 | nv+d | + 225 | nv+d | + 300 |
| | + 225 | | + 250 | | + 300 | | + 275 |
| nv+vl | + 275 | nv | + 350 | nv+vl | + 325 | nv | + 275 |
| | + 275 | | + 325 | | + 375 | | + 350 |
| vl | 24 | vl | 167 | | 4 | nv | 166 |
| | + 225 | | + 275 | | + 325 | | + 300 |
| vl | + 325 | | + 375 | vl | + 275 | vl | + 275 |
| | + 350 | | + 325 | | + 325 | | + 350 |
| | 51 | | 178 | | 132 | | 132 |
| | + 175 | | + 150 | | + 175 | | + 150 |

^c de accolade duidt aan, dat top, blad 12 en internodium 11-12 tezamen getoetst werden.

^d + geeft aan dat de lesies niet goed geteld konden worden vanwege het feit, dat ze in elkaar overgingen; + 300 wil zeggen 275 < aantal lesies < 325.

Tabel 3.2 Verdeling van de infectiositeit in *N. rustica* in februari resp. 6, 9, 12 en 16 dagen na inoculatie van blad 7 en 8 van plant 1, 3, 5 en 7 en na inoculatie van blad 8 en 9 van plant 2, 4, 6 en 8

| | 6 dagen | | | | 9 dagen | | | |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | plant 1 | | plant 2 | | plant 3 | | plant 4 | |
| | sympt. ^a | lesies ^b | sympt. | lesies | sympt. | lesies | sympt. | lesies |
| top | | | | | | | | |
| blad 12 | | 0 ^c | nv | 0 | | 0 | nv | 92 |
| internodium 11-12 | | | | | | | | |
| blad 11 | nv | | nv | | nv | 107 | nv | 93 |
| internodium 10-11 | | 0 | | 0 | | 0 | | 7 |
| blad 10 | gnv | 0 | gnv | 0 | znv | 0 | gnv | 2 |
| internodium 9-10 | | 0 | | 0 | | 0 | | 3 |
| blad 9 | | 0 | v1 | 25 | | 0 | | 73 |
| internodium 8-9 | | 0 | | 0 | | 0 | | 1 |
| blad 8 | | 0 | v1 | 5 | | 23 | | 27 |
| internodium 7-8 | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 |
| blad 7 | | 3 | | 0 | | 7 | | 0 |
| internodium 6-7 | | 0 | | 0 | | 0 | | 1 |
| stengeldeel beneden blad 6 | | 0 | | 0 | | | | |
| wortels | | | | | | | | |

^a symptomen op *N. rustica*: nv = nerfvergeling, gnv = gedeeltelijke nerfvergeling, znv = zwakke nerfvergeling, v1 = gele vlekken, geen symptomen wanneer niets wordt vermeld.

^b het gemiddelde aantal vlekken op 4 halve bladeren van *P. hybrida* (blad/buffer = 1:2 w/w). De ene serie bladhelften werd gebruikt voor toetsing van plant 1 en de andere serie voor de toetsing van een overeenkomstig gedeelte van plant 2 etc.

^c de accolade duidt aan, dat top, blad 12, internodium 11-12 en blad 11 tezamen getoetst werden.

| 12 dagen | | | | 16 dagen | | | |
|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|
| plant 5 | | plant 6 | | plant 7 | | plant 8 | |
| sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies | sympt. lesies |
| nv | 1 | nv | 89 | n | ~ | nv | ~ |
| nv | 0 | nv | ~ ^d | nv | ~ | nv | ~ |
| | 0 | | ~ | | + 520 ^e | | + 550 |
| znv | 32 | nv | ~ | nv | ~ | nv | ~ |
| | 0 | | 233 | | ~ | | ~ |
| | 0 | | 0 | znv | 0 | | 188 |
| | 0 | | 250 | | ~ | | ~ |
| | 0 | | 350 | | 0 | | ~ |
| | 0 | | 183 | | 280 | | ~ |
| | 41 | | 23 | | 277 | | 17 |
| | 0 | | 106 | | ~ | | ~ |
| | 93 | | 0 | | 8 | | 0 |
| | 0 | | 125 | |] - + 340 | |] - ~ |
| | 1 | | 140 | | | | |
| | | | | | 101 | | + 350 |

^d ~ geeft aan, dat de lesies zo sterk in elkaar overgingen dat ze in het geheel niet geteld konden worden.

^e + geeft aan dat de lesies niet goed geteld konden worden vanwege het feit, dat ze in elkaar overgingen; + 520 wil zeggen $495 < \text{aantal lesies} < 545$.

3.2. Infectiositeit van TSWV in perssap van *N. rustica*

Tengevolge van bewaring van perssap uit *N. rustica* bij 18°C trad een zeer snelle teruggang van de infectiositeit in de tijd op. Direct na bereiding van het perssap werden 600 lesies per blad gevonden; na 30 min bleek nog maar 1% van deze infectiositeit te resteren. Na 1 uur was dit nog maar 0,1% en na 2 uur werd geen infectiositeit meer gevonden. De houdbaarheid in ruw sap is dus ongeveer 1 uur met een "halfwaardetijd" van 15 min.

Het verdunningseindpunt van TSWV in perssap van *N. rustica* werd bepaald op 10^{-4} - 10^{-5} .

De inactiveringstemperatuur bleek tussen 42 en 46°C te liggen. De hier gevonden infectiositeiten zijn goed in overeenstemming met de door diverse onderzoekers gepubliceerde gegevens (Best, 1968; Ie, 1970; Gumpf en Weathers, 1972; Tsakiridis en Gooding, 1972; Joubert et al., 1974; en Paliwal, 1974).

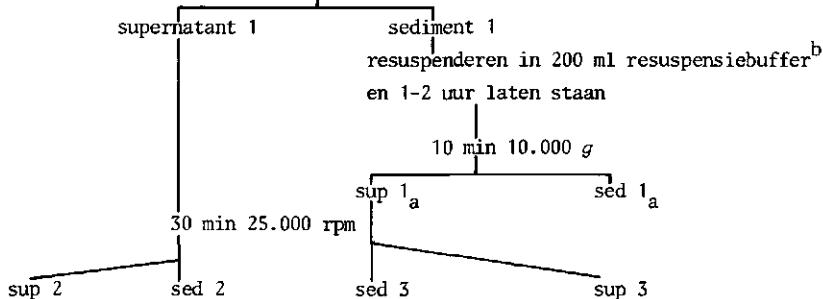
3.3. Zuivering van het virus uit *N. rustica*

Gedurende dit onderzoek werden ook diverse andere waardplanten bekeken op hun vatbaarheid voor infectie en de mate, waarin het virus zich erin vermeerderde. De resultaten waren als volgt. Uit *C. sativus* kon het virus alleen redelijk gezuiverd worden wanneer de cotylen geheel met lesies bezet waren. Het bleek echter zeer moeilijk om de cotylen zodanig te infecteren dat dit het geval was. De homogenaten van geïnfecteerd blad van *N. glutinosa* vertoonden een vrij lage infectiositeit. Bij zuivering hieruit werd nooit een viruszone in de eerste suikergradiënt gevonden. De waarneming van Paliwal (1974), dat *N. rustica*-blad meer virus bevat dan vergelijkbaar *N. glutinosa*-blad wordt hiermee bevestigd. *P. sativum* bleek onder onze omstandigheden moeilijk te infecteren. De zuiveringen uit deze plant mislukten dan ook. Aanvankelijk werd een keer vrij goed gezuiverd uit *S. oleraceus*; dit kon evenwel later niet meer gereproduceerd worden. De mogelijkheid, dat deze plant te gebruiken is voor de zuivering van het virus mag nog niet uitgesloten worden.

Wat het virusisolaat betreft bleek alleen TSWV-S zich goed in *N. rustica* te vermeerderen. De overige onderzochte isolaten bleken zich vrij traag te vermeerderen met als gevolg lage virusconcentraties. Het later van de Plantenziektenkundige Dienst afkomstige isolaat was wat betreft symptomen op diverse waard-

Schema 3.1 Zuiveringsschema voor TSWV zoals in het hier beschreven onderzoek is toegepast

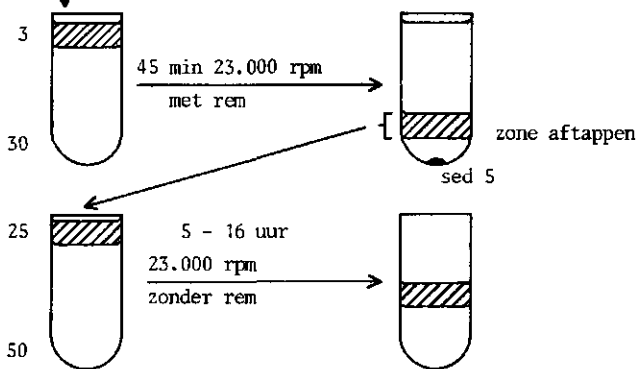
100 g geïnfecteerd blad + 400 ml extractiebuffer^a
 infiltratie van de bladeren in vacuüm
 homogenisatie in een Waring Blendor (stand: laag, tijd: 30 sec)
 homogenisaat door kaasdoek persen
 centrifugeren 10 min 10.000 g



elk sediment resuspenderen in 20 ml buffer en
 30-60 min laten staan
 antiserum tegen *N. rustica* toevoegen en
 1 uur laten staan
 10 min 10.000 g

sup 4 sed 4

- 1^e suikergradiënt
 3-30% (w/w) sucrose
 in resuspensiebuffer
- 4-6 ml virussuspensie
 per gradiënt opbrengen
- 2^e suikergradiënt
 25-50% (w/w) sucrose
 in resuspensiebuffer
- 6-8 ml virussuspensie
 per gradiënt opbrengen

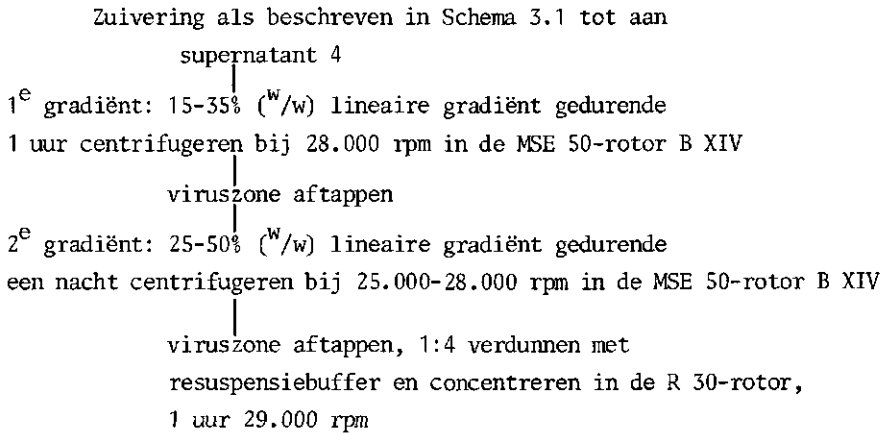


zone aftappen, verdunnen
 met resuspensiebuffer
 en concentreren

^a extractiebuffer: 0,01 M Na₂SO₃; 0,1% cysteïne en 0,1 M Tris, pH 8

^b resuspensiebuffer: 0,01 M Na₂SO₃; 0,1% cysteïne; 0,01 M glycine en 0,01 M Tris, pH 7,9

Schema 3.2 Zuivering van TSWV met zone-rotor



planten en vermeerdering in *N. rustica* identiek met TSWV-S.

De uiteindelijke zuivering van TSWV uit *N. rustica* is opgebouwd uit de volgende stappen: laag toerental centrifugering, hoog toerental centrifugering, neerslaan van waardspecifieke bestanddelen met behulp van een antiserum daartegen, zone-centrifugering, evenwichtscentrifugering en een concentrering (Schema 3.1). Deze verschillende stappen zullen nu achtereenvolgens nader besproken worden.

Voor het homogeniseren van geïnfecteerd *N. rustica*-blad werd gebruik gemaakt van een buffer bevattende 0,1 M Tris, 0,01 M Na₂SO₃ en 0,1% cysteïne, pH 8. Aanvankelijk werd gezuiverd met een door Best (1968) beschreven buffer, die 0,07 M Na₂SO₄, 0,01 M Na₂SO₃, 10⁻⁴ M EDTA (natriumzout) en 0,01 M (Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄), pH 7, bevatte. De aanwezigheid van 0,01 M Na₂SO₃ bleek echter niet altijd voldoende om de in het bladhomogenaat aanwezige polyfenoloxydasen te remmen, hetgeen tot uiting kwam in een bruine kleur van supernatant 1 (Schema 3.1). Gezien de gevoeligheid van het virus voor oxydatie (Best, 1968) werd deze bruinkleuring tegengegaan door de toevoeging van 0,1% cysteïne.

De invloed van de pH op de zuivering van het virus werd eveneens nagegaan. Uit Tabel 3.3 blijkt, dat buffer 2 beter geschikt is voor zuivering van het virus dan buffer 1 en 3. De pH van supernatant 1 is een indicatie voor de bufferende werking. Uit de sterke daling van de pH blijkt, dat buffer 1 en 3 zeer slecht bufferen. Bij gebruik van buffer 2 bleek de pH na de homogenisatie nauwe-

Tabel 3.3 Verdeling van de infectiositeit over supernatant 1 (S_1) en sediment 1 (P_1) en zichtbaarheid van de viruszones op de 1^e suikergradiënt bij zuivering van TSWV met 3 buffers.

| buffer | pH | infectiositeit ^d | | zichtbaarheid viruszones ^e | |
|----------------|------|-----------------------------|-------|---------------------------------------|---------------------|
| | | S_1 | P_1 | zuivering uit S_1 | zuivering uit P_1 |
| 1 ^a | 6,5 | 34 | 6 | ++ | - |
| 2 ^b | 7,95 | 54 | 60 | +++ | +++ |
| 3 ^c | 6,3 | 40 | 20 | ++ | + |

^a 0,1 M glycine + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,1% cysteïne, pH 7,

^b 0,1 M glycine + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,1% cysteïne, pH 8,

^c 0,01 M (Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4) + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,07 M Na_2SO_4 + 0,1% cysteïne, pH 7.

^d De infectiositeit is uitgedrukt als het totaal aantal lesies op 4 bladeren van *P. hybrida*.

^e De zichtbaarheid van de viruszones is weergegeven als: - afwezig, + zwak, ++ matig en +++ goed zichtbaar.

Tabel 3.4 Verdeling van de infectiositeit over supernatant 1 (S_1) en sediment 1 (P_1) en zichtbaarheid van de viruszones op de 1^e suikergradiënt bij zuivering met Tris-buffer pH 8 en pH 9, waaraan 0,01 M Na_2SO_3 en 0,1% cysteïne waren toegevoegd.

| buffer | infectiositeit ^a | | zichtbaarheid viruszones | |
|------------------|-----------------------------|-------|--------------------------|-----------------------|
| | S_1 | P_1 | zuivering uit S_1 | zuivering uit P_1 |
| Tris-buffer pH 8 | 396 | 350 | } geen verschil } | } meer virus bij pH 8 |
| Tris-buffer pH 9 | 496 | 6 | | |

^a De infectiositeit is uitgedrukt als het totaal aantal lesies op 4 bladeren van *P. hybrida*.

Tabel 3.5 Infectiositeit van homogenaat en supernatant 1 na malen van geïnfecteerd blad in buffers van verschillende pH.

| fractie | infectiositeit ^d | | |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| | pH 5 ^a | pH 6 ^b | pH 8 ^c |
| homogenaat | 3 | 165 | 557 |
| supernatant ^e 1 | 1 | 0 | 20 |

^a 0,1 M citroenzuur-trinatriumcitraat + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,1% cysteïne, pH 5,

^b als a, maar op pH 6 gebracht,

^c 0,1 M Tris + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,1% cysteïne, pH 8,

^d totaal aantal lesies op 4 bladeren van *P. hybrida*,

^e supernatant 1 werd verkregen door het homogenaat 10 min bij 10.000 g te centrifugeren.

Tabel 3.6 Invloed van $MgCl_2$ op de infectiositeit van TSWV

| $MgCl_2$ ^a concentratie (M) | Infectiositeit ^b | |
|---|-----------------------------|-------------------------|
| | voor dialyse | na dialyse ^c |
| 0,1 | 270 (141) | 37 (18) |
| 0,05 | 74 (78) | 19 (25) |
| 0,01 | 51 (58) | 101 (58) |
| 0,005 | 175 (90) | 36 (44) |
| 0,001 | 52 (35) | 107 (90) |

^a aan gezuiverd TSWV werd $MgCl_2$ in 0,03 M glycinebuffer pH 7,3, toegevoegd tot eindconcentraties van 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 en 0,001 M, als controle diende gezuiverd TSWV in 0,03 M glycinebuffer.

^b totaal aantal lesies op 4 bladhelften van *P. hybrida*. De getallen tussen haakjes zijn het totaal aan lesies, dat de controle suspensie op de tegenoverliggende bladhelften veroorzaakte.

^c gedialyseerd werd tegen 0,03 M glycine + 10^{-3} M EDTA, pH 7,3, bij 2°C gedurende 3 uur.

lijks te zijn gedaald. Uit Tabel 3.4 blijkt, dat een verdere verhoging van de pH van 8 naar 9 niet gunstig is, omdat dan minder virus uit het sediment geïsoleerd wordt. Uit Tabel 3.5 blijkt, dat de infectiositeit van de homogenaten, die na malen van geïnfecteerd blad met een buffer met een pH van 5 en een pH van 6 werden verkregen, beduidend lager is dan na malen met een buffer van pH 8. Op grond van de resultaten, die in Tabel 3.3, 3.4 en 3.5 zijn weergegeven werd in het vervolg gezuiverd met een Tris-buffer, pH 8.

EDTA werd uit de zuiveringsbuffer weggelaten aangezien geen duidelijk effect van Mg^{++} -ionen op de infectiositeit van gezuiverd TSWV gevonden werd (Tabel 3.6). Bovendien bleek EDTA geen merkbare invloed te hebben op het desaggregeren van TSWV-clusters. Dit kon geconcludeerd worden uit het feit, dat vergelijkbaar bladmateriaal zowel met de buffer volgens Best (1968), welke EDTA bevat, als met de buffer volgens Black et al. (1963), welke geen EDTA bevat, eenzelfde verdeling van de infectiositeit over supernatant 1 en sediment 1 gevonden werd (resp. 35 en 65%). Aangezien geen duidelijke invloed van Na_2SO_4 op de zuivering van TSWV gevonden werd, werd deze verbinding verder niet meer toegevoegd.

Voor het homogeniseren werd het blad onder vacuüm gedurende enkele min met buffer geïnfiltreerd om zuurstof zoveel mogelijk uit bladmateriaal en buffer te verwijderen. Verder zou het infiltreren van het blad met de buffer een eventuele osmotische shock van het virus tijdens het malen kunnen voorkomen. Het bladmate-

riaal werd in extractiebuffer gedurende 30 seconden in een Waring Blendor op lage snelheid gemalen. In het geval langer werd gehomogeniseerd, werd het moeilijker om celfragmenten van het virus te scheiden. Bovendien zou door langer homogeniseren het gevaar van inactivatie van het virus door oxydatie aan de lucht groter kunnen worden.

Monsters van verschillende partijen blad vertoonden bij zuivering een variabele verdeling van de infectiositeit over supernatant en sediment na de eerste centrifugering bij laag toerental. Monsters van eenzelfde partij blad, dat bij 2-4°C werd bewaard, gaven steeds dezelfde verdeling van de infectiositeit over supernatant en sediment te zien. Ook de keuze van de buffer bleek deze verdeling nauwelijks te beïnvloeden. Zo werd, zoals reeds is opgemerkt, dezelfde verdeling gevonden bij toepassing van resp. de buffers volgens Best (1968) en Black et al. (1963). Dit verklaart mogelijk ook dat Katekar (Best, 1968) niet in staat was te zuiveren volgens de methode van Black aangezien 90% van de infectiositeit in de supernatant terecht kwam na de eerste centrifugering bij laag toerental.

Uit de bestudering van ultradunne coupes, die werden gemaakt van sediment 4 bleek, dat naast afzonderlijke virusdeeltjes vaak ook groepen virusdeeltjes werden gevonden, die door een membraan waren omgeven (Fig. 3.1).

Mogelijk zijn deze groepen virusdeeltjes de clusters die door diverse auteurs zijn waargenomen in de cisternae van het endoplasmatisch reticulum en die ondanks de homogenisatie nog niet uiteengevallen zijn. Bij een milde homogenisatieprocedure van geïnfecteerde komkomercotylen werden na laag toerental centrifugering zeer duidelijke clusters in het sediment gevonden (Fig. 3.2). De stevigheid van de clustermembraan enerzijds en de aggregatie van virusdeeltjes anderzijds zouden de verdeling van de infectiositeit over supernatant en sediment kunnen beïnvloeden.

Sediment 1 (Schema 3.1) en de virussedimenten die later in de zuiveringsprocedure werden gevormd, werden opgelost in 0,01 M Tris, 0,01 M Na₂SO₃, 0,01 M glycine en 0,1% cysteïne, pH 7,9 (in het vervolg aangeduid als resuspensiebuffer). Deze buffer werd samengesteld op grond van de resultaten van een drietal experimenten.

In het eerste experiment werd een homogenaat in drie gelijke porties verdeeld. Na laag toerental centrifugering werden de sedimenten resp. opgelost in de buffer volgens Best (1968), in 0,01 M Na₂SO₃, pH 7, en in 0,01 M glycine, pH 7. Na een incubatie van 3 uur werd de infectiositeit bepaald. De infectiositeit

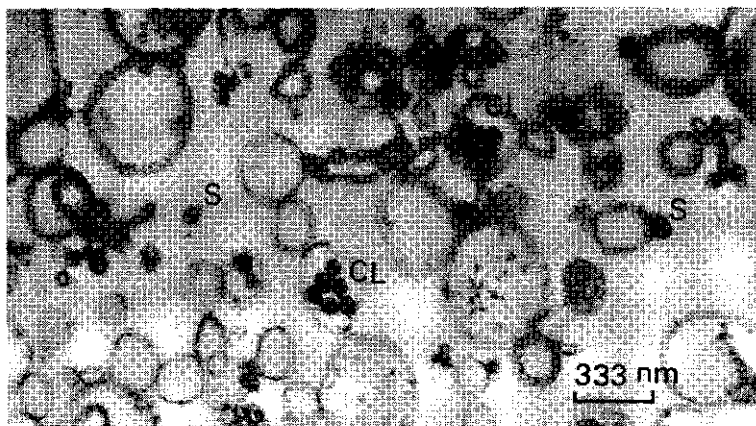


Fig. 3.1 Ultradunne coupe van sediment 4 (Schema 3.1). Verschillende clusters (Cl), al of niet omgeven door een membraan, zijn zichtbaar. Ook enkele afzonderlijke deeltjes zijn aanwezig (S). Verder zijn veel membraanuze fragmenten van celorganellen te zien.



Fig. 3.2 Ultradunne coupe van het sediment, dat verkregen werd na centrifugering gedurende 15 min bij 1000 g van een homogenaat van komkommerecotylen. Geïnfecteerde komkommerecotylen werden 4 dagen na inoculatie gehomogeniseerd in Honda-buffer (0,25 M sucrose, 2,5% Ficoll, 5% Dextran T 40 in 0,025 M Tris-HCl, pH 7,8 + 0,001 M Mg-acetaat + 0,004 M 2-ME) volgens Assink (1973). Duidelijk zichtbaar zijn 2 clusters (Cl). Chl zijn fragmenten van chloroplasten. De pijlen tonen virusdeeltjes, die de indruk geven dat ze geassocieerd zijn met een membraan.

(lesies/blad) was 98 voor de buffer volgens Best (1968), 42,6 voor 0,01 M Na_2SO_3 , pH 7, en 144,2 voor 0,01 M glycine, pH 7. Uit dit experiment bleek dat glycine een gunstige werking had op het resuspenderen van sediment 1.

In het tweede experiment werd een homogenaat in twee gelijke porties verdeeld. Na laag toerental centrifugering werden de sedimenten opgelost in de buffer volgens Best (1968) en in 0,01 M glycine + 0,01 M Na_2SO_3 + 0,07 M Na_2SO_4 + 10^{-4} M EDTA, pH 7. Het gemiddeld aantal lesies/blad bij toetsing op *P. hybrida* was 26 voor eerstgenoemde buffer en 106 voor laatstgenoemde buffer. Hieruit bleek dat veel meer virus uit sediment 1 werd vrijgemaakt wanneer 0,01 M (Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4) in de buffer volgens Best (1968) door 0,01 M glycine werd vervangen.

In het derde experiment werden P_1 neerslagen geresuspendeerd in extractiebuffer pH 8, in 1:10 verdunde extractiebuffer en in 0,05 M glycine, pH 8.

De verkregen suspensies werden verder gezuiverd volgens Schema 3.1. Na centrifugering op de 1^e suikergradiënt werd een vage viruszone gevonden indien sediment P_1 was geresuspendeerd in extractiebuffer, pH 8. Een duidelijke zone werd gevormd wanneer 1:10 verdunde extractiebuffer was gebruikt en een goede zone werd na gebruik van 0,05 M glycine verkregen. Onverdunde extractiebuffer was dus weinig geschikt om sediment 1 te resuspenderen. Ook hier bleek het gunstig effect van glycine. Opvallend was dat 1:10 verdunde extractiebuffer een redelijke viruszone gaf in tegenstelling tot de niet verdunde extractiebuffer. Blijkbaar was het terugbrengen van de ionensterkte in dit stadium van de zuivering gunstig. Op grond van bovenvermelde gegevens werd de resuspensiebuffer samengesteld.

Het virus in supernatant 1 en 1_a (Schema 3.1) werd geconcentreerd door een centrifugering bij 25.000 rpm gedurende 30 minuten. Na resuspensie van de sedimenten 2 en 3 werd antiserum toegevoegd, dat tegen *N. rustica*-bladbestanddelen was geproduceerd (2.7). Deze stap had als functie om allerlei celbestanddelen van ongeveer dezelfde grootte of dichtheid als het virus te verwijderen. Na afcentrifugeren van het gevormde precipitaat werd de virussuspensie onderworpen aan centrifugering op een dichtheidsgradiënt. Het patroon na toevoegen van antiserum tegen *N. rustica* is in Fig. 3.3 te zien, waar dit vergeleken wordt met toevoeging van normaalserum. Na behandeling met normaalserum was de viruszone aan de onderzijde nog groenig tengevolge van de aanwezigheid van een groene zone, die zich tot aan de bodem van de buis uitstreckte. Deze zone was na behandeling met antiserum tegen *N. rustica* voor een groot deel verdwenen. Deze verontreinig-

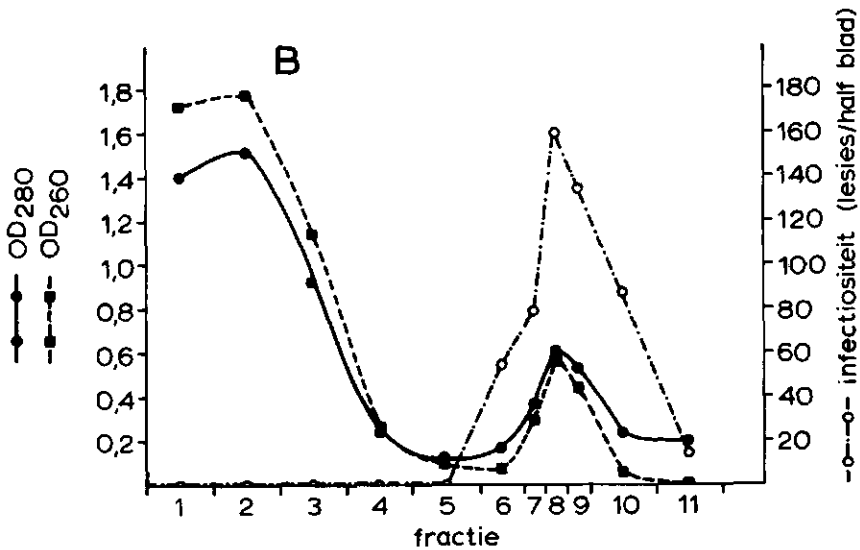
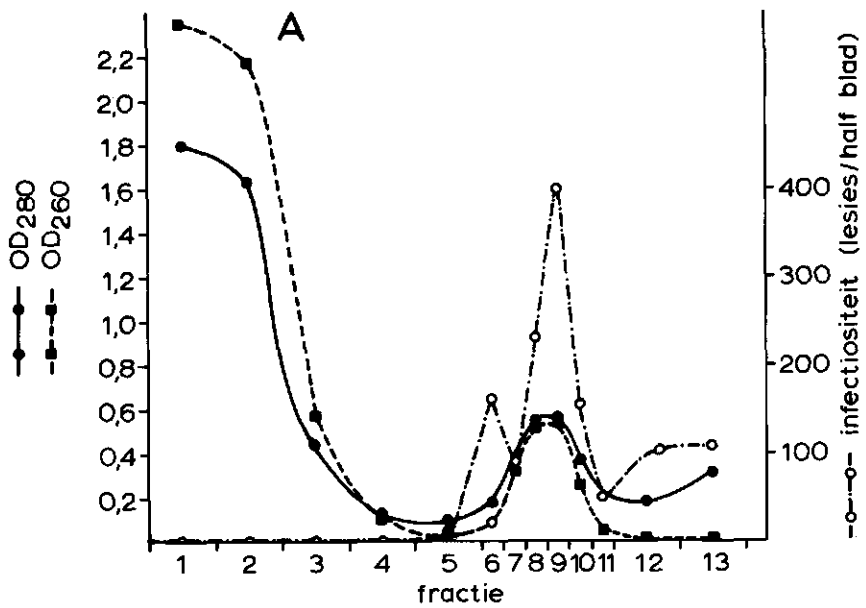


Fig. 3.3 Verdeling van materiaal, dat licht absorbeert bij 260 en 280 nm, en infectiositeit over de 1^e suikergradiënt (3-30% w/w sucrose) na centrifugering gedurende 45 minuten bij 23.000 rpm in een SW 25-rotor in een Spinco-L-ultracentrifuge van supernatant 4 na behandeling met resp. normaalserum (A) en antiserum tegen *N. rustica* (B). De sedimentatie is van links naar rechts.

