

NN 0201

no 468

C

DE ZUIVERING EN DE EIGENSCHAPPEN
VAN DE REPLICATIEVE VORM
VAN HET RNA VAN COWPEA-MOZAÏEKVIRUS

Bibliotheek
der
Landbouw Hogeschool
WAGENINGEN

NN08201.468

L.J.L.D. VAN GRIENSVEN

DE ZUIVERING EN DE EIGENSCHAPPEN
VAN DE REPLICATIEVE VORM
VAN HET RNA VAN COWPEA-MOZAÏEKVIRUS

Dit proefschrift met stellingen van

LEONARDUS JOHANNES LAMBERTUS DONATUS VAN GRIENSVEN,

landbouwkundig ingenieur, geboren te Eindhoven, 15
februari 1941, is goedgekeurd door de promotor
Dr. Ir. J.P.H. van der Want, hoogleraar in de
Virologie.

De Rector Magnificus van de Landbouwhogeschool,

F. HELLINGA

Wageningen, 1 mei 1970

DE ZUIVERING EN DE EIGENSCHAPPEN
VAN DE REPLICATIEVE VORM
VAN HET RNA VAN COWPEA—MOZAÏEKVIRUS

*With a summary: Purification and properties of the replicative
form of cowpea mosaic virus RNA*

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS,
DR. IR. F. HELLINGA, HOGLERAAR IN
DE CULTURTECHNIEK, IN HET OPENBAAR
TE VERDEDIGEN IN DE AULA VAN DE
LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP WOENSDAG 17 JUNI 1970 TE 16.00 UUR

DOOR

L.J.L.D. VAN GRIENSVEN

Dit onderzoek is verricht onder auspiciën van de Stichting Scheikundig Onderzoek in Nederland (S.O.N.) met financiële steun van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver-Wetenschappelijk Onderzoek (Z.W.O.).

STELLINGEN

1. Het nucleïnezuur dat Hiruki isoleerde uit met bromegrass mosaic virus geïnfecteerde haverplanten en dat door hem beschouwd wordt als dubbelstrengig RNA, is niet identiek met de replicatieve vorm van het RNA van bromegrass mosaic virus.

Hiruki, C. (1969). Properties of single- and double-stranded ribonucleic acid from barley plants infected with bromegrass mosaic virus. *J. Virol.* 3, 498-505.

2. De hypothese van Emanoil-Ravicovitch et al., dat er een lineair verband bestaat tussen de hybridisatiegraad van Rauscher leukemie virus-RNA en het gastheer-DNA enerzijds en de vatbaarheid van de gastheer voor infectie met het Rauscher leukemie virus anderzijds, is onvoldoende gefundeerd.

Emanoil-Ravicovitch, R., Baudelaire, M. F. en Boiron, M. (1969). Etude du taux d'hybridation entre le RNA du virus leucémogène de Rauscher et le DNA de différentes cellules murines. *C. R. Acad. Sci. (D). (Paris).* 269, 1903-1905.

3. Uit het feit dat in tumorweefsel in aanwezigheid van actinomycine D cellulair RNA gesynthetiseerd kan worden, blijkt het grote voorbehoud dat men moet maken bij de lokalisatie van de synthese van virus-RNA met behulp van autoradiografie.

Kempf, J. en Mandel, P. (1969). Caractères des RNA synthétisés en présence d'actinomycine D dans le plasmocytome de la souris. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris).* 51, 1121-1138.

Lafèche, D. en Bové, J. M. (1968). Sites d'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules du parenchyme foliaire de *Brassica chinensis*, saines ou infectées par le virus de la mosaïque jaune du navet. *C. R. Acad. Sci. (D). (Paris).* 266, 1839-1841.

4. Het slagen van de door Biswal en Benyesh-Melnick uitgevoerde isolatie van de replicatieve vorm van het RNA van het muize-sarcoom-leukemie viruscomplex is niet te danken aan de "verbetering" van de extractiemethode.

Biswal, N. en Benyesh-Melnick, M. (1969). Complementary nuclear RNA's of murine sarcomaleukemia virus complex in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 64, 1372-1379.

5. De veronderstelling van Sander dat de stimulering van de synthese van tabaksmozafekvirus in tabaksplanten onder invloed van verschillende antimetabolieten een

gevolg zou zijn van een remming in de vorming van een anti-virus factor is gebaseerd op onderling niet vergelijkbare resultaten.

Sander, E. (1969). Stimulation of biosynthesis of tobacco mosaic virus by antimetabolites. *J. gen. Virol.* 4, 235-244.

6. Het feit dat vroege DNA-synthese nodig is om door avian leukosis virus geïnfecteerde cellen met behulp van Rous sarcomavirus te transformeren leidt niet noodzakelijkerwijs tot ondersteuning van de hypothese van Temin, dat infectie met een oncogeen RNA-virus de vorming van een uit DNA opgebouwd provirus veroorzaakt.

Duesberg, P. H. en Vogt, P. K. (1969). On the role of DNA synthesis in avian tumor virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 64, 939-946.

Temin, H. M. (1964). The participation of DNA in Rous sarcoma virus production. *Virology* 23, 486-494.

7. Onderzoek, waarbij van L-cellen gebruik gemaakt wordt, zonder dat met de chronische infectie van deze cellen met virussen van het C-type rekening gehouden wordt, leidt tot onjuiste interpretatie van de gevonden waarden.

Zetterberg, A. en Sköld, O. (1969). The effect of serum starvation on DNA, RNA and protein synthesis during interphase in L-cells. *Exp. Cell Res.* 57, 114-118.

8. De door Friedman et al. aangevoerde argumenten voor de identificatie van het fibrillaire exopolymeer van *Zoogloea ramigera* als cellulose zijn niet steekhoudend.

Friedman, B. A., Dugan, P. R., Pfister, R. M. en Remsen, C. C. (1968). Fine structure and composition of the zoogloal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*. *J. Bact.* 96, 2144-2153.

Id. (1969). Structure of exocellular polymers and their relationship to bacterial flocculation. *J. Bact.* 98, 1328-1334.

9. Uit het feit dat bij compressie van een monolaag van runderserumalbumine een deel van het polymeer uit het grensvlak geduwd kan worden mag niet geconcludeerd worden, dat polymeeradsorptie reversibel is.

Gonzales, G. en Mac Ritchie, F. (1970). Equilibrium adsorption of proteins. *J. Colloid Interface Sci.* 32, 55-61.

10. Het is niet uitgesloten dat de methode die Massey et al. beschreven hebben voor de isolatie van D-aminozuuroxidase leidt tot een verandering van het FAD gehalte van dit enzym.

Massey, V., Palmer, G. en Bennett, R. (1961). The purification and some properties of D-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 48, 1-9.

Henn, S. W. en Ackers, G. K. (1969). Molecular sieve studies of interacting protein systems. IV Molecular size of the D-amino acid oxidase apoenzyme subunit. *J. Biol. Chem.* 244, 465-470.

Voor mijn ouders
Voor Berthy

VOORWOORD

Gaarne betuig ik mijn dank aan allen die op enigerlei wijze hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift.

Prof. Dr. Ir. J.P.H. van der Want ben ik zeer erkentelijk voor zijn behoedzame leiding en stimulerende discussies.

De samenwerking met Dr. A. van Kammen, die ik met grote regelmaat confronteerde met de problemen van dit onderzoek, was buitengewoon. Aan hen beiden dank ik een groot deel van mijn wetenschappelijke vorming, voorzover die althans met dit proefschrift is afgerond.

Mejuffrouw G.J. Oldersma verrichtte op kundige wijze een groot deel van het praktische werk. Haar enthousiasme en haar persoonlijke benadering ook van de problematiek van het onderzoek mag niet onvermeld blijven.

Vele anderen hebben in belangrijke mate medegewerkt aan het tot stand komen van de resultaten.

De heren G. de Bruyn, G. Looijen en G. van Surksom als representanten van bibliotheek, kas en werkplaats komt daarom een hartelijk woord van dank toe.

Mevrouw A.F.F. de Vries-Eras verzorgde het manuscript en bereidde daarvan ook de uitgave voor.

De heer K. Boekhorst dank ik hartelijk voor de vervaardiging van figuren en tabellen.

Tenslotte ben ik al diegenen erkentelijk die tussen 1966 en 1970 op het laboratorium voor Virologie werkzaam waren. Zij vormden het milieu waarin dit werkstuk tot stand kon komen.

Het onderzoek werd mogelijk gemaakt door financiële steun van de Nederlandse organisatie voor zuiver-wetenschappelijk onderzoek (Z.W.O.) en de stichting voor scheikundig onderzoek in Nederland (S.O.N.).

INHOUD

VOORWOORD	VI
GEBRUIKTE AFKORTINGEN	3
INLEIDING	5
1 OVERZICHT VAN DE LITERATUUR	7
1.1 Het cowpea-mozaïekvirus	7
1.2 De meercomponenten plantevirussen	8
1.2.1 De bolvormige meercomponenten virussen	9
1.2.2 De langwerpige meercomponenten virussen	11
1.2.2.1 Tabaksratelvirus	11
1.2.2.2 Luzerne mozaïekvirus	12
1.2.3 De satelliet virussen	13
1.2.4 Conclusie	14
1.3 De vermeerdering van virus-RNA	14
1.3.1 Enkele structurele aspecten van de vermeerdering van virus-RNA	15
1.3.2 Enkele enzym-aspecten van de vermeerdering van virus-RNA	17
1.3.3 Conclusie	19
2 MATERIAAL EN METHODEN	20
2.1 De vermeerdering van cowpea-mozaïekvirus	20
2.2 De zuivering van cowpea-mozaïekvirus	20
2.3 De scheiding der componenten	21
2.4 De bereiding van CPMV-RNA	21
2.5 De vermeerdering van turnip yellow mosaic virus	22
2.6 De zuivering van turnip yellow mosaic virus	22
2.7 De bereiding van TYMV-RNA	23
2.8 Labeling van RNA met ^{32}P in <i>Vigna</i>	23
2.9 Labeling van RNA met ^{32}P in Chinese kool	23
2.10 De bereiding van bentoniet	23
2.11 Bepaling van de radioactiviteit	23
2.12 Incubaties met enzymen	24
2.12.1 Incubatie met DNase	24
2.12.2 Incubatie met RNase	24
2.12.3 Incubatie met pronase	24
2.13 Bepalingen	25
2.13.1 Eiwitbepalingen	25
2.13.2 RNA-bepalingen	25
2.13.3 DNA-bepalingen	25

2.13.4	RNA-bepaling in bladmateriaal	25
2.14	Chemicaliën	26
3	EIGENSCHAPPEN VAN COWPEA-MOZAIIEKVIRUS EN ZIJN RNA	27
3.1	De zweefdichtheid van de bodem- en middencomponent in CsCl	27
3.2	De sedimentatiecoëfficiënten van M-RNA en B-RNA	31
3.3	De zweefdichtheid van CPMV-RNA in Cs ₂ SO ₄	33
3.4	De invloed van de temperatuur op de virussythese	34
3.5	De incorporatie van ³² P in CPMV-RNA	35
4	DE ZUIVERING VAN DUBBELSTRENGIG RNA	37
4.1	De bereiding van nucleïnezuur uit bladeren van <i>Vigna</i>	37
4.2	Methylalbumine-kieselguhr kolomchromatografie	42
4.3	De bereiding van een deeltjespreparaat volgens Bové	43
4.4	De isolatie van tegen RNase resistent RNA	44
5	DE EIGENSCHAPPEN VAN DUBBELSTRENGIG CPMV-RNA	46
5.1	De gevoeligheid voor RNase	46
5.2	Het smeltpunt	47
5.3	De zweefdichtheid	50
5.4	De sedimentatiecoëfficiënt	53
5.5	De elektronenmicroscopie	56
6	DE HYBRIDISATIE EXPERIMENTEN	62
6.1	De verzadigingscurve	63
6.2	De hybridisatie met M-RNA en B-RNA	65
7	SAMENVATTING EN DISCUSSIE	69
8	SUMMARY	74
9	LITERATUUR	77

GEBRUIKTE AFKORTINGEN

A	Adenine
A_{260} m μ	Optische dichtheid bij 260 m μ
AMV	Alfalfa mosaic virus, luzerne-mozafekvirus
ATP	Adenosinetrifosfaat
B	Bodemcomponent
BSA	Bovine serum albumin, runderserum albumine
BPMV	Bean pod mottle virus
C	Cytidine
Ci	Curie
cpm	counts per minute, tellen per minuut
CPMV	Cowpea mosaic virus, cowpea-mozafekvirus
CTP	Cytosinetrifosfaat
DNA	Deoxyribonucleic acid, desoxyribonucleïnezuur
DNase	Desoxyribonuclease
E_{260} m μ	Extinctie bij 260 m μ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyleendiaminetetraazijnzuur
G	Guanine
GTP	Guanosinetrifosfaat
HeLa	Hélène Lambert
I	Inosine
M	Middencomponent
MAK	Methylalbumine-kieselguhr
mCi	Millicurie
MW	Molecular weight, molecuulgewicht
m RNA	Messenger RNA, boodschapper-RNA
n_D^{20}	Brekingsindex bij 20° C (referentie Na D-lijn)
PEBV	Pea early browning virus, vroege-verbruiningsvirus van de erwt
PEG	Polyethyleenglycol
RF	Replicative form
RI	Replicative intermediate
RNA	Ribonucleic acid, ribonucleïnezuur
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolutions per minute, toeren per minuut
$S_{20, w}$	Sedimentatiecoëfficiënt in water bij 20° C
S_0	Sedimentatiecoëfficiënt bij concentratie = 0

s-RNA	Soluble RNA, oplosbaar RNA
SSC	Standard saline citrate, oplossing van 0,15 M NaCl en 0,015 M Na-citraat, pH 7,2
SV	Satellietvirus
T	Thymine
T _m	Smeltpunt van dubbelstrengig nucleïnezuur
TCA	Trichloroacetic acid, trichloorazijnzuur
TMV	Tobacco mosaic virus, tabaksmozaïekvirus
TNV	Tobacco necrosis virus, tabaksnecrosevirus
tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan
t-RNA	Transfer RNA, transporteur RNA
TRSV	Tobacco ringspot virus
TRV	Tobacco rattle virus, tabaksratelvirus
TYMV	Turnip yellow mosaic virus
UTP	Uridinetrifosfaat

INLEIDING

Men kent thans een aantal plantevirussen die in de plant de vorming van twee of meer virusnucleoproteïnen veroorzaken. Zij worden hier aangeduid als meercomponenten virussen. Voorbeelden hiervan zijn het bean pod mottle virus (Bancroft, 1962) en het hieraan verwante cowpea-mozafekvirus (Agrawal, 1964; Van Kammen, 1967). De betrokken nucleoproteïnen verschillen in sedimentatiecoëfficiënt en kunnen na zuivering van het virus gemakkelijk worden aangetoond in de analytische ultracentrifuge. Bancroft (1962) toonde aanvankelijk aan, dat in het geval van bean pod mottle virus slechts één van de twee nucleoproteïnecomponenten, te weten de zwaarste, infectieus was. Wood en Bancroft (1965) vonden later dat toevoeging van de niet-infectieuze component aan de wel-infectieuze component resulteerde in een verhoogde infectiositeit. Dit proces bleek stamspecifiek, en de auteurs realiseerden zich dat dit impliceerde, dat de niet-infectieuze componenten van verschillende stammen van het virus op hun nucleïnezuur genetisch verschillende eigenschappen droegen. Van Kammen (1968), die werkte met cowpea-mozafekvirus (CPMV), dat in sedimentatiegedrag gelijkenis vertoont met bean pod mottle virus, bewees dat niet één van de beide nucleoproteïne componenten infectieus was, maar dat beide noodzakelijk waren om infectie te bewerkstelligen.

Het feit dat de genetische informatie nodig voor het optreden van een bepaald verschijnsel, namelijk de vorming van een lesie, binnen één virussysteem op twee nucleïnezuurketens lag, opende de mogelijkheid om door recombinatieproeven genetisch onderzoek te doen. Recombinatie van de componenten van verschillende stammen zou kunnen leiden tot lokalisatie van virusgenen.

Naast de mogelijkheden voor genetisch onderzoek bood een dergelijk meercomponentensysteem ook aangrijpingspunten voor de ontraadseling van het mechanisme van de replicatie van het virus-RNA, met name ter bestudering van het ontstaan van de onderscheiden virus-RNA componenten. Een analyse van de intermediaire dubbelstrengige RNA-ketens zou uitsluitsel kunnen geven over de vraag of de replicatie van het virus-RNA als één lange keten of als enige korte ketens - elk corresponderende met het RNA van de respectievelijke componenten - zou geschieden.

De isolatie van het dubbelstrengige RNA zou tevens de mogelijkheid bieden om door moleculaire hybridisatie eventuele genetische verwantschappen tussen de RNA's uit beide nucleoproteïnecomponenten van het virus te bestuderen. Een combinatie van de gegevens uit recombinatie- en hybridisatie-experimenten zou in ultimo tot de samenstelling van een genetische kaart kunnen leiden. Tenslotte was het niet uitgesloten om door middel van hybridisatie-experimenten tussen dubbelstrengig CPMV-RNA en enkelstrengige RNA's uit andere virussen te komen tot een reëel classificatiesysteem voor dit deel van het virusrijk.

Omdat de hierboven aangeduide onderzoekingen slechts mogelijk zouden zijn na isolatie van dubbelstrengig CPMV-RNA, werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek begonnen.

In het eerste gedeelte van het proefschrift wordt een overzicht gegeven van de eigenschappen van de meercomponenten virussen, hetgeen gevolgd wordt door een korte bespreking van het mechanisme van de RNA-vermeerdering. Het tweede gedeelte is gewijd aan de experimenten.

I Overzicht van de literatuur

1.1 Het cowpea-mozafekvirus

In 1959 werd bij Paramaribo in Suriname een mozafekziekte in cowpea of kouseband (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) gesignaleerd. Van Hoof (1962) toonde aan dat het virus werd overgebracht door bepaalde kevers. Dit suggereerde een mogelijke verwantschap met een cowpea-mozafekvirus beschreven door Dale (1949).

Agrawal (1964) identificeerde Surinaamse monsters van het virus en vergeleek deze met enkele isolaten van het cowpea-mozafekvirus uit Nigeria en Trinidad. Uit dit onderzoek bleek dat het Surinaamse virus inderdaad een cowpea-mozafekvirus was. Agrawal werkte bovendien een zuiveringsmethode voor het virus uit, gebaseerd op differentieel centrifugeren. Gezuiverde preparaten van het virus bleken isometrische deeltjes te bevatten, met een diameter van ongeveer 28 m μ . In de analytische ultracentrifuge waren de viruspreparaten heterogeen; ze bestonden uit een drietal componenten met sedimentatiecoëfficiënten van respectievelijk 58, 100 en 119 S. Deze werden aangeduid als top-(T), midden-(M) en bodemcomponent (B). Bij evenwichtscentrifugeren in CsCl werden eveneens drie componenten gevonden. Wanneer deze componenten gescheiden werden en gecentrifugeerd in de analytische ultracentrifuge, dan werd in alle gevallen slechts één homogene band opgemerkt. De uit een lege eiwitmantel bestaande topcomponent was niet infectieus, terwijl de RNA bevattende middencomponent een hogere infectiositeit bezat dan de, eveneens RNA bevattende, bodemcomponent. De viruspreparaten waren heterogeen in "vrije" elektroforese. Deze gaf twee componenten te zien met een verschillende elektroforesesnelheid.

Van Kammen (1968), die twijfelde aan de door Agrawal beschreven hogere infectiositeit van de middencomponent, zette het onderzoek voort. De sedimentatiecoëfficiënten, die hij vond voor T, M en B bedroegen respectievelijk 58, 95 en 115 S. Het RNA-gehalte van de componenten was 0%, 24% en 33%. Alleen de bodemcomponent was infectieus, niet de top- of middencomponent. Nadat Van Kammen (1968) de componenten zeer zorgvuldig van elkaar gescheiden had, nl. door middel van herhaald centrifugeren in dichtheidsgradiënten gevolgd door evenwichtscentrifugeren, bleek de infectiositeit van de onderscheiden componenten echter tot nihil te zijn gereduceerd. Werden B en M weer gemengd, dan leidde dit tot een herstel van de oorspronkelijke infectiositeit. Hetzelfde verschijnsel deed zich voor op RNA niveau: RNA uit de afzonderlijke componenten bleek niet-infectieus; M-RNA gemengd met B-RNA was een infectieus mengsel.

Agrawal (1964) had een hoge infectiositeit voor M gevonden. De scheiding van de componenten, die hij toepaste, was gebaseerd op een evenwichtscentrifugering in een CsCl-gradiënt. Later werd gevonden dat een gedeelte van B een dichtheid bezat, die dicht bij die van M lag (Bruening, 1969; Van Kammen en Van Griensven, 1970; zie ook 3.1). Dit resulteerde in een verontreiniging van M met B en dus in het infectieus

worden van de M-fractie.

Van Kammen (1967) maakte gebruik van suikergradiënten en scheidde de viruscomponenten eerst op sedimentatiesnelheid; daarna pas werden de reeds betrekkelijk zuivere componenten op CsCl gradiënten gecentrifugeerd. Hij pompte CCl_4 onder in de buis en ving de fracties boven uit de buis op. M werd op die manier zuiver verkregen, doch de bodemcomponent werd met een weinig M verontreinigd. Later (Van Kammen, 1968; Van Kammen en Van Griensven, 1970) werd een complete zuivering van de middencomponent verkregen door herhaald centrifugeren in een B IV of B XIV zone-rotor; de bodemcomponent onderging nog een evenwichtscentrifugering in CsCl. Zo was het mogelijk beide componenten zeer zuiver en dus vrij van infectiositeit te krijgen.

Deze zuiveringsmethode vormde de basis voor de recombinatieproeven van De Jager en Van Kammen (1970). Zij slaagden erin om door middel van nitrietbehandeling een mutant van het cowpea-mozaïekvirus te verkrijgen. Door recombinatie-experimenten uit te voeren tussen de componenten van de mutant en de uitgangsisolatie konden zij het gemuteerde gen lokaliseren. Dit gen, de informatie voor de vorming van T dragend, was gelegen op het M-RNA.

Voor resultaten van anderen met het CPMV wordt verwezen naar 1.2.1.

1.2 De meercomponenten plantevirussen

Vele meercomponenten virussen zijn in de literatuur beschreven. De genetische informatie die deze virussen bezitten is over verschillende RNA componenten verdeeld, die elk in een eigen eiwitmantel zijn gelegen. Dit verschijnsel doet zich zowel bij de diervirussen als bij de plantevirussen voor. In de plantevirologie kunnen de meercomponenten virussen in de volgende drie groepen onderscheiden worden. Onder de eerste groep vallen de polyedervormige virussen met twee in serologisch opzicht identieke nucleoproteïnecomponenten (Tabel 1 geeft de samenstelling van deze groep weer). De tweede groep bevat de langwerpige virussen met twee of meer serologisch identieke nucleoproteïnen, te weten het tabaksratelvirus (TRV), het serologisch hieraan verwante vroege-verbruiningsvirus van de erwt (PEBV) en het luzerne-mozaïekvirus (AMV). De derde groep omvat de virussen die voor hun vermeerdering afhankelijk zijn van een ander, serologisch niet verwant virus. Dit laatste virus, dat helpervirus genoemd wordt, is zelf tot autonome vermeerdering in staat. Dit is het geval voor het zogenaamde satellietvirus, dat voor zijn vermeerdering afhankelijk is van het zelf autonoom vermeerderende tabaksnecrosevirus (TNV). Hier is dus geen sprake van een wederzijdse afhankelijkheid van de componenten binnen het systeem, doch slechts van een eenzijdige.

Virus	Lit.	Sedimentatiecoëfficiënt (S)			RNA-gehalte (%)	
		T	M	B	M	B
Bean pod mottle virus	1	54	91	112	29	37
Cowpea mosaic virus	2	58	95	115	24	33
Pea green mottle virus	3					
Pea symptomless virus	4	55	94	118	26	36
Radish mosaic virus	5					
Squash mosaic virus	6	57	95	118	27	35
Tobacco ringspot virus	7	53	94	128	28	42
Tobacco streak virus	8		72	96		
Tomato top necrosis virus	9	52	102	126		

Tabel 1. De bolvormige meercomponenten virussen.

Literatuurverwijzingen:

- 1 Bancroft (1962); Semancik en Bancroft (1964)
- 2 Van Kammen (1967, 1968)
- 3 Valenta et al. (1969)
- 4 Peters en Mahmood, niet gepubliceerd
- 5 Campbell (1964)
- 6 Rice et al. (1955)
- 7 Stace-Smith et al. (1965)
- 8 Fulton (1967)
- 9 Bancroft (1968)

1.2.1 De bolvormige meercomponenten virussen

Reeds in 1955 beschreven Rice et al. (1955) een virus bij squash (*Cucurbita pepo* L.), dat uit een drietal componenten met verschillende sedimentatiesnelheid bestond. Bancroft (1962) en Semancik en Bancroft (1964) beschreven het bean pod mottle virus, dat gelijkenis vertoonde met het squash-mozaïekvirus. Een ander verwant virus is het cowpea-mozaïekvirus, dat reeds, voorzover het onderzoek betreft dat in Wageningen is uitgevoerd, in 1.1 beschreven is. Deze virussen veroorzaken alle drie de vorming van drie componenten in de plant, waarvan er twee RNA bevatten. De componenten van elk van deze virussen zijn in serologisch opzicht identiek (Bancroft, 1962; Bruening en Agrawal, 1967). In geval van squash-mozaïekvirus bleken de verschillende componenten een gelijke aminozuursamenstelling te hebben (Mazzone et al., 1962).

Semancik (1966) toonde aan dat de centrifugecomponenten van CPMV elektroforetisch heterogeen waren en bestonden uit 2 elektroforesecomponenten. Hieruit kon uiteraard niet geconcludeerd worden dat er verschillende structurele eiwitten waren. Experi-

menten van Niblett en Semancik (1969) wezen uit dat het mogelijk was om de langzame elektroforesecomponent om te zetten in de snelle, door behandeling met carboxypeptidase of met chymotrypsine.

De middencomponent van deze groep van virussen bevat 30-50% minder RNA dan de bodemcomponent. Dit betekent echter niet, dat de middencomponent incompleet is en de bodemcomponent de gehele genetische informatie bevat. Wood en Bancroft (1965) toonden in experimenten met BPMV en CPMV aanvankelijk aan, dat toevoeging van de niet-infectieuze middencomponent aan de infectieuze bodemcomponent resulteerde in een aanzienlijk hogere infectiositeit. Toevoeging van de topcomponent, die geen RNA bevat, had geen effect. Hun theorie was, dat het infectieuze RNA van de bodemcomponent een specifieke, zwakke plaats bevatte, waar gemakkelijk een breuk zou kunnen optreden. Het RNA van de middencomponent zou de breukplaats overlappen en het uiteindelijke resultaat zou een herstel zijn van de genetische informatie, nodig voor de vorming van een lokale lesie. Het verwarmen van de bodemcomponent veroorzaakte een verlies in infectiositeit. Deze kon echter hersteld worden door middencomponent toe te voegen. Het verwarmen van de middencomponent had geen effect op zijn activerend vermogen. Het activerend vermogen van de middencomponent was gevoelig voor bestraling met U.V. De infectiositeit van de bodemcomponent verdween onder invloed van U.V. Het bleek niet mogelijk deze te herstellen door middencomponent toe te voegen. Wood en Bancroft (1965) interpreteerden hun resultaten als volgt. Het RNA van de bodemcomponent draagt de gehele genetische informatie, die nodig is voor infectie en vermeerdering; het RNA van de middencomponent draagt slechts een gedeelte van deze informatie. Verwarming geeft aanleiding tot een breuk op de specifiek zwakke plaats op het RNA van de bodemcomponent. Bestraling met U.V. leidt echter tot breuken die over het gehele RNA verspreid liggen: reactivering van de infectiositeit is niet meer mogelijk. De resultaten van hun experimenten konden overigens door Van Kammen (1967) niet bevestigd worden.

Bruening en Agrawal (1967) isoleerden RNA uit de afzonderlijke componenten van CPMV en bepaalden hiervan de sedimentatiecoëfficiënten. Deze bedroegen 23 S voor M-RNA en 33 S voor B-RNA. Wanneer dit RNA gedurende 80 sec. op 80° C verwarmd werd, dan bleef 70% van het materiaal in de 23 S en 33 S banden intact. Dit toonde duidelijk dat er geen sprake was van specifieke zwakke plaatsen op M-RNA en B-RNA. Mede naar aanleiding van de door Kleczkowski (1950) gemaakte statistische analyses van de relatie tussen de concentratie van virusdeeltjes in het inoculum en de hiermede opgeroepen aantallen vlekken, concludeerden zij dat de meeste CPMV infecties niet veroorzaakt werden door een afzonderlijk M- of B-deeltje, maar door een groep van M- en B-deeltjes tezamen. Zij sloten de mogelijkheid niet uit, dat een infectie bewerkstelligd zou worden door twee typen deeltjes, die ieder een afzonderlijk deel van de noodzakelijke genetische informatie droegen. Voor de verdere studies over CPMV, voor zover die in Wageningen zijn uitgevoerd, wordt verwezen naar 1.1.

Volgens Fulton (1967) vertoont ook tobacco streak virus het activeringseffect. Hij publiceerde dat alleen de zwaarste van de twee RNA bevattende componenten infectieus was. Toevoeging van de lichte component aan de zware resulteerde in een opmerkelijke stijging van de infectiositeit. Dezelfde eigenschap geldt volgens Kodama (persoonlijke mededeling) voor radish enation mosaic virus, dat mogelijk identiek is met radish mosaic virus (Campbell, 1964). Van pea green mottle virus (Valenta et al., 1969), pea symptomless virus (Peters en Mahmood, niet gepubliceerd) en tomato top necrosis virus (Bancroft, 1968), die wat betreft hun fysische eigenschappen zeer nauw verwant zijn aan de hierboven beschreven virussen, kan verwacht worden dat nadere bestudering zal doen blijken, dat beide componenten nodig zijn voor infectie.

Tobacco ringspot virus (TRSV) zou in deze groep een uitzondering kunnen vormen, aangezien van dit virus tot dusverre geen activeringseffect bekend is. Volgens Stace-Smith et al. (1965) bestaat het uit drie componenten met sedimentatiecoëfficiënten van respectievelijk 53 S, 94 S en 128 S. Van de infectiositeit bleek 97% te zijn gelokaliseerd in B; de overige 3% in M. Het RNA-gehalte van de verschillende componenten bedroeg respectievelijk 0, 28 en 42%. Diener en Schneider (1966) zuiverden het RNA uit M en B. Zij vonden dat het RNA, dat bereid was uit de niet-infectieuze middencomponent, homogeen en niet infectieus was. Het bezat een sedimentatiecoëfficiënt van 24 S. Het RNA, gezuiverd uit de infectieuze bodemcomponent, bestond uit twee componenten: een niet-infectieuze met een sedimentatiecoëfficiënt van 24 S en een infectieuze met een sedimentatiecoëfficiënt van 32 S. Zij veronderstelden dat het TRSV-RNA in de vorm van twee stukken gesynthetiseerd wordt, die al of niet van gelijke lengte zijn en die later samengaan en aldus een infectieuze eenheid vormen.

1.2.2 De langwerpige meercomponenten virussen

1.2.2.1 Tabaksratelvirus

In 1948 hadden Van der Want en Rozendaal (1948) aangetoond dat preparaten van het staafvormige tabaksratelvirus (TRV) twee soorten deeltjes van verschillende lengte bevatten. Paul en Bode (1955) bewezen dat dit verschijnsel niet veroorzaakt werd door aggregatie. Harrison en Nixon (1959) fractioneerden zulke preparaten op dichtheidsgradiënten. Op deze wijze verkregen zij relatief zuivere fracties bestaande uit korte deeltjes met een lengte van 70 m μ en lange deeltjes met een lengte van 180 m μ . In de plant kwam het virus voor in een stabiele vorm als nucleoproteïne of in een instabiele vorm als vrij nucleïnezuur (Sänger en Brandenburg, 1961; Cadman, 1962).

Pas in 1966 vond Lister (1966) dat het voorkomen van stabiel of instabiel virus in de plant afhankelijk was van de samenstelling van het virusmengsel waarmee ge-

inoculeerd was. Hij scheidde het virusmengsel op een suikergradiënt in componenten en inoculeerde planten met de verschillende fracties. Zijn resultaten wezen uit, dat, wanneer gefinoculeerd werd met een mengsel van lange en korte deeltjes, het geproduceerde virus stabiel was. Wanneer echter met een preparaat bestaande uit lange deeltjes gefinoculeerd werd, was het geproduceerde virus instabiel. De voor de hand liggende conclusie was dat de korte deeltjes op hun RNA de informatie droegen voor het manteleiwit. Het RNA van de lange deeltjes codeerde voor verdere replicatie, maar miste de manteleiwitinformatie. Ook in het geval van TRV had men dus te maken met een systeem waarmee men recombinaties van componenten van verschillende stammen zou kunnen uitvoeren. De kenmerken van het nageslacht zouden dan kunnen leiden tot de lokalisatie van virusgenen op de twee RNA-componenten. Het lukte echter vooralsnog niet om recombinaties uit te voeren.

Frost, Harrison en Woods (1967) waren niet in staat enige interactie te ontdekken tussen de deeltjes van twee, in serologisch opzicht, slechts weinig verwante stammen van TRV. Semancik en Kajiyama (1968) waren de eersten, die in staat waren om een verhoging van de stabiliteit van lange deeltjes aan te tonen door toevoeging van heterologe deeltjes aan het inoculum. Het onderscheid van de betrokken stammen was echter gebaseerd op de lengten van de deeltjes; in serologisch opzicht waren zij niet te onderscheiden.

Sänger (1968) voerde een geslaagde recombinatie uit van componenten van serologisch nauwelijks verwante stammen van TRV. Hij (Sänger, 1969) lokaliseerde bovendien de informatie voor de lokale symptomen op tabak op het RNA van het lange deeltje.

Lister en Bracker (1969), tenslotte, deden recombinaties bij TRV en vonden dat de systemische symptomen die het virus veroorzaakte op tabak en de deeltjeslengte bepaald werden door informatie op het korte deeltje.

1.2.2.2 Luzerne-mozafekvirus

Gezuiverde preparaten van luzerne-mozafekvirus (alfalfa mosaic virus, AMV) bestaan uit vijf nucleoproteïnecomponenten, namelijk de topcomponenten o, a en b (respectievelijk aangeduid met T_o , T_a en T_b), een middencomponent en een bodemcomponent (Bancroft en Kaesberg, 1960; Frisch-Niggemeyer en Steere, 1961; Kelly en Kaesberg, 1962; Gibbs, Nixon en Woods, 1963; Jaspars en Moed, 1966). Bancroft (1962) meende dat de infectiositeit alleen samenhang met de bodemcomponent. Wood en Bancroft (1965) scheidden de verschillende componenten in een dichtheidsgradiënt en toonden aan dat de infectiositeit van de bodemcomponent verhoogd werd door middencomponent aan het inoculum toe te voegen. Gillaspie en Bancroft (1965) isoleerden het virus-RNA en concludeerden, dat alleen het snelst sedimenterende RNA infectieus was. Dit RNA bleek het bodemcomponent-RNA te zijn.

In 1967 bepaalden Van Vloten-Doting en Jaspars de infectiositeit van combinaties van RNA, geïsoleerd uit de verschillende componenten van het virus. Toevoeging van T_a -RNA aan het weinig infectieuze B-RNA resulteerde in een aanzienlijke verhoging van de infectiositeit. Van Vloten-Doting, Kruseman en Jaspars (1968) toonden aan dat dit activeringseffect niet stamspecifiek was: toevoeging van T_a -RNA van de ene stam aan het B-RNA van een andere stam resulteerde eveneens in een verhoging van de infectiositeit. Isolaties afkomstig van lesies die met dergelijke inocula gevormd waren, bezaten biologische en fysische eigenschappen die wezen op een recombinatie. Toevoeging van T_a -RNA van deze nieuwe stam aan B-RNA van de oorspronkelijke stam leverden een mengsel dat, gebruikt als inoculum, resulteerde in isolaten die niet van de oorspronkelijke te onderscheiden waren.

Van Vloten-Doting (1968) concludeerde dat de genetische informatie bij AMV over vier RNA-ketens verdeeld was. Iedere component bevatte een verschillend gedeelte van het genoom. Homologe fragmenten van verschillende stammen konden onderling verwisseld worden, daarbij het ontstaan van nieuwe stammen van het virus inducerend. De genetische informatie was waarschijnlijk als volgt over de verschillende componenten verdeeld: T_a -RNA bepaalt de eiwitmantel van het virus; T_b bepaalt het type van symptomen op boon; T_a en M bepalen de symptomen op tabak; T_a -RNA, T_b -RNA en B-RNA bepalen tezamen de infectiositeit van het virus uitgedrukt in aantal gevormde lesies; T_o , tenslotte, is voorzover bekend niet functioneel.

1.2.3 De satellietvirussen

In de plantevirologie is tot dusverre slechts één helpervirussysteem bekend: het kleine satellietvirus (SV) met een sedimentatiecoëfficiënt van 50 S en zijn helper, tabaksnecrosevirus (TNV) dat een sedimentatiecoëfficiënt heeft van 116 S. Kassanis en Nixon (1961) vonden dat deze twee deeltjes serologisch niet verwant waren. Gezuiverde preparaten van het satellietvirus veroorzaakten geen infectie van, noch lesies op, planten die zij in aanwezigheid van het TNV wel infecteerden. Het TNV zelf vermeerderde in deze planten op normale wijze.

Reichmann et al. (1962) toonden aan dat het SV-RNA uit 1200 nucleotiden bestond. Uit eindgroepbepalingen van het manteleiwit vonden Reichmann et al. (1966) aanvaardelijk dat het manteleiwit een molecuulgewicht bezat van ongeveer 40.000 en bestond uit 400 aminozuren. Zij concludeerden dat het SV-RNA uitsluitend de informatie voor het manteleiwit bezat.

Recentelijk vonden Roy et al. (1969) met polyacrylamidegelelektroforese dat het molecuulgewicht van de SV eiwit-subunit twee keer zo groot was als het minimum molecuulgewicht van ongeveer 13.000, dat bepaald was door Reichmann (1964) en waarvan verondersteld werd dat het trimeer de eiwitmantel-subunit zou vormen. Het SV-RNA draagt waarschijnlijk ook nog de codering voor een tweede eiwit. Omtrent de aard

hiervan kan slechts gespeculeerd worden.

1.2.4. Conclusie

Alle meercomponenten virussen, uitgezonderd wellicht tobacco ringspot virus, hebben gemeen dat de componenten afzonderlijk het vermogen missen om de vorming van nieuwe virusdeeltjes in de gastheercel te veroorzaken. Dit kan een gevolg zijn van het feit dat iedere component een tekort heeft aan genetische informatie die noodzakelijk is voor de virusvermeerdering.

Het bestuderen van de interacties tussen de verschillende componenten van dit soort virussen zal niet alleen leiden tot een inzicht in de vorming van het virus zelf maar bovendien de lokalisatie van verschillende functies op de verschillende componenten mogelijk maken. Een dergelijk onderzoek zou in ultimo tot de samenstelling van een genetische kaart kunnen leiden.

1.3 De vermeerdering van virus-RNA

Wanneer een RNA-virus een cel binnendringt, wordt het RNA-metabolisme van de cel zodanig gemodificeerd, dat virus-RNA wordt gevormd. Op enkele uitzonderingen na hebben de RNA-virussen gemeen dat zij een enkelstrengig RNA-molecuul als genoom bevatten. Het virus-RNA kan dan zelf als boodschapper voor de synthese van virusspecifieke eiwitten fungeren, zoals de replicases, d.w.z. de voor de RNA-replicatie essentiële enzymen. Hoewel de genetische constitutie van de gastheer waarschijnlijk een rol speelt bij het infectieproces (Pons, 1967; Scholtissek, 1969), is op verschillende manieren aangetoond dat het proces van de vermeerdering van het RNA van de kleine RNA-virussen niet van cel-DNA afhankelijk is. In stammen van *Escherichia coli* K 12 die geen thymidine kunnen vormen, vermeerderden RNA-fagen goed onder condities, waarbij aan het medium geen thymine maar wel broomdesoxyuridine werd toegevoegd (Cooper en Zinder, 1962; Hofschneider, 1963). Simon (1961) had door gebruik te maken van desoxynucleoside-analogen aangetoond dat remming van de synthese van gastheer DNA geen remmend effect had op de vermeerdering van poliovirus in HeLacellen. Experimenten met Actinomycine D, waarvan bekend is dat het de cellulaire RNA-synthese remt, wezen uit dat de synthese van virus-RNA door deze stof niet werd gestopt (Reich et al., 1961; Haywood en Sinsheimer, 1963; Sanger en Knight, 1963; Bancroft en Key, 1964). Doi en Spiegelman (1962) wendden de specifieke DNA-RNA hybridisatietest aan om aan te tonen dat er geen gelijkheid in basenvolgorde tussen het RNA van faag f-2 en het DNA van de gastheer *E. coli* bestond.

1.3.1 Enkele structurele aspecten van de vermeerdering van virus-RNA

In 1962 werd door Sinsheimer et al. (1962) aangetoond dat het enkelstrengige DNA van de faag ϕ X-174 - wanneer het de cel eenmaal was binnengedrongen - werd omgezet in een dubbelstrengige vorm. Deze structuur speelde kennelijk een rol bij de vermeerdering van het faag-DNA en werd door hen "replicative form" of RF genoemd. Tijdens de DNA vermeerdering trad de RF op als matrijs of "template" voor de synthese van nieuw faag-DNA. Zijn eigen structuur bleef behouden. Het vermeerderingsmechanisme was zgn. conservatief.

Montagnier en Sanders (1963) veronderstelden dat de vermeerdering van enkelstrengig RNA op analoge wijze zou gaan. Het virus-RNA zou eerst een complementaire keten vormen en de vermeerdering zou zich op dezelfde wijze afspelen als die van het DNA van ϕ X-174. Als dit waar was, zou in een bepaald stadium van de virusvermeerdering een dubbelstrengig RNA gevonden moeten kunnen worden. De fysische eigenschappen van zulk een RNA in oplossing zouden op die van DNA lijken, temeer daar ook de structuur van de dubbelstrengige stukken van transporteur-RNA niet fundamenteel verschilde van dubbelstrengig DNA. Zulk een dubbelstrengig RNA zou een scherpe temperatuurovergang vertonen en enige resistentie tegen RNase bezitten. De veronderstelling van Montagnier en Sanders bleek juist en zij waren in staat zulk een RNA te isoleren uit Krebs II ascitescellen, die met encephalomyocarditis-virus besmet waren. Het bleek onmogelijk een dubbelstrengig RNA uit niet-geïnfecteerde cellen te isoleren.

Deze resultaten vergrootten de kennis van het mechanisme van de vermeerdering van virus-RNA zeer. Van een groot aantal bacteriële en dierlijke RNA-virussen is thans bekend dat een RF na infectie in de cel voorkomt. Wat betreft plantevirussen zijn de resultaten tot dusver niet zo succesvol. Alleen van tabaksmozafekvirus (Shipp en Haselkorn, 1964; Burdon et al., 1964) turnip yellow mosaic virus (Mandel et al., 1964; Bové, 1967) luzerne-mozafekvirus (Pinck et al., 1968) en cowpea-mozafekvirus (Van Griensven en Van Kammen, 1969) zijn RF's geïsoleerd. Aanvankelijk waren alle zuiveringsmethoden van dubbelstrengig RNA gebaseerd op het gebruik van RNase A om de afbraak van enkelstrengig RNA te bewerkstelligen. Omdat dit zou kunnen leiden tot partiële degradatie van het dubbelstrengig RNA was het toetsen van de experimentele waarden aan de verwachte waarden een moeilijke zaak. Amman et al. (1964) werkten een zuiveringsprocedure uit waarbij geen gebruik gemaakt werd van nucleasen. Het produkt dat zij verkregen, had een hoge resistentie tegen RNase A.

Het bezat een scherpe smeltcurve, gemeten als de van de temperatuur afhankelijke hyperchromiciteit bij 260 m μ . De zweefdichtheid in Cs₂SO₄ was een weinig geringer dan die van enkelstrengig RNA. De lengte der moleculen, zoals die gemeten werd in de elektronenmicroscop, kwam overeen met de waarden die, uitgaande van de enkelstrengige vorm, berekend waren. De proef op de som was dat een warmtebehandeling van het niet-infectieuze dubbelstrengige RNA de ketens deed scheiden waardoor de infectiosi-

teit weer verscheen. Dit resultaat gaf niet alleen aan dat de dubbelstrengige keten een gehele, infectieuze, enkelstrengige RNA-keten bevatte maar bovendien dat de zuiveringsmethode die zij ontworpen hadden, niet-gedegradeerd dubbelstrengig RNA opleverde.

Het beeld van het bestaan van een intermediaire replicatieve vorm van het virus-RNA werd gecompliceerd door de resultaten van het onderzoek van Fenwick et al. (1964). Zij werkten met door faag R-17 geïnfecteerde *E. coli*-cellen en merkten op dat, wanneer zij de dubbelstrengig-RNA-bevattende fractie op suikergradiënten analyseerden, dit materiaal pas na incubatie met RNase A als een homogene band centrifugeerde. Dit leidde hen tot de veronderstelling dat de groeiende virus-RNA-ketens vastgehecht waren aan een dubbelstrengige RNA-keten, hetgeen tot een zekere heterogeniteit in sedimentatiegedrag zou leiden. Deze structuur werd aangeduid als "replicative intermediate" of RI om haar te onderscheiden van de "replicative form" of RF van Montagnier en Sanders (1963). De gedachte was dat de behandeling van de RI met RNase de groeiende enkelstrengige RNA-keten brak als gevolg waarvan een structuur ontstond die een sterke gelijkenis met de RF vertoonde.

Hoe RF en RI betrokken zijn bij het mechanisme van de vermeerdering van het virus-RNA wordt hieronder in het kort beschreven. Voor meer gedetailleerde gegevens zij verwezen naar recente overzichtsartikelen (Weissmann en Ochoa, 1967; Spiegelman, 1967; Erikson, 1968). Weissmann et al. (1964) infecteerden *E. coli*-cellen met met ³²P gemerkte MS-2 fagen en vonden dat de infecterende ketens eerst opgenomen werden in een tegen RNase resistente structuur: de RF. Dat in deze RF-bevattende fractie tevens de, door incubatie met RNase gemodificeerde RI voorkwam, was hun nog onbekend. Kort na infectie steeg de radioactiviteit van de RF, vervolgens daalde zij. Zij verklaarden de afname van de radioactiviteit van de RF met een mechanisme waarbij nieuwe, niet radioactieve, virus-RNA-ketens de oorspronkelijke, wel radioactieve, positieve ketens uit de dubbelstrengige structuur verdrongen tijdens hun synthese. Zulk een mechanisme van vermeerdering werd semiconservatief genoemd, omdat de complementaire (negatieve) keten in de RF bewaard bleef. Fenwick et al. (1964) toonden bij bacteriofaag R-17 aan dat aan de geïnfecteerde *E. coli*-cultuur toegevoegd ³H-uridine eerst opgenomen werd in de RI en vervolgens aantoonbaar was in het faag-RNA. Dit wees op een precursor-produkt relatie tussen RI en virus-RNA. De verdere analyses van Fenwick et al. toonden eveneens een semiconservatief vermeerderingsmechanisme. Het zal duidelijk zijn, dat bij een dergelijk mechanisme de oorspronkelijke infecterende RNA-keten teruggevonden moet worden in de nakomelingschap. Toch waren Davis en Sinsheimer (1963), die dit trachtten aan te tonen bij door MS-2 geïnfecteerde *E. coli*-cellen, niet in staat dit soort overdracht van het infecterende RNA naar het nageslacht RNA aan te tonen. De resultaten van Doi en Spiegelman (1963) met de f-2 faag waren geheel gelijklopend. Ook zij konden geen infecterend RNA in de nakomelingschap aantonen.

De volgorde der verschillende reacties bij de vermeerdering van RNA werd meer in detail bestudeerd door de groepen van Weissmann en Ochoa (1967) en van Spiegelman (1967). Billeter et al. (1966) vonden dat na infectie van *E. coli* door de faag MS-2 eerst een negatieve RNA-keten gevormd werd en dat daarna pas een overmaat positieve RNA-ketens ontstond. Weissmann en Feix (1966) toonden in vitro met het Q β -replicase aan dat in de eerste minuten van de incubatie voornamelijk negatieve ketens gevormd werden. Het grootste deel hiervan was gevoelig voor de invloed van RNase en verkeerde dus niet in de dubbelstrengige vorm. Feix et al. (1967) vonden dat een gedeelte van deze negatieve ketens voorkwam in een structuur die een sedimentatiecoëfficiënt van ongeveer 40 S bezat, en waarschijnlijk bestond uit toegevoegde positieve template ketens, de negatieve ketens en eiwit. Dit complex leverde dubbelstrengig RNA wanneer het met fenol geëxtraheerd werd. Spiegelman en medewerkers (Spiegelman, 1967) waren aanvankelijk niet in staat de experimenten van Weissmanns groep te bevestigen. Zorgvuldiger analyses wezen echter uit dat in vivo een periode van latentie de vorming van nieuw infectieus Q β -RNA voorafging (Mills et al., 1966). Gedurende deze periode van latentie speelden zich een aantal processen af, die zich als volgt laten samenvatten:

1. Het infecterende faag-RNA wordt omgezet in een niet-infectieus complex: de RF. Dit complex is samengesteld uit het infecterende RNA en het geheel van het eerst gevormde produkt. Dit eerste produkt zou de negatieve keten zijn.
2. Nadat de RF gevormd is, worden zowel template als produkt opgenomen in de RI structuren.

Na de periode van latentie verschijnen de nieuwe infectieuze RNA-ketens.

Weissmann et al. (1967) bestudeerden de voorkeur van het Q β -replicase voor verschillende templates. Zij merkten dat de synthesesnelheid in het begin van de reactie groter was wanneer gedenatureerd dubbelstrengig RNA werd gebruikt, dan wanneer Q β -RNA gebruikt werd. Wanneer als template gedenatureerd dubbelstrengig RNA gebruikt werd bestond het eerstgevoerde produkt van de reactie vrijwel geheel uit positieve ketens. Het eerste produkt bestond daarentegen uit negatieve ketens wanneer als template positief Q β -RNA gebruikt werd. Het dubbelstrengig RNA bezat weinig of geen template activiteit.

Pollet et al. (1967) ontwikkelden een zuiveringsmethode voor intacte negatieve Q β -RNA-ketens. Feix et al. (1968) bewezen dat deze ketens niet infectieus waren. Bovendien waren deze gezuiverde negatieve RNA-ketens een meer efficiënte template dan de positieve ketens.

Voor een conclusie uit het bovenstaande wordt verwezen naar 1.3.3.

1.3.2 Enkele enzym-aspecten van de vermeerdering van virus-RNA

Het enzym dat de vorming van virus-RNA katalyseert is een van RNA afhankelijk

RNA-polymerase (RNA-nucleotidyltransferase E.C.2.7.7.6.). Dit enzym, dat gewoonlijk replicase of synthetase genoemd wordt, katalyseert de incorporatie van de vier ribonucleosidetrifosfaten ATP, GTP, CTP en UTP in de viruspolynucleotide keten. Bij deze reactie wordt virus-RNA als template gebruikt.