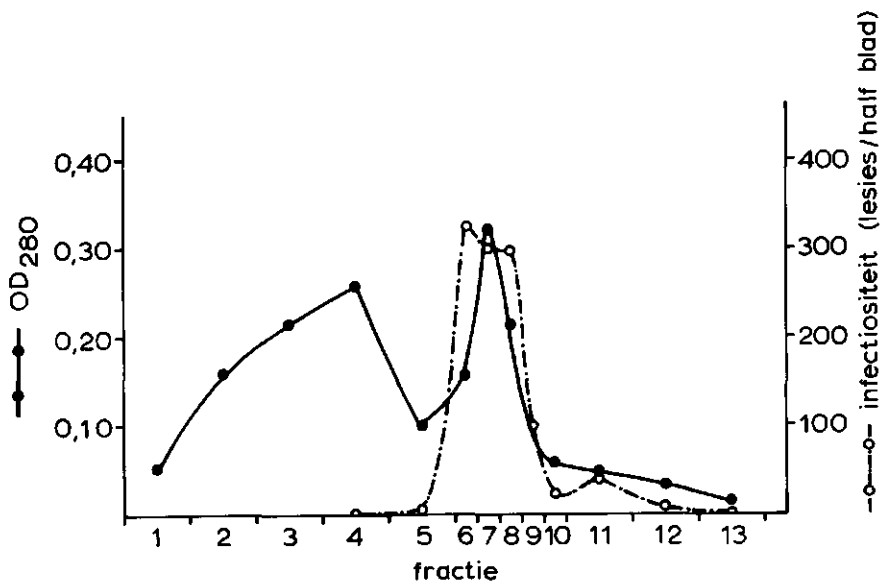


Fig. 3.4 Verdeling van materiaal, dat licht absorbeert bij 280 nm, en infectiositeit over de 2^e suikergradiënt (25-50% w/w sucrose) na centrifugering gedurende 6 uur bij 23.000 rpm in een SW 25-rotor in een Spinco-L-ultracentrifuge van de viruszone uit de 1^e suikergradiënt na behandeling met antiserum tegen *N. rustica*. De sedimentatie is van links naar rechts.

ging blijkt UV-licht met een golflengte van 280 nm te absorberen, maar niet met een golflengte van 260 nm, zoals in Fig. 3.3 is te zien. De infectiositeit in Fig. 3.3A en B correspondeert goed met de piek in het absorptiepatroon. Opvallend is, dat in een aantal experimenten de infectiositeit over twee niet volledig gescheiden pieken is verdeeld. In Fig. 3.3A is deze scheiding duidelijker te zien dan in Fig. 3.3B. Verder valt op dat na behandeling met antiserum tegen *N. rustica* de infectiositeit lager is dan na behandeling met normaalserum. Omdat de absorptie in Fig. 3.3A en B ongeveer even groot is kan men dit verlies aan infectiositeit moeilijk wijten aan verlies van virus door precipitatie met antiserum tegen *N. rustica*. Dit verlies kan mogelijk aan een factor in het antiserum geweten worden (Tabel 3.7). Wat verder opvalt in deze tabel is de hoge infectiositeit na toevoeging van fysiologisch zout. Dit werd niet nader onderzocht. Het teruglopen van de infectiositeit door toevoeging van antiserum tegen *N. rustica* was niet altijd zo sterk als in Tabel 3.7 is aangegeven.

Tabel 3.7 Invloed van de toevoeging van resp. antiserum tegen *N. rustica*, normaalserum, resuspensiebuffer en fysiologisch zout op de infectiositeit van een geresuspendeerd sediment 3 (Schema 3.1).

| toevoeging van | aantal lesies per blad | |
|-----------------------------------|------------------------|----------|
| | supernatant | sediment |
| antiserum tegen <i>N. rustica</i> | 0 ^a | 0 |
| normaalserum | 1 | 0,2 |
| resuspensiebuffer | 17 | 0,2 |
| fysiologisch zout | 103,5 | 0,5 |

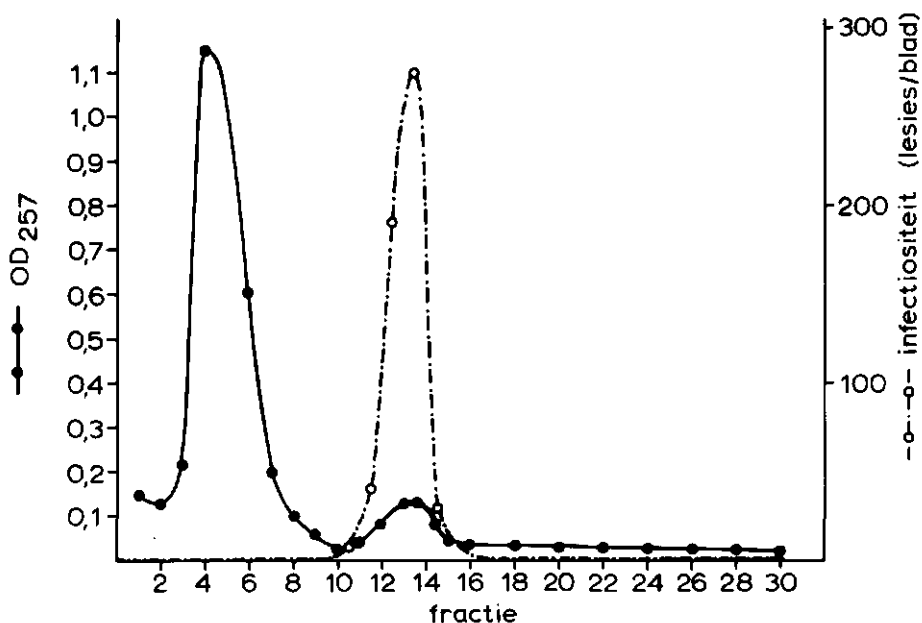
^a De suspensies werden 1 uur na toevoeging van de diverse oplossingen gecentrifugeerd bij laag toerental. De infectiositeit van de supernatant en het opgeloste sediment werden door toetsing op 5 bladeren van *P. hybrida* bepaald.

In het geval de infectiositeit op de 1^e gradiënt over twee niet gescheiden pieken verdeeld was, was hetzelfde verschijnsel ook op de 2^e suikergradiënt waarneembaar (Fig. 3.4). Er werd geen onderzoek verricht naar de aard van deze heterogeniteit. Tsakiridis en Gooding (1972) vonden eveneens twee vlak naast elkaar gelegen virusbanden bij gradiënt-centrifugering. Door bovengenoemde auteurs werd ook geen verder onderzoek hiernaar verricht.

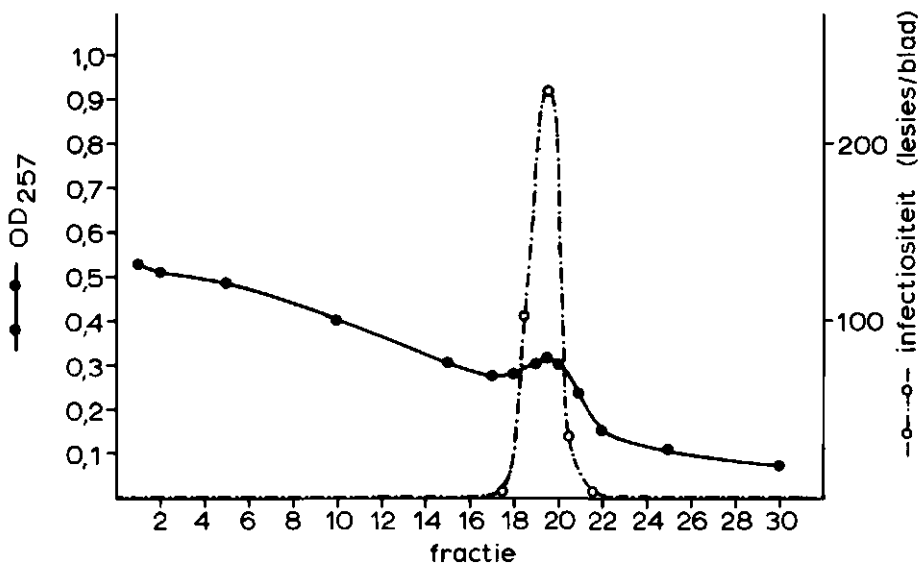
Het is opvallend, dat de infectiositeit niet of nauwelijks vermindert gedurende de gradiënt-centrifugeringen. Tenslotte moet er nog op gewezen worden, dat de fracties 3 en 4 van de 2^e gradiënt een hoge lichtabsorptie bij 257 nm vertonen terwijl de gradiënt ter plaatse vrij weinig materiaal leek te bevatten. Bij analyse van deze fracties op polyacrylamidegel bleken de viruseiwitten 1, 2+3 en 4 (Hoofdstuk 5) in geringe mate aanwezig te zijn naast andere eiwitten van zeer heterogene aard.

In de loop van het onderzoek werd een methode ontwikkeld om het virus uit grote hoeveelheden bladmateriaal (bijv. 200 g) te zuiveren. De centrifugering van het virus op suikergradiënten in de SW 25 werd hierbij vervangen door een centrifugering in de zone-rotor (Schema 3.2).

Fig. 3.5 toont de verdeling van het materiaal, dat licht met een golflengte van 257 nm absorbeert en de infectiositeit over de 1^e gradiënt; Fig. 3.6 toont dit voor de 2^e suikergradiënt. De infectiositeit valt in beide figuren goed samen met de piek in het absorptiepatroon. Het viruspreparaat, dat met behulp



Figuur 3.5 Verdeling van de optische dichtheid (257 nm) en infectiositeit over een 15-35% (^w/w) lineaire suikergradiënt na centrifugering gedurende 45 min bij 28.000 rpm in de MSE 50-rotor B XIV.



Figuur 3.6 Verdeling van de optische dichtheid (257 nm) en infectiositeit over een 25-50% (^w/w) lineaire suikergradiënt na centrifugering gedurende 12 uur bij 25.000 rpm in de MSE 50-rotor B XIV. De sedimentatie is van links naar rechts.

van de zone-rotor werd verkregen was over het algemeen schoner dan dat van de suikergradiënten uit de SW 25-rotor. Bovendien had dit het voordeel, dat de viruszone gemakkelijker gefractioneerd kon worden opgevangen.

De virusopbrengst en de infectiositeit verschilden vaak sterk van zuivering tot zuivering. Wat de infectiositeit betreft kan slechts een algemene trend aangegeven worden. Vaak nam de infectiositeit over de eerste stappen van de zuivering (tot en met sediment 3, Schema 3.1) in geringe mate af. Na behandeling met antiserum tegen *N. rustica* werd er meestal een zeer sterke daling in infectiositeit gevonden (vergelijk hiervoor bijv. de infectiositeit van Fig. 3.3A met die van Fig. 3.3B). In de laatste stappen van de zuivering kwam de infectiositeit over het algemeen voor een deel terug (vergelijk hiervoor de infectiositeitspiek in Fig. 3.4 met die in Fig. 3.3B en Fig. 3.3A).

De toename van de infectiositeit kan mogelijk verklaard worden door een verwijdering van een remmer uit het antiserum ofwel een desaggregatie van het virus in oplossingen met suiker.

Tot het resuspenderen van de sedimenten 1_a, 4 en 5 werd overgegaan nadat gebleken was, dat deze sedimenten nog vrij veel virus konden bevatten. De geresuspendeerde sedimenten liet men gedurende een nacht of nog langer bij 0-4°C staan en na centrifugering bij laag toerental werd de supernatant op een 1^e suikergradiënt geplaatst en verder gezuiverd volgens Schema 3.1. Naar gelang de hoeveelheid virus, die in deze sedimenten werd gevonden, werd een of meerdere malen geëxtraheerd. De hoeveelheid virus uit deze sedimenten overtrof vaak de hoeveelheid virus dat direct na homogeniseren van het bladmateriaal uit het eerste supernatant en sediment werd verkregen.

In sommige gevallen kon nauwelijks enig virus geëxtraheerd worden indien het eerste supernatant en sediment volgens Schema 3.1 werden opgewerkt. Werden evenwel de sedimenten 1_a, 4 en 5 geresuspendeerd en verder behandeld als sediment 1 dan werd vaak een redelijke hoeveelheid virus hieruit verkregen.

Was de virusconcentratie in de plant hoog (bepaald door toetsing van sap op *Petunia*-bladeren), dan kon het virus goed gezuiverd worden. Bij lage virusconcentratie in de *N. rustica*-planten kon weinig of geen virus geëxtraheerd worden, terwijl het bovendien sterk verontreinigd was met membraneus materiaal. Voor het welslagen van de zuivering speelt dus onder meer de virusconcentratie in de plant een belangrijke rol. Pogingen om deze virusconcentratie te beïnvloeden

door variatie in de kweekomstandigheden zoals temperatuur, daglengte, lichtintensiteit en relatieve vochtigheid waren tot nu toe zonder succes. Wel werd een invloed gevonden van temperatuur op snelheid van symptoomontwikkeling en necrotisering. Bij hoge temperatuur 25-30°C werden de planten sneller ziek en trad er eerder een necrotisering van het blad op dan bij lagere temperatuur (20-25°C). Er werd echter geen duidelijk verschil in virusconcentratie gevonden in afhankelijkheid van de temperatuur.

De geïnfecteerde *N. rustica*-planten vertoonden een nog niet verklaarde fluctuatie in virusopbrengst en stabiliteit van de virusdeeltjes over het seizoen. Terwijl in de zomermaanden zonder veel problemen gezuiverd kon worden en hoge virusopbrengsten en kwalitatief goede viruspreparaten verkregen werden, trad in de herfst en winter een verslechtering op met een dieptepunt in december en januari, waarna weer een geleidelijke verbetering optrad. In december en januari kon vaak nauwelijks virus uit de planten gezuiverd worden. De dan verkregen preparaten vertoonden bovendien zeer veel kapotte deeltjes. De symptomen in deze periode waren vrijwel identiek aan die in de zomer, alleen de ontwikkeling van de symptomen verliep trager.

Nagegaan zou moeten worden of de planten in de winter duidelijk minder virus bevatten ofwel dat het merendeel van het virus tijdens de zuivering uit elkaar valt. Een combinatie van beide factoren zou ook zeer goed het geval kunnen zijn.

3.4. Infectiositeit van gezuiverd TSWV

Wanneer het virus uit de zone van de 2^e suikergradiënt (zone bevat ca. 40% suiker) werd bewaard bij 18°C, werd na 6 uur nog een geringe infectiositeit gevonden. Bij bewaring bij 0°C was zelfs na 18 dagen nog infectiositeit aantoonbaar, nl. 1 lesie op 6 bladeren. Beide gegevens wijzen erop, dat de infectiositeit van gezuiverd virus in suikeroplossingen beter behouden blijft dan in ruw perssap.

De inactiveringstemperatuur van TSWV in een milieu met 40% suiker bleek tussen 50 en 55°C te liggen. Dit is aanzienlijk hoger dan voor TSWV in ruw perssap. Volgens Norris (1946) is de lage inactiveringstemperatuur in ruw perssap waarschijnlijk niet toe te schrijven aan thermische denaturatie van viruseiwit, maar aan een versnelling van het oxydatieproces ten gevolge van de verwarming. Dezelfde auteur vermeldt ook dat bladeren van *Solanum capsicastrum*, die 10 minuten verhit waren op 52°C nog niet vrij waren van TSWV. De inactiveringstempera-

tuur zou dus aanzienlijk hoger liggen dan 46⁰C.

Klinkowski en Uschdraweit (1952) konden een ongezuiverde virussuspensie in aanwezigheid van 0,01 M cysteïne, pH 7,5, en bij afwezigheid van zuurstof gedurende 35 dagen infectieus houden. De vraag dringt zich op welk bestanddeel van het virus zo extreem gevoelig is voor oxydatie.

3.5. Elektronenmicroscopie van gezuiverd TSWV

Bij het bekijken van gezuiverd virus in de elektronenmicroscopie bleek fixatie van het virus een eerste vereiste. Wanneer een viruspreparaat zonder fixatie werd gecontrasteerd met PTA, pH 6, traden vaak deeltjes met "staarten" op. De frequentie van het optreden van dergelijke "staarten" kon vergroot worden door objectdragers met niet gefixeerd TSWV gedurende enige tijd op een wateroppervlak te laten drijven en vervolgens te behandelen met PTA (Fig. 3.7). Bij het fixeren speelt de pH van het fixatiemedium mogelijk een belangrijke rol. Wanneer 1% OsO₄ gebufferd werd met resp. Veronal-acetaatbuffer, pH 7,4 of met Sörensen-buffer pH 7,2, traden ook de bovengenoemde "staarten" op. Met een oplossing van 1% OsO₄ in bidest (pH 6-7) of met een ongebufferde oplossing van 2,5% glutaaraldehyde werd een goede fixatie van het virus verkregen.

Het optreden van "staarten" werd ook gerapporteerd door andere onderzoekers o.a. Van Kammen et al. (1966), Best (1968) en Joubert et al. (1974). De laatste auteurs vonden ook een sterke toename van het aantal deeltjes met "staarten" ten gevolge van resuspensie van het virus in bidest en konden dit verschijnsel door fixatie met glutaaraldehyde voorkomen. Het optreden van "staarten" moet gezien het bovenstaande toegeschreven worden aan een onvoldoende fixatie van het virus.

De voor TSWV beschreven "staarten" vertonen veel overeenkomst met de "kop en staart"-vorm die optreedt bij het mammatumovirus van de muis (Sarkar en Moore, 1974). Ook bij dit virus kan men door fixatie met glutaaraldehyde deze "kop en staart"-vorm tegengaan. Volgens Sarkar en Moore (1974) is deze "staart"-vorming waarschijnlijk een gevolg van het verdwijnen van een grote (naar men veronderstelt met vloeistof) gevulde ruimte tussen de nucleocapside en de membraan bij het opdrogen van het virus op de objectdrager. De overmaat membraan die daardoor ontstaat, zou om nog niet bekende redenen een "staart" vormen. De lengte van de "staarten" van een aantal TSWV-deeltjes is echter veel groter dan verklaard zou

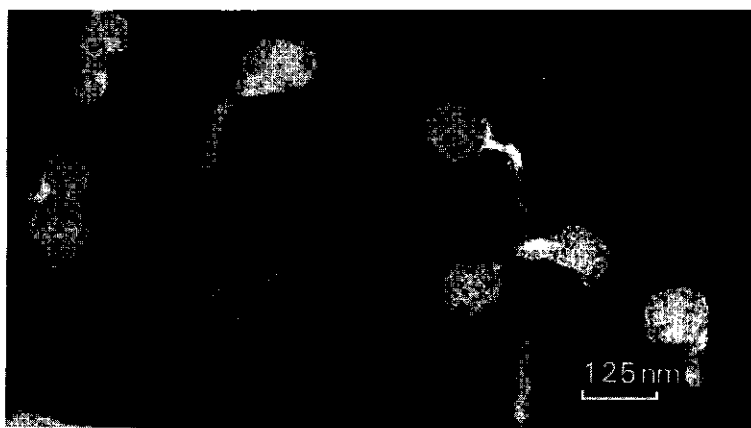


Fig. 3.7 "Staart"-vorming bij niet gefixeerd TSWV. Het virus werd zonder te zijn gefixeerd op een objectdrager gebracht en na indrogen van het preparaat omgekeerd gedurende 2 min op een wateroppervlak gelegd. Vervolgens werd gecontrasteerd met 2% PTA pH 6. Vrijwel alle deeltjes blijken nu een meer of minder lange "staart" te bezitten.

kunnen worden op grond van bovenstaande theorie (Fig. 3.7).

De hoeveelheid virus per zuivering en de homogeniteit van het gezuiverde preparaat bleek nauw samen te hangen met het groeiseizoen.

Fig. 3.8 en 3.9 geven stereotype beelden van virus dat in de zomer en winter werd gezuiverd. In de zomer werden vrijwel sferische deeltjes verkregen. In de winter waren vorm en grootte van de deeltjes veel variabeler.

Deeltjes, waarin de negatieve kleurstof is binnengedrongen vertonen duidelijk een membraan (Fig. 3.8). Op de membraan bevinden zich eiwituitsteeksels, de zogenaamde "spikes", die zich lang niet zo duidelijk aftekenen als bij influenzavirus (Schulze, 1973). Deeltjes, waarin de PTA niet is binnengedrongen vertonen deze membraan niet. Wel zijn de "spikes" zichtbaar aan de periferie van deze deeltjes. Tot nu toe werd geen regelmaat in de rangschikking van de "spikes" over het oppervlak van het deeltje waargenomen. Verschillende factoren zoals afplatting en deformatie van het virus bij het opdrogen op de objectdrager, het over elkaar heen vallen van de boven- en onderzijde van het virusdeeltje en de binnen de mem-

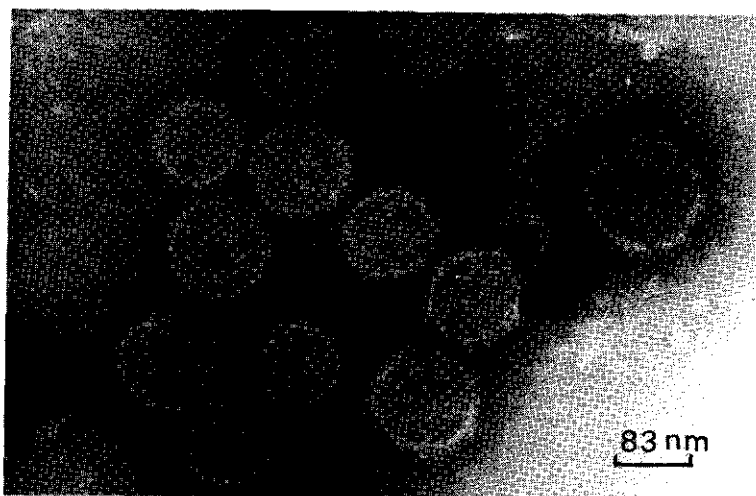


Fig. 3.8 Elektronenmicroscopie van een viruspreparaat, dat in de zomer gezuiverd werd. Het virus werd gefixeerd met een gelijk volume 5% glutaraaldehyde; na indrogen van het preparaat werd 2 min gewassen en vervolgens gecontrasteerd met 2% PTA, pH 6. Er is een duidelijke variatie in grootte van de deeltjes, maar de vorm is ongeveer dezelfde. De preparaten bevatten over het algemeen weinig kapotte deeltjes.

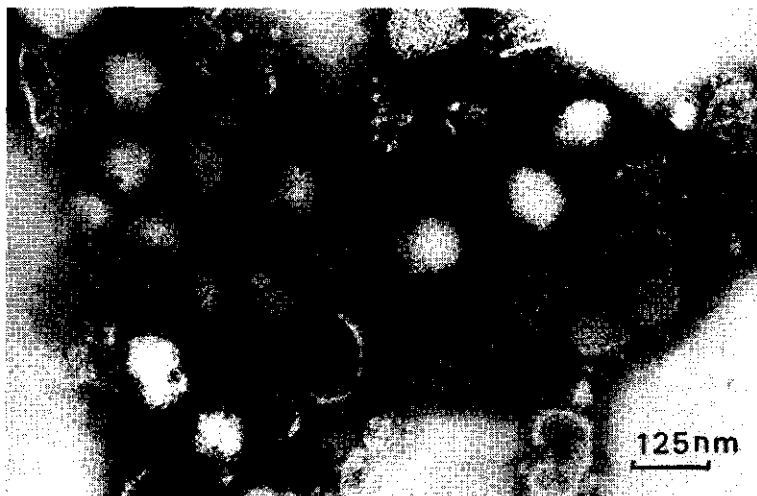


Fig. 3.9 Elektronenmicroscopie van een viruspreparaat, dat in de winter gezuiverd werd. Het virus werd gefixeerd met een gelijk volume 5% glutaraaldehyde; na indrogen van het preparaat werd 2 min gewassen en vervolgens gecontrasteerd met 2% PTA, pH 6. De gezuiverde deeltjes zijn zeer variabel in vorm en grootte. Veel deeltjes zijn bovendien kapot.

braan gelokaliseerde structuren (in geval van penetratie van de kleurstof in het deeltje) maken het uitermate moeilijk om regelmatigheiden in de structuur te ontdekken.

Tot nu toe werd in deeltjes waarin de negatieve kleurstof binnengedrongen was, geen herkenbare nucleocapside waargenomen, ook niet na fragmentatie van de virusdeeltjes met ether of NP-40. Vaak kreeg men de indruk dat de gebarsten deeltjes alleen bestonden uit membraneuze structuren. Mohamed et al. (1973) verkregen een subeenheid na behandeling van het virus met NP-40. Zij namen aan, dat deze subeenheid overeenkwam met de veronderstelde "core" van het virus. Onder onze omstandigheden viel het virus na behandeling met 0,05% NP-40 gedurende 1 min op de objectdrager al volledig uit elkaar (5.4.2).

3.6. Conclusies

Uit de verdeling van de infectiositeit in *N. rustica* op de 6^e, 9^e, 12^e en 16^e dag na inoculatie in februari en september werd geconcludeerd dat het virus zich in de zomer sneller vermenigvuldigt dan in de winter met het gevolg dat geïnfecteerd blad in de zomer eerder geogst kan worden dan in de winter. Verder bleek dat bladeren, die geen symptomen vertonen over het algemeen geen virus bevatten.

Voor de zuivering van TSWV werd een procedure ontwikkeld bestaande uit differentieële centrifugering, toepassing van een antiserum tegen *N. rustica*-celbestanddelen, gevolgd door zone- en evenwichtscentrifugering op suikergradiënten (Schema 3.1). Duidelijk opbrengstverhogend werkten de introductie van de extractiebuffer (0,1 M Tris, 0,01 M Na₂SO₃ en 0,1% cysteine, pH 8) bij het malen van het bladmateriaal en de resuspensiebuffer (0,01 M Tris, 0,01 M glycine, 0,01 M Na₂SO₃ en 0,1% cysteine, pH 7,9) voor het resuspenderen van de sedimenten. Aan gezien vrij veel virus verloren ging in de sedimenten 1_a, 4 en 5 (Schema 3.1) werden deze een of meer keren met resuspensiebuffer geëxtraheerd.

Bij het zuiveren van virus uit grote hoeveelheden blad (bijv. meer dan 200 g) werd gebruik gemaakt van de zone-rotor (Schema 3.2).

Zuivering in de zomermaanden leverde veel, intact en weinig verontreinigd virus op, terwijl bij zuivering in de wintermaanden vaak weinig, kapot en verontreinigd virus werd verkregen.

De infectiositeit van gezuiverd TSWV in een milieu met 40% suiker bleek met betrekking tot de inactiveringstemperatuur en inactiveringssnelheid duidelijk te verschillen van de infectiositeit in ruw perssap.

Het optreden van "staarten" in negatief gecontrasteerde preparaten van TSWV zoals gerapporteerd door diverse onderzoekers, kan voorkomen worden door het virus te fixeren met een gelijk volume 5% glutaaraldehyde.

4. SEROLOGISCH ONDERZOEK AAN GEZUIVERD TSWV

Aanvankelijk lag het in de bedoeling om een specifiek antiserum tegen het virus te bereiden, wat bruikbaar zou kunnen zijn bij

1. de bepaling van virusconcentraties in geïnfecteerde bladeren van *N. rustica* om het tijdstip van oogsten beter te kunnen bepalen;
2. de karakterisering van de diffuse massa's (Ie, 1964), die vaak in associatie met TSWV voorkomen.

Diverse antisera werden bereid (Hoofdstuk 2). Aan 2 antisera, die resp. verkregen waren door intramusculaire injectie van gezuiverd TSWV (antiserum 1) en door injectie van TSWV in de voetkussentjes gevolgd door intraveneus inspuiten (antiserum 2) werd verder onderzoek verricht. Aangetoond werd dat deze antisera tegen het virus aanzienlijk verschilden in hun reactie met de verschillende antigene determinanten, die in het virus voorkomen (4.1). Verder werden door verzadiging van de antisera met sap van niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten (4.2), met polysacchariden gezuiverd uit niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten (4.3), met gedenatureerd TSWV (4.4), en met intact TSWV (4.5) en door reactie van een antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten met TSWV (4.6) sterke aanwijzingen verkregen voor het voorkomen van waardantigeen in TSWV.

4.1. Verschil in werkzaamheid van antiserum 1 en 2

De beide antisera werden vergeleken in hun reactie met

1. de eiwitten van TSWV na denaturatie van het virus met SDS en elektroforese op polyacrylamidegel (Hoofdstuk 5),
2. gezuiverd TSWV,
3. sap uit een niet geïnfecteerde *N. rustica*-plant,
4. polysacchariden uit niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten.

De reactie van de antisera met de eiwitten van TSWV die na denaturatie elektroforetisch werden gescheiden is weergegeven in Fig. 4.1. Antiserum 1 geeft een middelmatige reactie met eiwit 1, 2+3 en 4 en geen reactie met glycolipide (Hoofdstuk 5). Antiserum 2 geeft een sterke reactie met eiwit 1, een middelma-

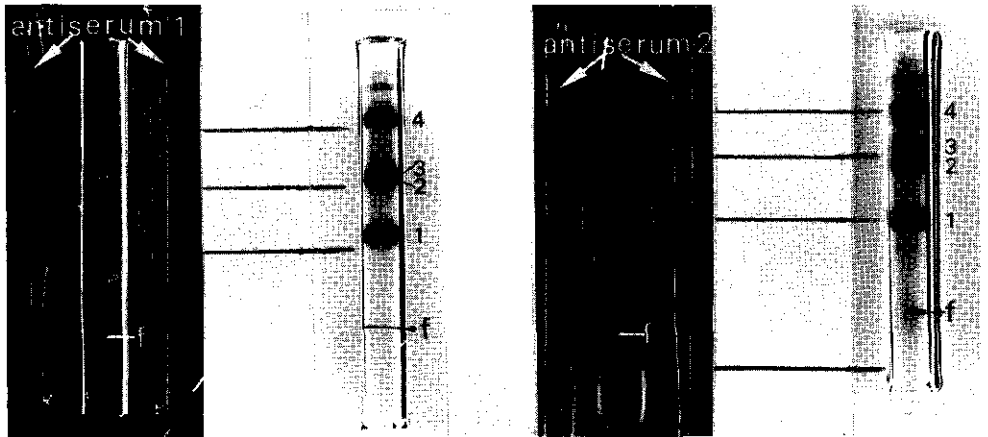


Fig. 4.1 Immunodiffusie in 1% agar van de antisera 1 en 2 tegen de elektroforetisch gescheiden eiwitten van TSWV op 7,5% polyacrylamidegels. De elektroforeserichting is van boven naar beneden. Het elektroforesefront is aangeduid als f.

tige reactie met eiwit 2+3, een zwakke reactie met eiwit 4 en een sterke reactie met glycolipide.

Aangenomen moet worden dat TSWV bij immunodiffusie in agar tegen TSWV-antiserum niet als complete deeltjes diffundeert, getuige het feit dat er enige precipitatielijnen worden gevonden (Fig. 4.2).

Complete virusdeeltjes zouden gezien hun afmeting slechts zeer langzaam in de agar zijn gediffundeerd (Ackers en Steere, 1962). Andere grote membraanvirussen zoals "lettuce necrotic yellows virus" (McLean et al., 1971) en "broccoli necrotic yellows virus" (Lin en Campbell, 1972) geven eveneens enige precipitatielijnen bij immunodiffusie in agar tegen de homologe antisera. McLean et al. (1971) verklaren het verkregen precipitatiepatroon door aan te nemen dat de virusenvelop in stukken breekt welke vervolgens weer aggregeren tot "rozetten".

Bij immunodiffusie van antiserum 1 en 2 tegen TSWV (Fig. 4.2) worden resp. 2 en 3 precipitatielijnen gevonden. De antisera blijken 2 precipitatielijnen gemeenschappelijk te kunnen produceren. De extra precipitatielijijn bij antiserum 2

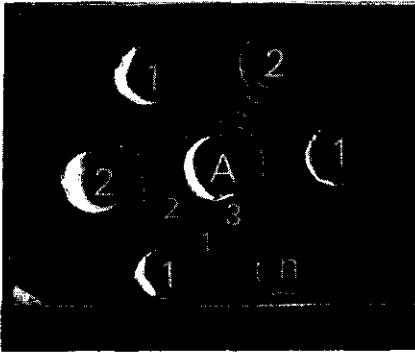


Fig. 4.2 Immunodiffusiepatroon in 1% agar van de antisera 1 (1) en 2 (2) en normaalserum (n) tegen gezuiverd TSWV (A), dat in de diepvries bewaard was (niet-gedenatureerd TSWV).

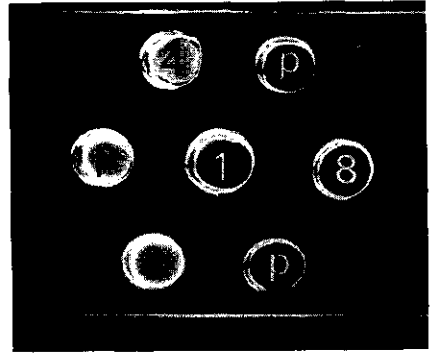


Fig. 4.3 Immunodiffusiepatroon in 1% agar van antiserum 1 (1) tegen enkele verdunningen van *N. rustica*-sap (1:2, 1:4 en 1:8) en polysacchariden uit *N. rustica* (p).

Tabel 4.1 Vergelijking van de reacties van de antisera 1 en 2 met achtereenvolgens de eiwitten 1, 2+3, 4, glycolipide, *N. rustica*-sap en polysacchariden uit *N. rustica*.

| Antigeen | antiserum 1 | antiserum 2 |
|------------------------|-----------------|-------------|
| eiwit 1 (Hoofdstuk 5) | ++ ^a | ++++ |
| eiwit 2+3 | ++ | ++ |
| eiwit 4 | ++ | + |
| glycolipide | - | +++ |
| <i>N. rustica</i> -sap | ++ | - |
| polysacchariden | ++ | + |

^a de sterkte van de precipitaties is aangegeven als - negatief, + zwak, ++ middelmatig. +++ sterk en ++++ zeer sterk.

ligt tussen de twee gemeenschappelijke precipitatielijnen in. Deze precipitatielijnen zullen in het vervolg van buiten naar binnen aangeduid worden als 1, 2 en 3.

Antiserum 1 bleek een vrij sterke reactie te geven met *N. rustica*-sap en polysacchariden uit *N. rustica* (Fig. 4.3). Antiserum 2 gaf geen reactie met *N. rustica*-sap en een vrij zwakke precipitatie met polysacchariden uit *N. rustica*.

Het verschil in reactie tussen de antisera is samengevat in Tabel 4.1.

4.2. Verzadiging van TSWV-antiserum met *N. rustica*-sap

De antisera tegen TSWV werden verzadigd met *N. rustica*-sap zoals beschreven (Hoofdstuk 2). Verzadigd en onverzadigd antiserum werden getoetst tegen TSWV met behulp van immunodiffusie in agargel. In Fig. 4.4 is dit weergegeven voor wat betreft antiserum 2. De precipitatielijnen 1 en 2 zijn bij gebruik van onverdund antiserum en bij verdunning 1 op 2 niet goed gescheiden (Fig. 4.4 A), hoewel dit 24 uur voordat dit patroon fotografisch werd vastgelegd wel het geval was.

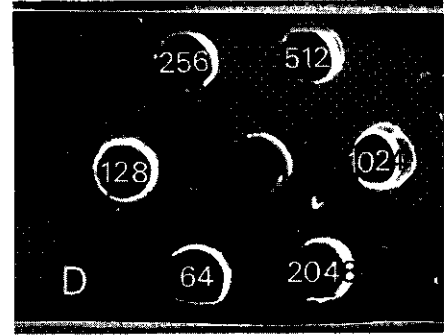
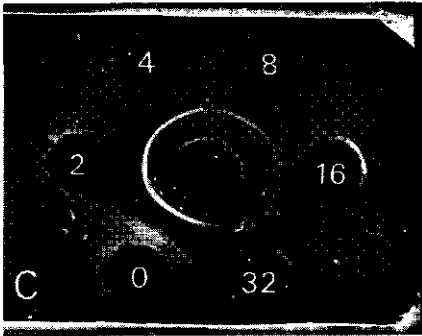
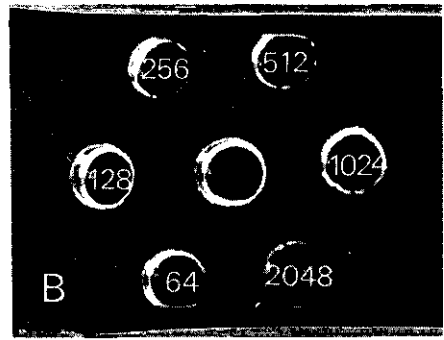
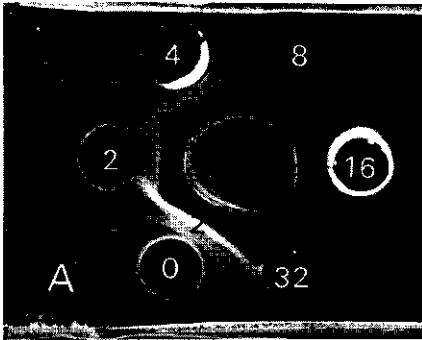


Fig. 4.4 Immunodiffusiepatroon tussen TSWV en een aantal verdunningen van onverzadigd antiserum 2 (A en B) en een aantal verdunningen van antiserum 2, dat met *N. rustica*-sap was verzadigd (C en D). Aan het middenputje was steeds niet-gedenatureerd TSWV toegevoegd. De cijfers bij de buitenste putjes geven het omgekeerde van de toegepaste serumverdunding aan.

De precipitatielijnen 1, 2 en 3 bestaan vaak uit enige vlak bij elkaar gelegen precipitaties, waardoor vaak geen duidelijk patroon verkregen wordt. Tengevolge van verzadiging met overmaat *N. rustica*-sap verdwijnt precipitatielijijn 1 geheel (Fig. 4.4 C). Ogenschijnlijk lijkt hier de middelste precipitatielijijn te verdwijnen. Uit andere precipitatiepatronen met verzadigd antiserum 2 (Fig. 4.7) bleek echter, dat precipitatielijijn 1 verdween. De verklaring hiervoor is, dat tengevolge van verzadiging van antiserum 2 de titer ten aanzien van het antigeen dat met precipitatielijijn 2 correspondeert, afneemt, waardoor deze lijn meer naar buiten verschuift. Uit het verdwijnen van precipitatielijijn 1 blijkt, dat hoewel antiserum 2 geen reactie met *N. rustica*-sap geeft, verzadiging met *N. rustica*-sap wel degelijk invloed heeft op de reactie van het aldus verzadigde antiserum met het virus. Hieruit moeten we concluderen dat de reactie van antiserum 2 met *N. rustica*-sap blijkbaar geen zichtbare precipitatie geeft. Verwacht mag worden dat in *N. rustica*-sap een groot aantal verschillende polysacchariden als antigenen voorkomen zowel vrij als gebonden aan eiwitten en lipiden. Verder kan de concentratie van die polysacchariden, die ook in het virus aanwezig zijn, bepalen of er precipitatielijnen bij immunodiffusie van *N. rustica*-sap en TSWV-antiserum ontstaan.

Tengevolge van verzadiging met overmaat *N. rustica*-sap loopt de titer van antiserum 2 ongeveer met een factor 4 terug. In Tabel 4.2 is na verzadiging de daling van de titer voor de virusantigenen welke corresponderen met de precipitatielijnen 1, 2 en 3 aangegeven.

Tabel 4.2 Titer van onverzadigd en verzadigd antiserum 2 met betrekking tot diverse antigeenfracties uit TSWV, welke corresponderen met de precipitatielijnen 1, 2 en 3.

| precipitatielijijn (antigeenfractie) | titer | |
|---|------------------|----------------|
| | voor verzadiging | na verzadiging |
| 1 | 2 | 0 |
| 2 | 16 | 2 |
| 3 | 128 | 32 |

Wanneer een in de lengte doorgesneden polyacrylamidegel na elektroforese van de TSWV-eiwitten getoetst werd tegen verzadigd antiserum 2, werd nog maar een zwakke reactie met eiwit 1 verkregen. Met verzadigd antiserum 1 ontstonden onder deze omstandigheden geen zichtbare precipitaties.

Het sterke teruglopen van de titer tengevolge van verzadiging zou geweten kunnen worden aan het wegnemen van eventuele verontreinigingen, aanwezig in het viruspreparaat dat voor immunisatie gebruikt was. Uit elektroforese van sterk verontreinigd TSWV op polyacrylamidegel werden aanwijzingen verkregen, dat eventuele verontreinigingen polydispers van aard zouden kunnen zijn, aangezien geen nieuwe eiwitbanden gevonden werden, maar wel een verhoogde achtergrondskleuring. Op grond hiervan kan het uitgesloten worden geacht dat tegen verontreinigingen een hoge concentratie aan antistoffen is ontstaan.

4.3. Verzadiging van TSWV-antiserum met polysacchariden

Na verzadiging van antiserum 1 met polysacchariden die gezuiverd waren uit *N. rustica* (Hoofdstuk 2), werd geen reactie meer verkregen met sap van niet geïnfecteerde *N. rustica*-planten (Fig. 4.5). Werd dit antiserum echter verzadigd met polysacchariden uit *Cucumis sativus* dan viel er nog wel een zwakke reactie met sap van *N. rustica* te constateren. Blijkbaar is er een verschil in polysaccharidensamenstelling tussen sap van *C. sativus* en *N. rustica*. Dit is niet zo vreemd als men bedenkt dat deze planten tot verschillende families behoren. Werd antiserum 1, na verzadiging met polysacchariden uit *N. rustica* getoetst tegen verdunningen van komkommersap dan trad geen precipitatie op (Fig. 4.6). Wanneer TSWV-antiserum verzadigd met polysacchariden uit *N. rustica*, niet meer reageert met *N. rustica*-sap dan mag men inderdaad verwachten, dat het ook niet meer zal reageren met sap uit een plant van een willekeurig andere soort.

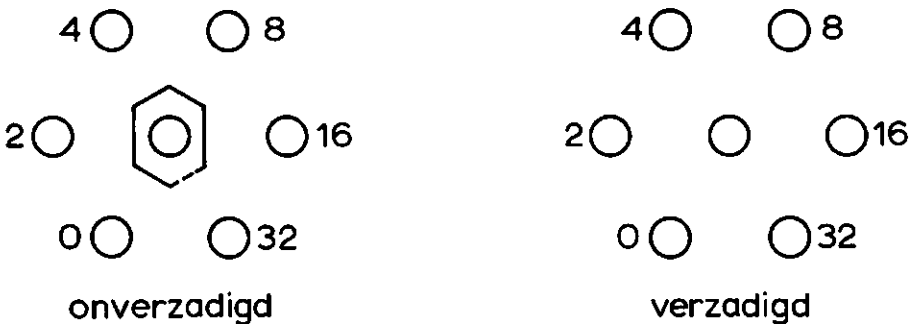


Fig. 4.5 Immunodiffusiepatronen van antiserum 1, voor en na verzadiging met polysacchariden uit *N. rustica*, getoetst tegen verdunningen (0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 en 1:32) van sap van niet-geïnfecteerde *N. rustica*-planten.

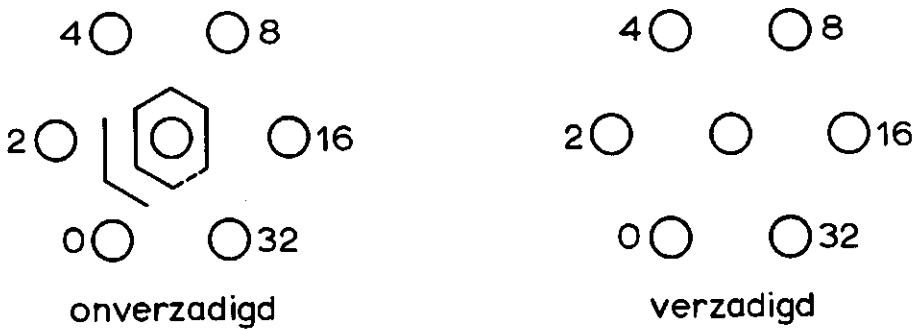


Fig. 4.6 Immunodiffusiepatronen van antiserum 1, voor en na verzadiging met polysacchariden uit *N. rustica*, getoetst tegen verdunningen (0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 en 1:32) van niet geïnfecteerde komkommerplanten.

Bovenstaande patronen tonen duidelijk aan dat de reactie van niet geïnfecteerd sap van zowel *N. rustica* als *C. sativus* met antiserum 1 toegeschreven moet worden aan het voorkomen van antilichamen tegen polysacchariden in dit antiserum. Derhalve zal het viruspreparaat dat gebruikt werd om het konijn te immuniseren polysacchariden bevat hebben. Dit kan als verontreiniging of als bestanddeel van het virusdeeltje zijn toegediend.

4.4. Verzadiging van TSWV-antiserum met gedenatureerd virus

Antiserum 2 werd met toenemende hoeveelheden gedenatureerd TSWV verzadigd zoals beschreven (Hoofdstuk 2). De aldus verzadigde oplossingen werden vervolgens getoetst tegen niet-gedenatureerd en gedenatureerd TSWV (Fig. 4.7).

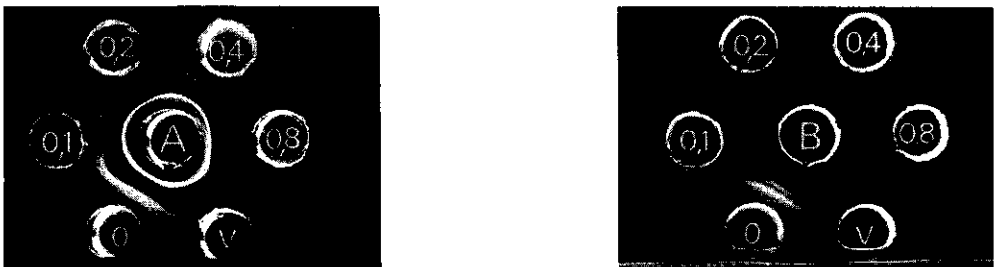


Fig. 4.7 Immunodiffusiepatronen in 1% agarose, welke ontstonden na reactie van niet-gedenatureerd TSWV (A), en virus dat met SDS en ME gedenatureerd was (B), met antiserum 2 waaraan toenemende hoeveelheden gedenatureerd TSWV waren toegevoegd (resp. 0; 0,1; 0,2; 0,4 en 0,8 ml). Getoetst werd ook tegen met *N. rustica*-sap verzadigd antiserum (v).

Opgemerkt moet worden dat de precipitatielijnen in het linker en rechter gedeelte van Fig. 4.7 niet direct te vergelijken zijn. In de reactie met gedenatureerd virus kunnen de eiwitten afzonderlijk in de agar diffunderen. De precipitatielijnen liggen daarom dicht tegen het antiserumputje aan. In de reactie met niet-gedenatureerd virus is het materiaal waarschijnlijk in de vorm van grove fragmenten gediffundeerd. Uit het rechterpatroon van Fig. 4.7 blijkt dat na toevoeging van 0,1 ml gedenatureerd virus het serum reeds verzadigd is, aangezien er geen precipitatielijnen ontstaan. Uit het linkerpatroon blijkt dat in dit verzadigde TSWV-antiserum nog vrij veel antilichamen tegen niet-gedenatureerd TSWV aanwezig zijn. Dit is een aanwijzing dat slechts een kleine populatie van de γ -globulinen tegen TSWV met gedenatureerd virus heeft gereageerd. Tengevolge van de denaturatie met SDS en ME kunnen het merendeel van de antigene groepen van de viruseiwitten vernietigd zijn. Alleen koolhydraatketens, die aan eiwit of lipiden bevestigd zijn, hebben weinig veranderingen ondergaan. Dit kon

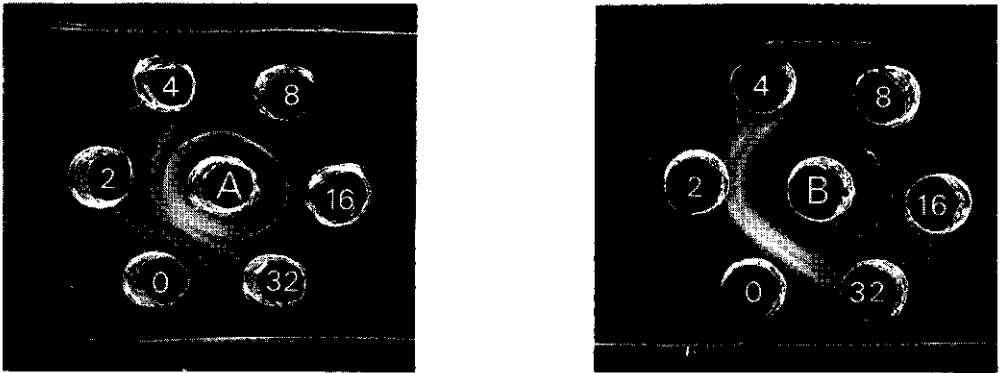


Fig. 4.8 Immunodiffusiepatronen van niet-gedenatureerd (A) en gedenatureerd TSWV (B) tegen verdunningen (0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 en 1:32) van antiserum 1.

bevestigd worden door verdunningen van TSWV-antiserum te toetsen tegen niet-gedenatureerd en gedenatureerd TSWV (Fig. 4.8). Bij een verdunning van 1:32 van antiserum 1 werd nog een reactie met niet-gedenatureerd TSWV gevonden, terwijl bij toetsing van hetzelfde antiserum tegen gedenatureerd TSWV bij een verdunning van 1:8 geen precipitatielijnen werden verkregen.

Verzadiging met overmaat *N. rustica*-sap heeft ongeveer hetzelfde effect als verzadiging met een overmaat gedenatureerd TSWV (Fig. 4.9), nl. het uitblijven van de reactie van TSWV-antiserum met gedenatureerd TSWV. Aangezien verzadiging van

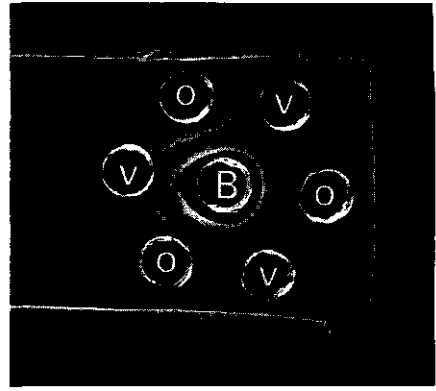
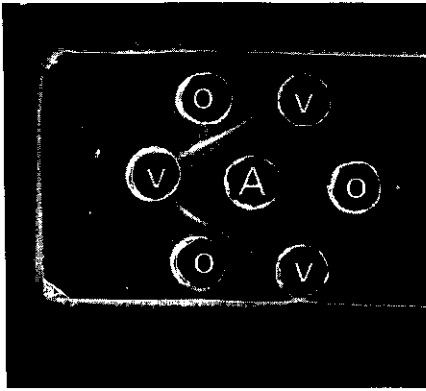
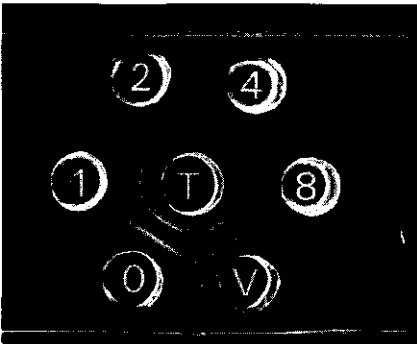


Fig. 4.9 Immunodiffusiepatroon in 1% agarose van antiserum 2 vóór (O) en na (v) verzadiging met *N. rustica*-sap. Het serum werd getoetst tegen met SDS en ME gedenatureerd virus (A) en tegen niet-gedenatureerd TSWV (B).

TSWV-antiserum met *N. rustica*-sap identiek is aan verzadiging met polysacchariden uit *N. rustica* lijkt de conclusie gerechtvaardigd, dat de reactie van TSWV-antiserum met gedenatureerd virus voornamelijk te wijten is aan polysacchariden in dit gedenatureerde virus.

4.5. Verzadiging van TSWV-antiserum met intact virus

De verzadiging van het antiserum werd uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk 2. De oplossingen van antiserum 2, die met toenemende hoeveelheden virus waren verzadigd, werden getoetst tegen niet-gedenatureerd virus (Fig. 4.10). Tengevolge



4.10 Immunodiffusion in 1% agarose van niet-gedenatureerd TSWV (T) tegen antiserum 2 waaraan toenemende hoeveelheden intact TSWV waren toegevoegd (resp. 0, 1, 2, 4 en 8 ml intact TSWV, Hoofdstuk 2) en tegen antiserum 2, dat met *N. rustica*-sap was verzadigd.

van deze verzadiging verdwenen alle precipitatielijnen met uitzondering van precipitatielijijn 3. Deze laatste precipitatielijijn moet toegeschreven worden aan antigenen die in het intacte virus niet met TSWV-antiserum geneutraliseerd waren. De mogelijkheid, dat deze precipitatielijijn veroorzaakt was door een antigeen op de membraan, dat afgeschermd zou zijn voor reactie met antilichamen tegen TSWV, lijkt onwaarschijnlijk gezien de resultaten van het ^{125}J experiment (5.4.3), waaruit bleek dat alle eiwitten, uitgezonderd eiwit 1, redelijk toegankelijk waren voor het lactoperoxydase— ^{125}J -complex. Wat verder opviel in het immunodiffusiepatroon was de blauwige kleur van deze binnenste precipitatielijijn in tegenstelling tot de overige precipitatielijijnen, die meer grijs van kleur waren. Gezien het bovenstaande en met de wetenschap dat TSWV-antiserum antilichamen tegen eiwit 1 bezit (4.1) lijkt het aannemelijk om deze precipitatielijijn aan eiwit 1 toe te schrijven. De buitenste precipitatielijijnen moeten aan antigenen die met de membraan geassocieerd zijn, toegeschreven worden.

4.6. Reactie van antiserum tegen sap van niet geïnfecteerde *N. rustica* met TSWV

Gezien de aanwijzingen voor het voorkomen van waardantigeen in TSWV (4.2 en 4.3) was het interessant om na te gaan of het antiserum tegen *N. rustica*-sap ook reageerde met het virus. Deze proef werd herhaaldelijk uitgevoerd, maar alleen in het geval, dat TSWV afgebroken was met 6,5 M guanidine-HCl werd een zwakke reactie met antiserum tegen *N. rustica*-sap verkregen. Door verzadiging van dit antiserum met polysacchariden uit *N. rustica* werd deze reactie teniet gedaan (Fig. 4.11).

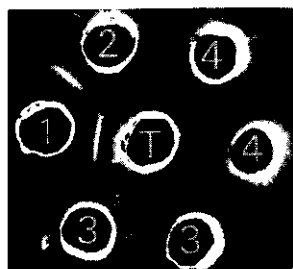


Fig. 4.11 Immunodiffusiepatroon in 1% agar van TSWV (T), dat met 6,5 M guanidine-HCl was afgebroken tegen a) antiserum 1 (1), b) antiserum 1 verzadigd met polysacchariden uit *N. rustica* (2), c) antiserum tegen *N. rustica*-sap (3), en d) antiserum tegen *N. rustica*-sap verzadigd met polysacchariden uit *N. rustica*-sap (4).

Het feit, dat slechts een zwakke reactie tussen het antiserum tegen *N. rustica*-sap en TSWV verkregen werd, is verklaarbaar wanneer we ons realiseren dat dit antiserum bereid was tegen een grote heterogene populatie van polysacchariden en andere antigenen, als gevolg waarvan dit antiserum slechts een lage titer had. In tegenstelling hiermee mogen we aannemen dat het antiserum tegen het virus gericht is tegen een kleine, maar homogene populatie van polysacchariden, die in relatief veel hogere concentratie in de voor immunisatie gebruikte virus-suspensie zullen voorkomen dan in plantesap. De titer van dit antiserum zal bijgevolg hoger zijn.

4.7. Conclusie

De tegen het virus bereide antisera waren niet specifiek voor het virus aangezien ze ook reageerden met plantesap. Verzadiging met *N. rustica*-sap ofwel met polysacchariden uit *N. rustica* leverde wel een specifiek werkzaam antiserum op. De titer van dit verzadigde antiserum was echter een factor 4 lager dan die van het oorspronkelijke antiserum. Tegen eiwit 1 kon een vrij specifiek antiserum verkregen worden door het antiserum te verzadigen met een overmaat intact virus. Van de diverse onderzoekers, die antisera bereid hebben tegen TSWV (Best en Hariharasubramanian, 1967; Tsakiridis en Gooding, 1972; Joubert et al., 1974; en Paliwal, 1974) vermeldt alleen Paliwal een reactie van TSWV-antiserum met gezond sap en een sterk teruglopen van de titer na verzadiging met gezond sap.

Op grond van onderstaande waarnemingen concluderen we dat in TSWV waardantigeen voorkomt.

1. het sterke teruglopen van de titer van TSWV-antiserum tengevolge van verzadiging met *N. rustica*-sap (4.1),
2. de reactie van TSWV-antiserum met *N. rustica*-sap die voorkomen kon worden door verzadiging van TSWV-antiserum met polysacchariden uit *N. rustica* (4.2). Hieruit is af te leiden, dat het viruspreparaat, dat voor immunisatie gebruikt werd polysacchariden bevatte.
3. de reactie van TSWV-antiserum met gedenatureerd virus die voornamelijk toegeschreven moest worden aan polysacchariden in dit gedenatureerde virus (4.4). Aangezien de precipitaties exact overeenkwamen met de posities van eiwit 1, 2+3 en 4 kan hier geen sprake zijn van een reactie met een eventuele contaminatie in het viruspreparaat.

4. uit kleuring met reagens volgens Schiff bleek, dat het merendeel van de eiwitten in het virus covalent gebonden koolhydraat bevatte (5.2.1),
5. de zwakke precipitatielijns van het antiserum tegen *N. rustica*-sap met TSWV kwam exact overeen met de positie van de precipitatielijns van TSWV met antiserum TSWV. Na verzadiging van het antiserum tegen *N. rustica*-sap met polysacchariden uit *N. rustica* bleef precipitatie achterwege (4.6).

Op grond van het bovenstaande moeten we aannemen, dat waardantigeen in de vorm van koolhydraten gebonden kan zijn aan de eiwitten 2, 3 en 4. Voor de eiwitten 5, 6 en 7 kon vanwege de geringe concentratie van deze eiwitten niet aangetoond worden of deze eventueel waardantigeen bevatten.

Of het koolhydraatgedeelte van de glycolipide(n) die uit het virus werden geëxtraheerd (5.2.2) ook afkomstig was uit de waardplant is nog niet onderzocht. Het is niet aannemelijk dat het genoom van TSWV informatie bevat voor volgorde en structuur van de suikerresiduen in de koolhydraatketens. Dit vereist namelijk dat het virus voor een aantal glycosyltransferases codeert en wel één transferase voor elk monosaccharide (Burge en Strauss, 1970). Deze redenering doet vermoeden dat het koolhydraatgedeelte van de glycolipide(n) van TSWV eveneens afkomstig is van de waardplant.

Waardantigeen in de vorm van glycolipide is aangetoond bij para-influenzavirus, SV 5 (Klenk et al., 1970) en "vesicular stomatitis virus" (Klenk en Choppin, 1971; Cartwright en Brown, 1972). Waardantigeen in de vorm van glycoproteïne is aangetoond bij influenzavirus (Laver en Webster, 1966).

5. EEN ANALYSE VAN DE EIWITTEN VAN TSWV

Uit studies aan negatief gecontrasteerde deeltjes en aan de structuur in ultradunne coupes concludeerden Best en Palk (1964), Ie (1964), Van Kammen et al. (1966) en Paliwal (1974) dat TSWV door een envelop is omgeven. Het virus bestaat chemisch uit 19% lipiden, 7% koolhydraat, 5% RNA en 69% eiwit (Best en Katekar, 1964). Deze samenstelling wijst ook op de aanwezigheid van een envelop in het virus.

Naar analogie van andere virussen die een membraan bezitten mogen we in TSWV enige eiwitten verwachten. Een van deze eiwitten is mogelijk met het nucleïnezuur geassocieerd. Voorts maken vermoedelijk een of meer eiwitten deel uit van, of zijn geassocieerd met de envelop.

Alle membraanvirussen bevatten een of meer glycoproteïnen, welke aan de buitenzijde van de envelop gelokaliseerd zijn (Lenard en Compans, 1974). In zeer veel gevallen, o.a. influenzavirus (Compans et al., 1970; en Schulze, 1970), para-influenzavirus (Chen et al., 1971), Sindbis-virus (Compans, 1971) en "vesicular stomatitis virus" (McSharry et al., 1971) heeft men kunnen aantonen dat de eiwituitsteeksels, die na negatieve kleuring van de diverse membraanvirussen zichtbaar zijn, uit glycoproteïnen bestaan.

De meeste membraanvirussen bevatten buiten het nucleocapside-eiwit minstens nog één niet-geglycosyleerd eiwit, dat geassocieerd is met de binnenzijde van de virusenvelop (Lenard en Compans, 1974). Bij de groep van de togavirussen vindt men dit eiwit niet. Deze virussen bevatten behalve het nucleocapside-eiwit alleen glycoproteïnen (Schlesinger et al., 1972). Bij een virus uit deze groep, namelijk Sindbis-virus, is met röntgendiffractie aangetoond, dat de nucleocapside direct tegen de lipidendubbellaag aanligt (Harrison et al., 1971 a).

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van een aantal experimenten worden besproken, die tot doel hadden na te gaan:

1. hoeveel eiwitten of polypeptiden er in TSWV voorkomen,
2. hoeveel eiwitten er covalent gebonden koolhydraten bevatten,
3. hoe groot het molecuulgewicht van deze eiwitten is,
4. waar de gevonden eiwitten in het virus gelokaliseerd zijn.

5.1. Afbraak van TSWV en scheiding van de eiwitcomponenten door elektroforese in polyacrylamidegel

Om de viruseiwitten in een oplosbare vorm te brengen wordt veel gebruik gemaakt van SDS. Deze verbinding hecht zich aan de diverse eiwitten in hoeveelheden variërend van 1,4 - 2,5 mg SDS per mg eiwit, met als resultaat dat de effecten van de intrinsieke lading en de conformatie van de moleculen op hun elektroforetisch gedrag klein zijn (Dunker en Rueckert, 1969).

Disulfidebindingen kunnen gesplitst worden door het eiwit te behandelen met bv. ME of DDT. De gevormde monomeren kunnen beschermd worden tegen ongewenste disulfide-interacties door alkylering met joodaceetamide of N-ethylmaleïmide (Smithies, 1965).