Het voorkomen van een virus-RNA replicase na infectie van een cel met een RNA-virus is voor een groot aantal dier- en bacteriecellen aangetoond. Van plantaardige systemen zijn weinig gegevens bekend. Replicase is aangetoond in Chinese kool na infectie met turnip yellow mosaic virus (Ralph en Wojcik, 1966; Bové, 1967), in tabak na infectie met komkommer-mozaiëkvirus (Bové, 1967) en in gerst na infectie met bromegrass mosaic virus (Semal en Hamilton, 1968).

Haruna en Spiegelman (1965 a, b, c) isoleerden het Q β -replicase na infectie van *E. coli* met de bacteriofaag Q β . Een aantal heterologe RNA's waaronder MS-2 RNA, het RNA van het satellietvirus van TNV en ribosomaal RNA werd vervolgens op template activiteit getoetst. Al deze RNA's bleken volledig inactief. Alleen Q β -RNA bezat een hoge template activiteit. Bovendien werd gevonden dat gefragmenteerd Q β -RNA, hoewel homoloog, nauwelijks actief was als template. De werkzaamheid van het replicase was geheel afhankelijk van de toevoeging van homoloog intact RNA. Dit betekende dat de isolatiemethode die Haruna en Spiegelman gebruikten, een zeer zuiver enzympreparaat opleverde. Spiegelman et al. (1965) toonden aan dat het reactieproduct dat zij verkregen niet alleen dezelfde afmeting bezat als het Q β -RNA, maar dat het bovendien infectieus was.

Lodish en Zinder (1966 a, b) werkten met een temperatuurgevoelige mutant van de bacteriofaag f-2. Deze mutant was niet in staat om bij 43^o C de synthese van negatieve RNA-ketens te induceren, zodat ook geen RI gevormd kon worden. Wanneer de negatieve keten eenmaal gevormd was, werd de vorming van nieuwe positieve ketens niet geremd. Deze resultaten leidden tot de veronderstelling dat het replicase in feite zou bestaan uit twee subunits. De resultaten van Weissmann en Feix (1966) dat het eerstgevormde product in de replicasereactie het negatieve RNA is, wezen ook al in deze richting. Eikhom en Spiegelman (1967) scheidde het Q β -replicase in twee componenten, die beide nodig waren voor de volledige enzymactiviteit. Het was Eikhom et al. (1968) mogelijk om een van beide componenten uit niet geïnfecteerde *E. coli*-cellen te isoleren. Door combinatie met de andere component, die alleen uit geïnfecteerde cellen geïsoleerd kon worden, ontstond een enzym dat in staat was de vorming van infectieus Q β -RNA te katalyseren. Wellicht kan het voorkomen van een dergelijk enzym de invloed van de genetische constitutie van de gastheer op het infectieproces verklaren.

Voor gedetailleerde enzymologische studies met dit replicase zij verwezen naar de oorspronkelijke literatuur (Bishop et al., 1967; Mills et al., 1968; Eikhom et al., 1968).

1.3.3. Conclusie

De experimentele gegevens die in het voorgaande hoofdstuk beschreven zijn, leiden tot een opeenvolging van reacties bij de vermeerdering van het RNA van een virus, die als volgt kunnen worden samengevat. Onmiddellijk nadat het virus-RNA de cel is binnengedrongen hecht het aan de ribosomen en fungeert als boodschapper voor de vorming van een virusspecifieke component van het replicasemolecuul. De nu gevormde component combineert met een replicasecomponent van de gastheer tot een actief replicasemolecuul. In het begin van het vermeerderingsproces katalyseert het enzym de vorming van negatieve RNA-ketens, met het infecterende RNA als template. Dit wordt gevolgd door de synthese van nieuwe infectieuze (positieve) RNA-ketens, waarbij de negatieve ketens als template gebruikt worden. Het complex waaraan zich het gehele proces afspeelt bestaat waarschijnlijk uit replicasemoleculen, negatieve RNA-ketens en positieve RNA-ketens in wording. De negatieve en positieve ketens worden hoogstwaarschijnlijk niet door een groot aantal waterstofbruggen bij elkaar gehouden, maar door de replicasemoleculen en enkele waterstofbruggen op de plaats waar de replicatiereactie zich afspeelt. Behandeling van dit complex met fenol en detergentia bevordert waarschijnlijk de vorming van waterstofbruggen; hetgeen dan uiteraard leidt tot het ontstaan van dubbelstrengig RNA. Omdat de negatieve ketens binnen de replicatiestructuur bewaard blijven en de gereedgekomen positieve ketens hieruit verdwijnen, wordt van een semiconservatief vermeerderingsmechanisme gesproken. Tenslotte is het niet uitgesloten dat de volledig dubbelstrengige RNA-keten of RF in de cel pas ontstaat wanneer het replicasemolecuul niet langer functioneert en de negatieve keten met haar complement verzadigd wordt.

2 Materiaal en methoden

2.1 De vermeerdering van cowpea-mozafekvirus

Het cowpea-mozafekvirus (CPMV) dat in deze studie gebruikt werd is de zg. "gele stam" die oorspronkelijk uit Suriname afkomstig is en door Agrawal (1964) aangeduid werd als het zg. Sb-isolaat. Het virus werd vermeerderd in *Vigna unguiculata* cv. "Early Ramshorn Blackeye". Het zaad van deze plant werd verkregen van Burpee Seed Company, Philadelphia, Pa., U.S.A. De planten werden geteeld op een grondmengsel bestaande uit zand, compost, bladaarde en stalmest. Deze grond was 2 uur gestoomd en naderhand gezeefd. De teelt der planten vond plaats in de kas bij een temperatuur van 20-22° C en een relatieve luchtvochtigheid van 65-80%. Gedurende de zomer ontvingen de planten het daglicht met een gemiddelde intensiteit van 30.000 erg cm⁻² sec⁻¹. Gedurende de wintermaanden werd continu bijbelicht met 80 Watt Ecko TL buizen (daglichttype 4300 °K). Wanneer de planten 17 dagen oud waren werden de primaire bladeren geïnoculeerd met een virusoplossing die 200 µg CPMV per ml 0,01 M Na-fosfaat buffer pH 7,0 bevatte. De secundaire bladeren werden verwijderd en, tenzij anders vermeld, werden de planten overgezet in een Sherer Model 255-6 groeikas bij een temperatuur van 30° C (zie 3.4), een relatieve luchtvochtigheid van 80-90% en een continue lichtintensiteit van ongeveer 100.000 erg cm⁻² sec⁻¹. De primaire bladeren werden 5 tot 6 dagen na inoculatie geoogst om het virus te isoleren.

2.2 De zuivering van cowpea-mozafekvirus

Het virus werd gezuiverd volgens de methode van Van Kammen (1967). Vers bladmateriaal werd gedurende 2 minuten in een Waring blender gehomogeniseerd in 0,1 M Na-fosfaat buffer pH 7,0. De gebruikte hoeveelheid bufferoplossing bedroeg 2-5 ml per gram bladmateriaal. De groene massa werd door kaasdoek geperst en gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij 15.000 x g. Het sediment werd gewoonlijk gebruikt voor de extractie van dubbelstrengig RNA (zie 4.3). De bovenstaande vloeistof werd gefiltreerd over een vouwfilter en het virus werd neergeslagen door de vloeistof op 0,2 M NaCl en 4% (w/v) polyethyleenglycol te brengen (Hebert, 1963). Het neerslag werd door centrifugeren verzameld en opgelost in een klein volume 0,1 M Na-fosfaat buffer pH 7,0. Nadat de oplossing gedurende 20 minuten gecentrifugeerd was bij 15.000 x g werd het virus uit de heldere bovenstaande vloeistof gesedimenteerd door 150 minuten te centrifugeren bij 105.000 x g in de Spinco R 40 rotor. Het sediment werd opgelost in een klein volume 0,01 M Na-fosfaat buffer pH 7,0 en bij 15.000 x g gedurende 20 minuten helder gecentrifugeerd.

De concentratie van het gezuiverde virus werd spectrofotometrisch bepaald in een Zeiss PMQ II spectrofotometer. Hierbij werd een specifieke extinctie gebruikt van

0,1%
E $260 \text{ m}\mu = 8,1$ bij een lichtweg van 1 cm. De gemiddelde virusopbrengst bedroeg 1,5 mg CPMV per gram primair blad.

2.3 De scheiding der componenten

Hoeveelheden van 30 tot 70 mg CPMV werden in componenten gescheiden door middel van centrifugering in een dichtheidsgradiënt in een MSE B XIV rotor. Het virus werd in 5-10 ml 5% saccharose oplossing op een met het volume lineaire gradiënt van 10 tot 40% saccharose in 0,01 M Na-fosfaat buffer van pH 7,0 gebracht. Er werd een "overlayer" opgebracht die bestond uit 100 ml 2% saccharose in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. Het vullen van de rotor gebeurde bij 2.500 rpm. Na $2\frac{1}{4}$ uur centrifugeren bij 35.000 rpm en 10° C werd de inhoud van de rotor uitgepompt met een oplossing van 50% consumptiesuiker in water (w/v). De rotorinhoud werd opgevangen in fracties van 10 ml. Het virusgehalte der fracties werd óf spectrofotometrisch bepaald óf aan de hand van eventuele radioactiviteit. De fracties die de componenten bevatten werden gecombineerd en ieder van de componenten werd neergeslagen door de oplossing op 0,2 M NaCl en 8% PEG te brengen. Het neerslag werd door centrifugeren verzameld en opgelost in een klein volume 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0.

Verdere zuivering werd bereikt door evenwichtscentrifugering in 40% CsCl (w/w) in de Spinco SW 25.1 rotor, uitgevoerd gedurende 48 uur bij 15° C. Na de run werd de bodem van de buis doorgeprikt en leeggepompt met een peristaltische pomp. De vloeistof werd geleid door een LKB Uvicord type 4701 A die de absorptie der oplossing bij een golflengte van $254 \text{ m}\mu$ meet, en verzameld in fracties van 32 druppels (1,0 ml) met een LKB fractiecollector type 3402 B. De fracties die de componenten bevatten werden gecombineerd en vervolgens gedialyseerd tegen 4 liter 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. Tenslotte werd het virus uit de oplossing neergeslagen met behulp van NaCl en PEG zoals hierboven beschreven en opgelost in een klein volume 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. De concentraties van gezuiverde midden- en bodemcomponent werden spectrofotometrisch bepaald. De specifieke extincties die gebruikt werden, waren respectievelijk $E_{260 \text{ m}\mu}^{0,1\%} = 6,2$ voor middencomponent en $E_{260 \text{ m}\mu}^{0,1\%} = 10,0$ voor bodemcomponent bij een weglengte van 1 cm.

2.4 De bereiding van CPMV-RNA

Virussuspensies met een concentratie van 0,4-0,5% nucleoproteïne (w/v) in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0, 0,15 M NaCl werden gebruikt als uitgangsmateriaal voor de zuivering van virus-RNA. Hieraan werd 1% Na-laurylsulfaat (w/v) en 3% diëthylpyrocarbonaat (v/v) toegevoegd. Oorspronkelijk werd in plaats van diëthylpyrocarbonaat gebruik gemaakt van 1% bentoniet. Aangezien het gebruik van adsorbentia tot het verlies van RNA kan leiden, werd na het verschijnen van de publikatie van Solymosy

et al. (1968), waarin vermeld werd dat diëthylpyrocarbonaat de werking van RNase volledig remt, het gebruik van bentoniet gestopt.

De virussuspensie werd drie maal met met water verzadigde, vers gedestilleerde fenol geëxtraheerd. De waterlaag werd drie maal met ether behandeld om de fenol te verwijderen. De ether werd uit de oplossing verdreven door N_2^{\dagger} over te leiden. Het virus-RNA werd tenslotte neergeslagen door 2 volumina ijskoude ethanol toe te voegen. Het neerslag werd afgecentrifugeerd, gedroogd in vacuo en opgelost in een klein volume 1 x SSC (Standard Saline Citrate: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citraat pH 7,2).

Wanneer een zeer hoge graad van zuiverheid vereist was, zoals b.v. bij de "annealing" proeven, werd het RNA verder gezuiverd door het neer te slaan als quaternair ammoniumzout met 0,33% cetyltrimethylammoniumbromide (w/v). Het neerslag werd afgecentrifugeerd en door drie maal wassen met 0,1 M Na-acetaat in 70% ethanol omgezet in het natriumzout. Dit neerslag werd daarna gedroogd en opgelost in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. Langdurige dialyse tegen 1 x SSC verwijderde tenslotte ook alle - eventueel nog gebonden - cetyltrimethylammoniumionen.

De gehele procedure van de bereiding van virus-RNA werd verricht bij 0° C. RNA concentraties werden spectrofotometrisch bepaald. De gebruikte extinctiecoëfficiënt was $E_{260\text{ m}\mu}^{0,1\%} = 24,0$ bij een weglengte van 1 cm. De uiteindelijke RNA preparaten hadden een verhouding $A_{260\text{ m}\mu} : A_{230\text{ m}\mu}$ tussen 2,3 en 2,6, wat overeenkomt met een eiwitgehalte $\leq 0,0045$ (w/w eiwit/RNA). Dezelfde procedure werd gevolgd voor de bereiding van RNA uit de afzonderlijke componenten van CPMV.

De gemiddelde opbrengst aan RNA bedroeg 70-90% van de theoretische hoeveelheid.

2.5 De vermeerdering van turnip yellow mosaic virus (TYMV)

TYMV werd vermeerderd in Chinese-koolplanten (*Brassica chinensis*, L. cv. Graanaat) die werden gekweekt onder kasomstandigheden, als beschreven in 2.1. Het zaad werd verkregen van N.V. Turkenburg's zaadhandel, Bodegraven. De planten werden op een leeftijd van 4-6 weken geïnoculeerd met 200 μ g TYMV (afkomstig van Dr. E.M.J. Jaspars, Lab. voor Biochemie, R.U. Leiden) per ml 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0.

Drie tot vijf weken na inoculatie werden de planten geogst en opgeslagen in een diepvriezer bij -20° C.

2.6 De zuivering van turnip yellow mosaic virus

Bevroren blad van geïnfecteerde Chinese-koolplanten werd gedurende 2 minuten in de Waring blender gehomogeniseerd in 0,1 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. Het homogenaat werd door kaasdoek geperst en gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 15.000 x g. De heldere bovenstaande vloeistof werd gedurende 2½ uur gecentrifugeerd bij 105.000 x g. Het sediment werd opgelost in een klein volume 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0.

De concentratie werd spectrofotometrisch bepaald. De gebruikte extinctiecoëfficiënt was $E_{260 \text{ m}\mu}^{0,1\%} = 7,3$ bij een lichtweg van 1 cm (Bové, 1967).

2.7 De bereiding van TYMV-RNA

De wijze waarop TYMV-RNA bereid werd was geheel identiek aan die van CPMV-RNA beschreven in 2.4.

2.8 Labeling van RNA met ^{32}P in Vigna

Vigna-bonen werden gekiemd op zilverzand. Na 12 dagen werden 8 jonge planten overgezet op potten die 4,5 l Hoagland's voedingsoplossing bevatten (Hoagland en Arnon, 1950). De oplossing werd gaaëreerd door er op rustige wijze perslucht door te leiden.

Na inoculatie met CPMV werden de potten overgezet in een Sherer groeikast bij een temperatuur van 30°C . Zes uur voor het begin van de labelingsperiode, werd de voedingsoplossing vervangen door gedesioniseerd water. ^{32}P werd toegevoegd als NaH_2PO_4 (Philips Duphar, DRN 1500/9, dragervrij). De gebruikte hoeveelheid en de labelingtijd worden bij de betreffende experimenten vermeld. De labelingsperiode werd beëindigd door de planten weer over te zetten op Hoagland's oplossing.

2.9 Labeling van RNA met ^{32}P in Chinese kool

De labeling geschiedde op dezelfde wijze als in 2.8 beschreven voor *Vigna*. Chinese-koolplanten werden niet op zilverzand gekweekt doch op kasgrond. Na intensief schoonspoelen der wortels werden de planten op Hoagland's oplossing geplaatst.

2.10 De bereiding van bentoniet

Bentoniet werd in een concentratie van 2-3% (w/v) gesuspenseerd in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. De suspensie werd gecentrifugeerd bij 2000 x g. Het neerslag werd verwijderd en de bovenstaande vloeistof werd gecentrifugeerd bij 10.000 x g. Het neerslag werd gesuspenseerd in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0. De bewerking werd tweemaal herhaald. Het neerslag werd tenslotte gesuspenseerd in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0 tot een concentratie van 3-4% (w/v). Het bentoniet-gehalte werd bepaald aan de hand van het drooggewicht.

2.11 Bepaling van de radioactiviteit

De bepaling van de radioactiviteit van ^{32}P bevattende droge monsters geschiedde gewoonlijk in een Philips integraal teller 111.6../00 voorzien van een Geiger-Müller

telbuis. De bepaling van de radioactiviteit van enkele ^{32}P bevattende monsters geschiedde in een Nuclear Chicago Mark I scintillatieteller. De gebruikte scintillator was een oplossing van 4 gram 2,5-difenyloxazole (PPO) en 0,5 gram 1,4-bis-2 (4 methyl-5-fenyloxazolyl)-benzeen (POPOP) in een liter tuoleen.

Nucleïnezuur en virus (20 μg) waarvan de radioactiviteit bepaald moest worden, werd met 8% TCA uit de oplossing neergeslagen waarbij 200 μg runderserumalbumine (BSA) per ml als drager werd toegevoegd. Het precipitaat werd verzameld op Millipore filters (HAWP 304 FO) en gewassen met overmaat 5% TCA. Hieraan was 0,1 mM Na-pyrosfosfaat per ml toegevoerd. Indien gebruik gemaakt werd van de scintillatieteller werden de filters na drogen in 15 ml scintillatievloeistof opgelost. Bij ^{32}P -bepalingen werd het filter op een planchet gebracht.

2.12 Incubaties met enzymen

2.12.1 Incubatie met DNase

Nucleïnezuur werd opgelost in 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl, 0,005 M MgCl_2 tot een concentratie van 1,0 mg per ml buffer. Tenzij anders vermeld, geschiedde de incubatie met 10 μg pancreas DNase I (E.C. 3.1.4.5) per ml bij 30° C gedurende 30 minuten. DNase oplossingen werden bewaard bij -20° C en voor gebruik getoetst op activiteit bij pH 7,2 met kalfsthymus-DNA als substraat.

2.12.2 Incubatie met RNase

Nucleïnezuur werd opgelost in 1 x SSC tot een concentratie van 1,0 mg per ml buffer. Tenzij anders vermeld geschiedde de incubatie met 0,5 μg pancreas RNase A (E.C. 2.7.7.16) en met 0,5 U RNase T1 uit *Aspergillus oryzae* per ml bij 30° C gedurende 30 minuten. De oplossingen van RNase A werden bewaard bij -20° C, die van RNase T1 bij 4° C. De stock van RNase T1 werd bewaard als precipitaat in een $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oplossing. Voor gebruik werd dit gedurende 24 uur gedialyseerd tegen een groot volume 1 x SSC. Oplossingen van RNase A en RNase T1 werden voor gebruik getoetst op activiteit in 1 x SSC met plante-RNA als substraat.

2.12.3 Incubatie met pronase

Oplossingen van tegen RNase resistent RNA werden na gelfiltratie met pronase (een protease uit *Streptomyces griseus*) behandeld om de laatste resten van RNase te verwijderen. De RNA-concentratie bedroeg 0,1-1,0 μg per ml 1 x SSC. De incubatie werd uitgevoerd met 50 μg pronase per ml bij 37° C gedurende 16 uur. Pronase werd voorbehandeld volgens de methode van Hotta en Bassel (1965), waarbij de pronase-

oplossing gedurende 10 minuten bij pH 5,2 op 80° C verhit werd. Eventueel aanwezige sporen DNase worden op deze wijze geïnactiveerd.

2.13 Bepalingen

2.13.1 Eiwitbepalingen

Eiwitbepalingen werden uitgevoerd volgens Lowry et al. (1951) met runderserum-albumine als standaard.

2.13.2 RNA-bepalingen

Ribosebepalingen met orcinol werden uitgevoerd volgens Dische (1955) met plantaardig ribosomaal RNA als standaard.

2.13.3 DNA-bepalingen

Desoxyribosebepalingen met difenylamine en acetaldehyde werden uitgevoerd volgens Burton (1956) met kalfsthymus-DNA als standaard.

2.13.4 RNA-bepalingen in bladmateriaal

Kwantitatieve RNA-bepalingen werden gedaan volgens Van Kammens (1963) modificatie van de methode van Ogur en Rosen (1950). Hiertoe werd 300-500 mg drooggevroren bladmateriaal in een mortier tot poeder gemalen. Dit poeder werd gesuspenderd in 15 ml 96% ethanol. De suspensie werd gedurende 2 minuten gekookt en de alcohol werd afgezogen op een G4 glasfilter. Daarna werd 20 ml aceton langzaam door de filterkoek gezogen en de filterkoek werd aan de lucht gedroogd. Het droge grijs-witte materiaal werd gemengd met een oplossing van 70% ethanol en 1% HClO₄. Na 10 minuten werd het precipitaat afgefiltreerd en gesuspenderd in een mengsel van ethanol en ether (3:1). Na filtratie werd deze behandeling herhaald. De laatste filtratie werd gevolgd door drogen en wassen van het materiaal met 5 ml koude 0,2 M HClO₄. Tenslotte werd het gedroogde materiaal gesuspenderd in 50 ml 1,0 M HClO₄ en gedurende de nacht bij 0° C bewaard. De nu gehydrolyseerde RNA bevattende HClO₄-oplossing werd afgefiltreerd, het neerslag werd zorgvuldig gewassen met 20 ml 1,0 M HClO₄ en de extinctie van de oplossing werd gemeten bij 260 m μ . De specifieke extinctie voor het gehydrolyseerde RNA was $E_{260 \text{ m}\mu}^{0,1\%} = 30,0$.

2.14 Chemicaliën

RNase A, Sigma, 1-A 5 x crystallized, protease free, from bovine pancreas.
RNase T1, Sigma, grade III, ammoniumsulphate suspension, from *Aspergillus oryzae*.
DNase I, Sigma, DN-EP, electrophoretically purified, RNase free, from beef pancreas.
Pronase, Calbiochem, B grade, *Streptomyces griseus* protease.
BSA, Sigma, fraction I, powder.
CsCl, Merck, Darmstadt, zur Analyse.
Diëthylpyrocarbonaat, K & K rare chemicals.
DNA, Sigma, type I, from calf thymus.
Fenol, Merck, Darmstadt, zur Analyse.
Polyethyleenglycol, Carbowax 6000, Heybroek, Amsterdam.
RNA, Sigma, type XI, from yeast.
Chelex 100, Calbiochem.
Sephadex G 20, Pharmacia, Stockholm.

Alle andere, voor routineprocedures gebruikte chemicaliën waren afkomstig van Merck, Darmstadt, BRD, en van BDH Chemicals Ltd., Engeland.

Dialysehuls Visking 8/32, 20/32 en 32/32 van Höfelt, 's-Gravenhage, werd voor gebruik uitgekookt in 10^{-4} M Na_3EDTA .

3 Eigenschappen van cowpea-mozaïekvirus en zijn RNA

Omdat de isolatie van dubbelstrengig CPMV-RNA als uitgangspunt werd genomen voor het onderzoek, leek het gewenst om eerst de in vitro eigenschappen van het CPMV en zijn RNA te karakteriseren. De verkregen resultaten zouden dan kunnen dienen als basis voor de verwachte eigenschappen van de dubbele streng en de isolatiemethode zou hierop afgestemd kunnen worden.

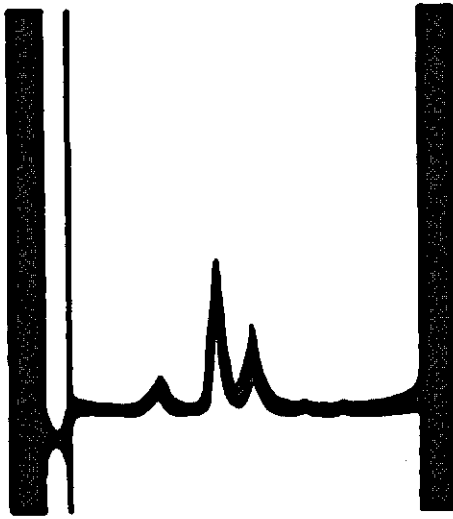
De zuivering van het virus en de wijze van scheiding van de nucleoproteïnecomponenten van het virus zijn reeds besproken in hoofdstuk 2. Tijdens de laatste stap van de scheidingsprocedure, nl. bij de evenwichtscentrifugering, bleek het mogelijk de zweefdichtheid van de componenten te bepalen. De resultaten van de scheidingsprocedure en de zweefdichtheidsbepalingen zullen aan discussie onderworpen worden.

De eigenschappen van het CPMV-RNA, i.c. de sedimentatiewaarden en de zweefdichtheid, werden bestudeerd en zullen ook in dit hoofdstuk besproken worden. Voorts wordt de virustoename in de geïnfecteerde plant beschreven. Groeicurven werden bepaald bij verschillende temperaturen om zo de optimale temperatuur voor de virus-synthese na te gaan. Zij dienden om de omstandigheden te vinden waarbij de hoeveelheid dubbelstrengig RNA in de plant zo groot mogelijk is.