Tabel 5.1 Afbraak van TSWV onder verschillende omstandigheden

| methode | SDS | ME | ureum | DTT | joodaceet- amide | incubatie- condities | duur van de dialyse | elektroforese- patroon identiek aan |
|-----------------|-----|----|-------|------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|---|
| | % | % | M | M | M | | | |
| 1 | 1 | | | | | 2 uur 37°C | nacht | Fig. 5.1A |
| 2 | 1 | 1 | | | | " | " | Fig. 5.1B |
| 3 | 1 | 1 | | | | 5 min 95°C | " | Fig. 5.1C |
| 4 | 1 | 1 | | | 0,3 | 2 uur 37°C | 1 uur | Fig. 5.1C |
| 5 | 1 | 1 | | | 0,3 | " | 4 " | " |
| 6 | 1 | 1 | | | 0,3 | " | nacht | " |
| 7 ^a | 1 | 1 | | | 0,3 | " | " | " |
| 8 ^b | 2 | 1 | 0,5 | | | 30 min 37°C | " | Fig. 5.1D |
| 9 ^b | 2 | 1 | 0,5 | 10 ⁻³ | | " | " | Fig. 5.1E |
| 10 ^c | 1 | | | 0,04 | | 20 min 50°C | " | Fig. 5.1C |

^a In dit geval werd 0,1% ME aan de elektroforesebuffer toegevoegd

^b Methode volgens Haslam et al. (1970)

^c Methode volgens Fairbanks et al. (1971).

TSWV werd volgens 10 verschillende methoden afgebroken zoals in Tabel 5.1 is aangegeven, en op een 7,5% polyacrylamidegel geëlektroforeerd volgens de methode van Weber en Osborn (1969).

Door TSWV met SDS af te breken, konden na elektroforese 9 banden gedetecteerd worden, zoals in Fig. 5.1A is te zien. Twee banden genummerd resp. 1 en 4 springen er duidelijk uit, dan volgen twee dicht bij elkaar gelegen banden genummerd 2 en 3 en tenslotte 5 kleine banden genummerd 3^a, 3^b, 5, 6 en 7. Door toevoeging van ME (Tabel 5.1; methode 2) verdwijnt eiwitcomponent 3^a (Fig. 5.1 B). Indien na incubatie het mengsel met joodaceetamide wordt behandeld (methode 4) om de eiwitten te carboxymethyleren, verdwijnt eveneens eiwitcomponent 3^b (Fig. 5.1C).

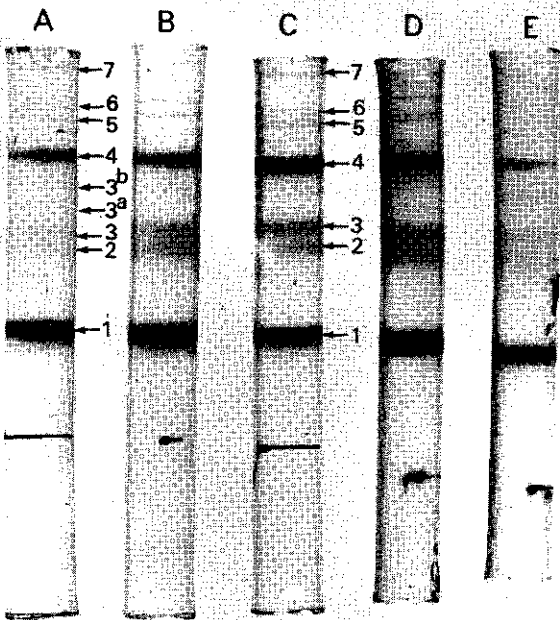


Fig. 5.1 Elektroforese in polyacrylamidegel van TSWV, dat volgens de methoden 1 (A), 2 (B), 3 (C), 8 (D) en 9 (E) (Tabel 5.1) was afgebroken. De eiwitcomponenten in gel C zijn genummerd van laag naar hoog molecuulgewicht. In gel A komen twee extra banden voor, die als 3^a en 3^b zijn aangeduid. Het elektroforesefront is gemerkt met Oostindische inkt.

Het patroon bestaat dan uit 7 eiwitcomponenten. Verschillende andere afbraakmethoden (3, 8 en 10) leiden niet tot een reductie van het aantal banden. Alleen door incubatie bij hoge pH en hoge temperatuur in aanwezigheid van 0,5 M ureum en 10^{-3} M DTT (methode 9) wordt het aantal eiwitcomponenten gereduceerd (Fig. 5.1E). De hoog-moleculaire eiwitcomponenten 5, 6 en 7 zijn dan nagenoeg volledig verdwenen

en ook eiwitcomponent 4 is sterk gereduceerd. Betwijfeld wordt of deze afbraak niet verder gaat dan de polypeptiden waaruit de eiwitten mogelijk zijn opgebouwd. Het valt nl. op dat in het densitogram, verkregen na toepassing van methode 9 (Fig. 5.2 B), de pieken van de eiwitcomponenten 1, 2 en 3 aan hun basis breder zijn dan in het densitogram verkregen na toepassing van methode 8 (Fig. 5.2 A). De condities van deze afbraakprocedure (hoge temperatuur en hoge pH) zijn zodanig, dat de koolhydraat-peptidebindingen die eventueel labiel zijn in alkalisch milieu, verbroken kunnen worden (Gottschalk, 1966). Dit kan resulteren in een breder bandje op de gel.

Uit een drietal representatieve elektroferogrammen van TSWV werd berekend in welke verhouding de diverse eiwitcomponenten voorkomen. Hiervoor werd de oppervlakte onder de pieken uit het densitogram van de met coomassie brilliant blue gekleurde gels gedeeld door het molecuulgewicht (ontleend aan 5.3). Hieruit volgde dat de gemiddelde verhouding van het aantal moleculen van eiwit 1 : eiwit 2 + 3 : eiwit 4 gelijk is aan 9 : 2 : 2. De eiwitten 5, 6 en 7 bleken tezamen niet meer dan 3% van het totale viruseiwit uit te maken.

De gevonden verhouding dient evenwel met grote voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden omdat

1. schatting van het molecuulgewicht van glycoproteïnen aanzienlijk kan afwijken het werkelijke molecuulgewicht (Grefrath en Reynolds, 1974; Moennig et al., 1974)
2. glycoproteïnen in mindere mate zullen kleuren met coomassie brilliant blue dan standaard-eiwitten (Fairbanks et al., 1971).

Desalniettemin is duidelijk dat eiwit 1, eiwit 2 + 3 en eiwit 4 de hoofdcomponenten zijn van het virus, waarbij vooral de grote hoeveelheid van eiwit 1 opvalt. De eiwitten 5, 6 en 7 zijn slechts in een vrij kleine hoeveelheid in het virus aanwezig.

Mohamed et al. (1973) vonden bij analyse van gezuiverd TSWV in polyacrylamidegel eveneens 7 eiwitcomponenten. Het door deze auteurs gepubliceerde densitogram is in grote lijnen identiek met het densitogram zoals dat is weergegeven in Fig. 5.2A. Het belangrijkste verschil is het feit dat Mohamed et al. in plaats van eiwit 2 en 3 een enkele eiwitpiek vonden, die wat de hoeveelheid betreft de som van de hoeveelheden van eiwit 2 en 3 ruim overtrof. Een ander verschil is dat de eiwitten 5 en 6 bij Mohamed et al. (1973) verdwenen tengevolge van verhitting bij 100°C (2 min) terwijl onder onze omstandigheden het patroon na 5 min 95°C geen verandering onderging.

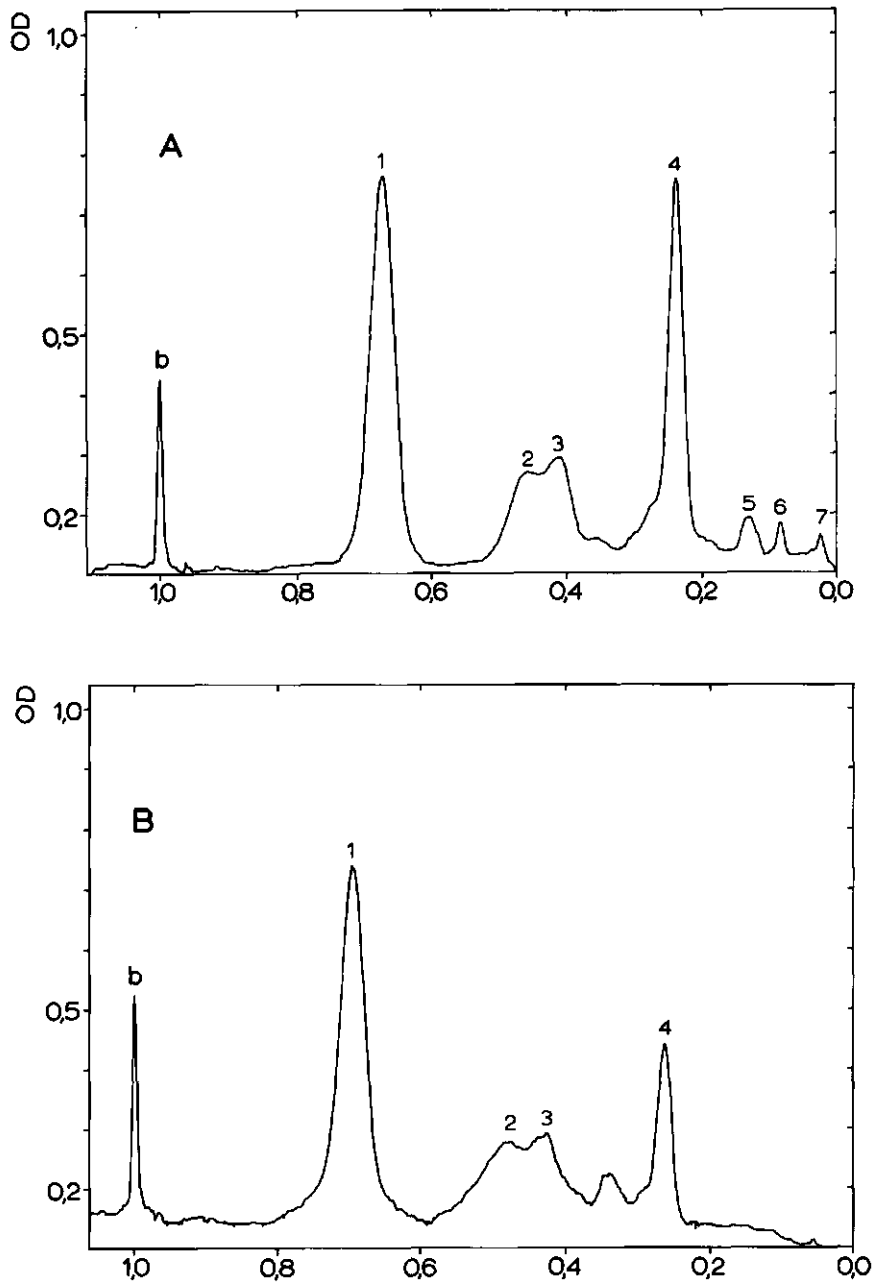


Fig. 5.2 Elektroforesepatronen, in 7,5% polyacrylamidegels, van TSWV afgebroken volgens methode 8 (A) en 9 (B). De elektroforese was van rechts naar links. De Oostindische inktpiek (b) geeft de plaats van de broomfenolblauwband aan.

5.2. Detectie van glycoproteïnen

Glycoproteïnen in polyacrylamidegels worden meestal met behulp van gemodificeerde PAS-kleuringen (Zacharius et al., 1969; Segrest en Jackson, 1972; Felgenhauer et al., 1970; en Kapitany en Zebrowski, 1973) gedetecteerd. In principe vereisen alle methoden een fixatiestap met zuur of ethanol, gevolgd door oxydatie van gebonden koolhydraat met perjoodzuur.

De oxydatie berust op splitsing van C—C-bindingen tussen opeenvolgende α -glycolen en de daaropvolgende omzetting van deze glycolen tot dialdehyden. Deze aldehyden reageren met Schiffs reagens tot een additieprodukt, dat een meer of minder intens rode kleur heeft. Perjoodzuur is te prefereren als oxydatiemiddel omdat het oxydeert tot het aldehydestadium, waarmee overoxydatie voorkomen wordt. (Kapitany en Zebrowski, 1973).

De PAS-kleuring is echter niet kwantitatief omdat het aantal met perjoodzuur te oxyderen covalente bindingen - bepalend voor de intensiteit van de kleurreactie - afhankelijk is van samenstelling en structuur van het koolhydraat in het glycoproteïne. De PAS-kleuring is ook niet kwalitatief omdat de kleuring niet differentieert tussen neutrale suikers, aminosuikers en siaalzuren (Wray en Perdue, 1974).

Glycoproteïnen kunnen ook aangetoond worden door het virus in vivo te labelen met glucosamine- ^3H (Teramoto et al., 1974; Sokol et al., 1971) of het gezuiverde virus in vitro te labelen met natriumboorhydride (NaB^3H_4) (Gahmberg en Hakomori, 1973; Steck en Dawson, 1974). Deze methoden hoeven niet hetzelfde resultaat te geven, omdat ze verschillende suikergroepen radioactief maken. Glucosamine en N-acetylglucosamine worden gelabeld met glucosamine- ^3H , en galactose en N-acetylgalactosamine met NaB^3H_4 .

Labeling met glucosamine- ^3H levert goede resultaten bij toepassing op weefselcultures van dierlijke aard, maar is moeilijk toepasbaar op planten. Labeling van de glycoproteïnen van gezuiverd virus is echter goed mogelijk met natriumboorhydride- ^3H en galactose-oxydase. Dit enzym oxydeert de OH groep aan het C_6 atoom van d-galactose en N-acetyl-d-galactosamine. De ontstane aldehyde-groepen worden gelabeld door reductie met natriumboorhydride- ^3H . Na scheiding van de polypeptiden van het virus in polyacrylamidegel kan nagegaan worden welke polypeptiden radioactief zijn.

5.2.1. Kleuring met PAS-reagens

Verschillende PAS-kleuringen werden getoetst op hun geschiktheid om de glycoproteïnen van het virus in de gel te kleuren. De methode van Zacharius et al. (1969) gaf de beste resultaten. Het patroon van deze PAS-kleuring is weergegeven in Fig. 5.3. Alle op deze gel duidelijk te detecteren polypeptiden van het virus

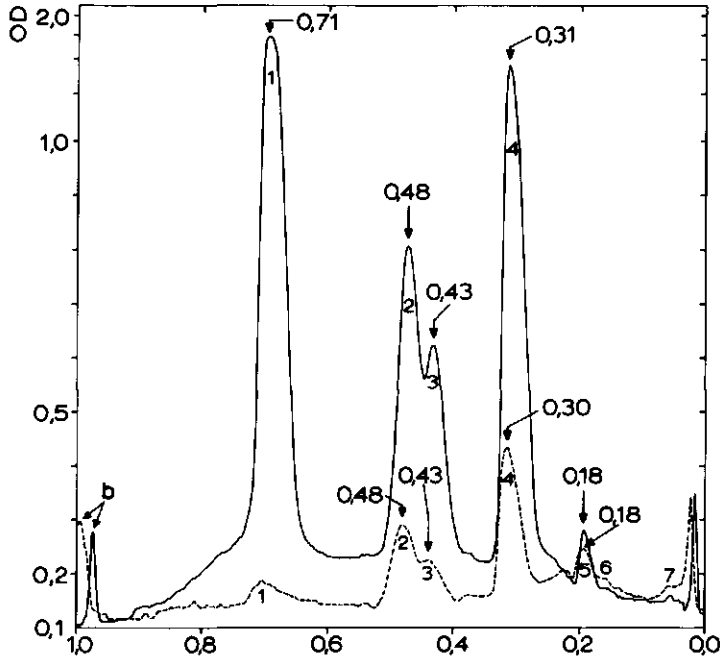


Fig. 5.3 Elektroforesepatronen van de eiwitten van TSWV op 7,5% polyacrylamidegels. De elektroforeserichting is van rechts naar links. Gekleurd werd met amidoblack (—) en PAS-reagens (----). Bij de voornaamste pieken in beide patronen zijn de Rf-waarden aangegeven. De PAS-kleuring werd gemeten bij 520 nm met behulp van een filter. De Oostindische inktpiek (b) geeft de plaats van de broomfenolblauwband aan.

(in dit geval no 1 tot en met 5) reageerden met het reagens. Kleuring volgens Kapitany en Zebrowski (1973) gaf hetzelfde resultaat. Bij de methode van Felgenhauer (1970) werden de glycoproteïnen tengevolge van incubatie met Schiff's reagens aanvankelijk goed gekleurd, maar bij het daaropvolgend wassen in een oplossing van kaliumdisulfiet en HCl vervaagden de banden sterk. De methode van Segrest en Jackson (1972) en Matthieu en Quarles (1973) kleurden nagenoeg identiek, maar veel minder sterk dan volgens Zacharius. Bij de kleuring volgens Caldwell en Pigman (1965) traden problemen op om de gel te ontkleuren.

De specificiteit van de methode van Zacharius et al. (1969) werd getoetst door 4 proteïnen (ribonuclease A, trypsine, carboxypeptidase A en bovineserumalbumine) en 4 glycoproteïnen (fetuïne, ovalbumine, peroxydase en bromelaine) na denaturatie met SDS en ME en elektroforese op polyacrylamidegel te kleuren. De glycoproteïnen reageerden positief na kleuring, de proteïnen daarentegen niet. Uit deze waarnemingen kunnen we concluderen dat deze methode voor zover onderzocht niet tot specifieke kleuring aanleiding geeft.

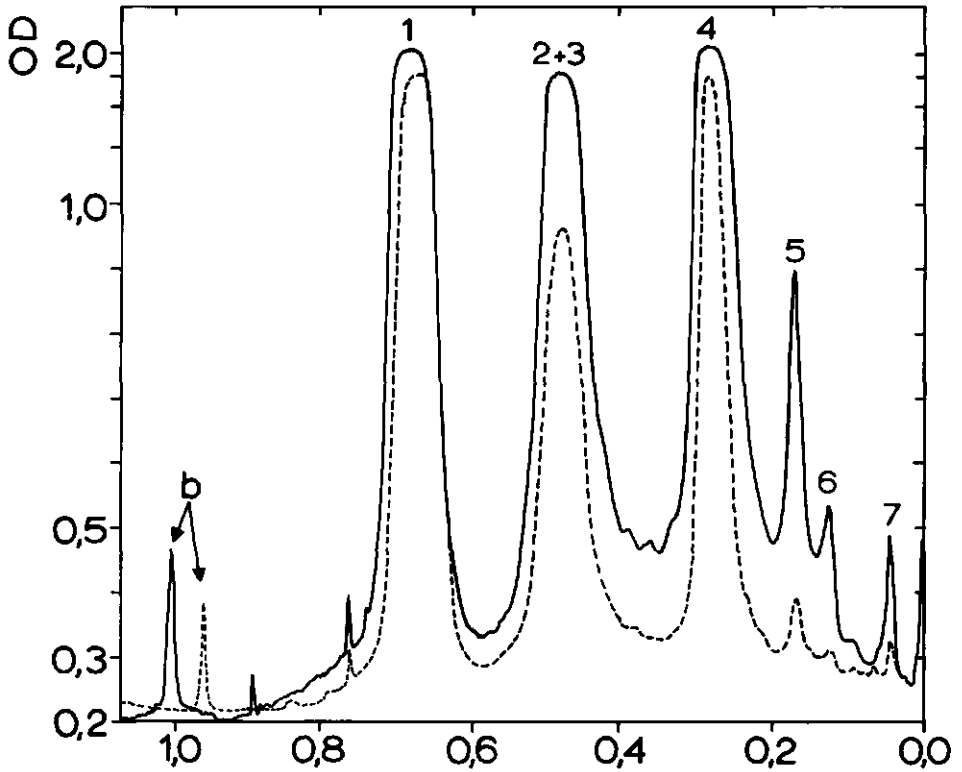


Fig. 5.4 Elektroforesepatronen van de eiwitten van TSWW op 7,5% polyacrylamidegels. De elektroforeserichting is van rechts naar links.
 — = patroon van een gel direct na elektroforese met coomassie brilliant blue gekleurd.
 ---- = patroon van een gel, eerst gekleurd op glycoproteïnen volgens Felgenhauer (1970) en vervolgens nagekleurd met coomassie brilliant blue.

Uit het patroon van Fig. 5.3 blijkt dat de mate van kleuring met PAS-reagens met het moleculgewicht van de polypeptiden toeneemt. Om de mogelijkheid uit te sluiten, dat eiwit van de laag moleculaire banden verloren was gegaan tengevolge van diffusie uit de gel tijdens de diverse malen dat er werd gewassen gedurende de kleuring en ontkleuring, werd een met PAS gekleurde gel nagekleurd met coomassie brilliant blue en vergeleken met een gel die direct na elektroforese gekleurd was (Fig. 5.4). De "piekhoogte" van de eiwitten 1, 2+3 en 4 bleek voor de nagekleurde gel resp. met 25%, 40% en 25% afgenomen te zijn ten opzichte van de gel, die direct met coomassie brilliant blue werd gekleurd. Voor de eiwitten 5, 6 en 7 lag deze reductie in de orde van grootte van 70-90%. De zwakke kleuring van eiwit 1 kan derhalve moeilijk aan een verlies van dit eiwit tengevolge van diffusie uit de gel tijdens de diverse behandelingen geweten worden.

Glossmann en Neville (1971) beweren dat alle kleumethoden met PAS-reagens waarbij de gels niet gewassen worden om de SDS van de eiwitten te verwijderen, kunnen leiden tot specifieke kleuringen. Het uitwassen van SDS uit de gels met 40% methanol en 7% azijnzuur resulteerde echter in een zeer sterke achteruitgang in kleuring met PAS-reagens vermoedelijk tengevolge van uitwassen van eiwit. De kleuring van peroxydase met PAS-reagens was na deze behandeling met een factor 6 afgenomen, bij TSWV bleken dan alleen de eiwitten 4 en 5 nog zwak te kleuren. Het wassen van de gels met 40% methanol en 7% azijnzuur veroorzaakte dus een sterke daling in de intensiteit, waarmee de eiwitten reageerden.

De eiwitcomponenten 2, 3, 4 en 5 kleuren duidelijk met PAS-reagens (Fig. 5.3) en moeten derhalve als glycoproteïnen worden beschouwd. Eiwit 1 bleek een heel zwakke kleuring te geven. De mogelijkheid dat dit eiwit enkele koolhydraten bevat kan daarom niet geheel uitgesloten worden. Wat de eiwitten 6 en 7 betreft kon vanwege de geringe hoeveelheden van deze eiwitten nog niet definitief bepaald worden of deze kleuren met PAS-reagens. Vaak werd ook een met PAS te kleuren zone waargenomen, die met het front meeliep. Dit zal in 5.2.2 nader besproken worden.

Mohamed et al. (1973) vonden een zeer sterke kleuring van eiwit 1 na toepassing van de methode volgens Clarke (1964). Verschil in de wijze van kleuring en mogelijk verschil in virusisolaat kunnen verklaren waarom deze auteurs tot dit andere resultaat kwamen. De mate van kleuring van de overige eiwitten kwam evenwel ongeveer overeen met het patroon in Fig. 5.3. In dit verband kan opgemerkt worden dat alle door ons gebruikte kleuringen op glycoproteïnen hetzelfde resultaat gaven.

De kleuring volgens Caldwell en Pigman (1965) werd niet in bovenstaande beoordeling betrokken aangezien de gel niet voldoende kon worden ontkleurd.

5.2.2. Analyse van een chloroform-methanol extract uit TSWV

Bij analyse van de polyacrylamidegels met PAS-reagens werd vaak een diffuse kleuring gevonden in een zone, die overeenkwam met de plaats van het elektroforesefront (Fig. 5.5, gel 1). Bij een kleuring met coomassie brilliant blue was deze zone niet zichtbaar, zodat het voorkomen van een laag moleculair glycoproteïne, zoals dat bij "mouse mammary tumor virus" (Teramoto et al., 1974) het geval is, uitgesloten kan worden. Na denaturatie van HeLa-celmembranen met SDS en analyse op polyacrylamidegels vonden Huang et al. (1973) eveneens een dergelijke zone. Bovengenoemde auteurs konden deze zone extraheren met ethanol-diethylether.

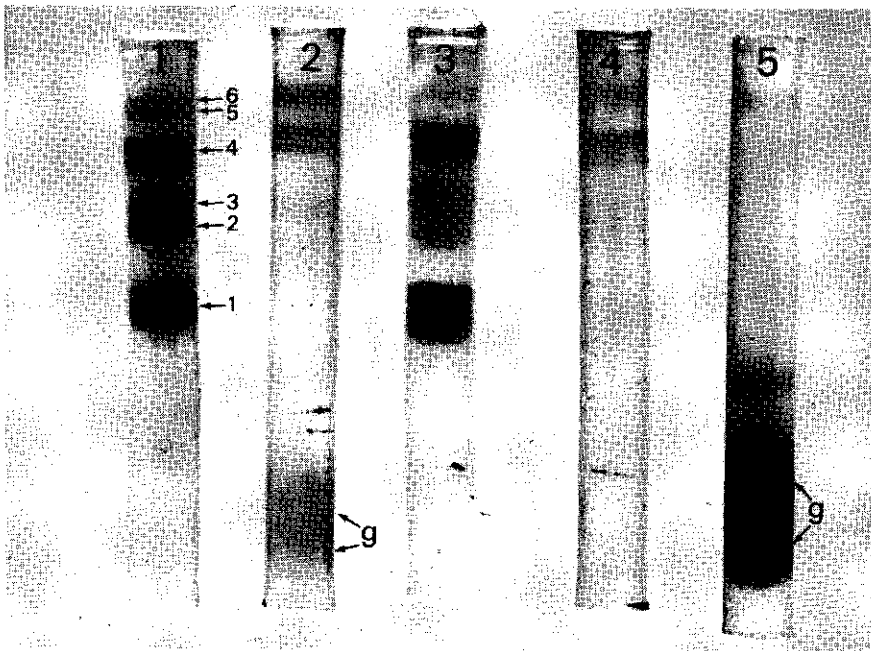


Fig. 5.5 Elektroforesepatronen van TSWV vóór (1 en 2) en na (3 en 4) extractie met chloroform-methanol, en van het chloroform-methanolextract (5). De gels 1 en 3 werden gekleurd met coomassie brilliant blue en de gels 2, 4 en 5 met PAS-reagens. De glycolipide zone is aangeduid met g.

In het geval van TSWV werd getracht deze zone te extraheren met chloroform-methanol. Bij analyse van het residu, dat na extractie werd verkregen, bleek bovengenoemde zone niet meer aanwezig (Fig. 5.5, gel 4). Deze zone werd echter teruggevonden in het geconcentreerde chloroform-methanolextract (Fig. 5.5, gel 5). Behalve deze zone kwamen er nog twee zwakke bandjes op de gel voor. Een van deze bandjes kwam ongeveer overeen met de positie van eiwit 5. Dit zou kunnen duiden op een associatie van dit eiwit met lipiden.

Het materiaal dat in de front zone gevonden wordt zou glycolipide kunnen zijn; dit omdat: 1) het met chloroform-methanol geëxtraheerd kan worden, 2) het met PAS-reagens en met TSWV-antiserum (Hoofdstuk 4) reageert, 3) geen reactie geeft met coomassie brilliant blue.

5.3. Schatting van de molecuulgewichten van de eiwitten

De methode van Weber en Osborn (1969) staat een redelijk nauwkeurige bepaling van de molecuulgewichten van de te onderzoeken eiwitten toe. De binding van dodecylsulfaat-ionen aan de eiwitten is de basis voor de scheiding in dit systeem. Door deze binding worden alle moleculen negatief geladen. De waarden van de hoeveelheid gebonden SDS lopen uiteen van 1,4-2,5 mg SDS per mg eiwit (Dunker en Rueckert, 1969).

De effecten van de intrinsieke lading en de conformatie van de moleculen op het elektroforetisch gedrag blijken in aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat relatief klein te zijn. De wisselwerking tussen anion-binding en frictie tengevolge van passage door de gel is een relatief constante verhouding tussen de logaritme van de molecuulgrootte en de mobiliteit.

Door enkele eiwitten waarvan het molecuulgewicht bekend is, mee te elektrofereren kan men een schatting maken van de molecuulgewichten van de viruseiwitten (Weber en Osborn, 1969).

Molecuulgewichtsbepaling in SDS-gels is niet direct toepasbaar op glycoproteïnen (Segrest en Jackson, 1972). Glycoproteïnen welke meer dan 10% koolhydraat bevatten, gedragen zich in vergelijking tot proteïnen afwijkend gedurende elektroforese in polyacrylamidegels met SDS. De reden van dit afwijkend gedrag is een verminderde binding van SDS per gram glycoproteïne in vergelijking tot proteïne. Dit resulteert ten opzichte van proteïnen in een kleinere lading per gram glycoproteïne

waardoor de mobiliteit gedurende elektroforese in een milieu met SDS kleiner is en dus het molecuulgewicht te hoog wordt geschat.

Twee factoren bepalen de mobiliteit van de eiwitten in SDS-polyacrylamidegels, nl. lading en moleculair zeefeffect. Met toenemende polyacrylamidegel-"cross linking" gaat het zeefeffect overheersen. Dit heeft voor glycoproteïnen het gevolg dat het geschatte molecuulgewicht steeds minder van het reële gaat afwijken en asymptotisch tot een minimum waarde zal naderen. Deze laatste waarde zal nog wat van het reële molecuulgewicht afwijken.

De procedure om de molecuulgewichten van glycoproteïnen te bepalen bestaat uit een schatting van de molecuulgewichten van deze eiwitten op een aantal gels met toenemende concentraties acrylamide (bv. 5, 7,5, 10 en 12,5%). De gevonden molecuulgewichten worden in een grafiek uitgezet tegen het percentage polyacrylamidegel en hieruit kan men een asymptotisch molecuulgewicht bepalen. Het verloop van de curves is een directe functie van het percentage koolhydraat in het glycoproteïne.

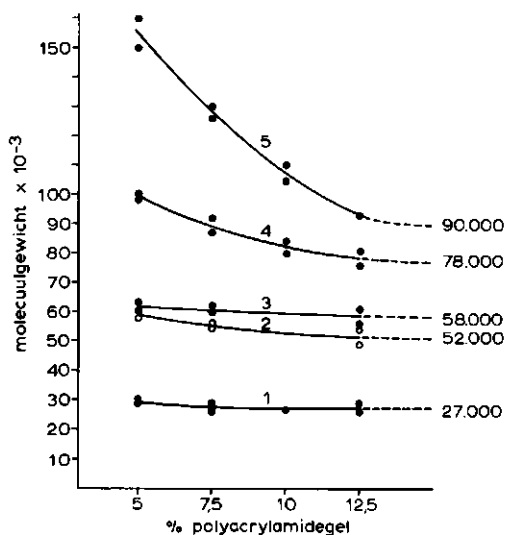


Fig. 5.6. De schijnbare molecuulgewichten van de eiwitten 1 tot en met 5 van TSWV na elektroforese in gels met verschillend percentage polyacrylamide. De molecuulgewichten van de eiwitten 1 t/m 5 op de diverse gels werden bepaald door middel van elektroforese in aanwezigheid van eiwitten met bekend molecuulgewicht.