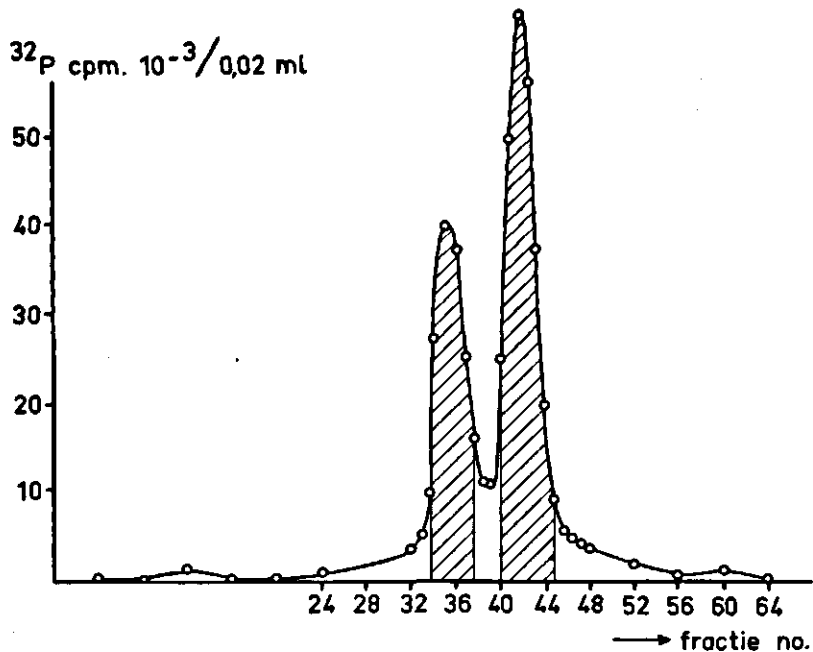
Tenslotte wordt in dit hoofdstuk de opname van $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ in *Vigna*-planten besproken om aan de hand van de resultaten hiervan een zo gunstig mogelijke labelingsperiode en -duur vast te stellen voor het verkrijgen van zo hoog mogelijk gelabeld dubbelstrengig CPMV-RNA.

3.1 De zweefdichtheid van de bodem- en middencomponent in CsCl

Cowpea-mozaïekvirus werd gezuiverd zoals beschreven in 2.2. De gezuiverde preparaten werden routinegewijs onderworpen aan een sedimentatieanalyse in de analytische ultracentrifuge. Afwijkingen in samenstelling van het mengsel kunnen op deze wijze eenvoudig geconstateerd worden. Figuur 1 toont het normale patroon van een CPMV (gele stam) preparaat dat gefsoleerd is uit primaire bladeren van *Vigna*, die bij 30° C gekweekt waren: een betrekkelijk geringe hoeveelheid van een lege topcomponent en een middencomponent waarvan de concentratie ongeveer twee maal zo hoog is als die van de bodemcomponent. De scheiding van het mengsel in nucleoproteïnecomponenten werd uitgevoerd zoals beschreven in 2.3. In figuur 2 zijn de resultaten van een run in de MSE B XIV zone-rotor afgebeeld. De fracties binnen het gearceerde gedeelte van de figuur werden verzameld. De fracties in het gebied waar mogelijk menging tussen M en B optrad, werden weggelaten. De resultaten van de scheiding na één zonerun blijken het duidelijkst uit figuur 3. Hierin staan de resultaten afgebeeld van een tweede identieke zonecentrifugering met de M en B die gescheiden

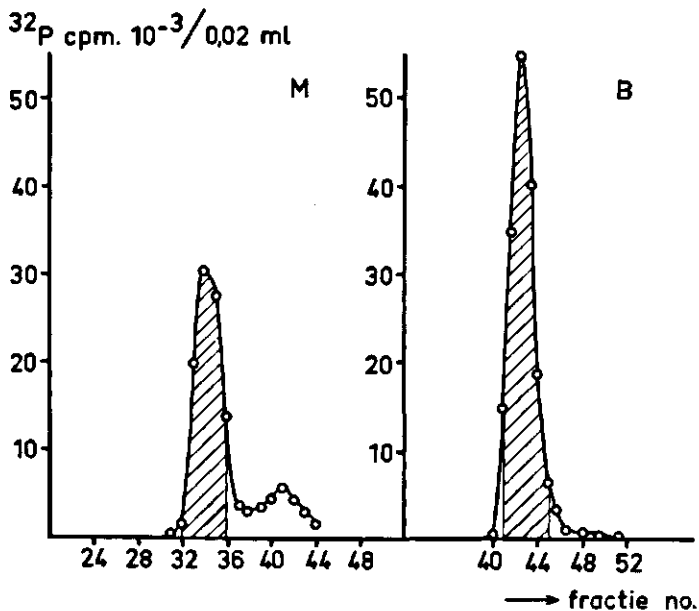


Figuur 1. Een schlierendiagram van cowpea-mozafekvirus. De sedimentatierichting is van links naar rechts. De ultracentrifuge-run werd uitgevoerd in een Spinco model E analytische ultracentrifuge bij 20° C en 31.410 rpm. De opname werd 16 minuten na aanvang van de run gemaakt. De oplossing bevatte 4,0 mg CPMV per ml 0,01 M Na-fosfaat-buffer pH 7,0, 0,1 M NaCl.



Figuur 2. De verdeling van de radioactiviteit van een gezuiverd CPMV preparaat over een suikergradiënt in een MSE B XIV zone rotor, na $2\frac{1}{4}$ uur centrifugeren bij 35.000 rpm. De sedimentatierichting is van links naar rechts. De opgebrachte hoeveelheid CPMV bedroeg 35 mg. De fracties binnen het gearceerde gebied werden verzameld.

waren in de eerste run. Deze figuur toont dat de hoeveelheid B die nog in de M fracties voorkwam, betrekkelijk gering was. Hetzelfde gold voor de verontreiniging van B met M.

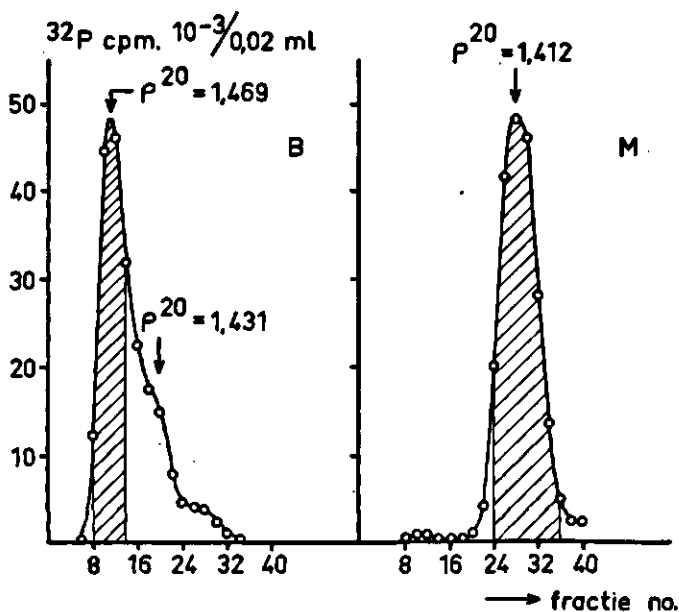


Figuur 3. De verdeling van de radioactiviteit van de afzonderlijke M- en B-preparaten uit figuur 2 over een suikergradiënt in een MSE B XIV zone rotor na $2\frac{1}{4}$ uur centrifugeren bij 35.000 rpm. De sedimentatierichting is van links naar rechts.

Evenals na de eerste run werden de fracties uit het gearceerde gebied opgevangen en met 8% PEG neergeslagen (zie 2.3). De neergeslagen viruscomponenten werden opgelost en als laatste trap in de scheidingsprocedure onderworpen aan evenwichtscentrifugering in CsCl zoals beschreven in 2.3. Fracties van 0,5 ml werden opgevangen en hun brekingsindex werd gemeten met een Atago refractometer volgens Abbe. De verdeling van de componenten over de gradiënt werd bepaald door de radioactiviteit van iedere fractie te meten. Uit de brekingsindex n_D^{20} werd met de volgende formule, die door Stols (1964) empirisch was vastgesteld, de zeeftichtheid ρ^{20} bepaald:

$$\rho^{20} = 10,250 n_D^{20} - 12,679 \quad 1,25 < \rho^{20} < 1,50$$

Uit figuur 4 blijkt dat het maximum van de M-band een zweeftichtheid bezat van $1,412 \text{ g/cm}^3$. De verontreiniging met B was vrijwel nihil. Deze laatste geringe hoeveelheid B werd verwijderd door alleen de fracties uit het gearceerde gebied te gebruiken.



Figuur 4. De verdeling van de radioactiviteit van gezuiverde M- en B-preparaten van CPMV over een evenwichtsgradiënt in CsCl in een Spinco SW 25.1 rotor, na 64 uur centrifugeren bij 20.000 rpm.

Ten aanzien van B kan worden opgemerkt dat de verontreiniging met M beduidend groter was dan in het omgekeerde geval. Een verdere fractionering loste dit probleem echter afdoende op. Er ontstonden in CsCl echter twee duidelijke banden uit de B fractie, die na zonecentrifugeren slechts één homogene band te zien gaf. De verdeling van de radioactiviteit over de verschillende fracties van de evenwichtsgradiënt toonde een piek met een zweefdichtheid van $1,469 \text{ g/cm}^3$ en een schouder met $1,431 \text{ g/cm}^3$. Wanneer de piek gefractioneerd werd opgevangen en alleen de band met de grootste dichtheid opnieuw in een identieke CsCl gradiënt werd gecentrifugeerd ontstond er wederom een piek met een dichtheid van $1,469 \text{ g/cm}^3$ en een schouder met $1,431 \text{ g/cm}^3$. Bij latere experimenten werd de indruk verkregen dat de kwantitatieve verhouding tussen de piek en de schouder varieerde. Bij langer (76 uur) centrifugeren veranderde de verhouding zodanig dat er een piek verscheen met een dichtheid van $1,431 \text{ g/cm}^3$. Deze piek bezat een schouder met een dichtheid van $1,469 \text{ g/cm}^3$.

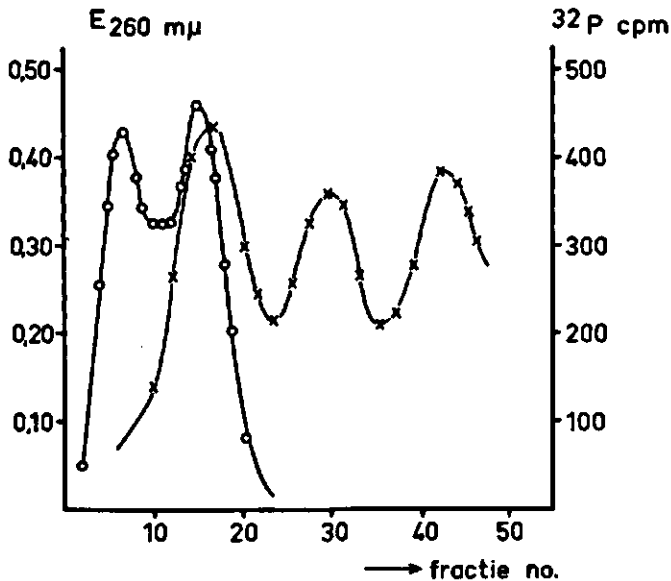
Bruening (1969) beschreef hetzelfde verschijnsel, nl. dat B in CsCl twee banden vormde met dichtheden van respectievelijk $1,422 \text{ g/cm}^3$ en $1,470 \text{ g/cm}^3$. Uit de zweefdichtheid van T en M van respectievelijk 1,297 (Bruening, 1969) en 1,412 kan berekend worden dat bij gelijkblijvende conformatie de verwachte zweefdichtheid van B 1,455 bedraagt. Hieruit volgt dat de zweefdichtheid van B waarschijnlijk niet

1,431 g/cm³ is, maar 1,469 g/cm³.

Omtrent de oorzaak van het verschijnsel van de omzetting van B in een minder dichte vorm kan slechts gespeculeerd worden. Gezien echter het feit dat enkelstrengig RNA in oplossingen met een hoge zoutconcentratie precipiteert lijkt het niet onwaarschijnlijk dat de oorzaak in een structuurverandering van het nucleoproteïne gezocht kan worden.

3.2 De sedimentatiecoëfficiënten van M-RNA en B-RNA

Om na te gaan of de methode die gebruikt werd om virus-RNA te bereiden (zie 2.4) inderdaad ook intact RNA opleverde werden een aantal experimenten gedaan, waarbij met ³²P gemerkt CPMV-RNA onderworpen werd aan centrifugering in een lineaire dichtheidsgradiënt die liep van 5-20% saccharose in 1 x SSC, 0,005 M Na₃EDTA. Hierbij werd plantaardig cytoplasma-RNA als referentie toegevoegd.

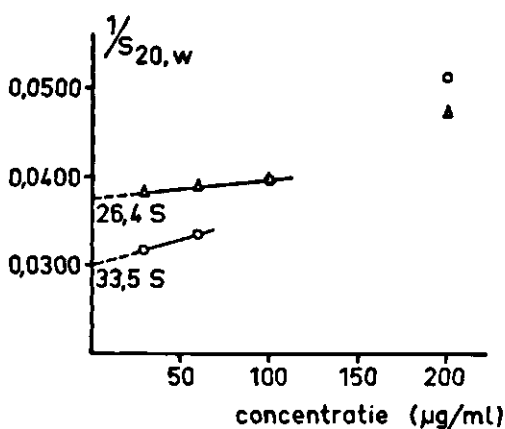


Figuur 5. De verdeling van de radioactiviteit (-o-o-) van gezuiverd CPMV-RNA over een suikergradiënt in een Spinco SW 25.1 rotor na 14 uur centrifugeren bij 23.000 rpm en 4° C. 1,0 mg plantaardig cytoplasma-RNA (-x-x-) was als referentie toegevoegd. De sedimentatierichting is van rechts naar links.

Zoals uit figuur 5 blijkt bestond het geïsoleerde RNA uit twee homogene fracties die sneller sedimenteerden dan het cytoplasma-RNA. Het was mogelijk om, ter schatting

van de sedimentatiecoëfficiënten van het virus-RNA, de benadering van Martin en Ames (1961) te gebruiken. In een lineaire gradiënt geldt dat de sedimentatiecoëfficiënt evenredig is met de afgelegde weg. Wanneer nu voor plantaardig cytoplasma-RNA sedimentatiecoëfficiënten aangenomen werden van 16-17 S en 25 S (Click en Hackett, 1966; Stutz en Noll, 1967) dan werden de sedimentatiecoëfficiënten van M-RNA en B-RNA geschat op respectievelijk 26 S en 34 S.

Bruening en Agrawal (1967) hadden gepubliceerd dat de RNA's van de beide CPMV-componenten sedimentatiecoëfficiënten bezaten van 23 S en 33 S. Om deze reden werd besloten een nauwkeuriger analyse te doen door gebruik te maken van de Spinco model E analytische ultracentrifuge uitgerust met U.V. optiek. Van M-RNA en B-RNA werd bij verschillende concentraties in 1 x SSC, 0,005 M Na₃EDTA de sedimentatiecoëfficiënt bepaald. De rotatiesnelheid bedroeg 50.740 rpm; de rotortemperatuur 4° C.



Figuur 6. De sedimentatiecoëfficiënten van CPMV-M-RNA en van CPMV-B-RNA bij verschillende concentraties van RNA. Het toerental van de ultracentrifuge bedroeg 50.740 rpm.
 -Δ-Δ- M-RNA -o-o- B-RNA

Figuur 6, waarin de reciproke der sedimentatiecoëfficiënt ($1/S_{20,w}$) op de ordinaat is uitgezet en de RNA concentratie (C) op de abscis, toont dat alleen in het gebied der lagere concentraties een lineaire relatie geldt tussen $1/S_{20,w}$ en C. Deze relatie is voor een groot deel het gevolg van het verband dat bestaat tussen de RNA concentratie en de viscositeit (η) van de oplossing. Lauffer (1944) toonde aan dat voor een aantal macromoleculen en voor b.v. TMV het produkt van sedimentatiecoëfficiënt en relatieve viscositeit van de oplossing onafhankelijk is van de concentratie

Eigner et al. (1960) toonden een lineair verband tussen $1/S$ en C bij $C < 200$ µg/ml. Aten (1965) mat de sedimentatiecoëfficiënten van verschillende T₄-DNA-preparaten bij $C < 70$ µg/ml. In figuur 6 blijkt dat de concentratieafhankelijkheid slechts lineair is voor M-RNA bij $C \leq 100$ µg/ml en voor B-RNA bij $C \leq 50$ µg/ml. De aldus gevonden sedimentatiecoëfficiënten bedroegen voor M-RNA en B-RNA respectievelijk

$S_o = 26,4 S$ en $S_o = 33,5 S$.

Spirin (1963) stelde empirisch een verband vast tussen het molecuulgewicht (MW) van een RNA en zijn sedimentatiecoëfficiënt (S), nl.

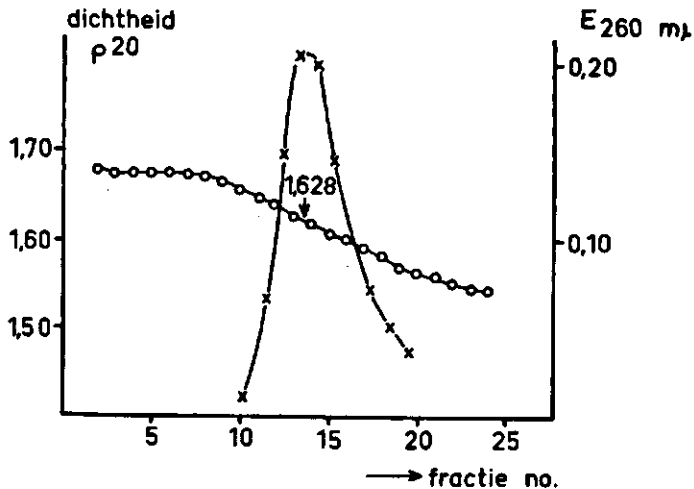
$$MW = 1550 \times S^{2,1}$$

Met behulp van deze formule werden voor M-RNA en B-RNA molecuulgewichten berekend van respectievelijk $1,5 \times 10^6$ dalton en $2,5 \times 10^6$ dalton.

3.3 De zweefdichtheid van CPMV-RNA in Cs_2SO_4

200 μ g CPMV-RNA werd opgelost in 25 ml van een oplossing van Cs_2SO_4 in 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0, 0,005 M Na_3EDTA . De dichtheid van deze oplossing was pycnometrisch bepaald en bedroeg $\rho = 1,63 \text{ g/cm}^3$. De oplossing bevatte 1% (w/v) formaldehyde om de precipitatie van het enkelstrengig RNA onder invloed van de hoge zoutconcentratie tegen te gaan (Lozeron en Szybalski, 1966). De reden voor het gebruik van Cs_2SO_4 in plaats van $CsCl$ is dat RNA een zeer hoge zweefdichtheid bezit, welke in Cs_2SO_4 ten gevolge van de hoge hydratatiegraad daalt tot een niveau waarbij een evenwichtsgradiënt gebruikt kan worden.

De oplossing werd gedurende 96 uur bij 20.000 rpm gecentrifugeerd in een Spinco SW 25.1 rotor. De rotortemperatuur bedroeg $15^\circ C$. Na afloop van de run werd de bodem van de buis doorgeprikt en fracties van 32 druppels werden opgevangen.



Figuur 7. De verdeling van de extinctie van een gezuiverd CPMV-RNA preparaat over een evenwichtsgradiënt in Cs_2SO_4 , 1% HCOH in een Spinco SW 25.1 rotor na 96 uur centrifugeren bij 20.000 rpm en $15^\circ C$.

-x-x- extinctie $E_{260 \text{ m}\mu}$

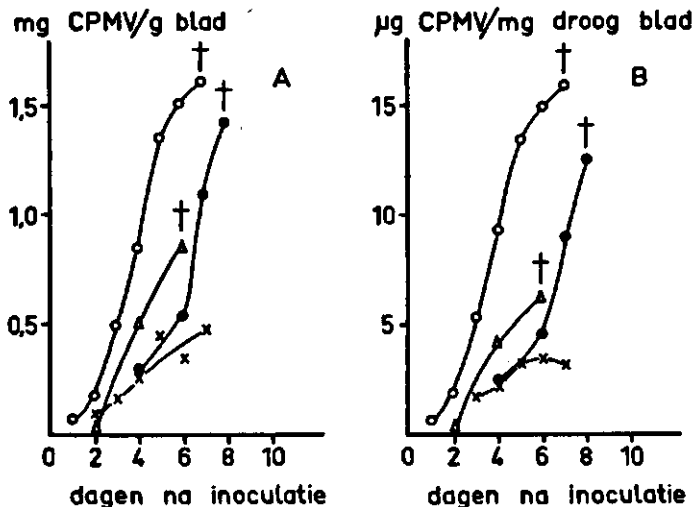
-o-o- dichtheid $\rho \text{ g/cm}^3$

Na verdunning tot 2 ml werd het RNA-gehalte der fracties met behulp van de spectrofotometer bepaald. Figuur 7 toont dat CPMV-RNA in een Cs_2SO_4 -gradiënt één band vormt. De gemiddelde zweefdichtheid van het RNA is $\rho = 1,628 \text{ g/cm}^3$ (pycnometrisch bepaald).

Het feit dat slechts één band gevormd werd betekent ook dat de verschillen in basenverhouding tussen M-RNA en B-RNA te gering zijn om in duidelijke zweefdichtheidsverschillen tot uiting te komen.

3.4 De invloed van de temperatuur op de virussyntese

De temperatuur waarbij planten gekweekt worden heeft niet alleen een uitgesproken effect op de symptoomontwikkeling bij een aantal plantevirussen (Beemster, 1957; Walters, 1963) maar ook op de hoeveelheid virus die in de cel gevormd wordt (Pound en Helms, 1955; Pound en Bancroft, 1956). Een onderzoek werd gedaan naar de invloed van de temperatuur op de snelheid van de virusvermeerdering in geïnfecteerde primaire bladeren van *Vigna*. Het doel hiervan was om de optimale temperatuur voor de vermeerdering van CPMV vast te stellen. Tevens zou op deze wijze het steilste gedeelte van de groeicurve bepaald kunnen worden, waarbij dus de virussyntese het snelst verliep. De primaire bladeren van *Vigna*-planten werden geïnoculeerd (zie 2.1) en de planten werden verder gekweekt bij respectievelijk kasomstandigheden en bij temperaturen van 25°C , 30°C en 35°C in een Sherer groeikast bij 24 uur verlichting. Per behandeling werden 75 planten gebruikt. Op verschillende tijdstippen na inoculatie werden van iedere groep 10 planten geoogst. Uit de primaire bladeren werd het virus gezuiverd (zie 2.2). De zuiveringsprocedure werd afgebroken vóór de centrifugering bij hoog toerental in de Spinco ultracentrifuge en de virusconcentratie werd spectrofotometrisch bepaald. Tijdens voorafgaande experimenten was gebleken dat bij verhoging der temperatuur de grootte der primaire bladeren toenam. Daarom werd gebruik gemaakt van het drooggewicht van het blad. Het droogvriezen van bevroren primaire bladeren gebeurde in een Phywé L2/WKF droogvriezer. Nu bleek dat het drooggewicht van de bladeren afnam bij verhoging van de kweektemperatuur. In figuur 8 is bij de verschillende behandelingen de gevormde hoeveelheid virus op verschillende dagen na infectie uitgezet zowel tegen droog als tegen vers bladgewicht. Het bleek dat de virussyntese de hoogste waarde bereikte bij een temperatuur van 30°C . De virussyntese is het snelst in het steilste gedeelte van de curve, t.w. tussen 3 en 5 dagen na infectie. Aangenomen werd dat in dit gebied ook de synthese van virus-RNA en dus de "turnover" van het dubbelstrengig RNA zo snel mogelijk zou zijn. Dientengevolge werd besloten om de merking van dubbelstrengig RNA met een radioactief isotoop te doen plaatsvinden tussen 3 en 5 dagen na infectie.



Figuur 8. De groeicurves van CPMV bij verschillende temperaturen.

A hoeveelheid virus per gram vers blad

B hoeveelheid virus per mg droog blad

x-x planten gekweekt bij 20° C en kasomstandigheden

●-● planten gekweekt bij 25° C, 24 uur licht, 80% relatieve luchtvochtigheid

o-o planten gekweekt bij 30° C, 24 uur licht, 80% relatieve luchtvochtigheid

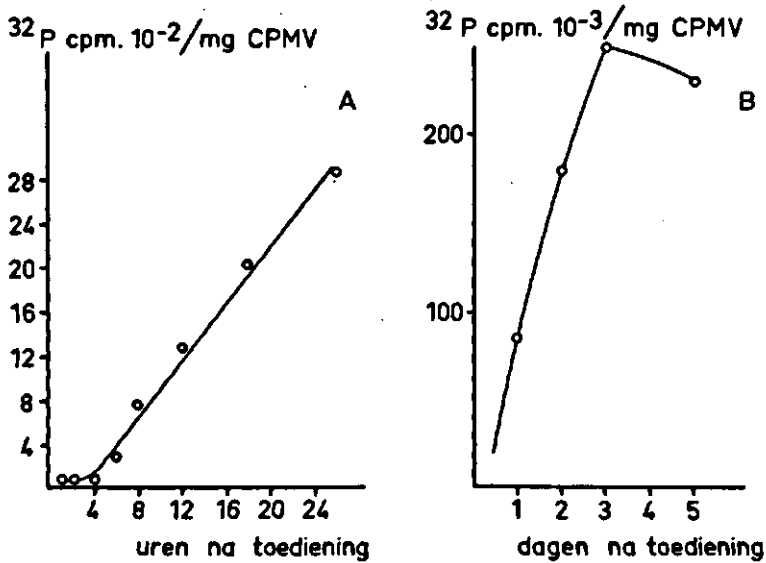
Δ-Δ planten gekweekt bij 35° C, 24 uur licht, 80% relatieve luchtvochtigheid

† de laatst gemeten waarde, hierna treedt bladval op.

3.5 De incorporatie van ^{32}P in CPMV-RNA

Het experiment werd opgezet om uit te maken gedurende hoeveel tijd bij de gegeven omstandigheden (zie 2.8) ^{32}P aan de plant gegeven diende te worden om een maximale incorporatie in de dubbelstrengige RNA-keten mogelijk te maken. Omdat een directe methode hiervoor ontbrak werd nagegaan hoe snel na de gift het ^{32}P in het virus-RNA werd geïncorporeerd.