Tabel 5.2 De daling van het geschat molecuulgewicht en de intensiteit van de kleuring met PAS-reagens voor de eiwitten 1 t/m 5 van TSWV

| eiwit | daling in molecuulgewicht (%) | intensiteit van de kleuring met PAS (verhouding PAS/coomassie kleuring) |
|-------|-------------------------------|--|
| 1 | 7 ^a | ^b + |
| 2 | 16 | + |
| 3 | 8 | + |
| 4 | 22 | ++ |
| 5 | 42 | +++ |

^a De daling van het molecuulgewicht bij zijn geëxtrapoleerde asymptotische waarde werd berekend door het molecuulgewicht, dat op een gel met 5% acrylamide werd gevonden op 100 te stellen.

^b De verhouding van de PAS/coomassie brilliant blue kleuring is uitgedrukt in + (zwak) tot +++ (sterk).

TSWV werd na afbraak met SDS en ME en carboxymethylering met joodacetamide geëlektroforeerd op gels van 5, 7,5, 10 en 12,5% polyacrylamide in aanwezigheid van een aantal eiwitten, met bekende molecuulgewichten. Na elektroforese werden de gels met coomassie brilliant blue gekleurd. Na ontkleuren van de gels werden de molecuulgewichten van de eiwitten bepaald.

In Fig. 5.6 zijn de gevonden molecuulgewichten uitgezet tegen het percentage polyacrylamide in de gels. Uit deze figuur blijkt, dat met toenemende percentages er een duidelijke afname in het geschatte molecuulgewicht voor eiwit 4 en 5 optreedt. Voor de overige eiwitten wordt een zwakkere afname waargenomen. Er blijkt een duidelijke correlatie te bestaan tussen de sterkte van de daling in molecuulgewicht en de intensiteit van de kleuring met PAS-reagens (Fig. 5.3). In Tabel 5.2 is dit nader geïllustreerd.

De schatting van de molecuulgewichten van de eiwitten 1 en 4 in gels met 10% acrylamide is vrij goed in overeenstemming met de door Mohamed et al. (1973) bepaalde waarden (Tabel 5.3). Het is echter opvallend dat er bij deze auteurs geen verschil werd gevonden in het molecuulgewicht van eiwit 4 in gels met 5 en 10% acrylamide. Wij vonden een verschil van maar liefst 17.000 D.

Voor wat betreft eiwit 5 is er een enorm verschil tussen de bepaling op gels met 5 en 10% acrylamide. Naarmate het percentage acrylamide toeneemt zal het geschatte molecuulgewicht meer naderen tot het werkelijke molecuulgewicht. De geëxtrapoleerde asymptotische molecuulgewichten (Tabel 5.3) geven derhalve een betere benadering van de werkelijke molecuulgewichten dan een waarde op gels met 5 dan wel 10% acrylamide. De werkelijke molecuulgewichten kunnen evenwel pas

Tabel 5.3 De geschatte molecuulgewichten van de eiwitten 1 t/m 5 van TSWV op gels met 5 en 10% acrylamide en de geëxtrapoleerde asymptotische waarden van de molecuulgewichten

| eiwit | Dit proefschrift (Fig. 5.6) | | | Mohammed et al. (1973) | |
|-------|-----------------------------|---------|---|------------------------|---------|
| | molecuulgewichten op | | geëxtrapoleerde waarde van het asymptotisch molecuulgewicht | molecuulgewichten op | |
| | 5% gel | 10% gel | | 5% gel | 10% gel |
| 1 | 29.000 | 28.000 | 27.000 | 29.000 | 29.000 |
| 2 | 59.000 | 53.000 | 52.000 | 50.000 | 50.000 |
| 3 | 62.000 | 60.000 | 58.000 | | |
| 4 | 99.000 | 82.000 | 78.000 | 84.000 | 84.000 |
| 5 | 155.000 | 108.000 | 90.000 | 132.000 | |

bepaald worden als het gehalte aan koolhydraat van de diverse eiwitcomponenten van TSWV bekend is.

De gewoonte van diverse onderzoekers om de molecuulgewichten van hoog-moleculaire eiwitten op gels met 5% polyacrylamide te bepalen kan in het geval dat het te onderzoeken eiwit een glycoproteïne is, tot aanzienlijke fouten aanleiding geven. Een aanwijzing dat schatting van het molecuulgewicht van een glycoproteïne op SDS-gels mogelijk een te hoge waarde oplevert blijkt uit het onderzoek van Moennig et al. (1974) met "Friend leukemia virus" en van Grefrath en Reynolds (1974) met rode bloedcellen.

Het zou aanbeveling verdienen om het in dit onderzoek gebruikte virusisolaat van TSWV en het isolaat van Mohamed et al. (1973) onder volkomen identieke condities qua virusvermeerdering, zuivering, elektroforese en kleuring met elkaar te vergelijken. Eventuele verschillen zullen dan waarschijnlijk toegeschreven kunnen worden aan het gebruikte virusisolaat. In dit verband kan vermeld worden dat bij zuivering van hetzelfde isolaat van TSWV uit resp. *N. rustica* en komkommer en daaropvolgende elektroforese van de gedenatureerde viruseiwitten in polyacrylamidegel, er weinig verschil was in de posities van eiwit 1 en 4 op de gel. In de posities van de eiwitten 2 en 3 was echter een duidelijk verschil (Fig. 5.7) waar te nemen. Er zijn veel aanwijzingen uit onderzoekingen met diervirussen, dat de waard waarin het virus zich vermeerdert in meer of mindere mate de samenstelling van het koolhydraatdeel van de glycoproteïnen kan beïnvloeden (Keller et al., 1970; Burge en Huang, 1970; Grimes en Burge, 1971; Lenard en Compans (1974).

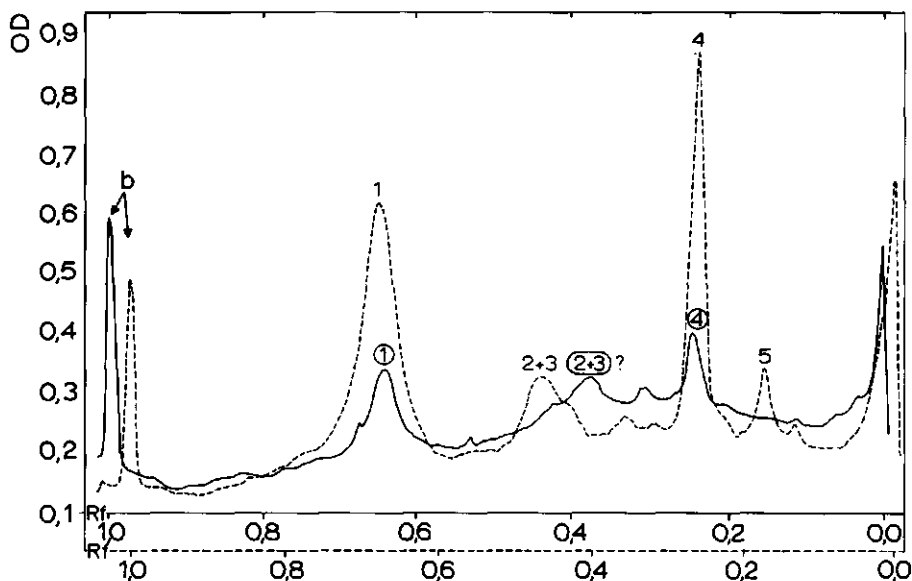


Fig. 5.7 Elektroforesepatronen van de eiwitten van TSWV op 7,5% polyacrylamidegels na vermeerdering van het virus in resp. *N. rustica* (-----) en komkommer (——). Om de posities van de eiwitten goed te kunnen vergelijken zijn de Rf-schalen van beide patronen op de X-as aangegeven. De elektroforeserichting is van rechts naar links.

5.4. Topografie van de eiwitten van TSWV

Voor de topografische bepaling van polypeptiden in virusdeeltjes wordt veel gebruik gemaakt van radio-isotopen (Bretscher, 1971; Bender et al., 1971; Phillips en Morrison, 1971). Een algemeen toegepaste en milde methode is die waarbij ^{125}J aan het aminozuur tyrosine gebonden wordt onder invloed van het enzym lactoperoxydase en H_2O_2 . Deze methode is o.a. toegepast voor de lokalisatie van de eiwitten van vacciniavirus (Katz en Margalith, 1973), "vesicular stomatitis virus" (Moore et al., 1974), herpes-simplexvirus (Olshevski en Becker, 1972) en "mouse mammary tumor virus" (Teramoto et al., 1974).

De methode is gebaseerd op de volgende reactie. Lactoperoxydase reageert met H_2O_2 door de vorming van een lactoperoxydase—O-complex. Dit complex reageert op zijn beurt met $^{125}J^-$ tot een lactoperoxydase— ^{125}J -complex. Deze laatste verbinding hecht de isotoop in het pH-traject van 7-8 selectief aan tyrosinegroepen.

Verschillen in de labeling van de diverse eiwitten treden op door de mate waarmee de tyrosinegroepen van de eiwitten voor het lactoperoxydase— ^{125}J -complex toegankelijk zijn. Strikt genomen zouden eiwitten binnen de membraan van het virus niet gelabeld kunnen worden aangezien het lactoperoxydase— ^{125}J -complex niet door de membraan heen zou dringen. Tsai et al. (1973) vonden echter bij labeling van bloedcellen met ^{125}J , dat onder bepaalde omstandigheden, nl. bij relatief hoge concentraties ^{125}J , ook eiwitten binnen de membraan gelabeld werden. Bovengenoemde auteurs verklaren dit door aan te nemen dat een jodideradicaal gevormd wordt, dat dieper in het deeltje kan doordringen dan het lactoperoxydase— ^{125}J -complex. Bij lage concentraties ^{125}J zal dit radicaal volledig weggevangen worden door de tyrosinegroepen van de membraaneiwitten, bij hogere concentraties zal dit radicaal dieper doordringen en ook eiwitten binnen de membraan labelen.

Informatie over de lokalisatie van eiwitten in membranen kan ook worden verkregen door afbraak van de eiwitten met proteolytische enzymen (Gahmberg et al., 1972; Steck et al., 1971). Eiwitten die aan de buitenzijde van een membraan gelokaliseerd zijn, zullen - aannemende dat deze eiwitten gevoelig zijn voor het enzym - het eerst afgebroken worden. Door hun afbraak in de tijd te vervolgen kan men dus een indruk krijgen van hun topografie.

5.4.1 Eliminatie van stoffen die de werking van lactoperoxydase remmen

De zuivering van TSWV vindt plaats onder gereduceerde condities vanwege de toevoeging van Na_2SO_3 en cysteïne aan de extractiebuffer. Aangezien het te verwachten was dat reducerende stoffen de vorming van een lactoperoxydase—O-complex remmen, werd nagegaan in welk traject Na_2SO_3 en cysteïne dit zouden doen. De reactie

$4 \text{ guaiacol} + 4 \text{ H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{peroxydase}} \text{tetraguaiacol} + 8 \text{ H}_2\text{O}$ (Maehly en Glick, 1954)

werd gebruikt om de invloed van de reducerende stoffen op de werking van het enzym na te gaan. Het in deze reactie gevormde tetraguaiacol heeft een oranjeachtige kleur met een maximale extinctie bij 470 nm. Dit maakt het mogelijk het effect van de toevoeging van bepaalde concentraties Na_2SO_3 en cysteïne aan het reactiemengsel op de vorming van tetraguaiacol te bestuderen. De remming door middel van Na_2SO_3

is weergegeven in Fig. 5.8. Bij concentraties hoger dan 0,005 mg/ml begint Na_2SO_3 te remmen. Bij 0,1 mg/ml is de remming nagenoeg volledig. De hoeveelheid die normaliter in de zuivering gebruikt wordt is 1,26 mg/ml. De concentratie aan Na_2SO_3 dient dus met een factor 1000 verlaagd te worden om het remmend effect teniet te doen.

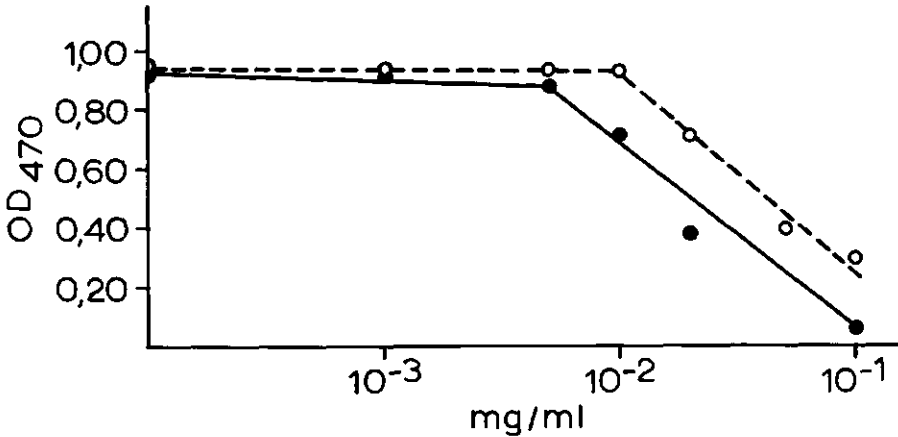


Fig. 5.8 Invloed van verschillende concentraties Na_2SO_3 (—) en cysteïne (---) op de werking van lactoperoxidase bij omzetting van guaiacol in tetra-guaiacol. Na toevoeging van H_2O_2 aan het reactiemengsel werd de optische dichtheid na 1 min bij 470 nm bepaald.

Uit Fig. 5.8 blijkt eveneens dat cysteïne bij dezelfde concentraties iets minder remt dan Na_2SO_3 . Concentraties hoger dan 0,01 mg/ml vertonen remming. Bij 0,5 mg/ml is deze remming volledig. De hoeveelheid cysteïne in de extractiebuffer is 0,79 mg/ml zodat de concentratie aan cysteïne met een factor 100 verlaagd moet worden, wil men remming erdoor vermijden.

Na_2SO_3 en cysteïne werden verwijderd door het virus van de 2^e suikergradiënt (Schema 3.1) te verdunnen met een groot volume 0,05 M natriumfosfaatbuffer, pH 7,2, vervolgens 1 uur bij 29.000 rpm in de R 30-rotor te concentreren en het sediment op te lossen in fosfaatbuffer. Er kon met de elektronenmicroscopie geen schadelijke invloed van deze behandeling op de morfologie van de virusdeeltjes worden geconstateerd.

5.4.2 Fragmentatie van TSWV

Aangezien als controle voor de labeling met ^{125}J alle tyrosinegroepen van de diverse eiwitten gelabeld dienden te worden, moest gezocht worden naar een methode om het virus zodanig te fragmenteren, dat aan deze voorwaarde was voldaan.

Aanvankelijk werd gedacht om TSWV af te breken met SDS en ME en daarna de niet gebonden SDS en ME door dialyse te verwijderen.

Het bleek echter dat nog een zeer sterke remming op de incorporatie van ^{125}J optrad in aldus behandelde preparaten. Vermoed werd dat deze remmende werking uitging van aan eiwit gebonden SDS.

Andere methoden voor dissociatie van virus, zoals incubatie in een hoge zoutconcentratie (tot 1 M CaCl_2), herhaaldelijk bevriezen en ontdooien, toepassing van een hoge pH (pH 10,6), of lage pH (pH 3), of ultrasoon trillen (tot 30 minuten in een Sonicator op 60 kHz) gaven niet de vereiste graad van fragmentatie van het virus.

Door behandeling met NP-40 bleek het virus zeer gemakkelijk uit elkaar te vallen. Inwerking van een concentratie van 0,05% NP-40 gedurende 1 minuut was voldoende om het virus zodanig te fragmenteren dat van de oorspronkelijke structuur niets overbleef (Fig. 5.9).

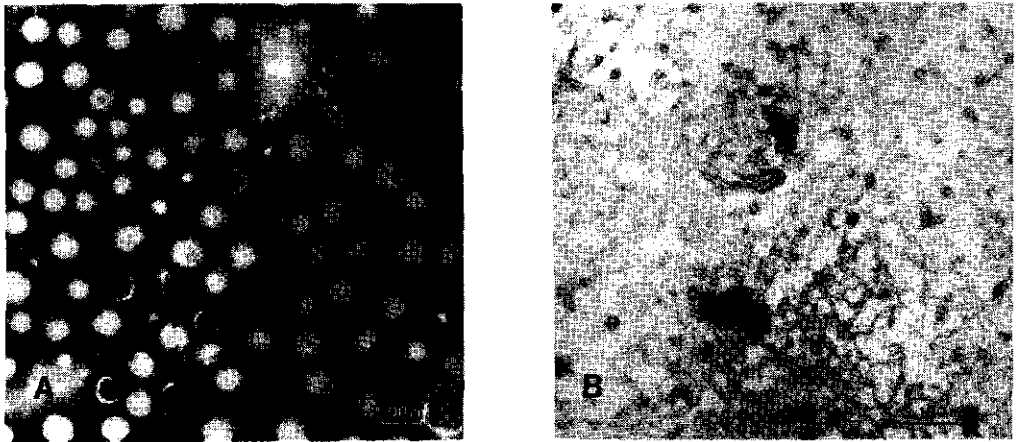


Fig. 5.9 Fragmentatie van TSWV met 0,05% NP-40. Onbehandeld virus (A), en virus, dat gedurende 1 minuut met 0,05% NP-40 werd behandeld (B). Beide preparaten werden gefixeerd met 5% glutaraaldehyde en gekleurd met 1% uranylformiaat.

5.4.3 Labeling van TSWV met ^{125}J

Na_2SO_3 en cysteine werden uit de virussuspensie verwijderd op de onder 5.4.1 beschreven methode. Een gedeelte van deze gezuiverde suspensie werd gebruikt voor de bereiding van gefragmenteerd virus met NP 40 (5.4.2). Een beknopt overzicht van de bewerkingen met de diverse virussuspensies is weergegeven in Tabel 5.4.

Gezuiverd virus werd met drie verschillende concentraties ^{125}J gelabeld (Tabel 5.4; IA, IB en IC) omdat de verhouding van ^{125}J en eiwit van invloed zou kunnen zijn op de labeling van eiwitten die binnen de membraan voorkomen (5.4).

Tabel 5.4 Labeling van TSWV met ^{125}J . Overzicht van de meest essentiële toevoegingen aan en bewerkingen met de diverse virussuspensies.

| Fractie | samenstelling reactiemedium | | bewerkingen na labeling | | |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------------|--|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| | μCi ^{125}J | lacto- peroxydase | concentrering ^a | behandeling na elektroforese ^b | |
| I ONGEFRAGMENTEERD TSWV | A ^c | 100 | + | SW 39 | plakjes |
| | B | 25 | + | " | " |
| | C | 5 | + | " | " |
| II GEFRAGMENTEERD TSWV | A | 25 | + | ethanol | plakjes |
| | B | 0 | + | " | coomassie |
| III CONTROLE (TSWV) | C | 0 | geen | geen | coomassie |
| IV CONTROLE (TSWV) | | 100 | geen | SW 39 | plakjes |

^a SW 39: 1 uur centrifugeren in de SW 39 bij 38.000 rpm, ethanol: concentrering met 2 volumina ijskoude ethanol.

^b plakjes: de gels werden in plakjes van 1 mm gesneden met een "Mickle gel slicer", coomassie: kleuring met coomassie brilliant blue.

^c A, B en C verwijzen naar de radioactiviteitspatronen in Fig. 5.10 en Fig. 5.11.

Gefragmenteerd virus werd gelabeld met 25 μCi ^{125}J (Tabel 5.4; II A).

Verder werden drie controles opgenomen. Door gefragmenteerd virus niet te labelen (Tabel 5.4, II B) werd bestudeerd of na precipitatie van de fragmenten met ethanol hetzelfde eiwitpatroon op een polyacrylamidegel kon worden verkregen als met onge-

fragmenteerd virus dat door centrifugeren was geconcentreerd (Tabel 5.4, III C). Tenslotte werd nog bekeken of de label zich op een niet-enzymatische wijze met de eiwitten zou kunnen associëren (Tabel 5.4, IV).

De patronen van de verdeling van de radioactiviteit dan wel de optische dichtheid over de gels zijn weergegeven in Fig. 5.10 en 5.11. Vergelijken we het patroon in Fig. 5.10A met dat in 5.10B dan zien we dat bij het laatste het niveau van de labeling nauwelijks lager is ondanks het feit dat hier maar 25 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}$ gebruikt is. Hieruit mag de conclusie getrokken worden dat de eiwitten met een overmaat ^{125}J zijn gelabeld. Dit komt ook tot uiting in radioactiviteitspieken op plaatsen waar geen zichtbare eiwitbanden worden aangetroffen.

Fig. 5.10B geeft een patroon waarin de radioactiviteitspieken goed overeenkomen met zichtbare eiwitbanden (Fig. 5.11C). Alle eiwitten in dit patroon zijn radioactief. De eiwitten 1, 2 en 3 zijn echter duidelijk minder radioactief dan de eiwitten 4 en 5.

Het niveau van de labeling in Fig. 5.10C is ongeveer een factor 5 lager dan in Fig. 5.10B. Dit komt overeen met de verlaging van de concentratie aan ^{125}J van 25 μCi naar 5 μCi . Labeling van ongefragmenteerd TSWV met 5 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}$ geeft een duidelijk lagere radioactiviteit in eiwit 1 dan wanneer met 25 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}$ gelabeld wordt (Tabel 5.5).

Bekijken we de incorporatie van ^{125}J in gefragmenteerd virus dan zien we dat deze een factor 3 tot 4 lager is dan de incorporatie in ongefragmenteerd virus (vergeleijk Fig. 5.11A met Fig. 5.10B). Deze remming is waarschijnlijk toe te schrijven aan NP-40, dat nog geassocieerd kan zijn met de eiwitten. De radioactiviteitspieken van patroon 5.11A zijn evenwel in redelijke overeenstemming met het patroon van de coomassie brilliant blue kleuring in Fig. 5.11B. Het laatste patroon bevat een schouderdje aan piek 2+3 dat in het patroon dat na afbraak met SDS en ME en carboxymethylering met joodaceetamide wordt verkregen (Fig. 5.11C) niet voorkomt. In patroon 5.11A treden ook nog radioactiviteitspieken op rechts van eiwitpiek 1. Deze pieken zijn in Fig. 5.11B en C niet terug te vinden. De betekenis van deze pieken is niet duidelijk.

Labeling zonder lactoperoxydase (Tabel 5.4, IV) resulteerde slechts in een geringe radioactiviteit over de gelplakjes, ongeveer 2 tot 3 keer zo hoog als de natuurlijke achtergrond. Aspectifieke labeling is dus te verwaarlozen.

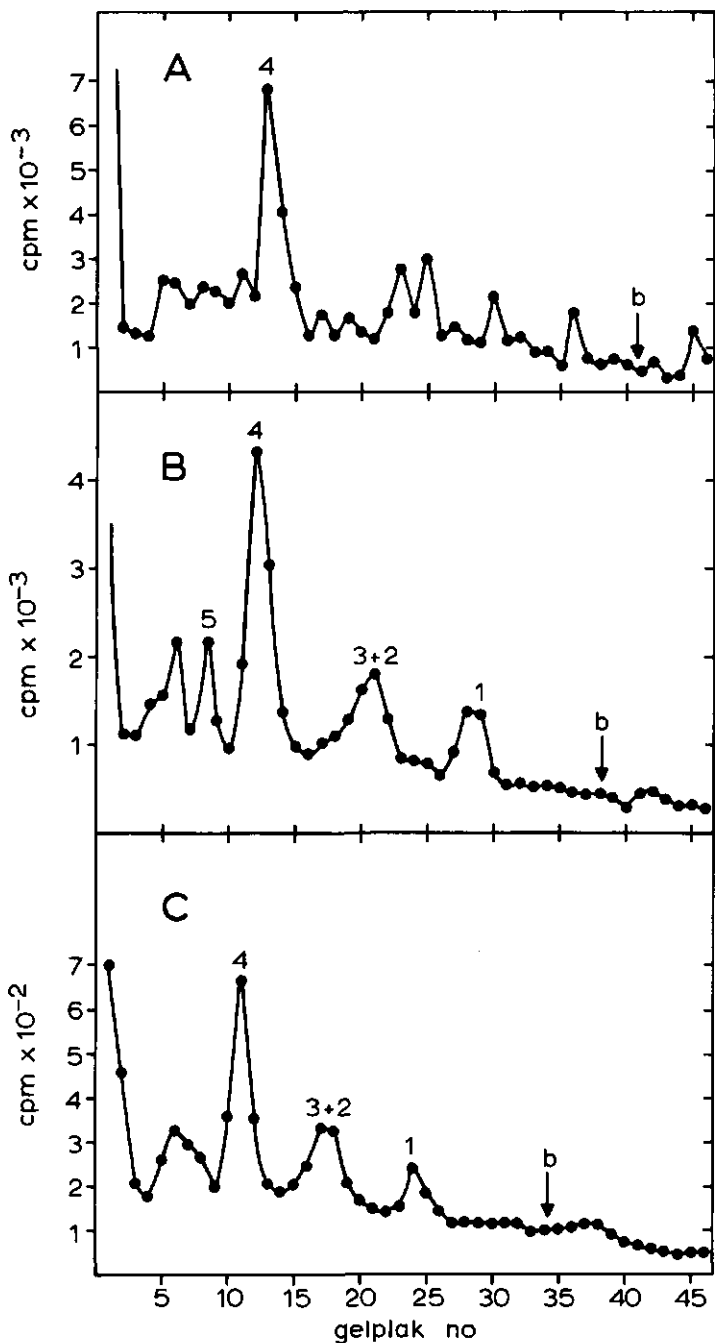


Fig. 5.10 Verdeling van de radioactiviteit op 7,5% polyacrylamidegels na elektroforese van de gedeneureerde polypeptiden (2.13) afkomstig van ongefragmenteerd virus, dat met verschillende concentraties ^{125}J werd gelabeld, nl. 100 μCi (A), 25 μCi (B) en 5 μCi (C). De elektroforeserichting is van links naar rechts. De positie van de broomfenolblauwband (b) is met een pijl aangegeven.

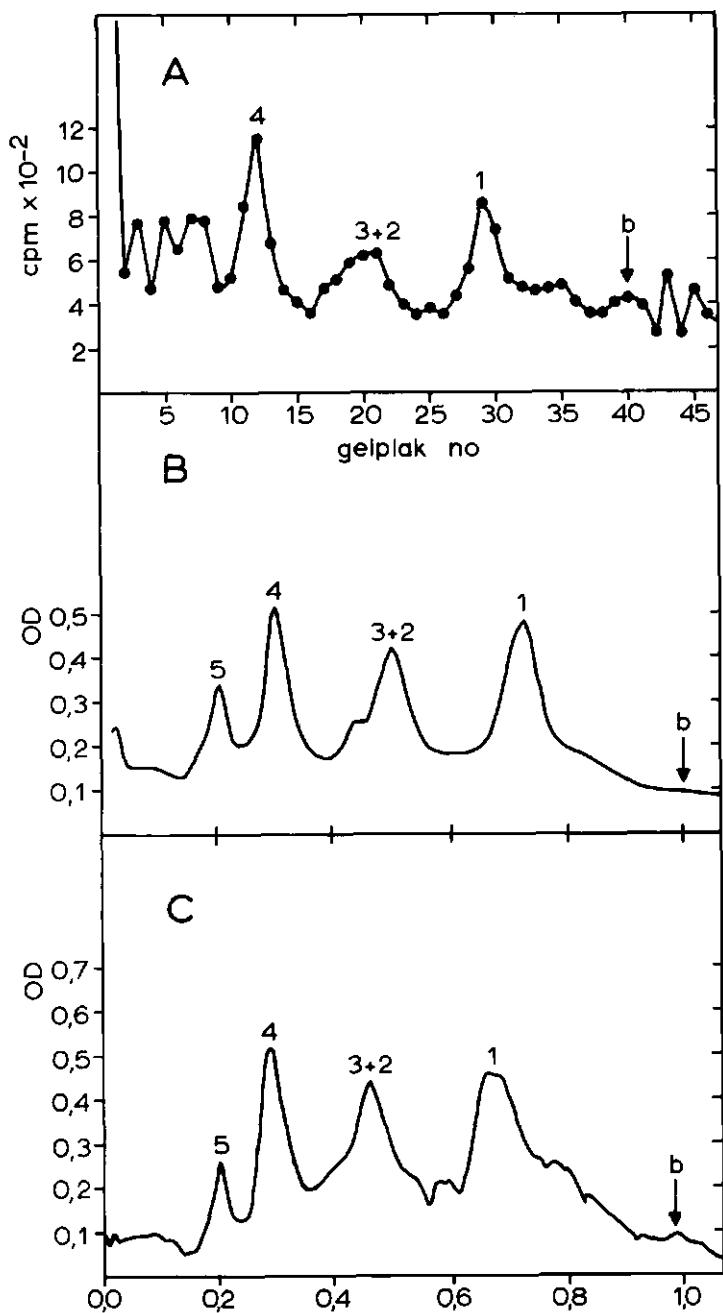


Fig. 5.11 Verdeling van radioactiviteit (A) en optische dichtheid (B en C) op 7,5 % polyacrylamidegels na elektroforese van de gedenatureerde polypeptiden (2.13) van TSWV, dat na behandeling met 0,05% NP-40, met 25 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}$ werd gelabeld (A); van TSWV, dat met 0,05% NP-40 werd behandeld (B); en onbehandeld TSWV (C). De elektroforeserichting is van links naar rechts. Gel B en C werden gekleurd met coomassie brilliant blue. De positie van de broomfenolblauwband (b) is met een pijl aangegeven.