Vigna-planten werden 4 dagen na inoculatie gedurende 2 uur gelabeld met 1 mCi $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ (spec. act. 69 Ci/mg P), zoals beschreven in 2.8. Hierna werd op verschillende tijdstippen een virusmonster gezuiverd en de specifieke radioactiviteit werd bepaald. Figuur 9 A toont dat pas na 4 uur enig ^{32}P werd ingebouwd in het virus-RNA. Daarna nam de specifieke radioactiviteit van het virus (^{32}P -cpm/mg CPMV) lineair met de tijd toe en bleef lineair tot tenminste 24 uur na toediening der label. Uit de curve kon dus geconcludeerd worden dat de maximale incorporatie van ^{32}P in dubbelstrengig RNA reeds bereikt was 4 uur na toediening der label.



Figuur 9. De specifieke radioactiviteit van CPMV op verschillende tijdstippen na toediening van $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$.

A 4 dagen na inoculatie, 2 uur labeling met 1 mCi $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$

B 6 uur na inoculatie, 6 uur labeling met 5 mCi $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$.

Hiernaast werd een experiment gedaan om uit te maken hoeveel tijd, na toevoeging van de label, nodig was om een maximale specifieke radioactiviteit van het virus te verkrijgen. *Vigna*-planten werden 6 uur na inoculatie gedurende 6 uur gelabeld met 5 mCi $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ (drager-vrij), zoals beschreven in 2.8. Op verschillende tijdstippen na inoculatie werd een virusmonster geïsoleerd en de specifieke radioactiviteit werd bepaald. Ditmaal bedroeg het interval 1 dag. Figuur 9 B toont dat de toename der specifieke radioactiviteit van het virus gedurende 3 dagen na toediening van de label lineair is. Daarna buigt de curve af. Of de oorzaak voor deze langdurige lineaire toename gezocht moet worden in de opslag van radioactiviteit in de fosfaat-'pool' van de plant of in de opslag van ^{32}P in of aan de wortel is niet onderzocht.

Vast stond dat het meest geschikte tijdstip voor isolatie van radioactief virus lag in de eerste 3 dagen na toediening van de label. In het hier beschreven onderzoek werd getracht zo hoog mogelijk gelabeld dubbelstrengig RNA te verkrijgen en als bijproduct tevens gelabeld CPMV. Daarom werd 3 dagen na inoculatie van het primaire blad 5 mCi $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ (drager-vrij) toegediend. De labelingsperiode werd beëindigd na 48 uur, waarna dubbelstrengig RNA uit het deeltjespreparaat bereid werd (zie 4.3) en het virus geïsoleerd werd uit het bij de bereiding van het deeltjespreparaat ontstane supernatant (zie 4.3).

4 De zuivering van dubbelstrengig RNA

In dit hoofdstuk worden de experimenten beschreven, die uiteindelijk geleid hebben tot de isolatie van dubbelstrengig RNA uit door CPMV geïnfecteerde bladeren van *Vigna*. In principe kan het dubbelstrengig RNA van het overige nucleïnezuur gescheiden worden door gebruik te maken van de ongevoeligheid van dubbelstrengig RNA voor RNase. Door incubatie met ribonuclease wordt het enkelstrengig RNA afgebroken tot kleine brokstukken, terwijl het dubbelstrengig RNA niet afgebroken wordt. Een fractionering van het mengsel naar grootte levert dan zuiver dubbelstrengig RNA.

Omdat de bestaande voorschriften voor de zuivering van nucleïnezuur uit bladmateriaal niet zonder meer toepasbaar bleken op *Vigna*-blad, werd eerst een procedure uitgewerkt om bladnucleïnezuur van *Vigna* te bereiden. Voor het fractioneren van het nucleïnezuurmengsel werd in eerste instantie gebruik gemaakt van chromatografie op methylalbumine-kieselguhr (MAK) kolommen volgens Mandell en Hershey (1960). Deze methode leverde voor het scheiden van enkelstrengig DNA en dubbelstrengig DNA prachtige resultaten (Sueoka en Cheng, 1962). Ralph et al. (1965) voerden een geslaagde isolering uit van dubbelstrengig TYMV-RNA met behulp van chromatografie op een MAK-kolom. Voor de isolatie van dubbelstrengig CPMV-RNA bleek de methode evenwel geheel ontoereikend (zie 4.2).

Inmiddels had Bové (1967) aangetoond dat in vitro dubbelstrengig TYMV-RNA gevormd werd in een fractie uit het blad die voornamelijk chloroplasten en kernfragmenten, waaronder intacte nucleoli, bevatte. Bovendien bleek het mogelijk om, na bereiding van een dergelijke fractie uit geïnfecteerde bladeren, hieruit dubbelstrengig TYMV-RNA te isoleren. Besloten werd toen om voor de isolatie van dubbelstrengig CPMV-RNA eveneens gebruik te maken van een dergelijke voorfractionering, in de hoop dat het op die wijze mogelijk was de hieruit te isoleren RNA oplossing relatief te verrijken met dubbelstrengig CPMV-RNA. De fractionering van het geëxtraheerde RNA geschiedde na incubatie met nuclease door gelfiltratie op Sephadex G 200.

4.1 De bereiding van nucleïnezuur uit bladeren van *Vigna*

Omdat de gebruikelijke manier van bewaren van bladmateriaal bij -20° C aanleiding geeft tot de vorming van polyfenolen die interfereren met de hieronder beschreven extractieprocedure van RNA, werd voor de bereiding van *Vigna*-RNA uitgegaan van vers bladmateriaal.

Vers bladeren van *Vigna* werden gewassen met gedestilleerd water en daarna in stukjes geknipt. Per gram blad werd 2 ml van een bufferoplossing en 4 ml vers gedestilleerde met water verzadigde fenol toegevoegd. De bufferoplossing was samengesteld uit 0,1 M glycine-NaOH, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,005 M Na_3EDTA , 1% natriumlaurylsulfaat en 1% bentoniet (zie 2.10). Het bladmateriaal werd met het buffer-

fenolmengsel gedurende twee minuten in een "Waring blender" gehomogeniseerd.

Toevoeging van bentoniet bleek ook bij de extractie van *Vigna*-RNA een absoluut vereiste om de RNase-werking op te heffen (Fraenkel-Conrat en Singer, 1961). Later werd het bentoniet vervangen door 3% diëthylpyrocarbonaat. Toevoeging van EDTA aan het buffermengsel voorkwam aggregatie en daarmee gepaard gaand verlies van nucleïne-zuren tijdens de extractieprocedure.

De scheiding der fasen van het homogenaat werd bereikt door 10 minuten centrifugeren bij 7000 x g. Hierbij traden drie lagen op: een bovenstaande, onder meer nucleinezuren bevattende heldere waterfase en een donkergroene fenolfase onder in de buis. Tussen deze twee fasen bevond zich een dikke lichtgroene interfase die onder meer uit gedenatureerd eiwit bestond. Een klein sediment van zetmeel completeerde het geheel.

De waterfase werd afgepipetteerd en interfase en fenolfase werden door met de hand te schudden nogmaals met buffer uitgetrokken. Na combinatie werden beide waterlagen nog twee maal met fenol behandeld om niet geëxtraheerd eiwit te verwijderen.

Het eiwitgehalte van de oplossing werd na de verschillende zuiveringsstappen gemeten met de methode van Lowry et al. (1951) (zie ook 2.13.1). Uit tabel 2 blijkt dat het effect van fenolextracties steeds geringer wordt en dat herhaling niet tot een veel zuiverder nucleïnezuurpreparaat leidt. Als controle op de kwantitatieve eigen-

Behandeling	Hoeveelheid eiwit in de oplossing	
	mg eiwit/mg RNA	
Fenolextractie 1x		1,76
2x		1,00
3x		0,80
4x		0,72
Fenolextractie 4x, dialyse, alcoholprecipitatie 2x		0,02-0,05
Fenolextractie 4x, dialyse, methoxyethanol, CTA precipitatie, alcoholwas 2x		< 0,002

Tabel 2. De invloed van de opeenvolgende zuiveringsstappen op het eiwitgehalte van een nucleïnezuurpreparaat. De eiwitbepalingen werden uitgevoerd volgens Lowry et al. (1951), zie 2.13.1.

schappen van de fenolextractie werd de groene interfase na 2 fenolextracties verzameld, drie maal met ether geëxtraheerd, en drooggevroren. Na suspenderen van dit materiaal werd hierop een orcinolbepaling (zie 2.13.2) uitgevoerd. Nu bleek dat de interfase een hoog suikergehalte bezat, zodat RNA niet aangetoond kon worden. Daarom

werd een kwantitatieve RNA bepaling gedaan volgens de methode van Van Kammen (1963) (zie 2.13.4). Hieruit bleek dat in de interfase geen RNA meer aanwezig was.

Om de fenol na de fenolextracties uit de oplossing te verwijderen werd het extract drie maal uitgeschud met een dubbel volume ether. Optredende emulgering is te wijten aan een te klein volume ether. De ether werd uit de oplossing verdreven door N_2 over te leiden. Vervolgens werd de oplossing gedialyseerd tegen 100 maal het volume aan 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl. Deze behandeling is noodzakelijk om met de extractieprocedure interfererende, niet nader gekarakteriseerde stoffen te verwijderen.

Polysacchariden werden van de nucleïnezuurbevattende oplossing gescheiden in een tweefasensysteem met 2-methoxyethanol volgens Ralph en Ballamy (1964). Hiertoe werden aan de oplossing een gelijk volume 2,5 M K-fosfaatbuffer pH 8,1 toegevoegd en een even groot volume 2-methoxyethanol. Het mengsel werd in een centrifugebuis gedaan, krachtig met de hand geschud en gedurende 10 minuten bij 10.000 x g gecentrifugeerd. De waterige bovenlaag werd afgepipetteerd en hieraan werd een gelijk volume 0,2 M Na-acetaat toegevoegd, waarna het nucleïnezuur werd neergeslagen als quaternair ammoniumzout door toevoeging van één volume 1% cetyltrimethylammoniumbromide in water (w/v). Het neerslag werd door 10 minuten centrifugeren bij 12.000 x g verzameld en door drie maal wassen met 0,1 M Na-acetaat in 70% ethanol omgezet in het natriumzout. In sommige gevallen werd de methoxyethanolbehandeling niet toegepast. Het nucleïnezuur werd dan onmiddellijk neergeslagen met 0,33% cetyltrimethylammoniumbromide (w/v). Een hoog polysaccharide-gehalte resulteerde in het ontstaan van een fibreuze massa wanneer het RNA (hier na de incubatie met DNase) werd neergeslagen met ethanol. Het bleek mogelijk deze massa rondom een glazen staaf te winden, wat ten onrechte de indruk wekte dat men te maken had met DNA.

Het Na-nucleaat werd tenslotte opgelost in 0,01 M tris-HCl pH 7,2. Het gebruik van een buffer van lage molariteit was noodzakelijk om het nucleaat in oplossing te krijgen. Ten slotte werd de oplossing gedurende 16 uur gedialyseerd tegen 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl. De dialyse verwijderde ook de laatste resten - mogelijk nog gebonden - cetyltrimethylammoniumionen. De concentratie van het nucleïnezuur werd spectrofotometrisch bepaald. De gebruikte extinctiecoëfficiënt bedroeg $E_{260 \text{ m}\mu}^{0,1\%} = 24,0$ bij een lichtweg van 1 cm. De hoeveelheid nucleïnezuur die op deze wijze uit *Vigna*-blad geïsoleerd werd bedroeg 1,0-1,5 mg per gram vers blad. Het eiwitgehalte gemeten met de Folin bepaling volgens Lowry et al. (1951) (zie 2.13.1) was 0,005 (w/v eiwit/RNA). De hierbij gevonden $A_{260 \text{ m}\mu} : A_{230 \text{ m}\mu}$ verhouding bedroeg 2,4. Het spectrum van nucleïnezuur vertoont een maximum bij 260 m μ en een minimum bij 230 m μ ; eiwit daarentegen heeft een maximum bij 280 m μ en een minimum bij 240 m μ . Het is mogelijk het eiwitgehalte van een nucleïnezuuroplossing te correleren met de $A_{260 \text{ m}\mu} : A_{230 \text{ m}\mu}$ verhouding. Als maat voor zuiverheid werd genomen

$A_{260 \text{ m}\mu} : A_{230 \text{ m}\mu} \geq 2,3$, hetgeen overeenkomt met een eiwitgehalte van $< 0,03$. Wanneer deze verhouding de waarde 2,6 overschreed bleek dit veroorzaakt door afbraak van het nucleïnezuur. Als algemene norm voor de kwaliteit van het nucleïnezuur werd gesteld:

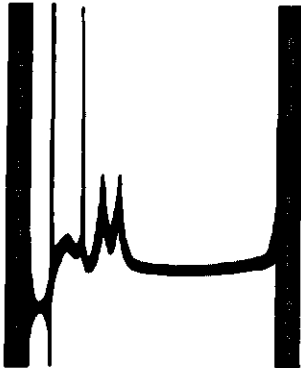
$$2,3 \leq A_{260 \text{ m}\mu} : A_{230 \text{ m}\mu} \leq 2,6$$

De modificatie volgens Van Kammen (1963) van de kwantitatieve RNA-bepaling van Ogur en Rosen (1950) werd toegepast op *Vigna*-blad en leverde RNA-gehalten die, zoals blijkt uit tabel 3, in dezelfde orde van grootte lagen als de volgens bovenstaande methode geïsoleerde hoeveelheid.

Versgewicht blad (g)	Drooggewicht blad (mg)	RNA-gehalte (mg)
3,0	360	3,8
4,5	470	4,5
4,4	480	4,7
3,5	340	4,2

Tabel 3. Het RNA-gehalte van *Vigna*-blad gemeten volgens de methode van Van Kammen (1963) zie 2.13.4.

Het sedimentatiepatroon van het *Vigna*-nucleïnezuur werd bestudeerd in de Spinco Model E analytische ultracentrifuge om ook op deze wijze de resultaten van de gevolgde zuiveringsprocedure te evalueren. In figuur 10 is een Schlierendiagram van een nucleïnezuurpreparaat afgebeeld. Het preparaat bevatte 4-5 S s-RNA, zeer homo-



Figuur 10. Een schlierendiagram van nucleïnezuur uit het primaire blad van *Vigna*. De sedimentatierichting is van links naar rechts. De ultracentrifugerun werd uitgevoerd in een Spinco model E analytische ultracentrifuge bij 10°C en 52.040 rpm. De opname werd 28 minuten na aanvang van de run gemaakt. De oplossing bevatte 6,0 mg nucleïnezuur per ml 0,01 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0, 0,15 M NaCl, 0,005 M Na_3EDTA .

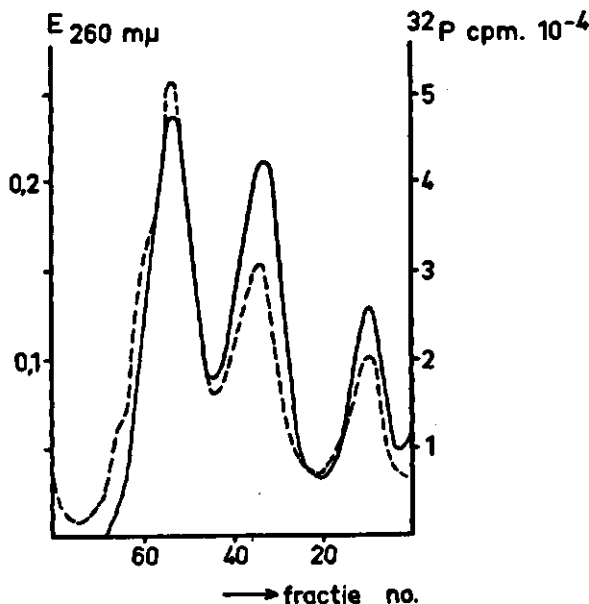
geen 12 S DNA en twee ribosomale fracties van respectievelijk 17 S en 25 S. De hoeveelheid 25 S was normaliter één tot anderhalf maal zo groot als de 17 S fractie; hetzelfde werd voor plantecytoplasma-RNA vermeld o.m. Cherry (1964), Click en Hackett (1966) en Loening en Ingle (1967).

De hoeveelheid DNA in de oplossingen werd gemeten met de difenylaminereactie van Burton (1956) (zie 2.13.3) en bedroeg - zoals blijkt uit tabel 4 - gemiddeld 10% van het nucleïnezuur. Dit komt overeen met de waarde van 9%, door Solymosy et al. (1968) opgegeven voor boon (*Phaseolus vulgaris*).

Aantal dagen na infectie	DNA-gehalte
0	10,9
2	8,0
3	9,5
4	9,0
5	10,5

Tabel 4. Het DNA-gehalte van nucleïnezuuroplossingen bereid uit *Vigna*-blad op verschillende tijdstippen na infectie. Het DNA-gehalte is uitgedrukt als het gewichtspercentage dat het DNA uitmaakt van het nucleïnezuur.

Het DNA werd uit de oplossing verwijderd door incubatie met pancreas-DNase zoals beschreven in 2.12.1. Na deze incubatie werd het RNA uit de oplossing neergeslagen door 2 volumina ijskoude ethanol 96% toe te voegen. Het RNA werd afgecentrifugeerd, gedroogd in vacuo en opgelost in 1 x SSC. Als controle op de werkzaamheid van het DNase werd het RNA onderworpen aan een suikergradiëntcentrifugering. De lineaire suikergradiënt liep van 5-20% saccharose in 0,005 M Na₃EDTA, 1 x SSC. Er werd 1,0 mg RNA opgelost in 1,0 ml 0,005 M Na₃EDTA, 1x SSC en op de suikergradiënt gepipetteerd. De run werd gedurende 14 uur uitgevoerd in de Spinco SW 25.1 rotor bij 23.500 rpm. Na afloop werd de buis gefractioneerd zoals beschreven in 2.3 voor evenwichtscentrifugeringen. De resultaten van zo'n analyse staan afgebeeld in figuur 11. Achtereenvolgens komen in het patroon voor 4-5 S s-RNA en 17 S en 25 S ribosomaal RNA. De 12 S DNA piek is geheel verdwenen, waaruit geconcludeerd wordt dat door de incubatie met DNase het DNA inderdaad afgebroken was. De suikergradiënten dienden Na₃EDTA te bevatten; toevoeging van 10⁻⁴ mM MgCl₂ per ml leidde tot vergroting van het oppervlak van de 25 S RNA piek en tot verkleining van de 17 S piek. Kennelijk leidde de aanwezigheid van MgCl₂ tot aggregatie; 10⁻² mM MgCl₂ per ml gaf aanleiding tot volledige aggregatie van het ribosomale RNA.



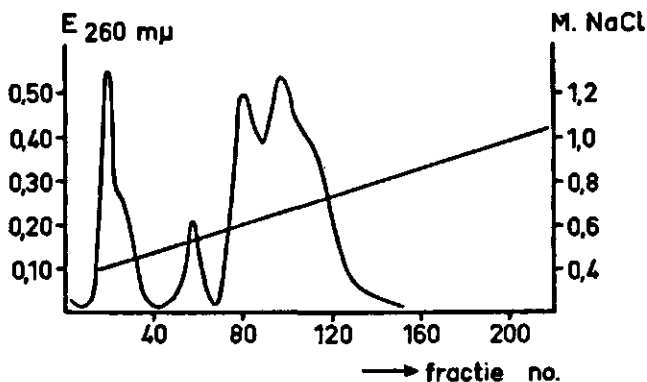
Figuur 11. De verdeling van de extinctie en radioactiviteit van *Vigna*-RNA over een lineaire suikergradiënt van 5 tot 20% saccharose in 0,005 M Na₃EDTA, 1 x SSC. De sedimentatierichting is van rechts naar links. Fractionering geschiedde na 14 uur centrifugeren in de Spinco SW 25.1 rotor bij 23.500 rpm en 4° C.

— , extinctie bij 260 mμ
 - - - , radioactiviteit

4.2 Methylalbumine-kieselguhr kolomchromatografie

Voor de bereiding van methylalbumine werd gebruik gemaakt van de methode van Hayashi et al. (1963). 5 gram albumine werd opgelost in 500 ml absolute methanol die met 4,2 ml 12 M HCl was aangezuurd. De oplossing werd gedurende 5 dagen in het donker bij 37° C geïncubeerd. Het ontstane neerslag van methylalbumine werd afgecentrifugeerd, gewassen met methanol en vervolgens met watervrije ether, aan de lucht gedroogd en boven KOH in een exsiccator opgeslagen. Kieselguhr (Merck, gereinigt und geglüht) werd twee maal gewassen met overmaat 0,2 M HCl, twee maal met 0,2 M NH₄OH, vervolgens vier maal met gedestilleerd water en tenslotte twee maal met 96% ethanol. Na drogen in de droogstoof werd de bovenliggende gele laag verwijderd.

Voor de bereiding van de kolommen werd vastgehouden aan het voorschrift van Mandell en Hershey (1960), waarbij alle oplossingen echter gebufferd werden met 0,01 M K-fosfaat pH 6,7. De kolom werd beladen met 4,0 mg nucleïnezuur in 0,4 M NaCl, 0,01 M K-fosfaat pH 6,7. Na wassen van de kolom met 100 ml van dezelfde oplossing, werd geëluëerd met 500 ml 0,01 M K-fosfaatbuffer pH 6,7 met een lineaire zoutgra-



Figuur 12. De verdeling van de extinctie van nucleïnezuur uit het primaire blad van *Vigna* over een MAK-kolom eluaat. De kolom werd geëluëerd met een lineaire NaCl-gradiënt. Opgebracht werd 5,2 mg nucleïnezuur. De recovery bedroeg 86%.

diënt lopend van 0,4 M NaCl tot 1,2 M NaCl. Figuur 12 toont de resultaten van een elutie van nucleïnezuur uit gezond *Vigna*-blad. Achtereenvolgens werden geëluëerd 4 S s-RNA, 5 S RNA, 12 S DNA, 17 S ribosomaal RNA en 25 S ribosomaal RNA. Het scheidende vermogen van de kolom was zeer goed; de recovery bedroeg gemeenlijk 90% van de opgebrachte hoeveelheid nucleïnezuur.

Nucleïnezuur uit de geïnfecteerde bladeren van *Vigna* werd geëluëerd met een recovery van 30-60%. Een van de redenen voor deze geringe hoeveelheid was gelegen in het feit dat CPMV-RNA irreversibel aan de kolom gebonden werd. Veelal bleef ook het ribosomale RNA tezamen met het CPMV-RNA op de kolom achter; dit verschijnsel was niet op te heffen door de zoutgradiënt op 0,005 M Na_3EDTA te brengen. Matus et al. (1964) vermeldden hetzelfde verschijnsel voor nucleïnezuurisolaties uit Chinese kool. Zij weten dit aan de vorming van aggregatiestructuren tussen virus-RNA en ribosomaal RNA ten gevolge van baseparing tussen deze moleculen.

4.3 De bereiding van een deeltjespreparaat volgens Bové

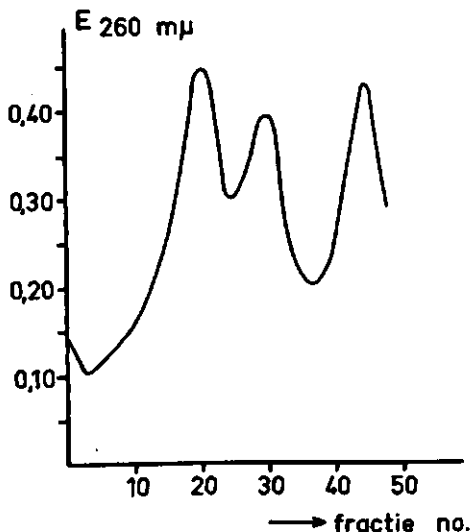
In 1965 toonden Bové et al. (1965) in een studie over de in vitro synthese van TYMV-RNA aan, dat de activiteit van virusspecifieke RNA-synthese was gebonden aan een fractie van een celhomogenaat van door TYMV geïnfecteerde Chinese-koolplanten. Deze fractie bestond voornamelijk uit chloroplasten en nucleoli. Het bleek mogelijk om uit een dergelijk preparaat dubbelstrengig TYMV-RNA te isoleren (Bové, 1966). Ralph en Clark (1966) hadden gevonden dat het proces van de synthese van TYMV-RNA zich afspeelde in de chloroplasten van de geïnfecteerde Chinese-koolplanten. Ralph en Wojcik (1966) toonden een in vitro labeling van dubbelstrengig TYMV-RNA aan in een chloroplastenpreparaat van geïnfecteerde Chinese-koolplanten.

De resultaten van Bové en van Ralph en medewerkers waren aanleiding om te trachten ook in het geval van *Vigna* een dergelijke voorfractionering van celmateriaal uit te voeren. De bereidingswijze werd als volgt tot een minimum gereduceerd. Verse *Vigna*-bladeren werden gedurende 2 minuten in een Waring blender gehomogeniseerd. Per gram blad werd 2-5 ml 0,1 M Na-fosfaatbuffer pH 7,0 gebruikt. Het homogenaat werd door kaasdoek geperst en gedurende 20 minuten gecentrifugeerd bij 15.000 x g. Het sediment, bestaande uit membraanstructuren, gebarsten chloroplasten en intacte nucleoli, werd met een met watten omwonden glasstaaf voorzichtig gesuspenderd in de bufferoplossing die gebruikt werd voor de extractie van nucleïnezuur (zie 4.1). Uit de bovenstaande vloeistof kon zo nodig CPMV geïsoleerd worden (zie 2.2).