5.4.4. Bepaling van de relatieve incorporatie van ^{125}J in de diverse eiwitten van TSWV

Om de positie van de polypeptiden in het virus te bepalen moeten we nagaan in welke mate deze polypeptiden radioactief worden wanneer niet gefragmenteerd virus met ^{125}J wordt gelabeld. Nemen we de oppervlakte van de radioactiviteitspieken in Fig. 5.10 en 5.11 als maat voor de radioactiviteit die in deze pieken geïncorporeerd is, dan kunnen we de relatieve labeling van de eiwitten met ^{125}J als volgt berekenen:

$$\text{relatieve labeling} = \frac{\text{oppervlak van de piek bij ongefragmenteerd TSWV}}{\text{oppervlak van de piek bij gefragmenteerd TSWV}} \times 100$$

Een moeilijkheid is echter dat het niveau van labeling bij gefragmenteerd virus een stuk lager is. Om de berekening toch te kunnen uitvoeren moeten alle waarden in de diverse figuren met een bepaalde standaard herleid worden. Hiertoe werd de oppervlakte van de piek van eiwit 4 bij zowel ongefragmenteerd als gefragmenteerd virus op 100 gesteld. De mate van labeling van de overige eiwitten werd dan berekend aan materiaal dat met 25 en 5 μCi ^{125}J werd gelabeld (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 Relatieve labeling van de eiwitten 1, 2+3 en 4 na toediening van resp. 25 μCi en 5 μCi ^{125}J aan het reactiemedium.

| eiwit | | Ongefragmenteerd virus | | | Gefragmenteerd virus | | |
|---|-------------------|------------------------|------|------|----------------------|------|------|
| | | 1 | 2+3 | 4 | 1 | 2+3 | 4 |
| Opp. van pieken in (cm^2) | Fig. 5.10 B | 1,19 ^a | 2,21 | 3,96 | | | |
| | Fig. 5.10 C | 0,50 | 1,55 | 2,62 | | | |
| | Fig. 5.11 A | | | | 2,03 | 1,58 | 2,44 |
| Relatieve Opp. (%) | Fig. 5.10 B | 30 ^b | 56 | 100 | | | |
| | Fig. 5.10 C | 19 | 59 | 100 | | | |
| | Fig. 5.11 A | | | | 83 | 65 | 100 |
| Relatieve labeling met (%) | 25 μCi | 36 ^c | 86 | 100 | | | |
| | 5 μCi | 23 | 90 | 100 | | | |

^a Als maat voor de radioactiviteit werd het oppervlak van de pieken van eiwit 1, 2+3 en 4 in Fig. 5.10 B en C en 5.11 A bepaald.

^b De oppervlakte van de piek van eiwit 4 bij zowel ongefragmenteerd als gefragmenteerd virus werd op 100 gesteld.

^c De relatieve labeling van de eiwitten na toediening van resp. 25 μCi en 5 μCi ^{125}J werd berekend uit $\frac{\text{oppervlak van de piek bij ongefragmenteerd TSWV}}{\text{oppervlak van de piek bij gefragmenteerd TSWV}} \times 100$

Uit het feit dat eiwit 1 het minst radioactief is en deze radioactiviteit bij verlaging van de concentratie aan ^{125}J sterker afneemt dan de radioactiviteit van de eiwitten 2, 3 en 4 (Tabel 5.5) kan men concluderen dat dit eiwit binnen de membraan gelokaliseerd moet worden. Uitgaande van de veronderstelling dat de virusmembraan impermeabel is voor het lactoperoxydase, dan is de gevonden radioactiviteit in eiwit 1 hoog te noemen. Bij andere virussen zoals Sindbis-virus (Sefton et al., 1973) en influenzavirus (Stanley en Haslam, 1971) werd een zwakke labeling van het ribonucleoproteïne gevonden na labeling van het ongefragmenteerde virus met ^{125}J . In beide gevallen werd deze labeling aan gedissociëerd virus toegeschreven. Het kan echter betwijfeld worden of dit ook het geval is voor TSWV in boven beschreven experimenten.

Ten eerste bleek bij elektronenmicroscopisch onderzoek dat het virus vrij intact (Fig. 5.9) was, er werden namelijk nauwelijks kapotte deeltjes waargenomen. Ten tweede werd in een inleidend experiment getracht om eiwit 1 toegankelijk te maken voor lactoperoxydase door herhaaldelijk bevroren en ontdooien. Door deze behandeling werd echter slechts een geringe toename van de labeling van eiwit 1 waargenomen hoewel in de elektronenmicroscop wel werd geconstateerd dat het aantal enigszins vervormde en gefragmenteerde deeltjes was toegenomen. Gezien deze waarnemingen lijkt het niet aannemelijk om alle radioactiviteit in eiwit 1 aan kapot virus toe te schrijven.

Moore et al. (1974) vonden bij "vesicular stomatitis virus" een aanzienlijke labeling van het "matrix"-proteïne, dat een eiwit is tussen het nucleoproteïne en de lipidendubbellaag. De veronderstelling dat met de lactoperoxydase- ^{125}J -methode alleen eiwitten aan de buitenzijde van membranen worden gelabeld, lijkt voor TSWV en "vesicular stomatitis virus" niet geheel op te gaan. Wanneer lactoperoxydase alleen eiwitten aan de buitenzijde van membranen met ^{125}J labelt, zou eiwit 1 van TSWV voor een gedeelte door de membraan heen moeten steken. Het gedeelte van eiwit 1, dat zich aan de buitenzijde van de membraan bevindt, zou dan toegankelijk voor labeling met ^{125}J zijn. Dit werd ook gesuggereerd door Moore et al. (1974) om de labeling van het "matrix"-eiwit bij "vesicular stomatitis virus" te verklaren. Voor de overbrugging van de dikte van de membraan is ongeveer een polypeptide nodig van 5000 D (Garoff et al., 1974).

Een tweede suggestie die Moore et al. (1974) gaven, is dat een klein aantal "matrix"-eiwitmoleculen aan de buitenzijde van het membraan gelokaliseerd zou zijn. De suggestie van Moore et al. (1974) zou betekenen dat het "matrix"-eiwit twee verschillende functies zou hebben nl. een functie als membraaneiwit en als

'matrix'-eiwit. Dat een eiwit twee zulke uiteenlopende functies in de structuur van een en hetzelfde virusdeeltje zou hebben lijkt weinig aannemelijk.

De eiwitten 2, 3, 4 en 5 zijn na labeling vrij radioactief, hetgeen een sterke indicatie is voor het voorkomen van deze eiwitten aan de buitenzijde van het virus. Verschil in de mate van labeling van deze eiwitten kan een gevolg zijn van het feit dat een deel van de tyrosinegroepen niet toegankelijk is door eiwit-eiwit of eiwit-lipide interacties dan wel afgeschermd is door andere glycoproteïnen.

De mate waarmee de eiwitten 5, 6 en 7 met ^{125}J werden gelabeld, werd niet berekend. De radioactiviteitspiek van eiwit 7 in de gel kwam niet boven de radioactiviteit, die op de opbrengplaats achtergebleven was, uit. De radioactiviteitspieken van de eiwitten 5 en 6 waren vaak niet goed gescheiden. De indruk werd verkregen dat deze eiwitten ongeveer in dezelfde mate gelabeld werden als eiwit 4.

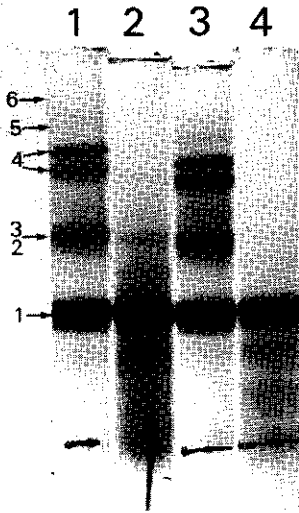


Fig. 5.12 Invloed van de proteolytische activiteit in een galactose-oxydase preparaat van *Polyporus circinatus* op ongefragmenteerd virus. Gezuiverd TSWV werd zowel met als zonder enzym gedurende 1 uur bij 20°C en 37°C geïncubeerd. Na incubatie werd het virus gedenatureerd en geanalyseerd op 7,5% polyacrylamidegels.
gel 1: controle TSWV bewaard bij 0°C
gel 2: TSWV + enzym, 1 uur incubatie bij 20°C
gel 3: TSWV zonder enzym, 1 uur incubatie bij 37°C
gel 4: TSWV + enzym, 1 uur incubatie bij 37°C

5.4.5. Gevoeligheid van de eiwitten van TSWV voor proteolyse

Bij gebruik van een galactose-oxydasepreparaat van *Polyporus circinatus* werd een proteolytische activiteit ontdekt, die bij incubatie met intact virus alle membraaneiwitten verwijderde (Fig. 5.12).

Eiwit 1 bleek echter vrij resistent te zijn. Dit afbraakpatroon suggereerde sterk dat de proteolytische activiteit gehinderd werd door de lipidendubbel-laag. Eiwit 1 zou derhalve binnen de lipidendubbellaag gelokaliseerd zijn en de eiwitten 2 t/m 6 erbuiten. Nagegaan zou moeten worden of na verwijdering van de lipidendubbellaag ook eiwit 1 wordt afgebroken, waardoor de mogelijkheid dat eiwit 1 als resistent eiwit op de membraan gelokaliseerd is, wordt uitgesloten. De hier veronderstelde eiwitverdeling is in overeenstemming met de eiwitverdeling die uit het lactoperoxydase—¹²⁵J experiment (5.4.4) werd verkregen.

5.5. Conclusie

Bij afbraak van TSWV met SDS, ME en joodaceetamide en elektroforese in polyacrylamidegel werden 7 eiwitcomponenten gevonden. De eiwitcomponenten 1, 2, 3 en 4 kwamen in grote hoeveelheden voor, de eiwitcomponenten 5, 6 en 7 echter in zeer geringe hoeveelheden.

Kleuring op koolhydraat met Schiff's reagens volgens de methode van Zacharius et al. (1969) bleek de meest gevoelige methode voor de detectie van glycoproteïnen in TSWV. De eiwitcomponenten 2, 3, 4 en 5 gaven een duidelijke reactie met Schiff's reagens, terwijl eiwitcomponent 1 zeer zwak met dit reagens kleurde. Bij elektroforese van TSWV in 7,5% polyacrylamidegels werd een met het front meelopende zone ontdekt die ook met Schiff's reagens kleurde. De eigenschappen van het materiaal in deze zone wezen op het voorkomen van glycolipiden in deze zone.

De molecuulgewichten van de viruseiwitten werden bepaald volgens de methode van Segrest en Jackson (1972) en bleken voor de eiwitcomponenten 1 t/m 5 rond de 27.000 D, 52.000 D, 58.000 D, 78.000 D en 90.000 D te liggen.

De lokalisatie van de diverse eiwitcomponenten in het virusdeeltje werd bestudeerd door intact en gefragmenteerd TSWV te joderen. Deze reactie werd gekatalyseerd met lactoperoxydase. Uit deze experimenten bleek dat eiwit 1 het minst

toegankelijk was voor labeling en dus waarschijnlijk binnen de envelop gelokaliseerd is. De eiwitten 2, 3, 4 en mogelijk ook 5 bleken beter toegankelijk te zijn voor labeling. Het is daarom aannemelijk dat deze eiwitten aan de buitenzijde van de membraan gelokaliseerd zijn.

De werking van een proteolytische activiteit die in een galactose-oxydase preparaat voorkwam bleek bij incubatie met intact virus de eiwitten 2, 3, 4, 5 en 6 sterk af te breken, terwijl eiwit 1 nauwelijks aangetast werd. Deze waarneming is in overeenstemming met de eiwitverdeling zoals die in het lactoperoxydase—¹²⁵J experiment werd gevonden.

6. ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN HET NUCLEÏNEZUUR VAN GEZUIVERD TSWV

Kennis van aard en eigenschappen van het nucleïnezuur van een virus zijn van groot belang voor de virusclassificatie. Van Kammen et al. (1966) nemen aan dat het nucleïnezuur van TSWV RNA is op grond van een positieve orcinol en een negatieve difenylamine-reactie. Best (1968) komt tot dezelfde conclusie op grond van papierchromatografie van het nucleïnezuur en geeft als globale basensamenstelling: guanine 38%, adenine 35%, cytosine 9% en uracil 18%.

In dit hoofdstuk zal het RNA van het virus nader gekarakteriseerd worden naar infectiositeit, gevoeligheid voor RNase en DNase, gedrag in 2 M LiCl, resistentie tegen verhitting, elektroforetisch gedrag op gels met verschillende percentages polyacrylamide, en grootte van het molecuulgewicht.

6.1. Extractie van het nucleïnezuur

Aangezien in een zuiveringsgang meestal te weinig virus werd verkregen om daaruit het nucleïnezuur te extraheren, werd virus dat uit een aantal bladporties was gezuiverd tot een hoeveelheid gecombineerd. Het nucleïnezuur werd hieruit geïsoleerd met behulp van fenol-SDS (Hoofdstuk 2).

6.2. Karakterisering van het nucleïnezuur

6.2.1. Infectiositeit

Nucleïnezuur, dat direct na zuivering van het virus met behulp van fenol-SDS geïsoleerd was, bleek niet infectieus te zijn bij toetsing op *P. hybrida*. Ook wanneer men gezuiverd TSWV in 0,1% SDS uit elkaar liet vallen en deze suspensie inoculeerde op *Petunia*-bladeren ontstonden er geen lesies. Op *P. hybrida* ontstonden evenmin lesies na toevoeging van 0,1% (^w/v) bentoniet aan het inoculum om de activiteit van RNases te remmen, wanneer het virus-RNA in resp. extractiebuffer, resuspensiebuffer en 1xSSC was opgenomen. Uit deze resultaten kan men concluderen dat het nucleïnezuur van TSWV niet infectieus was onder de gegeven condities.

Het RNA van de myxo-, paramyxo- en rhabdovirussen (Gibbs en Skehel, 1973) blijkt na extractie met fenol evenmin infectieus te zijn. Deze virussen hebben nl. een polymerase nodig voor infectie. Dit polymerase is wel in complete virusdeeltjes aanwezig, maar gaat bij de winning van het RNA verloren (Bukrinskaya, 1973). Mogelijk heeft TSWV-RNA ook een polymerase nodig om infectieus te kunnen zijn. Dit zou nagegaan kunnen worden door te analyseren of virus na behandeling met een detergens in vitro RNA kan synthetiseren dat complementair is aan virus-RNA.

6.2.2. Elektroforese in polyacrylamidegel

Het geëxtraheerde nucleïnezuur werd geanalyseerd door middel van elektroforese in 2% acrylamidegels versterkt met 0,5% agarose. De hoeveelheid RNA die opgebracht werd, varieerde van 10-25 µg. In het patroon, dat na doormeten van de gel bij 260 nm ontstond, werden 4 tot 5 bandjes gevonden, die wat betreft hun intensiteit afhankelijk waren van het jaargetijde waarin het RNA werd geïsoleerd (Fig. 6.1). De relatieve mobiliteit van de banden bleef echter gelijk. Ook na kleuren met toluïdine blue O werden er 5 banden gevonden.

De patronen a en b (Fig. 6.1) vertonen rechts van piek 1 een aanzienlijke absorptie bij 260 nm, die in patroon c niet gevonden wordt. Deze absorptie is mogelijk te wijten aan afbraak van het RNA in het virusextract, dat in februari en april werd verkregen.

De pieken 1, 2 en 4 waren altijd duidelijk aanwezig. Piek 3 werd bij doormeten van de gels bij 260 nm in de meeste gevallen als een schouder van piek 2 teruggevonden. Na kleuren met toluïdine blue O werd deze piek wel als een afzonderlijke band gedetecteerd. Piek 5 was niet altijd zichtbaar hetgeen te wijten was aan de geringe hoeveelheid materiaal in de fractie corresponderend met deze piek.

De oorzaak van de gevonden veranderlijkheid van het RNA-patroon is niet duidelijk. Een feit is echter dat ook het virus wat betreft de vermeerderingssnelheid in de waardplant en stabiliteit van het gezuiverde virus (Hoofdstuk 3) over het seizoen verschilde. Mogelijk staan beide waarnemingen in verband met elkaar. De hierna volgende experimenten werden verricht met het nucleïnezuur van TSWV, dat in juni-juli was gezuiverd. Dit nucleïnezuur correspondeert derhalve met virus, dat zowel kwalitatief als kwantitatief goed te zuiveren was. Dit preparaat leverde bij RNA-analyse op gels steeds hetzelfde patroon op.

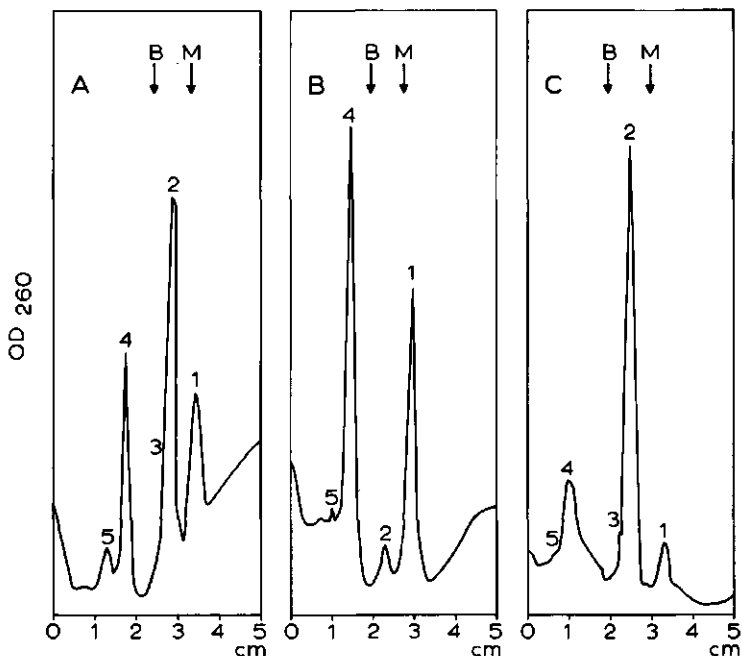


Fig. 6.1 Elektroforesepatronen van TSWV-RNA afkomstig van virus gezuiverd in resp. februari (A), april (B) en juni-juli (C) op 2% polyacrylamidegels versterkt met 0,5% agarose. De pieken in het absorptiepatroon zijn genummerd 1 t/m 5. De posities van het midden (M) en bodem (B) RNA van CPMV, die op afzonderlijke gels werden geëlektroforeerd, zijn in de patronen aangegeven. De elektroforeserichting is van links naar rechts.

Het voorkomen van het RNA in een aantal fracties is geen artefact tengevolge van bewaring van het virus in de diepvrieskast, aangezien virus, dat direct na de zuivering werd gemengd met SDS en op polyacrylamidegel werd geëlektroforeerd een identiek patroon gaf. De mogelijkheid dat fragmentatie van het nucleïnezuur tijdens de zuivering van het virus of bij het extraheren van het nucleïnezuur uit het virus optreedt kan evenwel niet uitgesloten worden.

Aannemende dat het RNA van TSWV niet-infectieus en gesegmenteerd is, dan vertoont dit veel overeenkomst met het RNA van de myxovirussen, die een genoom bezitten dat waarschijnlijk uit 8 of 9 verschillende segmenten bestaat (Skehel, 1972).

6.2.3. Incubatie met RNase en DNase

Het geëxtraheerde nucleïnezuur werd getoetst op gevoeligheid voor RNase en DNase door de gels na elektroforese met een van deze enzymen te incuberen. In Fig. 6.2 is het patroon weergegeven van gels die 5 en 12 uur met RNase A en T_1 waren geïncubeerd. Vergelijking van de inwerking van RNase op TSWV-RNA en

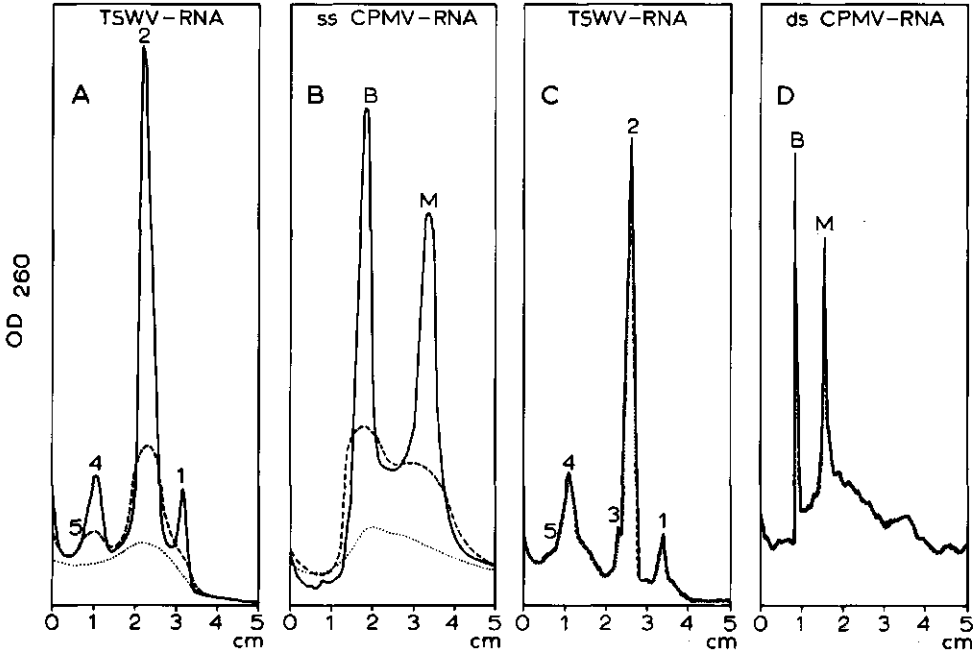


Fig. 6.2 Verdeling van de optische dichtheid (260 nm) over de gels na elektroforese van TSWV-RNA (A en C), ss CPMV-RNA (M en B) (B) en ds CPMV-RNA (M en B) (D).
 A, B en D: patroon vóór (—), na 5 uur (---) en na 12 uur (...) incubatie van de gel met 25 μ g RNase A/ml en 25 units RNase T_1 /ml in 2x SSC.
 C : patroon vóór (—), na 5 uur (---) en na 12 uur (...) incubatie van de gel in 2xSSC.

ss CPMV-RNA liet duidelijk zien dat de RNA-fracties 1 t/m 4 vrijwel eenzelfde gevoeligheid voor RNase bezitten als enkelstrengig CPMV-RNA. Dubbelstrengig CPMV-RNA bleek onder deze omstandigheden niet afgebroken te worden. Incubatie van TSWV-RNA zonder RNase gaf geen verandering in het patroon te zien. De fractie corresponderend met piek 5 bleek vrij resistent tegen inwerking van RNase. Na incubatie van de gel met RNase en daaropvolgende kleuring met toluidine blue O was

deze fractie nog aanwezig, terwijl de fracties 1 t/m 4 verdwenen waren.

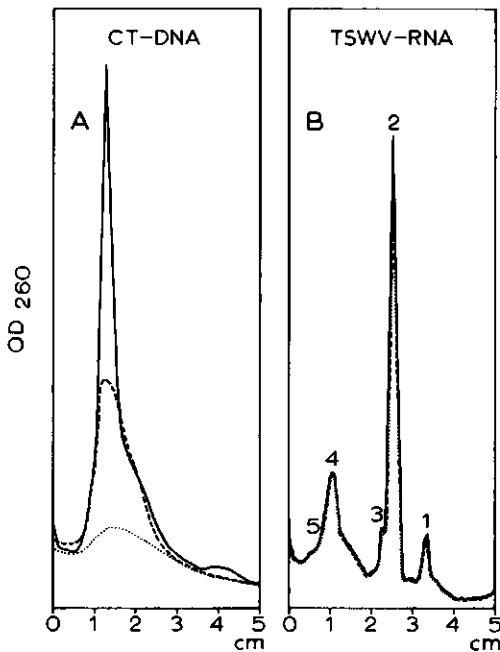


Fig. 6.3 Verdeling van de optische dichtheid (260 nm) over de gels na elektroforese van CT-DNA (A) en TSWV-RNA (B).
 a en b: patroon vóór (—), na 5 uur (----) en na 12 uur (...) incubatie van de gels in 2xSSC + 5 mM MgCl₂ + 5 µg DNase I/ml.

In Fig. 6.3 is het patroon weergegeven nadat de gels 5 en 12 uur met DNase I waren geïncubeerd. Als controle op de afwezigheid van RNase-activiteit werd ss CPMV-RNA gebruikt. Het gebruikte DNase bleek geen RNase-activiteit te bezitten. Uit het nagenoeg volledig verdwijnen van de CT-DNA piek in 12 uur bleek dat het DNase-preparaat goed werkzaam was. Onder deze omstandigheden werd geen afbraak van TSWV-RNA geconstateerd.

Uit de gevoeligheid voor RNase A en T₁, en de resistentie tegen DNase I blijkt dat het nucleïnezuur van TSWV enkelstrengig RNA is.

6.2.4. Differentiële precipitatie met zout

Enkel- en dubbelstrengig RNA verschillen in oplosbaarheid bij toenemende concentratie van natrium- of lithiumchloride (Erikson en Franklin, 1966). Dubbelstrengig virus-RNA, dubbelstrengig DNA en transport-RNA worden met 2 M LiCl niet neergeslagen. Met deze techniek is getracht het TSWV-RNA nader te karakteriseren.

De gevolgde procedure was van Segal en Sreevalsan (1974). Aan een oplossing van TSWV-RNA werd LiCl tot een concentratie van 2 M toegevoegd. Deze oplossing liet men gedurende de nacht bij -20°C staan. Na centrifugering bij laag toerental werden supernatant en sediment in polyacrylamidegel geanalyseerd. De RNA-fracties 1, 2 en 4 bleken nagenoeg kwantitatief in het sediment teruggevonden te worden (Fig. 6.4).

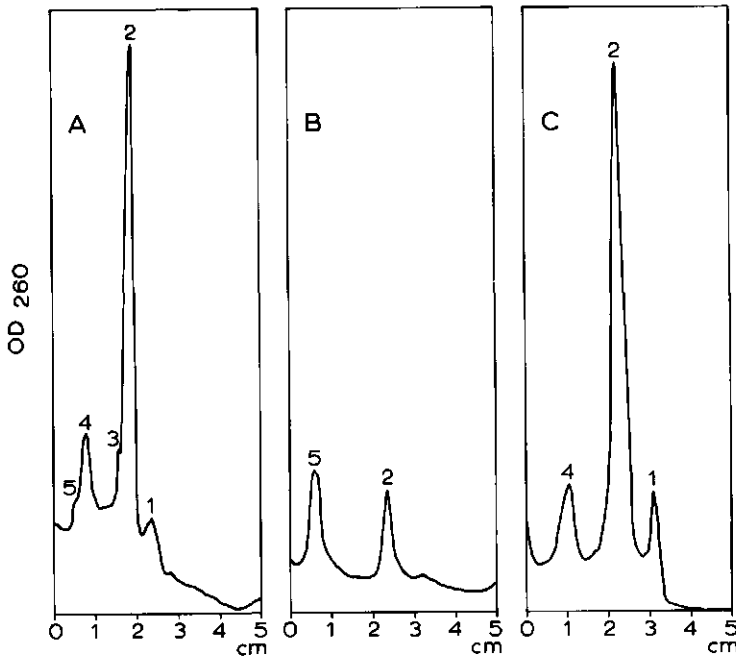


Fig. 6.4 Verdeling van de optische dichtheid (260 nm) over de gel na elektroforese van TSWV-RNA (A), de supernatant na precipitatie van TSWV-RNA met 2 M LiCl (B) en het sediment na precipitatie van TSWV-RNA met 2 M LiCl (C). De hoeveelheid materiaal, dat in b werd opgebracht, correspondeerde met een 10 x zo grote hoeveelheid TSWV-RNA als in A en C.

In de met 2 volumina ijskoude ethanol geconcentreerde supernatant werd nog een relatief kleine hoeveelheid van de RNA-fractie 2 teruggevonden en verreweg het merendeel van het materiaal dat piek 5 vormt. Uit het gedrag in 2 M LiCl is af te leiden dat de pieken 1 t/m 4 enkelstrengig RNA bevatten. Het materiaal dat piek 5 vormt blijkt zich afwijkend te gedragen.

6.2.5. Resistentie tegen verhitting

Het enkel- of dubbelstrengig karakter kan ook afgeleid worden uit gevoeligheid voor verhitting op 100°C. Eventuele dubbelstrengen zullen uitgesmolten worden hetgeen tot uiting zal komen in een positieverandering van de desbetreffende RNA-band na elektroforese in polyacrylamidegel.

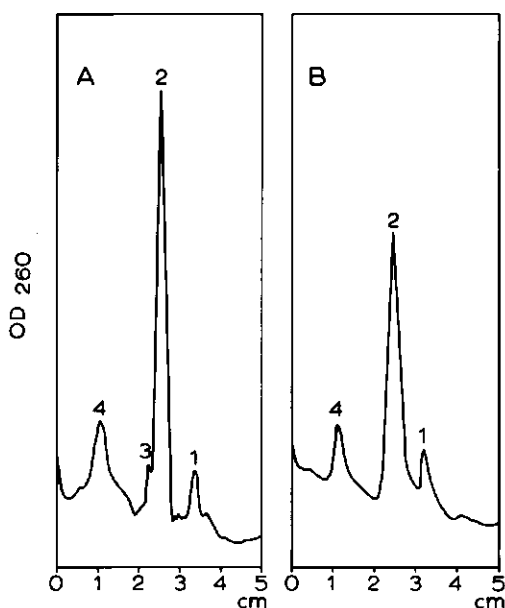


Fig. 6.5 Verdeling van de optische dichtheid (260 nm) over de gel na elektroforese van TSWV-RNA (A) en na verhitting van TSWV-RNA gedurende 5 minuten bij 100°C (B).

TSWV-RNA werd 3-10 minuten verhit op 100°C in 0,01 M EDTA, pH 7,0 en vervolgens snel afgekoeld. Het aldus behandelde RNA werd geëlektroforeerd in polyacrylamidegel (Fig. 6.5). Het RNA-patroon was identiek met de niet verhitte controle voor

wat betreft de RNA-fracties 1 t/m 4. De fractie corresponderend met piek 5 verdween steeds tengevolge van verhitting.

Ook de supernatant en het sediment verkregen na precipitatie van TSWV-RNA met 2 M LiCl, werden verhit op 100°C. Het RNA-patroon van het sediment bleef hetzelfde. In het patroon van de supernatant was alleen de RNA-fractie 2 nog zichtbaar.

Dit experiment bevestigt het enkelstrengig karakter van de RNA-fracties 1 t/m 4 en het afwijkend gedrag van het materiaal dat piek 5 vormt.

6.2.6. Eigenschappen van het materiaal corresponderend met piek 5

Bij een nauwkeurige bepaling van de optische dichtheid over de gels bij 260 en 280 nm bleek, dat het materiaal van piek 5 een grotere verhouding $E_{280\text{nm}}/E_{260\text{nm}}$ vertoonde dan de RNA-fracties 1 t/m 4. De mogelijkheid van een contaminatie van deze piek met eiwit leek daardoor reëel. Kleuring van een dergelijke gel met coomassie brilliant blue toonde aan dat het materiaal van de pieken 1 t/m 4 niet, maar dat van piek 5 wel met dit reagens kleurde. Deze waarnemingen wijzen sterk op het voorkomen van eiwit in het materiaal van piek 5.

Dit materiaal heeft kort samengevat de volgende eigenschappen:

1. Het is resistent tegen RNases;
2. Het kleurt met coomassie brilliant blue;
3. Het kleurt met toluïdine blue O (deze kleurstof kan echter ook eiwit kleuren);
4. Het heeft een grotere verhouding $E_{280\text{nm}}/E_{260\text{nm}}$ dan het materiaal van de pieken 1 t/m 4;
5. Het verdwijnt bij verhitting.

Gezien de kleuring met coomassie brilliant blue bevat het materiaal van piek 5 eiwit. Uit de punten 1 t/m 5 is niet af te leiden of dit materiaal ook RNA bevat. Het is echter niet aannemelijk dat hierin alleen eiwit voorkomt. Zo'n eiwit zou een zeer groot moleculgewicht moeten hebben, gezien zijn positie op de gel na elektroforese onder de beschreven omstandigheden.