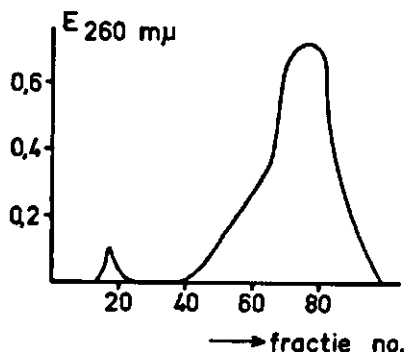
4.4 De isolatie van tegen RNase resistent RNA

Uit een deeltjespreparaat volgens 4.3 uit 100 gram bladmateriaal bereid, kon volgens de methode, beschreven in 4.1, 10 mg RNA bereid worden. Figuur 13 toont de aard van dit RNA na fractionering op een lineaire suikergradiënt van 5-20%. Evenals bij het *Vigna*-RNA in figuur 11 toont de figuur respectievelijk 4-5 S s-RNA, 17 S ribosomaal RNA en 25 S ribosomaal RNA. Dit wees op de aanwezigheid van overmaat cytoplasma RNA. Of er sprake was van een relatieve verrijking van RNA uit de chloroplasten en dus van 16 S en 23 S ribosomaal RNA (Stutz en Noll, 1967) is op grond van figuur 13 niet uit te maken. Op grond van het sedimentatiepatroon is ook niet te zeggen of er een verrijking aan dubbelstrengig RNA plaatsvond.

Na de incubatie met DNase werd het RNA neergeslagen met 2 volumina ijskoude ethanol en, na drogen in vacuo, opgelost in 1 x SSC tot een concentratie van 1,0 mg RNA per ml 1 x SSC. Het RNA werd geïncubeerd met 0,5 µg RNase A en 5 U RNase T₁ zoals beschreven in 2.12.2, en vervolgens onderworpen aan gelfiltratie op een Sephadex G 200 kolom (35 x 2,5 cm geëquilibreerd met 1 x SSC). Elutie geschiedde met 1 x SSC. De snelheid van elutie bedroeg 25 ml per uur. Figuur 14 toont het patroon van een dergelijke elutie. Hierbij was 5 mg RNA opgebracht in 5 ml 1 x SSC. Onmiddellijk na het eigen volume van de kolom elueerde de fractie met hoog molecuulgewicht, na enige tijd gevolgd door materiaal bestaande uit gehydrolyseerde, laagmoleculaire nucleotiden. De hoogmoleculaire fractie bezat een nucleïnezuurspectrum, de orcinolbepaling (zie 2.13.2) hierop toegepast was positief; de reactie op difenylamine (zie 2.13.3) was negatief. Dit toonde aan dat het hoogmoleculaire materiaal ribose bevatte en het karakter van RNA bezat. Wanneer ter controle RNA uit een deeltjespreparaat uit gezonde *Vigna*-bladeren aan een dergelijke behandeling onderworpen werd, dan bleek slechts zelden een hoogmoleculaire fractie aanwezig bij gelfiltratie. Dit bezat echter nooit een nucleïnezuurspectrum.



Figuur 13.



Figuur 14.

Figuur 13. De verdeling van de extinctie van het RNA uit een deeltjespreparaat van primair *Vigna*-blad na infectie met CPMV over een lineaire suikergradiënt van 5 tot 20% saccharose in 0,005 M Na_3EDTA , 1 x SSC. De sedimentatierichting is van rechts naar links. Fractionering geschiedde na 14 uur centrifugeren in de Spinco SW 25.1 rotor bij 23.500 rpm en 4°C .

Figuur 14. De verdeling van de extinctie van met RNase behandeld RNA uit een deeltjespreparaat van met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad over een Sephadex G 200 eluaat. De afmetingen der kolom waren 2,5 x 35 cm. Opgebracht werd 5,0 mg RNA. De elutie geschiedde met 1 x SSC. Het volume der fracties bedroeg 2 ml.

De hoogmoleculaire fractie (ongeveer 50 μg) werd opgevangen en geïncubeerd met 50 μg pronase zoals beschreven in 2.12.3, om het eventueel nog aanwezige RNase af te breken. Om de resten pronase te verwijderen werd weer een fenolextractie toegepast. Het RNA werd daarop gechromatografeerd op een 5 cm hoge Chelex-100 kolom om divalente metaalionen te verwijderen (Weissmann et al., 1965) en tenslotte geconcentreerd in een roterende vacuümverdampster. Opslag van het materiaal geschiedde bij -20°C .

De hoogste opbrengst aan tegen RNase resistent RNA, op deze wijze verkregen, was 100 μg uit 100 g bladmateriaal, d.w.z. 0,1% van het totale RNA-gehalte. Het is dit RNA dat diende als uitgangspunt voor de bereiding van zuiver dubbelstrengig RNA door middel van evenwichtscentrifugering in Cs_2SO_4 . Daarbij (zie 5.3) bleek dat slechts een tiende gedeelte van het tegen RNase resistente RNA uit dubbelstrengig RNA bestond.

5 De eigenschappen van dubbelstrengig CPMV-RNA

In dit hoofdstuk worden de experimenten besproken die tot doel hebben het geïsoleerde, tegen RNase resistente, RNA nader te karakteriseren. Zij dienden enerzijds om het dubbelstrengig karakter van het geïsoleerde materiaal te bewijzen, anderzijds om nadere informatie te verschaffen over de wijze van replicatie van de enkelstrengige CPMV-RNA's. De gevoeligheid voor RNase, het smeltpunt en de zweefdichtheid gaven informatie over de structuur. De sedimentatiecoëfficiënt en de lengtemetingen in de elektronenmicroscop gaven inzicht in het replicatiemechanisme, nl. of M-RNA en B-RNA als één ongesplitst molecuul gerepliceerd worden of als twee onafhankelijke moleculen.

5.1 De gevoeligheid voor RNase

Zoals reeds beschreven werd in 1.3, is dubbelstrengig RNA ongevoelig voor RNase A en RNase T₁. Beide enzymen breken alleen enkelstrengig RNA af. Wanneer dubbelstrengig RNA opgelost is in 0,15 M NaCl en de ionenconcentratie van het medium wordt verlaagd naar 0,015 M NaCl, dan vindt aanzienlijk minder afscherming van de negatief geladen fosfaatgroepen plaats. Het gevolg is dat de afstotende werking van de fosfaatgroepen de aantrekkingskrachten tussen de A-U en G-C basenparen overtreft. De starre dubbelstrengstructuur verdwijnt, de ketens zijn losser gebonden en worden gevoelig voor RNase.

Uit 8 *Vigna*-planten werd het met ³²P gemerkt tegen RNase resistent RNA geïsoleerd, zoals beschreven in 4.4. Dit RNA (ongeveer 10 µg), opgelost in 1 x SSC, werd in vijf gelijke monsters verdeeld en de monsters werden met toenemende hoeveelheden RNase A gedurende 30 minuten bij 30° C geïncubeerd. Het niet afgebroken ³²P-RNA werd opgewerkt en de radioactiviteit ervan werd bepaald als beschreven in 2.11. De resultaten, die vermeld zijn in tabel 5, tonen dat het RNA niet gehydrolyseerd werd door RNase A. In een volgend experiment werd van een der monsters de zoutconcentratie met een faktor 10 verlaagd. Tabel 5 toont dat de daaropvolgende incubatie met RNase tot gevolg had dat het RNA geheel werd gehydrolyseerd.

Deze beide experimenten laten de conclusie toe, dat het nucleïnezuur in een hoge ionenconcentratie resistent is tegen de invloed van RNase. De structuur van het nucleïnezuur verandert onder invloed van een verlaging van de ionenconcentratie zodanig dat hydrolyse door RNase optreedt. Een en ander duidt wel op het dubbelstrengige karakter van het nucleïnezuur, maar bewijst niet dat de oplossing dubbelstrengig RNA bevatte. Verwacht kon nl. worden dat een DNA-RNA hybride een soortgelijk gedrag bezat. Op de eigenschappen van DNA-RNA hybriden wordt nader ingegaan in 5.3.

RNase-concentratie µg/ml	Buffer	Zuurprecipitabele radioactiviteit cpm. x 10
0	1 x SSC	1063
0,5	1 x SSC	1043
1,0	1 x SSC	982
5,0	1 x SSC	993
10,0	1 x SSC	1084
0	1 x SSC	1700
10,0	1 x SSC	1610
10,0	0,1 x SSC	54

Tabel 5. De invloed van de concentratie aan RNase en van de ionenconcentratie van het milieu op de resistentie tegen RNase van het dubbelstrengig voor CPMV specifieke RNA.

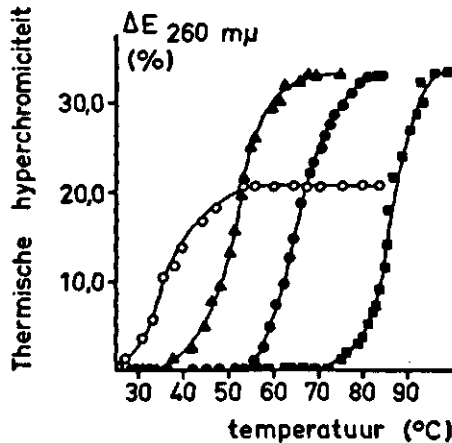
5.2 Het smeltpunt

Het temperatuursinterval waarbinnen de overgang van dubbelstrengstructuur naar enkelstrengstructuur plaats vindt, wordt het smelttraject genoemd. Het middelpunt van dit smelttraject, de T_m of smeltpunt, wordt gemeenlijk beschouwd als een karakteristiek voor ieder dubbelstrengig nucleïnezuur en wordt volgens Michelson et al. (1967) voornamelijk bepaald door het G-C gehalte van het nucleïnezuur. Boven het smeltpunt treden voor RNA een aantal veranderingen van fysische eigenschappen op, waarvan hier genoemd kunnen worden: een hyperchrom effect in het U.V., een verhoging van de zweefdichtheid en, uiteraard, een verlaging van de resistentie tegen RNase A. De grootte van het smelttraject is karakteristiek voor de zuiverheid van het preparaat en voor de intactheid der moleculen. Naarmate het smelttraject kleiner is, is het RNA-preparaat homogener in lengte (Michelson et al., 1967).

Het smeltpunt van het geïsoleerde tegen RNase resistente RNA werd op 2 wijzen bepaald. In de eerste plaats werd de temperatuursafhankelijke hyperchromiciteit bij 260 mµ gemeten in zoutoplossingen met verschillende ionensterkte. Omdat de stabiliteit van de structuur van dubbelstrengige nucleïnezuren toeneemt met een verhoging van de ionenconcentratie werd ook met toenemende zoutconcentratie een verhoging van het smeltpunt verwacht. De tweede manier die gebruikt werd om het smeltpunt te bepalen, was het meten van de temperatuursafhankelijkheid van de resistentie tegen RNase A.

RNA resistent tegen RNase, werd geïsoleerd zoals beschreven in 4.4. De hyperchromiciteit hiervan werd gemeten bij zoutconcentraties van respectievelijk

0,01 x SSC, 0,1 x SSC en 1,0 x SSC. De metingen werden uitgevoerd in een dubbelwandige kwartscuvet die verbonden was met een "Haake" waterbadthermostaat. Door de stop van de cuvet was in een glascapillair een Cu-Co thermokoppel bevestigd dat verbonden was met een Kipp A₁ galvanometer. Als referentie diende smeltend ijs. De temperatuurstijging bedroeg 1° C, per 5 minuten. De resultaten zijn weergegeven in fig. 15.



Figuur 15. De temperatuursafhankelijke hyperchromiciteit van tegen RNase resistent RNA geïsoleerd uit met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad. De metingen werden verricht bij verschillende ionensterkten.

- CPMV-RNA in 0,1 x SSC
- ▲ tegen RNase resistent RNA in 0,01 x SSC
- tegen RNase resistent RNA in 0,1 x SSC
- tegen RNase resistent RNA in 1,0 x SSC

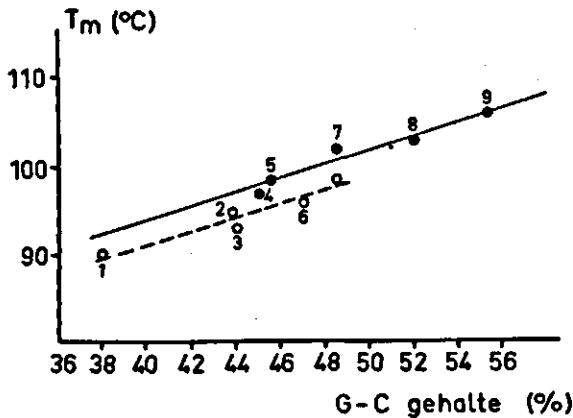
De middenwaarden T_m van de smelttrajecten waren respectievelijk

$$T_m^{0,01 \text{ x SSC}} = 52,5^\circ \text{ C}, \quad T_m^{0,1 \text{ x SSC}} = 67,5^\circ \text{ C} \text{ en } T_m^{1,0 \text{ x SSC}} = 86,5^\circ \text{ C}.$$

De hyperchromiciteit bedroeg 33,0% in tegenstelling tot de hyperchromiciteit van het enkelstrengige CPMV-RNA die 20,0% in 0,1 x SSC bedroeg. Hiervan was het smeltpunt bovendien veel lager, nl. $T_m^{0,1 \text{ x SSC}} = 36,0^\circ \text{ C}$. De verschillen in T_m bij verschillende ionensterkten komen overeen met de resultaten van Bové (1967), die in geval van dubbelstrengig TYMV-RNA een stijging van 15° C in smeltpunt vond met een tienvoudige toename van de $[\text{Na}^+]$ -concentratie.

Een $T_m^{1,0 \text{ x SSC}}$ van 86,5° C is echter tamelijk laag voor niet-afgebroken dubbelstrengig RNA met een G-C gehalte van ongeveer 0,40 (Van Kammen en Van Griensven, 1970). Dit blijkt ook uit figuur 16, waarin een aantal uit hyperchromiciteits-

metingen bepaalde smeltpunten van dubbelstrengige RNA's uitgezet zijn tegen de respectievelijke G-C gehalten. De berekende regressielijn leverde een verwacht smeltpunt van 91° C voor CPMV-specifiek dubbelstrengig RNA. Na de bepaling van de temperatuursafhankelijke hyperchromiciteit werd temperatuursafhankelijkheid van de resistentie tegen RNase A gemeten. Voor de bepaling hiervan werd gebruik gemaakt van dubbelstrengig RNA dat met ^{32}P was gemerkt en dat was bereid zoals beschreven in 2.4 en

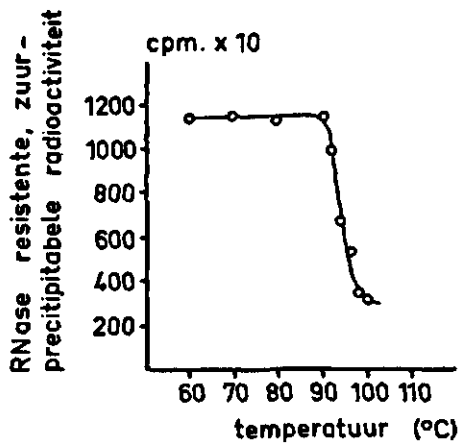


Figuur 16. De smeltpunten T_m van verschillende dubbelstrengige RNA's bij zoutconcentratie van 0,15 M, bepaald uit de resistentie tegen RNase (●) en uit de hyperchromiciteit bij 260 m μ (○). Door beide groepen van punten is de regressielijn getrokken.

RNA	G-C (%)	T_m (°C)		Literatuurverwijzing
		Resistentie	Δ E260	
1 Wound tumor virus-RNA	38,0		90	Gomatos en Tamm (1963 ^b)
2 Rice dwarf virus-RNA	43,8		95	Miura et al. (1966)
3 Reovirus-RNA	44,0		93	Gomatos en Tamm (1963 ^a)
4 d.s. TMV-RNA	45,0	97		Burdon et al. (1964)
5 d.s. AMV-RNA	45,5	98		Pinck et al. (1968)
6 Encephalomyocarditis virus-RNA	47,0		96	Montagnier en Sanders (1963)
7 d.s. Newcastle disease virus-RNA	48,5	102	98	Kingsbury (1966)
8 d.s. bacteriofaag MS2-RNA	52,0	103		Weissmann et al. (1964)
9 d.s. TYMV-RNA	55,3	106		Bové (1967); Bockstahler (1967)

Met ^{32}P gemerkt, tegen RNase resistent RNA (ca. 10.000 counts/10 minuten) in 1 x SSC werd in een aantal gelijke monsters van 1,0 ml verdeeld. Elk monster werd gedurende 20 minuten op een bepaalde temperatuur verhit. De oplossing werd vervolgens

snell tot 0° C afgekoeld en daaropvolgend gedurende 30 minuten bij 30° C geïncubeerd met 100 µg RNase A en 150 U RNase T₁. Hierna werd het niet gehydrolyseerde RNA neergeslagen en de radioactiviteit ervan gemeten zoals beschreven in 2.11. De resultaten afgebeeld in figuur 17, tonen een scherp smeltpunt $T_m = 94^\circ$ C. In figuur 16 zijn



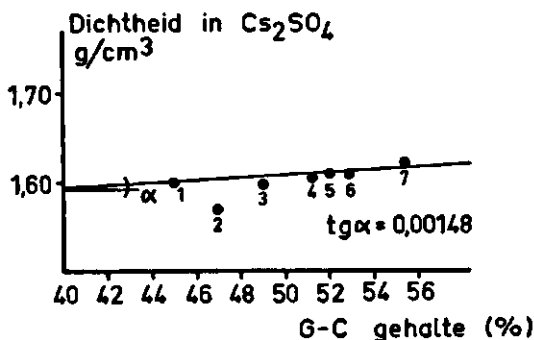
Figuur 17. De temperatuursafhankelijke resistentie tegen RNase van dubbelstrengig voor CPMV specifiek RNA. Monsters met gelijke hoeveelheid radioactiviteit werden gedurende 20 minuten op de aangegeven temperatuur verhit, snel afgekoeld en vervolgens met RNase geïncubeerd, zoals beschreven in de tekst. Na de incubatie werd de niet afgebroken met TCA precipitabele radioactiviteit van elk monster bepaald.

naast smeltpunten die bepaald zijn uit hyperchromiciteitsmetingen ook smeltpunten afgebeeld die bepaald zijn uit resistentiebepalingen tegen RNase. De berekende regressielijn leverde voor een dubbelstrengig RNA met een G-C gehalte van 0,40 - zoals dubbelstrengig CPMV-RNA dat heeft - een verwacht smeltpunt van 94° C. Dit komt volledig overeen met de gevonden waarde van het dubbelstrengig voor CPMV specifiek RNA. Het feit dat de T_m uit de hyperchromiciteitsmetingen niet overeenkomt met die uit de resistentiebepalingen wordt verklaard in 5.3. In dat hoofdstuk blijkt namelijk dat in een evenwichtsgradiënt de fracties die de radioactiviteit bevatten geen extinctie bij 260 mµ bezitten.

5.3 De zweefdichtheid

Zoals reeds aangegeven in 5.2 heeft de overgang van dubbelstrengstructuur naar enkelstrengstructuur een duidelijk effect op de zweefdichtheid van het nucleïnezuur. In tabel 6 zijn de verschillen vermeld zoals gepubliceerd voor verschillende virus-RNA's en de daarbij behorende dubbelstrengige RNA's. Het verschil bedraagt

0,02-0,05 g/cm³. De zweefdichtheid van de dubbelstreng is ook afhankelijk van het G-C gehalte. Sueoka et al. (1959) gingen empirisch het verband na tussen het G-C gehalte van DNA en zijn zweefdichtheid in CsCl. Zij vonden een lineaire relatie waarbij de dichtheid met 0,00103 g/cm³ veranderde per procent verandering in G-C gehalte.

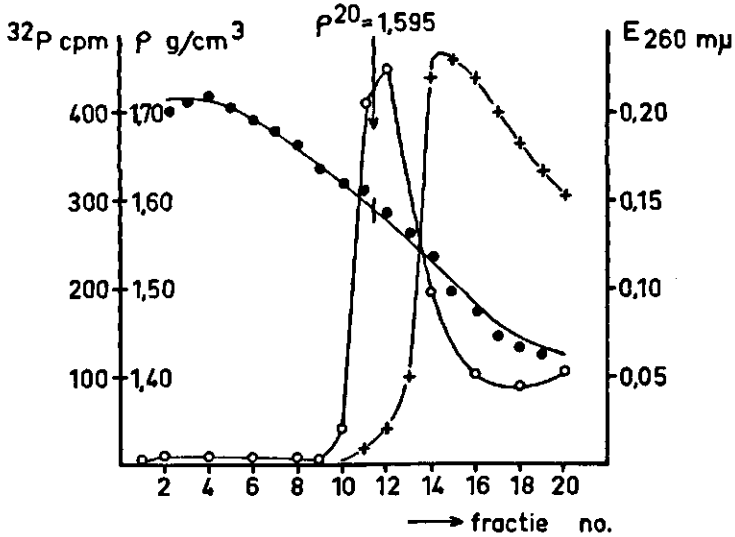


Figuur 18. De zweefdichtheid in Cs₂SO₄ van een aantal verschillende RNA's in relatie tot hun respectievelijke G-C gehalten. Door de punten werd de regressielijn getrokken.

RNA	G-C (%)	Dichtheid (g/cm ³)	Literatuurverwijzing
1 d.s. TMV-RNA	45,0	1,601	Burdon et al. (1964)
2 d.s. Encephalomyocarditis virus-RNA	47,0	1,57	Montagnier en Sanders (1963)
3 d.s. Poliovirus-RNA	49,0	1,60	Bishop en Koch (1967)
4 d.s. bacteriofaag R-17-RNA	51,2	1,606	Erikson en Franklin (1966)
5 d.s. bacteriofaag MS-2-RNA	52,0	1,609	Weissmann et al. (1964)
6 d.s. bacteriofaag fr-RNA	53,0	1,609	Kaerner en Hoffmann-Berling (1964)
7 d.s. TYMV-RNA	55,3	1,617	Bové (1967); Bockstahler (1968)

In figuur 18 is de zweefdichtheid in Cs₂SO₄ van een aantal dubbelstrengige RNA's uitgezet tegen hun respectievelijke G-C gehalten. Ook hier schijnt een lineair verband te bestaan tussen G-C gehalte en zweefdichtheid. Een regressielijn werd bepaald waarin de oudste waarneming, nl. die van Montagnier en Sanders (1963) over dubbelstrengig encephalomyocarditis virus-RNA wegens haar duidelijk afwijkende waarde, niet werd opgenomen. De helling van de lijn geeft een dichtheidsverschil per procent verandering in G-C gehalte van 0,00148 g/cm³. Hoewel deze waarde in dezelfde orde van grootte ligt als die bepaald voor DNA in CsCl moet in aanmerking genomen worden dat de hydratatioestand van polynucleotiden in Cs₂SO₄ geheel verschilt van die in CsCl (Hearst en Vinograd, 1961). Beide waarden mogen dan ook niet zonder meer met elkaar vergeleken worden.

Dubbelstrengig RNA gemerkt met ^{32}P werd bereid zoals beschreven in 4.4 en 4.5. 20 μg dubbelstrengig RNA (2500 cpm x 10) werd opgelost in 4,5 ml van een Cs_2SO_4 oplossing in 1 x SSC met een pycnometrisch bepaalde dichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$. Centrifugering in een evenwichtsgradiënt werd uitgevoerd in de Spinco SW 39.1 rotor bij 35.000 rpm gedurende 72 uur. De temperatuur was 15°C . Na de run werd de bodem van de buis doorgeprikt en fracties van 8 druppels (0,25 ml) werden opgevangen. De dichtheid der fracties werd pycnometrisch bepaald; de optische dichtheid werd bij 260 $\text{m}\mu$ gemeten in de spectrofotometer en de radioactiviteit werd bepaald als in 2.11 beschreven. Uit figuur 19 blijkt dat de radioactiviteitspiek niet samenviel met de



Figuur 19. De verdeling van de extinctie en radioactiviteit van tegen RNase resistent RNA, geïsoleerd uit met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad over een Cs_2SO_4 gradiënt na 72 uur centrifugeren in een Spinco SW 39.1 rotor bij 35.000 rpm en 15°C .

- o-o- de radioactiviteit
- +-+ de extinctie bij 260 $\text{m}\mu$
- de dichtheid van het Cs_2SO_4 in g/cm^3 .

absorptiepiek. De eerste heeft een zweefdichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$, de tweede van $1,53 \text{ g/cm}^3$. De zweefdichtheid van enkelstrengig CPMV-RNA van $1,628 \text{ g/cm}^3$ in aanmerking genomen en de gepubliceerde dichtheidsverschillen van $0,02-0,05 \text{ g/cm}^3$ (tabel 6) hierop toegepast geven aanleiding om te veronderstellen dat het RNA dat een band vormt bij een dichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$ het dubbelstrengig CPMV-RNA is. De ongevoeligheid voor RNase en het smeltpunt $T_m = 94^\circ \text{C}$ bevestigen deze veronderstelling.

RNA	Dichtheid in Cs_2SO_4 (g/cm^3)		Verschil
	enkelstreng	dubbelstreng	
TMV ¹⁾	1,640 ⁺	1,601	0,039
Poliovirus ²⁾	1,65	1,60	0,05
MS2-faag ³⁾	1,634	1,609	0,025
TYMV ⁴⁾	1,642	1,617	0,025

Tabel 6. De zweefdichtheid in Cs_2SO_4 van enkelstrengig RNA en homoloog dubbelstrengig RNA.

+ precipitaat

Literatuurverwijzingen:

1) Burdon et al. (1964)

3) Weissmann et al. (1964)

2) Bishop en Koch (1967)

4) Bové (1967)

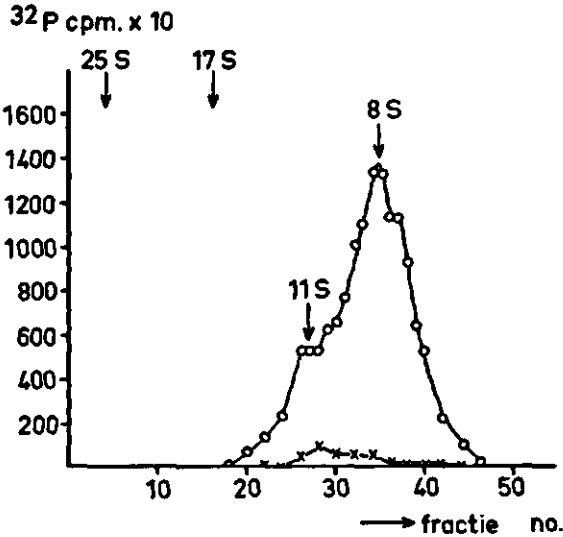
De aard van het kwantitatief belangrijkste bestanddeel van het nucleïnezuurmengsel laat zich moeilijk vaststellen. De vorm van de hyperchromiciteitscurven (fig. 15) wijst op een dubbelstrengstructuur. De zweefdichtheid in Cs_2SO_4 van $1,53 \text{ g}/\text{cm}^3$ lijkt te liggen tussen die van DNA en RNA en komt overeen met de zweefdichtheid van een DNA-RNA hybride. Chamberlin (1965) vermeldde voor de hybride rI : dC (polyriboïnosinezuur : polydesoxyribocytidylzuur) een dichtheid in Cs_2SO_4 van $1,54 \text{ g}/\text{cm}^3$. Geiduschek et al. (1962) en Chamberlin (1965) publiceerden hyperchromiciteitscurven voor DNA-RNA hybriden die overeenkomst vertoonden met die in figuur 15. Bovendien vertoonden deze DNA-RNA hybriden een grote mate van resistentie tegen RNase. Wellicht is het nucleïnezuur met een dichtheid van $1,53 \text{ g}/\text{cm}^3$ een hybride. De negatieve difenylamine reactie (zie 4.4) is dan waarschijnlijk een gevolg van een te laag DNA-gehalte van de getoetste preparaten.

De hoeveelheid tegen RNase resistent RNA die in 4.4 berekend werd op maximaal 0,1% van het totale gehalte aan RNA bestaat dus slechts voor één tiende uit dubbelstrengig RNA. De maximale opbrengst uit 100 gram bladmateriaal bleek na dichtheidsgradiëntcentrifugering nog slechts 10 μg dubbelstrengig RNA t.w 0,01% van het totale RNA-gehalte.

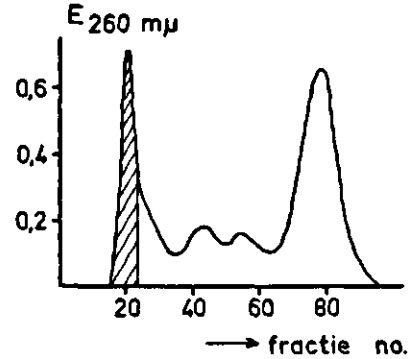
5.4 De sedimentatiecoëfficiënt

De bepaling van de lengte van het dubbelstrengige RNA was een van de meest belangwekkende experimenten in dit onderzoek. Het zou namelijk uitsluitsel geven omtrent de vraag of M-RNA en B-RNA als één RNA-keten gerepliceerd worden en pas daarna door een specifieke breuk als twee afzonderlijke RNA-ketens ontstaan. De andere mogelijkheid was dat beide RNA-ketens afzonderlijk gerepliceerd worden en er dus

twee dubbelstrengige RNA-ketens van verschillende lengte voorkomen. De meest voor de hand liggende methode om te bepalen of er moleculen van 2 verschillende lengten voorkomen was het meten van de sedimentatiecoëfficiënt.



Figuur 20.



Figuur 21.

Figuur 20. De verdeling van de radioactiviteit van tegen RNase resistent RNA uit *Vigna*-blad over een lineaire suikergradiënt van 5 tot 20% saccharose in 0,005 M Na_3EDTA , 1 x SSC. De sedimentatierichting is van rechts naar links. Fractionering geschiedde na 16 uur centrifugeren in de Spinco SW 25.1 rotor bij 23.500 rpm en 4°C .

- o-o- RNA uit met CPMV geïnfecteerde *Vigna*-planten
- x-x- RNA uit gezonde *Vigna*-planten.

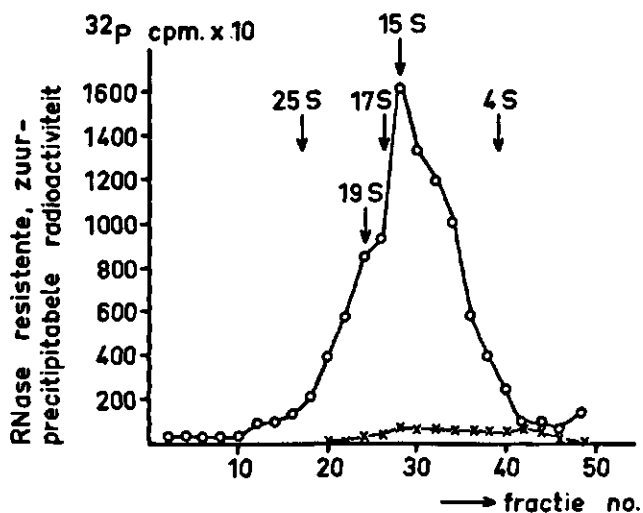
Figuur 21. De verdeling van de extinctie van een RNA-preparaat uit met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad over een Sephadex G 200 eluaat. Uit het preparaat was enkelstrengig RNA door middel van precipitatie met zout verwijderd. De afmetingen van de kolom waren $2,5 \times 35$ cm. De elutie geschiedde met 1 x SSC. Het volume der fracties bedroeg 2 ml. De fracties in het gearceerde gebied werden bij elkaar gevoegd en gebruikt voor fractionering op een suikergradiënt.

Wanneer dubbelstrengig RNA, gemerkt met ^{32}P en bereid als beschreven in 2.8 en 4.4, onderworpen werd aan een zonecentrifugering op een lineaire suikergradiënt van 5-20% dan bleek het RNA te sedimenteren in een brede band in het gebied met sedimentatiecoëfficiënten van 8-11 S. In figuur 20 zijn de resultaten van een dergelijk experiment weergegeven. Deze gevonden sedimentatiewaarde was geringer dan verwacht werd op grond van molecuulgewichtsberekeningen. Het lag voor de hand om aan te nemen

dat een partiële degradatie van het dubbelstrengig RNA ten gevolge van de incubatie met RNase tijdens de zuiveringsprocedure zou optreden (Billeter en Weissmann, 1966; Bockstahler, 1967). Om nu geen hinder van dit verschijnsel te ondervinden werd de zuiveringsmethode zodanig gemodificeerd dat de incubatie met RNase pas toegepast werd na fractionering van het RNA op een suikergradiënt.

Met ^{32}P gemerkt RNA werd bereid zoals beschreven in 4.4 en 4.5. Na de incubatie met DNase werd de oplossing op 2 M NaCl gebracht en bevroren. Het preparaat werd langzaam ontdooid bij 4°C en het uitgevlokte enkelstrengige RNA werd afgecentrifugeerd bij $15.000 \times g$. De bovenstaande vloeistof werd onderworpen aan gelfiltratie op een met 1 x SSC geëquilibreerde kolom van Sephadex G 200 (2,5 x 35 cm) om s-RNA en polyfenolen te verwijderen. In figuur 21 is een elutiepatroon van dit materiaal gegeven. Achtereenvolgens elueerden hoogmoleculair RNA, 2 fracties bestaande uit s-RNA en de polyfenolenfractie. De fractie, die onmiddellijk na het eigen volume van de kolom elueerde en die het meest hoogmoleculaire RNA bevatte en dus ook het dubbelstrengige RNA, werd opgevangen, geconcentreerd en gefractioneerd op een lineaire suikergradiënt van 5-20%. Na het opvangen der fracties werd elke fractie gefincubeerd met $10 \mu\text{g}$ RNase A en 5,0 U RNase T₁ bij 30° gedurende 30 minuten. Figuur 22 toont dat het tegen RNase resistente en dus dubbelstrengige RNA sedimenteerde met een piek bij 15 S en een schouder bij 18-19 S. De schouder bij 12 S was een aanwijzing, dat ook tijdens deze, gemodificeerde, extractieprocedure nog degradatie van het dubbelstrengige RNA optrad. Als controle werd dezelfde extractie en daaropvolgende behandeling uitgevoerd op nucleïnezuur, geïsoleerd uit de gezonde plant. Die controle is ook weergegeven in figuur 22 en daaruit blijkt dat in de gezonde plant geen tegen RNase resistent RNA aanwezig was.

Studier (1965) legde een verband tussen de sedimentatiecoëfficiënt (S) van dubbelstrengig DNA en zijn molecuulgewicht (M) : $S_{20,w} = 0,0882 \times M^{0,346}$. De grote overeenkomst in structuur en chemische samenstelling tussen dubbelstrengig DNA en dubbelstrengig RNA laten het gebruik van deze relatie ook voor dubbelstrengig RNA toe. Wanneer de in 3.1.2 berekende molecuulgewichten van M-RNA en B-RNA van respectievelijk $1,5 \times 10^6$ en $2,5 \times 10^6$ dalton met een faktor 2 vermenigvuldigd werden en gesubstitueerd in deze formule, werden theoretisch sedimentatiecoëfficiënten voor de corresponderende dubbelstrengige RNA's berekend op respectievelijk 15 S en 19 S. Daar de theoretisch berekende waarden fraai overeenkwamen met de experimenteel gevonden waarden van de tegen RNase resistente RNA-fracties was er aanleiding om te veronderstellen dat voor M-RNA en voor B-RNA een afzonderlijke dubbelstrengstructuur in de cel bestond. Het dubbelstrengige 12 S materiaal heeft volgens Studiers formule een molecuulgewicht van $1,5 \times 10^6$.



Figuur 22. De verdeling van de radioactiviteit van tegen RNase resistent RNA uit *Vigna*-blad over een lineaire suikergradiënt van 5 tot 20% saccharose in 0,005 M Na₃EDTA, 1 x SSC. De sedimentatierichting is van rechts naar links. Uit het preparaat was het enkelstrengige RNA tevoren verwijderd door precipitatie met zout. Het resulterende RNA was door middel van gelfiltratie (zie fig. 21) gescheiden in een hoogmoleculaire en een laagmoleculaire fractie. Het hoogmoleculaire RNA werd onderworpen aan de centrifugering in een suikergradiënt. Fractionering geschiedde na 14 uur centrifugeren in een Spinco SW 25.1 rotor bij 23.500 rpm en 4° C. De fractionering werd gevolgd door incubatie met RNase, zoals beschreven in de tekst.

-o-o- RNA uit met CPMV geïnfecteerde *Vigna*-planten

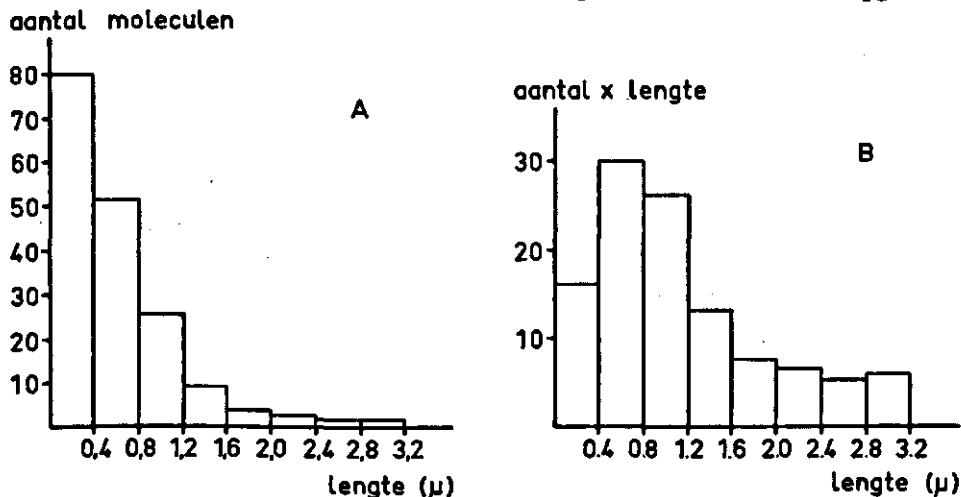
-x-x- RNA uit gezonde *Vigna*-planten.

5.5 De elektronenmicroscopie

Een andere methode om de afmeting van het geïsoleerde dubbelstrengige RNA te bestuderen is de elektronenmicroscopie (Kleinschmidt et al., 1962). Hiertoe wordt het nucleïnezuur gespreid op een wateroppervlak, vervolgens op de grid overgebracht en daarna onder een kleine hoek roterend geschaduw. Op deze wijze is het mogelijk dubbelstrengige nucleïnezuurketens in de elektronenmicroscopie zichtbaar te maken. De lengte van de deeltjes kan gemeten worden en hieruit kunnen molecuulgewichten bepaald worden. De te beschrijven experimenten werden opgezet om de veronderstelling, gemaakt aan het einde van 5.4, nl. het voorkomen van twee verschillende dubbelstrengige RNA's in *Vigna* na infectie met CPMV, te toetsen.

Dubbelstrengig RNA werd geïsoleerd zoals beschreven in 4.4 en vervolgens onder-

worpen aan een dichtheidsgradiëntcentrifugering in Cs_2SO_4 (zie 5.4). Het RNA met een zweefdichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$ ($4 \mu\text{g}$ in 1 ml Cs_2SO_4 oplossing) werd verzameld en gedurende 48 uur gedialyseerd tegen 2 maal 2 liter $0,5 \text{ M}$ NH_4 -acetaat. Preparaten voor elektronenmicroscopie werden vervaardigd door Dr. E.F.J. van Bruggen (Laboratorium voor Structuurchemie, R.U. Groningen) volgens een iets gemodificeerde methode van Kleinschmidt. De oplossingen bevatten $2 \mu\text{g}$ RNA per ml $0,02\%$ cytochroom C, $0,5 \text{ M}$ NH_4 -acetaat. Deze oplossingen werden via een vers gespleten micaplaatje gespreid op een $0,5 \text{ M}$ NH_4 -acetaat oplossing. Grids, voorzien van een koolvlies, werden gedurende ca. 1 minuut met het gespreide RNA in contact gebracht en vervolgens roterend geschaduw met 8 mg Pt-Ir (85/15) legering op een afstand van 5 cm onder een hoek van 7° bij een druk van minder dan 5×10^{-4} Torr. De preparaten werden bestudeerd in een Philips EM 300 elektronenmicroscop. De resultaten van de lengtemetingen van een aantal preparaten werden gecombineerd en staan afgebeeld in figuur 23 A. Hierin is de lengte der deeltjes uitgezet tegen de frequentie waarmee zij voorkomen in het preparaat. Om de figuur duidelijker en tevens vergelijkbaar te maken met de extinctiepatronen in figuur 20 en figuur 21 werd in figuur 23 B de lengte der deeltjes uitgezet tegen het produkt van hun frequentie en hun respectievelijke lengte. Alle RNA-deeltjes waren kleiner dan $3,2 \mu$, naarmate de deeltjes kleiner zijn kwamen zij in groter aantal in het preparaat voor. Uit beide figuren (fig. 23 A en B) blijkt dat de verklaring uit 5.4 voor de partiële afbraak van het dubbelstrengig RNA - namelijk de invloed van de incubatie met RNase tijdens de isolatieprocedure - ook hier opgaat.



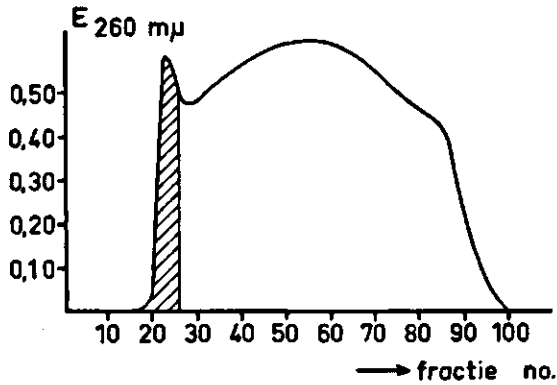
Figuur 23. Een histogram van voor CPMV specifiek dubbelstrengig RNA dat geïsoleerd was met behulp van RNase. De lengtemetingen werden verricht aan de hand van opnamen van het RNA met de elektronenmicroscop. In figuur A is een normaal histogram afgebeeld; in figuur B is op de ordinaat de hoeveelheid RNA (aantal x lengte) uitgezet.

De resultaten in figuur 23 B komen in sterke mate overeen met die in figuur 20.

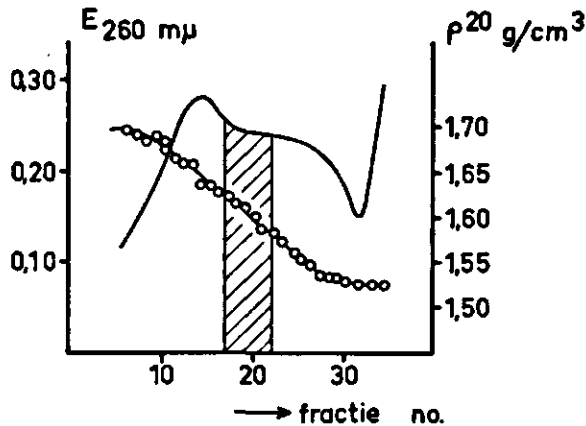
Molecuulgewichten voor dubbelstrengig RNA kunnen uit de lengten der deeltjes berekend worden. Bellamy et al. (1967) bepaalden voor reovirus-RNA een molecuulgewicht van $2,1 \times 10^6$ dalton/ μ . Arnott et al. (1967) vonden met röntgendiffractiemetingen voor reovirus-RNA echter $2,6 \times 10^6$ dalton/ μ . Granboulan en Franklin (1966) hadden een nauwkeurige meting uitgevoerd van de lengte van de RF van het bacteriofaag-R 17-RNA aan de hand van opnamen met de elektronenmicroscop. Zij berekenden hieruit een base translatie van $3,17 \text{ \AA}$ per residu. Deze waarde werd later bevestigd door Granboulan en Girard (1969) voor het enkelstrengige RNA van poliovirus.

Wanneer van de waarde van $3,17 \text{ \AA}$ per baseresidu en van een molecuulgewicht van 322 dalton per base gebruik gemaakt werd om de verwachte lengten van dubbelstrengig M-RNA en B-RNA te berekenen, dan werden lengten van respectievelijk $1,48 \mu$ en $2,45 \mu$ gevonden. Deeltjes met deze afmetingen kwamen in de preparaten - zij het in zeer geringe concentratie - wel voor. Er waren echter ook deeltjes met een lengte die niet verwacht werd, namelijk met een lengte groter dan $2,4 \mu$. De aard hiervan is niet met zekerheid vast te stellen.

Om geen hinder te ondervinden van de invloed van het RNase werd in een volgend experiment, evenals in 5.4, het enkelstrengige RNA met zout geprecipiteerd. Nucleïnezuur werd bereid uit geïnfecteerde primaire bladeren van *Vigna* als beschreven in 4.4 en 4.5. Na de incubatie met DNase werd de oplossing op een concentratie van 4 M NaCl gebracht en bevroren. Het preparaat werd langzaam ontdooid bij 4°C en het uitgevlokte enkelstrengige RNA werd afgecentrifugeerd bij $15.000 \times g$. De bovenstaande vloeistof werd onderworpen aan gelfiltratie op een met $1 \times \text{SSC}$ geëquilibreerde kolom van Sephadex G 200 ($2,5 \times 35 \text{ cm}$) om s-RNA en polyfenolen te verwijderen. De resultaten hiervan zijn afgebeeld in figuur 24. Uit vergelijking van figuur 21 met figuur 24 blijkt dat bij precipitatie met 4 M NaCl minder enkelstrengig RNA in het preparaat achterblijft dan bij precipitatie met 2 M NaCl. De fractie die onmiddellijk na het eigen volume van de kolom elueerde en die het dubbelstrengige RNA bevatte werd opgevangen, geconcentreerd en onderworpen aan evenwichtscentrifugering in een Cs_2SO_4 -gradiënt met een gemiddelde dichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$. Figuur 25 toont de verdeling van de extinctie van een dergelijk preparaat over de verschillende fracties van de dichtheidsgradiënt. De dichtheid van de gradiënt werd pycnometrisch bepaald. De fracties met een dichtheid tussen $1,58 \text{ g/cm}^3$ en $1,62 \text{ g/cm}^3$ werden verzameld, geconcentreerd en gedialyseerd tegen $0,5 \text{ M}$ NH_4 -acetaat. Daarna werden de preparaten op de hierboven beschreven wijze behandeld om met de elektronenmicroscop bestudeerd te worden. De opnamen werden gemaakt met een Siemens Elmiskop I. Figuur 26 toont een aantal dubbelstrengige RNA moleculen. Aan de hand van de resultaten van de lengtemetingen werden twee histogrammen opgesteld die in figuur 27 zijn afgebeeld. Hieruit blijkt dat thans - nu de incubatie met RNase tijdens de isolatieproef niet werd gebruikt - de resultaten duidelijk tonen dat er een tweetal preferente lengten zijn.



Figuur 24. De verdeling van de extinctie van een RNA-preparaat uit met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad over een Sephadex G 200 eluaat. Uit het preparaat was het enkelstrengige RNA verwijderd door middel van precipitatie met zout. De afmetingen der kolom waren 2,5 x 35 cm. De elutie geschiedde met 1 x SSC. Het volume der fracties bedroeg 2 ml. De fracties in het gearceerde gebied werden bij elkaar gevoegd en gebruikt voor verdere zuivering.



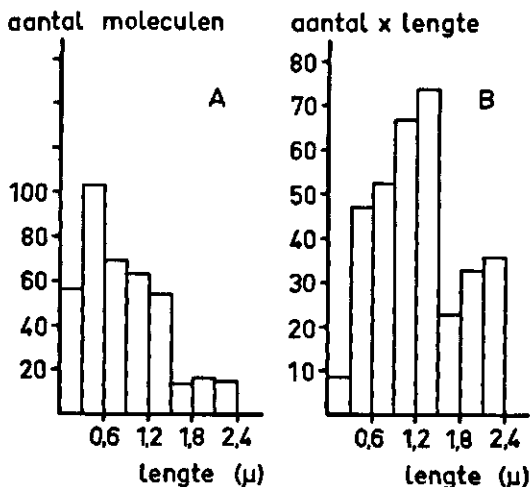
Figuur 25. De verdeling van de extinctie van een RNA-preparaat uit met CPMV geïnfecteerd *Vigna*-blad, waaruit door middel van precipitatie met zout het enkelstrengige RNA verwijderd was over een evenwichtsgradiënt in Cs₂SO₄. Het RNA was door middel van gelfiltratie (zie fig. 21) in een hoogmoleculaire en een laagmoleculaire fractie gescheiden. De hoogmoleculaire fractie werd aan de centrifugering in Cs₂SO₄ onderworpen. Fractionering geschiedde na 96 uur centrifugeren in een Spinco SW 25.1 rotor bij 20.000 rpm en 15° C. De fracties binnen het gearceerde gebied werden bij elkaar gevoegd en gebruikt voor elektronenmicroscopie.



Figuur 26. Een afbeelding van voor CPMV specifiek dubbelstrengig RNA dat geïsoleerd was met de methode waarbij enkelstrengig RNA door precipitatie met zout uit het preparaat verwijderd was. Het RNA werd met de z.g. Kleinschmidt-methode op een oppervlak van 0,5 M NH_4 -acetaat gespreid en op een objectdrager overgebracht. Nadat het RNA met een Pt-Ir legering roterend geschaduwd was werd het met de Siemens Elmiskop I bekeken. De opname werd gemaakt bij een vergroting van 10.000 maal. De eindvergroting bedraagt 47.200 maal.

Deze twee preferente lengten zijn, bij de gegeven intervallen van het histogram, 0,9-1,5 μ en 1,8-2,4 μ . De gemiddelde lengte van de deeltjes binnen deze intervallen bedraagt respectievelijk 1,2 μ en 2,05 μ . Dit betekent dat het molecuulgewicht $2,5 \times 10^6$ dalton per μ bedraagt voor de RF van CPMV-RNA. Deze waarde komt overeen met die door Arnott et al. (1967) gevonden voor het dubbelstrengige reovirus-RNA. Een statistische analyse van de meetgegevens werd niet uitgevoerd omdat de invloed van de bewerkingen tijdens de isolatieprocedure op de lengte van RNA-moleculen hierin niet verwerkt kan worden. Omdat de extractieprocedure de deeltjes wel kan afbreken doch niet langer kan maken moet meer waarde toegekend worden aan de langere deeltjes binnen de intervallen dan aan de kortere. Zeer belangrijk is dan ook dat geen dubbelstrengig RNA met een lengte groter dan 2,4 μ aanwezig bleek. Figuur 27 B toont verder een treffende overeenkomst met de figuur 22, waarin de resultaten van een gradiëntcentrifugering van dubbelstrengig RNA staan afgebeeld. Ook de schouder bij 12 S, waarvoor een lengte van 0,7 μ berekend werd, keert weer terug. De conclusie die

uit de elektronenmicroscopische waarnemingen werd getrokken was geheel overeenkomstig de conclusie volgend uit de sedimentatie-analyse. Daar de experimenteel gevonden lengten redelijk overeenkwamen met de verwachte lengten voor dubbelstrengig M-RNA en B-RNA werd evenals in 5.4 geconcludeerd dat voor M-RNA en voor B-RNA in de cel een afzonderlijke dubbelstrengstructuur bestaat.



Figuur 27. Een histogram van voor CPMV specifiek dubbelstrengig RNA dat met de methode, waarbij het enkelstrengig RNA uit het preparaat met zout verwijderd was, bereid was. De lengtemetingen werden verricht aan de hand van opnamen van het RNA met de elektronenmicroscop. In figuur A is een normaal histogram afgebeeld; in figuur B is op de ordinaat de hoeveelheid RNA (aantal x lengte) uitgezet.