Een associatie van eiwit met nucleïnezuur zou een dergelijke fractie op de gel wel kunnen voorstellen, hetgeen ook in overeenstemming is met het gedrag in 2 M LiCl en het verdwijnen van piek 5 tengevolge van verhitting.

Aannemende dat een complex van nucleïnezuur en eiwit verantwoordelijk is voor piek 5, dan is het wel merkwaardig dat door een behandeling met fenol en SDS dit complex niet dissociëert. Eiwitten met veel basische groepen kunnen een dergelijke SDS resistente associatie met RNA vertonen (Kubinski en Gibbs, 1970).

Het is de vraag of dit veronderstelde complex van nucleïnezuur en eiwit specifiek is voor het virus dan wel als contaminatie, afkomstig van de waardplant, moet worden beschouwd. Het is zeer interessant om dit complex nader te karakteriseren wat betreft eiwit, nucleïnezuur en biologische functie.

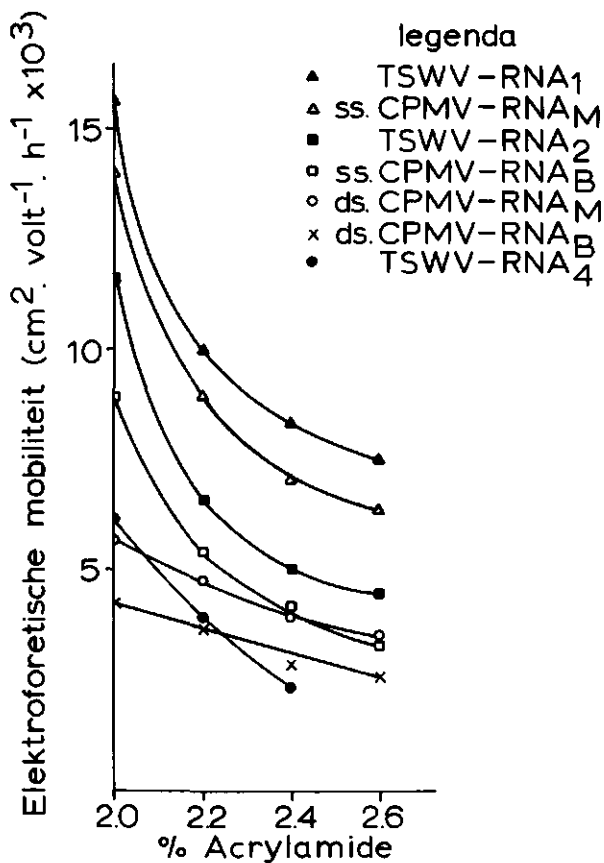


Fig. 6.6. Mobiliteit van verschillende in de legenda aangegeven RNA's bij elektroforese in gels met verschillende concentraties acrylamide.

6.2.7. Elektroforetisch gedrag

Uit de mate waarin de mobiliteit van het nucleïnezuur verandert bij elektroforese in gels met toenemende percentages acrylamide is af te leiden of het RNA enkelstrengig, dubbelstrengig lineair, dan wel dubbelstrengig circulair is (Harley et al., 1973).

RNA van TSWV werd in aanwezigheid van enkel en dubbelstrengig RNA van CPMV op gels met diverse percentages acrylamide geëlektroforeerd. In Fig. 6.6 zijn de mobiliteiten van deze RNA's uitgezet tegen het percentage acrylamide in de gel. De grote overeenkomst tot uiting komend in het parallel verloop van de mobiliteitscurves van de TSWV-RNA-fracties 1, 2 en 4 en de enkelstrengige CPMV-RNA-moleculen (RNA_M en RNA_B) wijst ook op het enkelstrengige karakter van de TSWV-RNA's.

6.2.8. Bepaling van de molecuulgewichten op polyacrylamidegel

De molecuulgewichten van de TSWV-RNA-fracties 1 t/m 4 werden bepaald door vergelijking met de enkelstrengige RNA's van CPMV waarvan de molecuulgewichten door Geelen (1974) bepaald waren op $1,37 \times 10^6 D$ (RNA_M) en $2,02 \times 10^6 D$ (RNA_B).

Met behulp van een ijklijn werden de molecuulgewichten voor de RNA-fracties 1 t/m 4 bepaald op $(1,3 \pm 0,065) \times 10^6 D$, $(1,7 \pm 0,085) \times 10^6 D$, $(1,9 \pm 0,095) \times 10^6 D$ en $(2,7 \pm 0,27) \times 10^6 D$. Iedere waarde is het gemiddelde van 10 bepalingen.

Bepaling van molecuulgewichten van RNA op polyacrylamidegel onder niet-denaturerende omstandigheden kan aanleiding geven tot aanzienlijke fouten (Reijnders et al., 1974), die voornamelijk terug te voeren zijn op verschillen in de mate van secundaire structuur in de verschillende RNA-moleculen. De molecuulgewichten werden ook onder denaturerende omstandigheden (Reijnders et al., 1973) bepaald. Aangenomen werd dat het RNA onder de elektroforesecondities ($60^\circ C$, 8 M ureum en lage zoutconcentratie) geheel gedenatureerd was in analogie met de bevindingen van Reijnders et al. (1973, 1974) met een aantal RNA's.

De molecuulgewichten, die nu voor de TSWV-RNA fracties 1 t/m 4 werden gevonden, werden bepaald op: $1,3 \times 10^6 D$, $1,7 \times 10^6 D$, $1,9 \times 10^6 D$ en $2,5 \times 10^6 D$ voor de respectievelijke TSWV-RNA-fracties 1 t/m 4. De waarden van RNA 1, 2 en 3 zijn identiek met de waarden die onder niet-denaturerende condities werden gevonden. De waarde van RNA 4 is echter iets lager.

De resultaten van beide methoden zijn goed met elkaar in overeenstemming.

Met behulp van de onder denaturerende omstandigheden bepaalde molecuulgewichten werd de onderlinge verhouding, waarin de RNA-fracties 1, 2 en 4 in Fig. 6.1 a, b en c voorkomen, bepaald door de piekoppervlakte te delen door het molecuulgewicht. De verhouding van RNA 1 : RNA 2 : RNA 4 was voor het in februari gezuiverde virus 3:8:2, voor het in april gezuiverde virus 12:1:6 en voor het in juni-juli gezuiverde virus 1:10:1. RNA 2 blijkt het sterkst te fluctueren. Men kan nu niet zonder meer verwachten dat elk virusdeeltje het RNA 1 t/m 4 zou bevatten. Dit zou een verhouding van 1:1:1:1 veronderstellen. De gevonden verhoudingen zouden verklaard kunnen worden door een van de twee volgende mogelijkheden.

1. TSWV zou bestaan uit een populatie van deeltjes, die zowel kwalitatief als kwantitatief een verschillende RNA-inhoud bezitten. Binnen zo'n populatie van deeltjes zouden verschuivingen kunnen optreden in de verschillende jaargetijden.
2. Fragmentatie van het RNA van TSWV treedt op tijdens de zuivering van het virus of tijdens de extractie van het RNA. Deze fragmentatie zou eveneens kunnen variëren met het seizoen.

6.3. Conclusie

Het nucleïnezuur van TSWV kon worden geëxtraheerd met waterverzadigde fenol + SDS en bleek niet infectieus te zijn. Bij analyse op polyacrylamidegels werden 4-5 fracties gevonden. De onderlinge verhouding van de piekhoogte in het densitogram van de diverse fracties vertoonde aanzienlijke veranderingen in relatie tot het seizoen. Om de resultaten van diverse experimenten met elkaar te vergelijken werd verder uitsluitend gewerkt met RNA van TSWV, dat in de periode juni-juli gezuiverd was.

Het materiaal corresponderende met de pieken 1 t/m 4 bleek gevoelig voor RNase A en T_1 en resistent tegen DNase I te zijn. Dit resultaat wees op de aanwezigheid van enkelstrengig RNA in deze fracties. De precipitatie in 2 M LiCl, de ongevoeligheid voor verhitting en de mobiliteit in gels met toenemend percentage acrylamide bevestigden dat het enkelstrengig RNA betrof.

Het materiaal corresponderende met piek 5, dat niet op alle gels kon worden aangetoond, bleek vrij resistent tegen RNase te zijn. Ook het feit dat het materiaal dat deze piek vormt, niet precipiteerde in 2 M LiCl en gevoelig voor verhitting bleek te zijn waren duidelijke aanwijzingen, dat het materiaal in deze piek geen enkelstrengig RNA was. Een indicatie voor het voorkomen van eiwit in fractie 5

Tabel 6.1 Aard en eigenschappen van het nucleïnezuur van de belangrijkste groepen membraanvirussen, welke enkelstrengig RNA bevatten. Samengesteld uit gegevens ontleend aan Lenard en Compans (1974) en Fenner (1974).

| GROEP | NUCLEÏNEZUUR | | | | |
|--------------------------|---|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | MOLECUUL- GEWICHT $\times 10^{-6}D$ | % NUCLEÏNE- ZUUR | AANTAL MOLECULEN | INFECTIOSITEIT NUCLEÏNEZUUR | TRANSCRIPTASE |
| Togavirus | 2-3 | 5-6 | 1 | + | |
| Myxovirus | 3-4 | 0,9 | 7 | - | + |
| Paramyxovirus | 6-7 | 0,9 | 1 | - | + |
| Rhabdovirus | 4-6 | 3 | 1 | - | + |
| RNA-tumorvirus | 10-12 | 1,9 | 4 | - | "reverse trans- criptase" |
| Arenovirus | 2-3 ^b | ? | mogelijk gesegmen- teerd | ? | ? |
| Coronavirus ^a | ? | ? | ? | ? | ? |
| TSWV | 7-8 | ? | 4 | - | ? |

^a het is nog niet geheel zeker of coronavirus enkelstrengig RNA bevat

^b Gibbs en Skehel (1973).

werd verkregen uit de grotere verhouding $E_{280 \text{ nm}}/E_{260 \text{ nm}}$ van dit materiaal in vergelijking met die van de fracties 1 t/m 4. De kleuring van fractie 5 met coomassie brilliant blue leverde een bevestiging van het bovenstaande. De gevonden eigenschappen van het materiaal corresponderende met piek 5 vormen een sterke indicatie voor het voorkomen van een complex van nucleïnezuur en eiwit in deze fractie.

Aannemende dat met elektroforese onder denaturerende omstandigheden de beste benadering van de werkelijke molecuulgewichten kan worden verkregen, zijn de molecuulgewichten voor de RNA-fracties 1 t/m 4 respectievelijk $1,3 \times 10^6D$, $1,7 \times 10^6D$, $1,9 \times 10^6D$ en $2,5 \times 10^6D$. Wanneer we aannemen dat in een infectieus deeltje elk RNA segment eenmaal moet voorkomen, dan bevat een deeltje een genoom met een gesommeerd molecuulgewicht van $7,4 \times 10^6D$.

Indien RNA 4 met een molecuulgewicht van $2,5 \times 10^6D$ het ongefragmenteerde genoom van TSWV zou vertegenwoordigen dan kan een dergelijk molecuul theoretisch coderen voor ongeveer 260.000 D aan eiwit (Paucha et al., 1974), hetgeen amper voldoende is voor de eiwitten 1 t/m 5 van TSWV.

Deze beschouwing pleit voor het voorkomen van enige RNA moleculen of van een gro-

ter RNA molecuul dan RNA₄ van TSWV om tot de benodigde hoeveelheid genetische informatie te kunnen komen.

Op basis van wat nu bekend is over het nucleïnezuur van het virus is TSWV niet te plaatsen in een van de enkelstrengig RNA bevattende membraanvirusgroepen (Tabel 6.1). De rangschikking van TSWV in een aparte groep (Harrison et al., 1971 b) wordt ondersteund door de in dit onderzoek bepaalde eigenschappen van het RNA.

7. EEN EERSTE KARAKTERISERING VAN INFECTIEUS RIBONUCLEOPROTEÏNE

De waarneming, dat het RNA van TSWV niet infectieus was (6.2.1) zou toegeschreven kunnen worden aan een van de twee volgende mogelijkheden.

1. Fragmentatie van het RNA als gevolg van extractie, kan resulteren in een niet infectieus RNA-preparaat.
2. Het RNA bestaat uit - strengen waarop eerst met behulp van een met het virusdeeltje geassocieerd transcriptase + strengen moeten worden gevormd. Deze + strengen kunnen wel vertaald worden. Het uit het virusdeeltje geëxtraheerde RNA, dat vrij is van transcriptase is dan niet infectieus. Men heeft voor "lettuce necrotic yellows virus" (Francki en Randles, 1972), "vesicular stomatitis virus" (Baltimore et al., 1970), influenzavirus (Chow en Simpson, 1971; Penhoet et al., 1971) aangetoond, dat de infectiositeit van het RNA uit deze virussen afhankelijk is van een met het virusdeeltje geassocieerd transcriptase.

Om te kunnen differentiëren tussen bovengenoemde mogelijkheden werd getracht een infectieus ribonucleoproteïne uit het virus te isoleren, waarna werd nagegaan welk eiwit of welke eiwitten hiermee geassocieerd waren. Een nadere karakterisering van dit eiwit of van deze eiwitten zou mogelijk antwoord kunnen geven op de vraag waarom het geëxtraheerde virus-RNA niet infectieus is.

7.1. Fragmentatie van TSWV met NP-40

Voor het isoleren van nucleocapsiden in een functionele staat uit membraanvirussen wordt meestal gebruik gemaakt van niet-ionische detergentia, zoals Triton-X-100 (Emerson en Wagner, 1972), Triton-N-101 (Baltimore et al., 1970; Chow en Simpson, 1971) en NP-40 (Francki en Randles, 1972).

Deze stoffen hebben de eigenschap om de membraan van het virus te dissociëren.

De werking van het detergens hangt verder nauw samen met de verhouding van detergens en virus (Helenius en Söderland, 1973); voorts wordt de dissociatie bevorderd door hoge pH en lage ionensterkte (Liljas et al., 1974).

Om de nucleocapside(n) van TSWV te isoleren werd gebruik gemaakt van het detergenten NP-40 aangezien reeds eerder gebleken was, dat 4 uur na toevoeging van NP-40 in een eindconcentratie van 0,1 en 0,5% aan gedeeltelijk gezuiverde viruspreparaten er nog resp. 3% en 8% van de oorspronkelijke infectiositeit aanwezig was, terwijl met Triton-X-100 dan geen infectiositeit meer werd gevonden. In elektronenmicroscopische studies bleek dat behandeling van het virus met 0,05% NP-40 gedurende 1 minuut op een objectdrager voldoende was om het virus volledig uit elkaar te laten vallen (Fig. 5.9).

7.2. Gedeeltelijke zuivering van infectieus ribonucleoproteïne op een gradiënt

Om de mogelijkheid uit te sluiten, dat de gevonden infectiositeit nog te wijten zou zijn aan complete virusdeeltjes werd de positie van de infectiositeit in een gradiënt, waarop resp. TSWV en het met NP-40 behandelde was gebracht, na centrifugering vergeleken.

Daartoe werd een virussuspensie in twee gelijke delen verdeeld. Aan een deel werd een gelijk volume buffer toegevoegd terwijl aan het andere deel een gelijk volume 0,1% NP-40 werd toegevoegd. Na 10 minuten werden deze suspensies 1 uur bij 40.000 rpm op een 8-43% (^W/v) glycerinegradiënt in 1 x SSC, pH 7,2, gecentrifugeerd in de SW 60 Ti-rotor van de MSE 65. De gradiënt werd gefractioneerd en van de verkregen fracties werd de optische dichtheid bij 257 nm bepaald (Fig. 7.1). In het optische-dichtheidspatroon van de gradiënt, waarin het behandelde virus was gecentrifugeerd, bleken 3 pieken voor te komen (Fig. 7.1 B).

Piek 1 moet worden toegeschreven aan NP-40, dat op de opbrengplaats was achtergebleven. Over de aard van de materie die correspondeerde met piek 2 kan niets met zekerheid worden gezegd. De fractie die ongeveer correspondeerde met piek 3 bleek infectieus te zijn. Bij het onbehandelde virus was de infectiositeit alleen geassocieerd met het sediment (Fig. 7.1 A). Hieruit kan worden geconcludeerd dat de infectiositeit die in de fractie corresponderende met piek 3 werd gevonden niet aan complete deeltjes toegeschreven kan worden en tevens dat deze fractie langzamer sedimenteert dan het complete virus.

7.3. Karakterisering van infectieus ribonucleoproteïne

Om na te gaan welke de aard van het infectieuze materiaal was, dat na behandeling van het virus met NP-40 was verkregen, werden de eiwitten die in de verschillende fracties van de gradiënt voorkwamen, geanalyseerd. De eiwitten in deze fracties werden geconcentreerd met 2 volumina ijskoude ethanol en vervol-

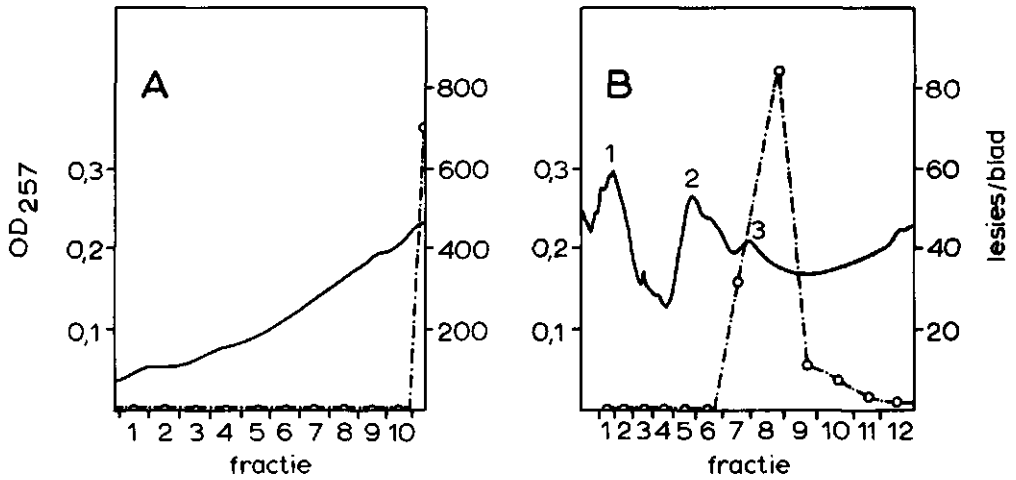


Fig. 7.1 Verdeling van de optische dichtheid bij 257 nm (—) en de infectiositeit (---) over een 8-43% glycerinegradiënt waarin resp. onbehandeld virus (A) en met NP-40 behandeld virus (B) was gecentrifugeerd (1 uur bij 40.000 rpm in de SW 60 Ti-rotor van de MSE 65). De sedimentatie-richting is van links naar rechts. De gradiënten werden gefractioneerd opgevangen en de infectiositeit van de diverse fracties werd bepaald op *P. hybrida*.

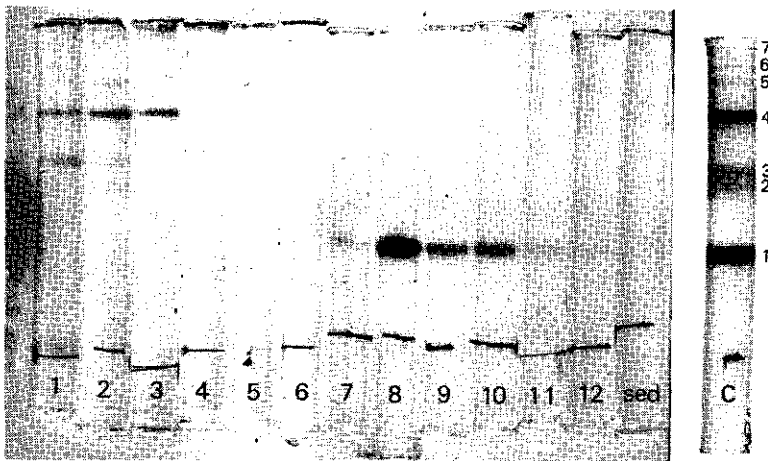


Fig. 7.2 Elektroforesepatronen van TSWV (c) en van de fracties (1 t/m 12 en het sediment) die uit een 8-43% glycerinegradiënt na centrifugering van met NP-40 behandeld TSWV werden geïsoleerd. Fractie 1 correspondeerde met de top uit de gradiënt. Het sediment uit de gradiënt werd direct opgelost in 1% SDS en 1% ME in 0,01 M natriumfosfaatbuffer. Geëlektroforeerd werd in 7,5% polyacrylamidegel. De positie van de broomfenolblauwband is gemerkt met Oostindische inkt.

gens met SDS afgebroken voor elektroforese in polyacrylamidegel. In Fig. 7.2 zijn de betrokken elektroforesepatronen van de diverse fracties uit de gradiënt te zien.

In de fracties 1 t/m 6 van de gradiënt blijken de eiwitten 2 t/m 6 voor te komen. In de fracties 7 t/m 12 vinden we eiwit 1 en geringe hoeveelheden van de eiwitten 3 en 4. De infectiositeit en eiwit 1 blijken nagenoeg op dezelfde wijze over de fracties van de gradiënt verdeeld te zijn (Fig. 7.1 B). Fractie 8 is de meest infectieuze fractie en bevat ook de grootste hoeveelheid van eiwit 1 (Fig. 7.1 B en Fig. 7.2). In deze fractie komen naast eiwit 1 ook geringe hoeveelheden van de eiwitten 3 en 4 voor. Eiwit 4 blijkt voornamelijk in de fracties 2 en 3 voor te komen (Fig. 7.2). Dit suggereert dat eiwit 4 niet direct geassocieerd is met het RNA, en hetzelfde kan van de eiwitten 5 en 6 gezegd worden. Het voorkomen van de eiwitten 2 en 3 blijkt beperkt te zijn tot een gering aantal fracties. De indruk werd verkregen dat de grootste hoeveelheid van deze eiwitten voornamelijk in de fracties 1 t/m 3 terecht kwam, maar ze werden ook in lager gelegen fracties gevonden. Men mag uit het bovenstaande concluderen dat eiwit 1 geassocieerd is met het RNA.

Mohamed et al. (1973) vonden dat hoofdzakelijk de eiwitten 1 en 7 en slechts sporen van de eiwitten 2, 3 en 4 geassocieerd waren met een sferisch deeltje, dat zij isoleerden na behandeling van het virus met NP-40. Eiwit 7 kon onder onze omstandigheden echter niet teruggevonden worden in de diverse gels.

De diverse fracties uit de gradiënt werden ook onder de elektronenmicroscopie bekeken om te zien welke structuren met deze fracties corresponderden. Het beeld dat in de elektronenmicroscopie van een bepaalde fractie werd verkregen, wisselde echter sterk van experiment tot experiment, zonder dat er enige conclusie uit kon worden getrokken.

Uit het feit dat het virus na behandeling met 0,05% NP-40 in vrij kleine fragmenten uiteengevallen was (Fig. 5.9) zou men mogen veronderstellen dat via de gevolgde procedure geen stabiele structuren kunnen worden verkregen.

7.4. Conclusie

TSWV bleek na een behandeling met NP-40 nog infectieus te zijn. Wanneer een met 0,05% NP-40 behandeld preparaat en een onbehandeld viruspreparaat op een 8-43% glycerinegradiënt werden gecentrifugeerd, dan bleek bij het met NP-40 behandelde virus de infectiositeit duidelijk langzamer te sedimenteren. Dit betekent dat de infectiositeit, die nog resteerde na NP-40 behandeling moeilijk aan complete virusdeeltjes toegeschreven kon worden.

De verdeling van de eiwitten van TSWV over de fracties van de bovengenoemde gradiënt werd bestudeerd door analyse van deze fracties op polyacrylamidegel. Uit de goede overeenkomst tussen de verdeling van eiwit 1 en de infectiositeit over deze gradiënt werd geconcludeerd dat eiwit 1 geassocieerd is met het RNA. Eiwit 1 en het RNA zouden tezamen het ribonucleoproteïne van het TSWV-deeltje kunnen vormen. De verschillende fracties uit de gradiënt werden bestudeerd met de elektronenmicroscop. In deze fracties konden echter nog geen duidelijke structuren gevonden worden.

8. ALGEMENE DISCUSSIE

Aan de hand van de in dit onderzoek verkregen resultaten zal nu getracht worden om de posities van de TSWV-eiwitten in het deeltje nader aan te geven. Daarbij is tevens rekening gehouden met de kennis van de rangschikking van de eiwitten in de deeltjes van andere membraanvirussen zoals deze in de literatuur is vastgelegd.

Na denaturatie van TSWV met SDS, ME en joodaceetamide werden met behulp van elektroforese in polyacrylamidegels 7 eiwitten gevonden. De eiwitten 1 t/m 4 bleken duidelijk sterk vertegenwoordigd te zijn. De eiwitten 5, 6 en 7 kwamen in zeer geringe hoeveelheid voor. Hun betekenis in de structuur van de virusdeeltjes is nog onduidelijk. Daarom zijn ze in de hierna volgende bespreking voorlopig buiten beschouwing gebleven.

De eiwitten 2, 3 en 4 gaven een duidelijke reactie met PAS-reagens en bevatten dus covalent gebonden koolhydraat. Eiwit 1 gaf daarentegen slechts een zeer zwakke reactie met PAS-reagens.

Bij alle tot nu toe onderzochte membraanvirussen (Rifkin en Quigley, 1974) blijken glycoproteïnen deel uit te maken van de envelop. Er zijn veel aanwijzingen dat bij de arbo-, myxo-, paramyxo- en rhabdovirussen alle eiwitten aan de buitenzijde van de membraan geglycosyleerd zijn, terwijl eiwitten binnen de membraan geen covalent gebonden koolhydraat bevatten (Burge en Strauss Jr., 1970). De glycoproteïnen op de envelop van diverse virussen blijken steeds geassocieerd te zijn met de eiwituitsteeksels (Lenard en Compans, 1974), die met de elektronenmicroscop zichtbaar zijn. Op grond van deze waarneming zou men kunnen veronderstellen dat de glycoproteïnen (nl. eiwit 2, 3 en 4), die in TSWV zijn gevonden aan de buitenkant van de membraan gelokaliseerd zijn en dat een of sommige ervan geassocieerd zouden kunnen zijn met de eiwituitsteeksels.

Door labeling van ongefragmenteerd en gefragmenteerd virus met ^{125}J kon aangetoond worden dat eiwit 1 veel minder toegankelijk was voor labeling dan de eiwitten 2, 3 en 4 (Tabel 5.5). Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat eiwit 1 binnen de lipidendubbellaag ligt en dat de eiwitten 2, 3 en 4 buiten deze dubbellaag gelokaliseerd zijn (Fig. 5.10 en 5.11).

De sterke afbraak van de eiwitten 2, 3 en 4 ten opzichte van eiwit 1 na incubatie van ongefragmenteerd virus met een niet nader gedefinieerd proteolytisch enzym, dat aanwezig was in een galactose-oxydasepreparaat van *Polyporus circinatus*, suggereerde eenzelfde eiwitverdeling (Fig. 5.12).

Na dissociatie van de membraan van TSWV met NP-40 en centrifugering op een gradiënt bleken eiwit 1 en de infectiositeit op dezelfde wijze over de gradiënt verdeeld te zijn (Fig. 7.1 en 7.2). Hieruit werd geconcludeerd dat eiwit 1 geassocieerd is met het virus-RNA.

Toevoeging van toenemende hoeveelheden ongefragmenteerd virus aan TSWV-antiserum leidde tot het verdwijnen van alle precipitatielijnen op één na bij dubbele diffusie tussen dit serum en TSWV in agarose. Deze waarneming bevestigt het voorkomen van een eiwit binnen de membraan.

Gezien de positie van eiwit 1 binnen de membraan is het moeilijk te begrijpen dat dit eiwit, zij het zeer zwak, met PAS-reagens kleurt. Er kan betwijfeld worden of deze kleuring van eiwit 1 inderdaad een positieve reactie op suiker is. De mogelijkheid dat hier sprake is van specifieke binding van kleurstof aan eiwit kan nl. niet uitgesloten worden. De sterke kleuring van eiwit 1 bij Mohamed et al. (1973) (in hun notatie eiwit 4) is in tegenspraak met de gangbare gedachte dat eiwitten binnen de envelop niet-geglycosyleerd zijn.

Ongeveer 50% van het totale viruseiwit bestaat uit eiwit 1 (5.1). Verder is eiwit 1 het enige van de sterk vertegenwoordigde eiwitten, dat binnen de membraan voorkomt. De eiwitten 2 t/m 4 blijken nl. op de envelop gelokaliseerd te zijn. Deze situatie wordt ook gevonden bij Sindbis-virus en "Semliki forest virus" (togavirussen). Bij deze virussen blijkt ook één eiwit binnen de membraan aanwezig te zijn, terwijl de overige eiwitten als glycoproteïnen op de envelop voorkomen (Schlesinger et al., 1972; Hay et al., 1968).

Bij de meeste enkelstrengig RNA bevattende membraanvirussen zoals influenzavirus (Schulze, 1970; Compans et al., 1970), para-influenzavirus (Mountcastle et al., 1971), "vesicular stomatitis virus" (Wagner et al., 1969) en "mouse mammary tumor virus" (Nowinski et al., 1971) is de situatie anders. Deze virussen bezitten, in betrekkelijk grote hoeveelheid twee niet-geglycosyleerde eiwitten binnen de membraan. Een van deze eiwitten is geassocieerd met het RNA, terwijl het andere eiwit in contact is met de lipidendubbellaag. Dit laatste eiwit noemt men vaak

"matrix"-eiwit. Een "matrix"-eiwit zou de envelop bij membraanvirussen stabiliseren (Schulze, 1973). Er zijn nl. aanwijzingen dat glycoproteïnen een dergelijke functie blijkbaar niet kunnen vervullen, omdat na verwijdering van glycoproteïnen met proteolytische enzymen de vorm van de virusdeeltjes niet veranderd is (Cartwright et al., 1969; Schulze, 1972). De gelijktijdige infectie van cellen met "simian virus" 5, een sferisch virus en "vesicular stomatitis virus", een bacil-vormig virus, leverde bacil-vormige deeltjes op, die bij analyse de glycoproteïnen van "simian virus" 5 bleken te bevatten (Choppin en Compans, 1970; McSharry et al., 1971). Blijkbaar oefenden de glycoproteïnen van het sferisch virus geen invloed uit op de vorm van het bacil-vormige virus (Schulze, 1973).

Bij Sindbis-virus (Harrison et al., 1971 a) werd met röntgendiffractie aangetoond dat het intern gelokaliseerde eiwit ("core"-eiwit) geassocieerd was met het virus-RNA en tevens in direct contact was met de lipidendubbellaag. Harrison et al. veronderstelden dat dit "core"-eiwit, gezien het bovenstaande, zowel de functie van nucleocapside-eiwit als van "matrix"-eiwit in zich verenigde. Indien we er van uitgaan dat de twee glycoproteïnen die in Sindbis-virus voorkomen, ook hier de lipidendubbellaag niet stabiliseren zal dit door het "core"-eiwit moeten gebeuren.

Bij TSWV komt alleen eiwit 1 in betrekkelijk grote hoeveelheden binnen de membraan voor. Dit eiwit blijkt met het virus-RNA geassocieerd te zijn. Omdat binnen de membraan van TSWV geen tweede eiwit werd gevonden mogen we aannemen dat eiwit 1 ook als "matrix"-eiwit fungeert, zoals voor het Sindbis-virus is voorgesteld.

Het is opvallend dat de molecuulgewichten van de "matrix"-eiwitten bij de diverse membraanvirussen vrij goed met elkaar overeenkomen en hetzelfde kan ook van die nucleocapside-eiwitten worden gezegd die geen "matrix"-eiwit functie hebben (Tabel 8.1). Mogelijk is er een correlatie tussen de functie van een eiwit en het molecuulgewicht. In dit verband kan opgemerkt worden dat het molecuulgewicht van eiwit 1 van TSWV (27.000 D) en het molecuulgewicht van het "core"-eiwit bij Sindbis-virus (32.000 D) dicht bij elkaar liggen.

Mohamed et al. (1973) veronderstelden dat het virus-RNA niet met eiwit 1 geassocieerd is, maar "naakt" aanwezig is binnen een omhulsel gevormd door eiwit 1 (eiwit 4 in hun notatie). De resultaten van mijn onderzoek wijzen echter op een nauwe associatie van eiwit 1 met het virus-RNA.

Tabel 8.1 Eiwitsamenstelling van de belangrijkste groepen membraanvirussen welke enkelstrengig RNA bevatten. De gegevens van de groepen 1,2, 3, 4 en 6 zijn ontleend aan Lenard en Compans (1974), de gegevens van groep 5 aan Nowinski et al. (1971) en Teramoto et al. (1974) en van groep 7 aan Hierholzer et al. (1972). De gegevens voor TSWV zijn ontleend aan dit proefschrift.

| Virusgroep | Virus | "major" polypeptiden | | | "minor" polypeptiden |
|------------------------------|---------------------------------|----------------------|--|--------------|---------------------------------|
| | | nucleocapside-eiwit | glycoproteïnen | matrix-eiwit | |
| 1. Togavirus | Sindbis | 32.000 | 53.000 47.000 | - | - |
| 2. Myxovirus | Influenza (A ₀ /WSN) | 60.000 | 75.000 or 50.000+25.000 55.000 | 26.000 | 1 à 2 eiwitten (80.000-100.000) |
| 3. Paramyxovirus | Newcastle disease Sendai | 60.000 | 65.000-75.000 55.000 | 40.000 | 1 à 4 eiwitten (50.000-75.000) |
| 4. Rhabdovirus | Vesicular stomatitis | 52.000 | 67.000 | 25.000 | 4 eiwitten (40.000-175.000) |
| 5. RNA-tumorvirus | Mouse mammary tumor | 52.000 | 3 eiwitten | 23.000 | 7 eiwitten |
| 6. Arenavirus ^a | Pichinde | ? | 72.000 34.000 | ? | ? |
| 7. Coronavirus ^b | Corona (OC 43) | (47.000) | 191.000 104.000 60.000 15.000 | (30.000) | ? |
| 8. Tomato spotted wilt virus | Tomato spotted wilt | 27.000 | 52.000 58.000 78.000 | - | 3 eiwitten (90.000-200.000) |

^a Bij Arenavirus komt nog een niet geglycosyleerd polypeptide voor met molecuulgewicht van 72.000 D, dat nog niet gelokaliseerd is.

^b Bij Coronavirus komen twee niet geglycosyleerde eiwitten met molecuulgewichten van resp. 47.000 D en 30.000 D voor. Op grond van analogie is het eiwit met molecuulgewicht van 47.000 D in de kolom nucleocapside-eiwit geplaatst en het eiwit met molecuulgewicht 30.000 D in de kolom van het matrix-eiwit.

Tot nu toe bleek het niet mogelijk om een stabiele nucleocapside uit TSWV te isoleren. Bij Sindbis-virus is de nucleocapside echter vrij gemakkelijk te isoleren (Horzinek en Mussgay, 1969).

Op grond van de in dit onderzoek verkregen resultaten kan het cryptogram verder worden aangevuld: R/1 : π/Σ 7,4 : S/S : S/Th. Het molecuulgewicht van het virus-RNA is de sommatie van de molecuulgewichten van de RNA-segmenten 1 t/m 4, welke onder denaturerende omstandigheden werden bepaald (Reijnders et al., 1973).

Op basis van wat nu bekend is over het nucleïnezuur van het virus is TSWV niet te plaatsen in een van de membraanvirusgroepen (Tabel 6.1), die enkelstrengig RNA bezitten.

Gelet op de eiwitsamenstelling vertoont TSWV een zekere overeenkomst met de togavirussen (Tabel 8.1). Deze overeenkomst berust er voornamelijk op dat binnen de lipidendubbellaag slechts één eiwit in betrekkelijk grote hoeveelheid voorkomt. Wat betreft de eigenschappen van het nucleïnezuur verschilt TSWV echter duidelijk van de togavirussen (Tabel 6.1).

De rangschikking van TSWV in een aparte groep (Harrison et al., 1971 b) wordt ondersteund door de gegevens over RNA en eiwitsamenstelling. Harrison et al. kwamen tot deze conclusie op grond van andere overwegingen, toen men nog over weinig kennis over de structuur van dit virus beschikte.

9. SAMENVATTING

De verdeling van TSWV in *Nicotiana rustica* werd vergeleken op twee verschillende tijden in het jaar, nl. in februari en in september. (Tabel 3.1 en 3.2). In februari verliep de virusvermeerdering trager dan in september. Uit deze waarneming werd geconcludeerd dat het tijdstip van oogsten dat optimaal is voor winning van virus, nauw samenhangt met het seizoen.

De procedure voor de zuivering van TSWV (Schema 3.1) bestond uit de volgende stappen: centrifugering bij laag toerental, centrifugering bij hoog toerental, neerslaan van waardplantspecifieke bestanddelen met behulp van een antiserum daartegen, zone-centrifugering, evenwichtscentrifugering en een concentrering door centrifugering bij hoog toerental. Wanneer grote hoeveelheden blad in de zuivering werden opgewerkt, kon met zeer gunstig resultaat van gradiënt-centrifugeringen in de zone-rotor gebruik worden gemaakt (Schema 3.2).

Antisera tegen gezuiverd TSWV werden in konijnen bereid. Deze sera reageerden met sap van gezonde *N. rustica* bij dubbele diffusie in agargel. Deze reactie kon teniet gedaan worden door verzadiging met óf sap van gezonde *N. rustica* óf met polysacchariden uit sap van *N. rustica* (Fig. 4.5 en 4.6). De onverzadigde sera reageerden met gedenatureerd virus getuige de precipitatielijnen bij dubbele diffusie tussen de antisera en een polyacrylamidegel met de elektroforetisch gescheiden viruseiwitten (Fig. 4.1). Na verzadiging waren deze precipitatielijnen zeer sterk in intensiteit afgenomen. De posities van de precipitatielijnen tussen gedenatureerd virus en TSWV-antiserum bleken overeen te komen met de posities van de eiwitten 1 t/m 4 op de gel. Uit deze waarnemingen werd geconcludeerd dat de reactie van TSWV-antiserum met de gedenatureerde viruseiwitten voor een groot deel toegeschreven moet worden aan koolhydraat (polysacchariden) van de waardplant dat covalent gebonden is aan de viruseiwitten.

Een onverzadigd antiserum gaf drie precipitatielijnen met gezuiverd TSWV bij dubbele diffusie in agargel (Fig. 4.2). Toevoeging van toenemende hoeveelheden intact virus aan dit antiserum had tot gevolg dat alle precipitatielijnen op één na verdwenen (Fig. 4.10).

Na afbraak van TSWV met SDS en ME gevolgd door carboxymethylering met joodaceetamide en elektroforese in polyacrylamidegel werden 7 banden gevonden (genummerd als 1-7 van laag naar hoog molecuulgewicht) (Fig. 5.1).

De eiwitten 1 t/m 4 bleken sterk vertegenwoordigd te zijn. De eiwitten 5, 6 en 7 bleken niet meer dan 3% van het totale viruseiwit uit te maken.

De eiwitten 2, 3, 4 en 5 gaven een duidelijke reactie met PAS-reagens en bevatten dus covalent gebonden koolhydraat (Fig. 5.3). Eiwit 1 gaf een zeer zwakke reactie met PAS-reagens. Vanwege de geringe hoeveelheden van de eiwitten 6 en 7 op de gel kon niet vastgesteld worden of ze al dan niet kleurden. Verder bleek een zone die met het front van de elektroforese meeliep, eveneens koolhydraat te bevatten. Het materiaal dat met deze zone correspondeerde kon uit gezuiverd virus geëxtraheerd worden met chloroform-methanol. Uit de eigenschappen van deze zone, nl. de aanwezigheid van koolhydraat, de oplosbaarheid in chloroform-methanol, de reactie met TSWV-antiserum (Fig. 4.1) en de afwezigheid van kleuring met coomassie brilliant blue werd geconcludeerd dat deze zone glycolipiden bevatte.

Molecuulgewichtsbepaling in SDS-gels werd uitgevoerd volgens Segrest en Jackson (1972). De asymptotisch benaderde molecuulgewichten voor de eiwitten 1-5 waren 27.000 D, 52.000 D, 58.000 D, 78.000 D en 90.000 D respectievelijk (Fig. 5.6).

Met behulp van labeling met ^{125}J van intact en met Nonidet P 40 behandeld virus onder invloed van lactoperoxydase werd getracht de diverse eiwitten te lokaliseren (Fig. 5.10 en 5.11). Uit het verschil in labeling van de eiwitten 1 t/m 4 (Tabel 5.5) werd geconcludeerd dat eiwit 1 binnen de virusenvelop gelokaliseerd was en de eiwitten 2, 3 en 4 met de buitenzijde van de envelop geassocieerd waren. De labelingspatronen suggereerden sterk dat ook eiwit 5 zich buitenop de envelop bevond.

De werking van een niet nader gedefinieerde proteolytische activiteit in een preparaat van galactose-oxydase suggereerde eenzelfde eiwitverdeling. Incubatie van intact virus met het enzympreparaat leidde tot de afbraak van alle eiwitten uitgezonderd eiwit 1 (Fig. 5.12).

Het nucleïnezuur van TSWV werd geëxtraheerd uit gezuiverd virus met fenol-SDS en bleek niet-infectieus onder de getoetste condities. Na elektroforese van het nucleïnezuur op 2% polyacrylamidegels versterkt met 0,5% agarose, werden 4-5 banden gevonden (Fig. 6.1). De hoeveelheid materiaal in de verschillende banden

bleek met het seizoen te variëren (Fig. 6.1). De banden 1, 2, 3 en 4 bleken gevoelig voor RNases en waren resistent tegen DNase (Fig. 6.2 en 6.3). Dit was een sterke indicatie voor de aanwezigheid van enkelstrengig RNA in deze banden. De precipitatie in 2 M LiCl (Fig. 6.4), de ongevoeligheid voor verhitting op 100°C (Fig. 6.5) en de mobiliteit in gels met toenemend percentage acrylamide (Harley et al., 1973) (Fig. 6.6) bevestigden het enkelstrengig karakter.

Band 5 bleek zeer resistent tegen de werking van RNases en kleurde met coomassie brilliant blue. De gevonden eigenschappen van band 5 wijzen op het voorkomen van een complex van nucleïnezuur en eiwit in deze band.

De molecuulgewichten van de RNA's 1 t/m 4 (corresponderend met band 1 t/m 4) werden onder niet-denaturerende (Loening en Ingle, 1967) en onder denaturerende omstandigheden (Reijnders et al., 1973) bepaald. De waarden die volgens deze methoden werden verkregen waren goed met elkaar in overeenstemming. Hieruit werden voor de RNA's 1 t/m 4 de molecuulgewichten $1,3 \times 10^6$ D; $1,7 \times 10^6$ D; $1,9 \times 10^6$ D en $2,5-2,8 \times 10^6$ D berekend.

Na dissociatie van de membraan van TSWV met Nonidet P 40 en centrifugering op een gradiënt bleken eiwit 1 en de infectiositeit op dezelfde wijze over de gradiënt verdeeld te zijn (Fig. 7.1 en 7.2). Hieruit werd geconcludeerd dat eiwit 1 geassocieerd is met het virus-RNA.

De in dit onderzoek verkregen resultaten betreffende de lokalisatie van de eiwitten werden bediscussieerd aan de hand van literatuurgegevens over de rangschikking van de eiwitten in de deeltjes van andere membraanvirussen. Geconcludeerd werd dat eiwit 1 binnen de lipidendubbellaag gelokaliseerd is in associatie met het RNA. De eiwitten 2, 3 en 4 moeten, gezien hun eigenschappen, aan de buitenzijde van de lipidendubbellaag worden gelokaliseerd; waarschijnlijk zijn een of meer van deze eiwitten geassocieerd met de eiwituitsteeksels.

Met de in dit onderzoek verkregen gegevens luidt het cryptogram van TSWV: R/1 : π/Σ 7,4 : S/S : S/Th. De rangschikking van TSWV in een aparte groep (Harrison et al., 1971 b) wordt ondersteund door de in dit onderzoek verkregen gegevens over RNA en eiwitsamenstelling.

10. SUMMARY

The distribution and rate of accumulation of TSWV in *N. rustica* was compared at two different times of the year, February and September (Table 3.1 and 3.2). In February the overall rate of accumulation was slower than in September. From this observation it was concluded that the optimal time of harvest for purification is subject to seasonal variation.

A modified procedure for purification of TSWV is described consisting of differential centrifugation, treatment with antiserum against sap of healthy *N. rustica* and zone- and density-gradient centrifugation in sucrose gradients and finally a concentration by high speed centrifugation (Scheme 3.1). When large amounts of infected leaves were to be processed the virus was purified by means of centrifugation in a zone-rotor (Scheme 3.2). This procedure gave very good results.

Antisera were raised in rabbits against purified TSWV. These sera reacted with healthy *N. rustica* sap in agar gel double diffusion studies. This reaction could be abolished by absorption with either healthy *N. rustica* sap or polysaccharides purified from *N. rustica* (Fig. 4.5 and 4.6). Unabsorbed sera reacted with the major structural proteins, following their electrophoretic separation in SDS-gels (Fig. 4.1), however, absorption greatly diminished the intensity of the reactions. The positions of the precipitin lines corresponded with those of the structural proteins visualized by staining. From these observations it was concluded that the reaction of TSWV-antiserum with the structural proteins must be due mainly to host derived polysaccharides covalently bound to the structural proteins.

An unabsorbed antiserum gave three precipitin lines with TSWV in agar gel double diffusion studies (Fig. 4.2). Absorption of this antiserum with increasing concentrations of intact virus resulted in the disappearance of all but one of the precipitin lines (Fig. 4.10).

Polyacrylamide gel electrophoresis of purified virus following disruption with SDS, ME and iodoacetamide revealed 7 proteins (referred to as protein 1-7, in order of increasing molecular weight) (Fig. 5.1). Protein 1-4 were major proteins,

proteins 5, 6 and 7 occurred in very small amounts and were designated minor proteins.

Proteins 2, 3, 4 and 5 gave a clear reaction with PAS-reagent, indicating their glycoprotein nature (Fig. 5.3). Protein 1 gave a very weak reaction with PAS-reagent. It was not possible to demonstrate the presence of carbohydrate in proteins 6 and 7 due to their small amounts. A PAS positive zone migrating in front of the bromophenol blue tracker dye was detected. The material contained in this zone could be extracted from purified virus with chloroform-methanol (Fig. 5.5). From the properties of this zone viz. the presence of carbohydrate, solubility in chloroform-methanol, reaction with TSWV-antiserum (Fig. 4.1), and the absence of staining with coomassie brilliant blue, it was concluded that this zone contained glycolipids.

Determination of molecular weights in SDS-gels was carried out according to Segrest and Jackson (1972). The asymptotic minimum molecular weights derived for proteins 1-5 were 27,000 d; 52,000 d; 58,000 d; 78,000 d and 90,000 d respectively (Fig. 5.6).

The technique of lactoperoxidase catalysed iodination of intact and Nonidet P 40 disrupted virus was used to locate the individual proteins. From the differential labeling of proteins 1-4 it was concluded that protein 1 was localized inside the virus envelop and proteins 2, 3 and 4 were external to the envelop (Fig. 5.10 and 5.11, and Table 5.5). Furthermore the radioactivity profiles strongly suggested that protein 5 was also localized outside the envelop.

The action of an unknown proteolytic enzyme present as a contaminant in a preparation of galactose oxidase suggested a similar distribution of the proteins. Incubation of intact virus with the enzyme preparation led to the degradation of all structural proteins except protein 1.

TSWV nucleic acid, extracted from purified virus with phenol-SDS, was non-infectious under the test conditions used. Following electrophoresis of the extracted nucleic acid in 2% polyacrylamide gels containing 0,5% agarose, 5 bands were observed (Fig. 6.1). The amount of material contained in the different bands varied with the season. Bands 1-4 were sensitive to RNases and resistant to DNase (Fig. 6.2 and 6.3). This was a strong indication for the presence of single stranded RNA in these bands. Precipitation in 2 M LiCl (Fig. 6.4), resistance to heat (Fig. 6.5)

and mobility in gels of increasing percentage acrylamide (Fig. 6.6) (Harley et al., 1973) confirmed the single stranded character.

Band 5 appeared very resistant to the action of RNases and stained with coomassie brilliant blue. This band therefore probably represents a complex between protein and nucleic acid.

The molecular weights of RNAs 1, 2, 3 and 4 (corresponding to bands 1-4) were estimated under both non-denatured (Loening and Ingle, 1967) and denatured conditions (Reijnders et al., 1973). The values obtained for RNAs 1, 2, 3 and 4 by the two methods agreed well. From this the molecular weights 1.3×10^6 d, 1.7×10^6 d, 1.9×10^6 d and $2.5-2.8 \times 10^6$ d for RNAs 1, 2, 3 and 4 were derived.

Following dissociation of the envelop of TSWV with Nonidet P 40, and centrifugation on a glycerin gradient, both protein 1 and infectivity showed the same distribution along the gradient (Fig. 7.1 and 7.2). From this it was concluded that protein 1 was associated with the nucleic acid.

The results obtained are discussed in relation to known data about the arrangement of proteins in particles of other enveloped viruses. It is concluded that protein 1 is localized inside the lipid bilayer and associated with the RNA. The proteins 2, 3 and 4, in view of their properties, have to be localized on the outside of the lipid bilayer and probably one or more of them are associated with the projections.

On the basis of the results obtained the cryptogram of TSWV may be written as: R/1 : \ast/ϵ 7.4 : S/S : S/Th. The classification of TSWV in a monotypic group (Harrison et al., 1971 b) is in agreement with the data presented here concerning the RNA and protein composition of TSWV.

- Ackers, G.K. en Steere, R.L. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 59, 137-149.
- Assink, J.M.H. (1973). Lokalisatie van de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus.
Dissertatie, Wageningen.
- Baltimore, D., Huang, A.S. en Stampfer, M. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*
66, 572-576.
- Bender, W.W., Garan, H. en Berg, H.C. (1971). *J. Mol. Biol.* 58, 783-797.
- Best, R.J. (1968). *Advan. Virus Res.* 13, 66-146.
- Best, R.J. en Hariharasubramanian, V. (1967). *Enzymologia* 32, 128-134.
- Best, R.J. en Katekar, G.F. (1964). *Nature* 203, 671-672.
- Best, R.J. en Palk, B.A. (1964). *Virology* 23, 445-460.
- Black, L.M. (1955). *Phytopathology* 45, 20-216.
- Black, L.M., Brakke, M.K. en Vatter, A.E. (1963). *Virology* 20, 120-130.
- Brakke, M.K. (1967). In *Methods in Virology* (Maramorosch, K. en Koprowski, H.,
red.), vol II, pp. 119-136, Academic Press, New York.
- Bretscher, M.S. (1971). *J. Mol Biol.* 59, 351-357.
- Bukrinskaya, A.G. (1973). *Advan. Virus Res.* 18, 195-255.
- Burge, B.W. en Huang, A.S. (1970). *J. Virol.* 6, 176-182.
- Burge, B.W. en Strauss Jr., J.H. (1970). *J. Mol. Biol.* 47, 449-466.
- Caldwell, R.C. en Pigman, W. (1965). *Arch. Biochem. Biophys.* 110, 91-96.
- Cartwright, B. en Brown, F. (1972). *J. Gen. Virol.* 15, 243-245.
- Cartwright, B., Smale, C.J. en Brown, F. (1969). *J. Gen. Virol.* 5, 1-10.
- Chen, C., Compans, R.W. en Choppin, P.W. (1971). *J. Gen. Virol.* 11, 53-58.
- Choppin, P.W. en Compans, R.W. (1970). *J. Virol.* 5, 609-616.
- Chow, N.L. en Simpson, R.W. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68, 752-756.
- Clarke, J.T. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 428-436.
- Compans, R.W. (1971). *Nature New Biology* 229, 114-116.
- Compans, R.W., Klenk, H.D., Caliguiri, L.A. en Choppin, P.W. (1970).
Virology 42, 880-889.
- Dahlberg, A.E., Dingman, C.W. en Peacock, A.C. (1969). *J. Mol. Biol.* 41, 139-147.
- Dunker, A.K. en Rueckert, R.R. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 5074-5080.
- Emerson, S.U. en Wagner, R.R. (1972). *J. Virol.* 10, 297-309.
- Erikson, R.L. en Franklin, R.M. (1966). *Bacteriol. Rev.* 30, 267-278.

- Fairbanks, G., Steck, T.L. en Wallach, D.F.H. (1971). *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Felgenhauer, K. (1970). *Clin. Chim. Acta* 27, 305-312.
- Fenner, F. (1974). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 52, 223-240.
- Francki, R.I.B. en Randles, J.W. (1972). *Virology* 47, 270-275.
- Gahmberg, C.G. en Hakomori, S. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 4311-4317.
- Garoff, H., Simons, K. en Renkonen, O. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71, 3988-3992.
- Geelen, J.L.M.C. (1974). *Structuur en eigenschappen van cowpea-mozaïekvirus*. Dissertatie, Wageningen.
- Gibbs, A. en Skehel, J. (1973). In *The ribonucleic acids* (Stewart, P. en Lethan, D., red.), pp 207-242, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Glossmann, H. en Neville Jr., D.M. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 6339-6346.
- Gottschalk, A. (1966). In *Glycoproteins. Their synthesis, structure and function* (Gottschalk, A., red.), Elsevier, Amsterdam.
- Grefrath, S.P. en Reynolds, J.A. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3913-3916.
- Grimes, W.J. en Burge, B.W. (1971). *J. Virol.* 7, 309-313.
- Gumpf, D.J. en Weathers, L.G. (1972). *Pl. Dis. Repr.* 56, 869-872.
- Harley, E.H., White, J.S. en Rees, K.R. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 299, 253-263.
- Harrison, S.C., David, A., Jumblatt, J. en Darnell, J.E. (1971 a). *J. Mol. Biol.* 60, 523-528.
- Harrison, B.D., Finch, J.T., Gibbs, A.J., Hollings, M., Shepherd, A.J. Valenta, V. en Wetter, C. (1971 b). *Virology* 45, 356-363.
- Haslam, E.A., Hampson, A.W., Egan, J.A. en White, D.O. (1970). *Virology* 42, 555-565.
- Hay, A.J., Skehel, J.J. en Burke, D.C. (1968). *J. Gen. Virol.* 3, 175-184.
- Helenius, A. en Söderland, H. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 307, 287-300.
- Hierholzer, J.C., Palmer, E.L., Whitfield, S.G., Kaye, H.S. en Dowdle, W.R. (1972). *Virology* 48, 516-527.
- Horzinek, M. en Mussgay, M. (1969). *J. Virol.* 10, 524-536.
- Huang, C.C., Tsai, C.M. en Canellakis, E.S. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 332, 59-68.
- Ie, T.S. (1964). *Neth. J. Plant Path.* 70, 114-115.
- Ie, T.S. (1970). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, nr. 39.
- Joubert, J.J., Hahn, J.S., Von Wechmar, M.B. en Van Regenmortel, M.H.V. (1974). *Virology* 57, 11-19.

- Kapitany, R.A. en Zeborwski, E.J. (1973). *Anal. Biochem.* 56, 361-369.
- Katz, E. en Margalith, E. (1973). *J. Gen. Virol.* 18, 381-384.
- Keller, J.M., Spear, P.G. en Roizman, B. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 65, 865-871.
- Klenk, H.D., Caliguiri, L.A. en Choppin, P.W. (1970). *Virology* 42, 473-481.
- Klenk, H.D. en Choppin, P.W. (1971). *J. Virol.* 7, 416-417.
- Klinkowski, M. en Uschdraweit, H.A. (1952). *Phytopathol. Z.* 19, 269-283.
- Kubinski, H. en Gibbs, P. (1970). *Fed. Proc.* 29, 897 A.
- Laver, W.G. en Webster, R.G. (1966). *Virology* 30, 104-115.
- Lenard, J. en Compans, R.W. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 344, 51-94.
- Liljas, L., Lundahl, P. en Hjertén, S. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 352, 327-337.
- Lin, M.T. en Campbell, R.N. (1972). *Virology* 48, 30-40.
- Loening, U.E. en Ingle, J. (1967). *Nature* 215, 363-367.
- Maehly, A.C. en Glick, D. (1954). In *Methods of biochemical analysis* (Glick, D., red.), vol. 1, p. 385, New York.
- Martin, M.M. (1964). *Virology* 22, 645-649.
- Matthieu, J.M. en Quarles, R.H. (1973). *Anal. Biochem.* 55, 313-316.
- McLean, G.D., Wolanski, B.S. en Francki, R.I.B. (1971). *Virology* 43, 480-487.
- McSharry, J.J., Compans, R.W. en Choppin, P.W. (1971). *J. Virol.* 8, 722-729.
- Milne, R.G. (1970). *J. Gen. Virol.* 6, 267-276.
- Milne, R.G. en De Zoeten, G.A. (1967). *J. Ultrastruct. Res.* 19, 398-407.
- Moennig, V., Frank, H., Hunsmann, G., Schneider, I. en Schafer, W. (1974). *Virology* 61, 100-111.
- Mohamed, N.A., Randles, J.W. en Francki, R.I.B. (1973). *Virology* 56, 12-21.
- Moore, N.F., Kelley, J.M. en Wagner, R.R. (1974). *Virology* 61, 292-296.
- Mountcastle, W.E., Compans, R.W. en Choppin, P.W. (1971). *J. Virol.* 7, 47-52.
- Norris, D.O. (1946). *Bull. Coun. Scient. Ind. Res., Melb.* 202, 51 pp.
- Nowinski, R.C., Sarkar, N.H., Old, L.J., Moore, D.H., Scheer, D.I. en Hilgers, J. (1971). *Virology* 46, 21-38.
- Olshevsky, U. en Becker, Y. (1972). *Virology* 50, 277-279.
- Paliwal, Y.C. (1974). *Can. J. Bot.* 52, 1177-1182.
- Paucha, E., Seehafer, J. en Colter, J.S. (1974). *Virology* 61, 315-326.
- Penhoet, E., Miller, H., Doyle, M. en Blatti, S. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68, 1369-1371.
- Phillips, D.R. en Morrison, M. (1971). *Biochemistry* 10, 1766-1771.

- Reijnders, L., Sloof, P., Sival, J. en Borst, P. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 324, 320-333.
- Reijnders, L., Aalbers, A.M.J., Van Kammen, A. en Thuring, R.W.J. (1974). *Virology* 60, 515-521.
- Reynolds, E.S. (1963). *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.
- Rifkin, D.B. en Quigley, J.P. (1974). *Ann. Rev. Microbiol.* 28, 325-351.
- Sarkar, N.H. en Moore, D.H. (1974). *Virology* 61, 38-55.
- Schlesinger, M.J., Schlesinger, S. en Burge, B.W. (1972). *Virology* 47, 539-541.
- Schulze, I.T. (1970). *Virology* 42, 890-904.
- Schulze, I.T. (1972). *Virology* 47, 181-196.
- Schulze, I.T. (1973). *Advan. Virus Res.* 18, 1-55.
- Sefton, B.M., Wickus, G.G. en Burge, B.W. (1973). *J. Virol.* 11, 730-735.
- Segal, S. en Sreevalsan, T. (1974). *Virology* 59, 428-442.
- Segrest, J.P. en Jackson, R.L. (1972). *Method. Enzymol.* 28, 54-63.
- Shepherd, G.R. en Gurley, L.R. (1966). *Anal. Biochem.* 14, 356-363.
- Skehel, J.J. (1972). *Virology* 49, 23-36.
- Smithies, O. (1965). *Science* 150, 1595-1598.
- Sokol, F., Stancek, D. en Koprowski, H. (1971). *J. Virol.* 13, 411-418.
- Stanley, P. en Haslam, E.A. (1971). *Virology* 42, 890-904.
- Steck, T.L. en Dawson, G. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 2135-2142.
- Teramoto, Y.A., Puentes, M.J., Young, L.J.T. en Cardiff, R.D. (1974). *J. Virol.* 13, 411-418.
- Tsai, C.M., Huang, C.C. en Canallakis, E.S. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 332, 47-58.
- Tsakiridis, J.P. en Gooding, Jr., G.V. (1972). *Phytopath. Medit.* 11, 42-47.
- Van der Want, J.P.H. et al. (1975). In voorbereiding.
- Van Kammen, A., Henstra, S. en Ie, T.S. (1966). *Virology* 30, 574-577.
- Wagner, R.R., Schnaitman, T.A. en Snyder, R.M. (1969). *J. Virol.* 3, 395-403.
- Weber, K. en Osborn, M. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Willers, J.M.M., Michel, M.F., Sysma, M.J. en Winkler, K.C. (1964). *J. Gen. Microbiol.* 36, 95-105.
- Wray, V.P. en Perdue, J.F. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 1189-1197.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H. en Woodlock, J.J. (1969). *Anal. Biochem.* 30, 148-152.

CURRICULUM VITAE

Petrus Wilhelmus Leonardus Tas werd op 25 augustus 1946 geboren te Pijnacker. Hij bezocht het St. Stanislas College in Delft, waar hij in 1964 het diploma gymnasium- β behaalde. In aansluiting hierop ging hij studeren aan de Landbouwhogeschool in Wageningen. Na het behalen van het kandidaatsexamen in 1968 werd de praktijktijd aan het Landbouwproefstation in Paramaribo, Suriname doorgebracht. In 1971 werd het doctoraal diploma behaald (hoofdvak virologie, verzwaard bijvak biochemie, bijvak entomologie).

Vanaf september 1971 tot december 1974 was hij als wetenschappelijk assistent verbonden aan de afdeling Virologie van de Landbouwhogeschool, Wageningen.