6 De hybridisatie-experimenten

In dit hoofdstuk worden de experimenten besproken, die tot doel hebben basenvolgordeverwantschappen tussen M-RNA en B-RNA op te sporen. Het molecuulgewicht van M-RNA en B-RNA tezamen bedraagt $4,0 \times 10^6$ dalton (zie 3.2) en laat ruimte voor 12.000 nucleotiden. Wanneer aangenomen wordt dat een eiwit van gemiddelde grootte uit 250 aminozuren bestaat dan vereist de informatie op het boodschapper RNA voor zo een eiwit 750 nucleotiden. Zo gerekend kan CPMV-RNA een genetische informatie voor ongeveer 16 eiwitten dragen. Omtrent het aantal genen dat op het virus-RNA is gelegen is nog slechts weinig bekend. Van een aantal virussen was aangetoond dat wanneer in een eiwitsynthetiserend systeem van *E. coli* virus-RNA als boodschapper werd gebruikt, er een eiwit gesynthetiseerd werd dat gelijkenis vertoonde met het manteleiwit van het virus (Nathans et al., 1962; Clark et al., 1965; Van Ravenswaaij Claasen et al., 1967). Voor TMV was het bestaan van een manteleiwitgen echter reeds aangetoond (Wittmann, 1960; Tsugita en Fraenkel-Conrat, 1960). Kado en Knight (1966) vonden voor TMV een gen, verantwoordelijk voor de vorming van lokale vlekken op *Nicotiana glauca*. Tezamen met het bestaan van een virus-RNA replicase (zie 1.3) bracht dit het aantal genen waarvan bekend is dat zij op het RNA van plantevirussen gelegen zijn, op drie. De vraag lijkt gerechtvaardigd of M-RNA en B-RNA niet een of meer gelijke genen bevatten, met andere woorden of er geen sprake is van een duplicatie in genetische informatie binnen het CPMV-systeem. De hypothese van Wood en Bancroft (1965, zie 1.2.1) ten aanzien van het voorkomen van een, als gevolg van breuk, niet-functioneel gen op het B-RNA, zou dan een verklaring kunnen zijn voor de onderlinge afhankelijkheid van beide componenten, voor zover het de infectiositeit betreft. M-RNA zou dan hetzelfde wel-functionele gen bezitten.

Bij een duplicatie, zoals hierboven aangegeven, veroorzaken de op M-RNA en B-RNA gelegen identieke genen gebieden met een gelijke basenvolgorde op beide RNA's. Deze gebieden kunnen opgespoord worden met de techniek van de moleculaire hybridisatie.

Deze techniek werd oorspronkelijk ontwikkeld door Hall en Spiegelman (1961) om het complementair zijn in basenvolgorde na te gaan tussen bacteriofaag T₂-DNA en voor T₂-specifiek RNA. Hierbij werd dubbelstrengig nucleïnezuur gesmolten waarbij het uiteenviel in twee complementaire enkelstrengige ketens. Elk van de enkelstrengige ketens kon weer gebonden worden aan een complementaire keten van andere oorsprong. De mate, waarin de dubbelstrengige structuur nu weer optrad, gaf de mate waarin de basen complementair zijn weer en daarmee tevens de overeenkomst in basenvolgorde tussen de oorspronkelijke keten en de keten van andere oorsprong.

Bij dubbelstrengig RNA wordt de omzetting van dubbelstrengstructuur naar enkelstrengstructuur ook door smelten bewerkstelligd (zie 5.2). De eigenlijke hybridisatie wordt uitgevoerd door het gesmolten nucleïnezuur in aanwezigheid van overmaat

radioactief gemerkt virus-RNA gedurende enige uren te verwarmen op een temperatuur die $10-40^{\circ}$ C beneden de T_m ligt. Bij de detectie van gehybridiseerde stukken RNA wordt gebruik gemaakt van de resistentie van die dubbelstrengige stukken tegen RNase. Uit de hoeveelheid radioactiviteit, die opgenomen is in de tegen RNase resistente fractie, kan de mate van hybridisatie en dus van overeenkomst in basenvolgorde op eenvoudige wijze berekend worden.

Uit de mate van hybridisatie van respectievelijk M-RNA, B-RNA en M-RNA + B-RNA met de complementaire ketens van een dubbelstrengig CPMV preparaat, kan berekend worden of er overlapping optreedt in de genetische informatie. Op de methodiek hiervan zal in 6.2 nader ingegaan worden. Een experiment, waarbij verschillende hybridisatieniveaus onderling vergeleken worden, kan alleen tot een eenduidig resultaat leiden als de omstandigheden en de concentratie waarbij het RNA tot een maximale hybridisatiegraad leidt, bekend zijn (zie 6.1).

6.1 De verzadigingscurve

Het begrip verzadiging wordt bij de moleculaire hybridisatie gebruikt om bij bepaalde hybridisatieomstandigheden aan te geven dat het oorspronkelijke endogene RNA in de dubbelstrengige keten geheel vervangen is door toegevoegd homogeen exogeen RNA. Voor de bepaling van de verzadigingscurve van de negatieve RNA keten met het positieve CPMV-RNA werd een vaste hoeveelheid dubbelstrengig CPMV-RNA bij 105° C gesmolten; vervolgens werd met verschillende hoeveelheden radioactief gemerkt positief RNA een hybridisatie experiment bij 70° C uitgevoerd.

Dubbelstrengig RNA werd geïsoleerd, zoals beschreven in 4.4 en vervolgens onderworpen aan centrifugering in een dichtheidsgradiënt in Cs_2SO_4 (zie 5.4). Het materiaal dat een piek vormde met een gemiddelde dichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$ (de fractie tussen $1,58$ en $1,62 \text{ g/cm}^3$) werd na concentratie en dialyse voor de hybridisatieproeven gebruikt. Wanneer geen fractionering op een gradiënt van Cs_2SO_4 werd toegepast bleek geen hybridisatie waargenomen te kunnen worden. $2 \mu\text{g}$ dubbelstrengig CPMV-RNA werd met de gewenste hoeveelheid met ^{32}P gemerkt CPMV-RNA in $0,5 \text{ ml}$ $1 \times \text{SSC}$ gedurende 20 minuten op 105° C in een afgesloten capsule verwarmd. Na het smelten werd de temperatuur tot 70° C verlaagd en het mengsel werd gedurende 150 minuten bij deze temperatuur gefincubeerd. De buis werd vervolgens snel in ijs afgekoeld en tot een volume van $1,0 \text{ ml}$ met $1 \times \text{SSC}$ aangevuld. Hierna werd een incubatie met RNase uitgevoerd zoals beschreven in 2.12.2; tenslotte werd het tegen RNase resistente RNA met TCA neergeslagen en de radioactiviteit bepaald zoals beschreven in 2.11. Ongeveer 5% van de totale radioactiviteit van een met ^{32}P gemerkt preparaat van CPMV-RNA was na afloop van een incubatie met RNase nog met TCA neer te slaan. Deze eigenschap van het virus-RNA veroorzaakte bij alle hybridisatie-experimenten een hoge background van

radioactiviteit. Om verwarring te voorkomen was het noodzakelijk dat de specifieke radioactiviteit van het CPMV-RNA hoger was dan 2×10^5 cpm/mg.

μg CPMV-(+)-RNA (spec. act. $1,3 \times 10^6$ ^{32}P cpm/mg)	Tegen RNase resistente TCA precipitabele radioactiviteit na hybridisatiereactie (^{32}P cpm)	Berekende hybridisatiegraad
2,5	360	0,28
5,0	580	0,45
10,0	610	0,48
50,0	1300	1,00

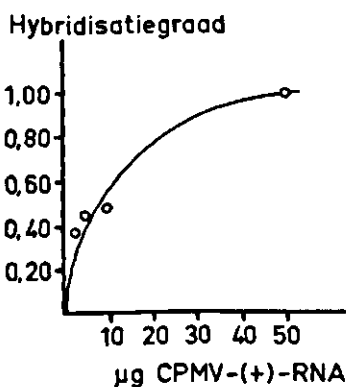
Tabel 7. De resultaten van de hybridisatiereactie tussen 1 μg CPMV(-)-RNA en toenemende hoeveelheden CPMV-(+)-RNA. De reactie werd uitgevoerd als beschreven in 6.1. De hybridisatiegraad werd berekend uit de hoeveelheid met TCA precipitabele tegen RNase resistente ^{32}P -radioactiviteit. De hybridisatiegraad geeft dat gedeelte van het in de dubbelstrengstructuur aanwezige endogene (+)-RNA aan, dat tijdens de reactie door exogeen radioactief (+)-RNA vervangen is.

In tabel 7 zijn de resultaten van de hybridisatiereactie tussen 1 μg CPMV(-)-RNA en toenemende hoeveelheden CPMV-(+)-RNA weergegeven. Uit de tegen RNase resistente met TCA neergeslagen radioactiviteit kon de gehybridiseerde hoeveelheid CPMV-(+)-RNA berekend worden. De hybridisatiegraad, die vermeld is in de laatste kolom van tabel 7, geeft de hoeveelheid gehybridiseerd CPMV-(+)-RNA in μg per μg CPMV(-)-RNA. Deze waarden zijn in figuur 28 grafisch weergegeven. Figuur 28 toont tevens dat een hybridisatiegraad van 1,00 bereikt werd, wanneer de concentratie aan CPMV-(+)-RNA 30 tot 40 maal de concentratie aan CPMV(-)-RNA bedroeg.

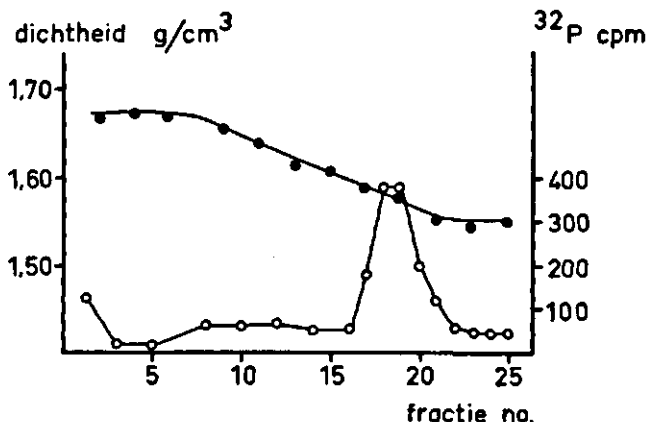
In een volgend experiment werd een analyse uitgevoerd van het bij de hybridisatiereactie gevormde produkt. Het hybridisatiemengsel werd na de reactie geïncubeerd met 0,5 μg RNase A/ml en 0,5 U RNase T₁, zoals beschreven in 2.12.2; en vervolgens onderworpen aan een centrifugering in een evenwichtsgradiënt van Cs_2SO_4 , zoals beschreven in 5.3. De resultaten, die afgebeeld zijn in figuur 29, wezen uit dat het gevormde radioactieve produkt een zweefdichtheid bezat van ongeveer $1,6 \text{ g/cm}^3$. Dit bewees dat exogeen radioactief virus-RNA was ingebouwd in de dubbelstreng en dat de hybridisatiereactie metterdaad verlopen was.

Bij de evaluatie van de hybridisatieverzadigingscurve dienen de volgende overwegingen in aanmerking genomen te worden. Normaliter bevatte een preparaat van CPMV-RNA evengrote gewichtshoeveelheden M-RNA als B-RNA. Dat het verzadigingsniveau van een hybridisatiereactie met CPMV-RNA bereikt werd bij 30 tot 40 maal de concentratie aan (-)-RNA, impliceerde niet, dat zowel voor M-RNA als voor B-RNA een 30 tot

40-voudige overmaat noodzakelijk was. Het dubbelstrengige RNA preparaat was namelijk zelf ook een mengsel van dubbelstrengig M-RNA en dubbelstrengig B-RNA, maar niet in een verhouding van één op één (zie fig. 22 en fig. 27). Figuur 28 gaf aan dat bij een 50-voudige overmaat aan CPMV-RNA in ieder geval een hybridisatiegraad van 1,0 bereikt was. Een dergelijk preparaat bevatte, zoals hierboven reeds vermeld, gelijke hoeveelheden M-RNA en B-RNA. Dan leidde in hetzelfde dubbelstrengige RNA preparaat een 25-voudige overmaat aan M-RNA (berekend per eenheid (M+B)-(-)-RNA) tot een hybridisatiegraad van 1,0 van het M-RNA met zijn homologe (-)-keten. Hetzelfde gold uiteraard voor B-RNA.



Figuur 28.



Figuur 29.

Figuur 28. Het verband tussen de hybridisatiegraad van 1 µg CPMV-(-)-RNA en de hoeveelheid CPMV-(+)-RNA die bij de hybridisatiereactie was toegevoegd. De lijn is gebaseerd op de waarden die in tabel 7 vermeld zijn.

Figuur 29. De verdeling van de radioactiviteit van het hybridisatiemengsel na afloop van de reactie over een evenwichtsgradiënt na 96 uur centrifugeren in een Spinco SW 25.1 rotor bij 20.000 rpm en 15° C.

- radioactiviteit
- dichtheid van het Cs₂SO₄ in g/cm³

6.2 De hybridisatie met M-RNA en B-RNA

Rekening houdende met de redenering aan het einde van 6.1, werd een aantal experimenten gedaan die tot doel hadden de eventuele gelijkheid in basenvolgorde tussen M-RNA en B-RNA te onderzoeken. 2 µg dubbelstrengig CPMV-RNA werd, onder omstandigheden als beschreven in 6.1, gehybridiseerd met respectievelijk M-RNA, B-RNA en met een mengsel van M-RNA en B-RNA. De gebruikte hoeveelheden van het enkelstrengige

hybridisatiegraad $0,15 + 10x$. Bij hybridisatie met exogeen M-RNA geldt dan een hybridisatiegraad van $0,85 + x$. De overlapping zoals die gemeten wordt bedraagt dus elf maal de werkelijke grootte van het gedeelte x . De berekening wordt nu:

Het totaal van de overlapping = gemeten hybridisatiegraad M-RNA + gemeten hybridisatiegraad B-RNA - gemeten (hybridisatiegraad mengsel M-RNA + B-RNA).

Hierin was het totaal van de overlapping $11x$. De gemeten hybridisatiegraad voor M-RNA en B-RNA bedroeg respectievelijk $0,14$ en $1,0$; voor het mengsel (M-RNA + B-RNA) was dit $1,0$. De overlapping x volgt nu uit:

$$11x = 1,0 + 0,14 - 1,0 = 0,14$$

en bedraagt $0,14/11$ te weten $0,013$ wat overeenkomt met $1,3\%$ van het genoom. Het molecuulgewicht van CPMV-RNA van $4,0 \times 10^6$ dalton laat ruimte voor ongeveer 12.000 nucleotiden. De lengte van het gedeelte x met gelijke basenvolgorde op M-RNA en B-RNA bedraagt dientengevolge 160 nucleotiden.

Het is duidelijk dat een dergelijk kleine overeenkomst in basenvolgorde bij de experimenten zoals die hier vermeld zijn ruim binnen de experimentele foutengrens valt. De voorlopige resultaten tonen dat M-RNA en B-RNA in genetische informatie nauwelijks enige overeenkomst vertonen. De zeer recente resultaten van Billeter et al. (1969) waarin aangetoond wordt dat van het RNA van de bacteriofaag Q8 de eerste 60 nucleotiden geen informatie voor een eiwit bevatten, doen veronderstellen dat het RNA-replicase omstreeks dat aantal nucleotiden ter herkenning vereist. In dat licht gezien is het niet onwaarschijnlijk dat twee RNA-ketens die in genetische informatie geheel verschillen doch voor hun vermeerdering vermoedelijk gebruik maken van hetzelfde replicase, een klein gedeelte bezitten met dezelfde basenvolgorde.

7 Samenvatting en discussie

In dit proefschrift worden de isolatie en de eigenschappen van de replicatieve vorm van het RNA van cowpea-mozaïekvirus besproken. Om over referentiegegevens te kunnen beschikken voor de zuivering van de RF werden eerst enige eigenschappen van het virus en zijn RNA bestudeerd. Nadat CPMV door middel van centrifugeren in een zonerotor in zijn componenten gescheiden was, werden de zweefdichtheden van de midden- en bodemcomponent bepaald. Deze bedroegen in CsCl respectievelijk $1,412 \text{ g/cm}^3$ en $1,469 \text{ g/cm}^3$. Uit beide gezuiverde nucleoproteïnecomponenten werd met fenol het RNA geëxtraheerd. In beide gevallen bleek dit RNA homogeen in de analytische ultracentrifuge. Het bezat sedimentatiecoëfficiënten van respectievelijk $26,4 \text{ S}$ en $33,5 \text{ S}$. Hieruit werden molecuulgewichten berekend van $1,5 \times 10^6$ dalton en $2,5 \times 10^6$ dalton. Het mengsel van beide RNA's vertoonde in een dichtheidsgradiënt in Cs_2SO_4 slechts één band. Deze bezat een gemiddelde zweefdichtheid van $1,628 \text{ g/cm}^3$.

Voor de isolatie van de RF van CPMV-RNA werd uitgegaan van een preparaat uit geïnfecteerde met ^{32}P gemerkte primaire bladeren van *Vigna*. Dit preparaat, dat uit een bladhomogenaat bereid werd door centrifugeren bij $15.000 \times \text{g}$, bestond voornamelijk uit chloroplasten, membranen en kernfragmenten, waaronder intacte nucleoli. De extractie van nucleïnezuur werd bij een hoge pH uitgevoerd met fenol in de aanwezigheid van Na-lauryl sulfaat. Om het preparaat in hoge mate vrij van eiwit te maken werd het nucleïnezuur neergeslagen met cetyltrimethylammoniumbromide en na wassen met alcohol weer opgelost. Het DNA werd uit de oplossing verwijderd met behulp van DNase en het enkelstrengige RNA werd gehydrolyseerd door middel van incubatie met RNase A en RNase T_1 . Het resulterende hoogmoleculaire nucleïnezuur werd van de hydrolyseproducten gescheiden door middel van gelfiltratie op een kolom van Sephadex G 200. Dit hoogmoleculaire met ^{32}P gemerkte nucleïnezuur bezat de eigenschappen, die voor de RF van CPMV-RNA verwacht mochten worden. Het was resistent tegen RNase in $1 \times \text{SSC}$ en gevoelig voor dit enzym in $0,1 \times \text{SSC}$. Het vertoonde in $1 \times \text{SSC}$ een scherp smelttraject met een T_m van 94°C , en bezat een zweefdichtheid van $1,60 \text{ g/cm}^3$. De opbrengst aan RF bleek $10 \mu\text{g}$ per 100 gram bladmateriaal te bedragen.

Voor de bepaling van de sedimentatiecoëfficiënt werd de isolatiemethode zodanig gewijzigd dat geen gebruik gemaakt werd van een incubatie met RNase om het enkelstrengige RNA uit de oplossing te verwijderen. Het enkelstrengige RNA werd met 2 M NaCl neergeslagen en afgecentrifugeerd; het resterende hoogmoleculaire RNA werd van het s-RNA gescheiden door gelfiltratie op een kolom van Sephadex G 200. Partiële degradatie van de RF ten gevolge van de invloed van RNase werd op deze wijze voorkomen. Het hoogmoleculaire RNA werd gefractioneerd op een lineaire suikergradiënt van 5 tot 20% en vervolgens werd de resistentie tegen RNase van alle fracties gemeten. Het dubbelstrengige RNA bleek te sedimenteren met een piek bij 15 S en een schouder bij

18 tot 19 S. Hieruit werden molecuulgewichten berekend van $2,8 \times 10^6$ dalton en $5,0 \times 10^6$ dalton. Dit leidde tot de veronderstelling dat CPMV na infectie de vorming van twee RF's zou induceren: één voor M-RNA en één voor B-RNA.

Een bevestiging van deze hypothese werd gezocht in een onafhankelijke bepaling van de lengte van de RF. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de elektronenmicroscopie. Dubbelstrengig RNA werd geïsoleerd met gebruikmaking van de methode van precipitatie met zout in plaats van incubatie met RNase om het enkelstrengige RNA uit de oplossing te verwijderen. Het resterende hoogmoleculaire RNA werd na gelfiltratie op een kolom van Sephadex G 200 onderworpen aan centrifugering in een dichtheidsgradiënt in Cs_2SO_4 . De fracties, die een dichtheid bezaten tussen $1,58 \text{ g/cm}^3$ en $1,62 \text{ g/cm}^3$ werden gebruikt voor de elektronenmicroscopie. Lengtemetingen wezen uit dat in de preparaten deeltjes voorkwamen met een tweetal preferente lengtetrajecten, te weten $0,9\text{-}1,5 \mu$ en $1,8\text{-}2,4 \mu$ respectievelijk. Deze trajecten kwamen overeen met die waarin de RF's van M-RNA en B-RNA verwacht werden.

Tenslotte is een hoofdstuk gewijd aan de experimenten met betrekking tot de moleculaire hybridisatie van de in de dubbelstrengige structuur voorkomende negatieve RNA ketens met exogene positieve CPMV-RNA ketens. Een verzadigingscurve wees uit dat bij de gegeven omstandigheden het negatieve RNA voor 100% hybridiseerde bij een 30 tot 40-voudige overmaat aan exogeen CPMV-RNA in het reactiemengsel. De voorlopige resultaten uit experimenten, waarbij aan het reactiemengsel alleen exogeen M-RNA of alleen exogeen B-RNA werd toegevoegd, wezen uit dat het mengsel van negatieve RNA ketens voor 85% hybridiseerde met M-RNA en voor 14% met B-RNA. Deze beide percentages die het kwantitatieve aandeel van M(-)-RNA en B(-)-RNA in het mengsel reflecteren en waarvan de somming ongeveer 100% bedraagt tonen aan dat er geen gelijkheid in basenvolgorde tussen M-RNA en B-RNA bestaat. Beide RNA-ketens dragen bijgevolg een verschillende genetische informatie.

Over de karakterisering van CPMV en zijn RNA laten zich slechts weinig opmerkingen maken. De methoden die gebruikt werden zijn reeds sinds kortere of langere tijd beschreven en zij leveren - vooropgesteld dat zij op de juiste wijze toegepast worden - reproduceerbare resultaten. De criteria die gebruikt werden voor de bepaling van het al of niet zuiver zijn van de afzonderlijke componenten van het virus zijn biologisch en berusten op het afwezig zijn van infectiositeit in de afzonderlijke componenten. Zelfs zeer geringe verontreinigingen van de ene component met de andere kunnen op deze wijze worden nagegaan (Van Kammen, 1968; Van Kammen en Van Griensven, 1970). De in 2.3 beschreven methode van de scheiding der componenten is hierop gebaseerd. De methode die gebruikt werd om RNA te isoleren uit het blad van *Vigna* (4.1), leverde een hoeveelheid RNA die praktisch overeenkwam met de totaal aanwezige hoeveelheid, te weten 1 mg RNA per gram blad. Deze hoeveelheid is 1,5 tot 4 maal hoger dan die door Solymosy et al. (1968) gevonden werd voor boon (*Phaseolus vulgaris*). Aan de hand van ultracentrifugepatronen werd aangetoond dat

de gevolgde extractiemethode geen degradatie van het RNA opleverde. Van groot belang bleek de zuiveringsstap, die bestond uit precipitatie van het nucleïnezuur met cetyltrimethylammoniumbromide, gevolgd door wassen van het precipitaat met 70% ethanol. Deze behandeling verlaagde de hoeveelheid nog in het preparaat aanwezig eiwit met een faktor 10, dat wil zeggen tot een niveau van minder dan 2 µg eiwit per mg RNA. Solymosy et al. (1968), die geen cetyltrimethylammoniumbromide gebruikten, gaven eiwitgehalten voor nucleïnezuurpreparaten uit bonebladeren, die variëerden van 24 tot 45 µg eiwit per mg nucleïnezuur. Deze zuiveringsstap bleek noodzakelijk om een smeltpunt van het voor CPMV specifieke dubbelstrengige RNA te kunnen bepalen. Wanneer de precipitatie met cetyltrimethylammoniumbromide achterwege werd gelaten en het dubbelstrengige RNA na isolatie met pronase werd geïncubeerd als beschreven in 2.13.3 om resterend eiwit te hydrolyseren, dan was het niet mogelijk het dubbelstrengige RNA te smelten.

De methode die gevolgd werd om tegen RNase resistent RNA te isoleren en die berust op de hydrolyse van enkelstrengig RNA met RNase gevolgd door gelfiltratie op Sephadex om de hydrolyseproducten uit het preparaat te verwijderen, is zeer gebruikelijk (Burdon et al., 1964; Bové, 1967; Bockstahler, 1967). Het produkt van deze procedure was een tegen RNase resistente fractie die in een dichtheidsgradiënt in Cs_2SO_4 twee banden vormde. Een van deze banden bevatte RNA dat de dichtheid en het smeltpunt bezat die op grond van literatuurgegevens (zie 5.1 tot en met 5.3) verwacht werden voor de RF van CPMV-RNA. De aard van het nucleïnezuur in de andere band is vooralsnog onbekend. De aanwezigheid van dit materiaal dat 90% van het tegen RNase resistente nucleïnezuur uitmaakte, leidde tot een extra zuiveringsstap, namelijk een fractionering in een dichtheidsgradiënt. De aldus geïsoleerde hoeveelheid dubbelstrengig, voor CPMV specifiek RNA bedroeg 10 µg per 100 gram geïnfecteerd blad. Deze hoeveelheid is een faktor 10 lager dan die door Bockstahler (1967) gevonden voor dubbelstrengig RNA geïsoleerd uit Chinese-koolplanten die met TYMV geïnfecteerd waren. Ook Burdon et al. (1964) en Ralph et al. (1965) geven hogere opbrengsten voor respectievelijk dubbelstrengig TMV-RNA en dubbelstrengig TYMV-RNA. Opgemerkt dient echter te worden dat ook 10 µg dubbelstrengig RNA per 100 gram blad een voldoende hoeveelheid template vormt om de synthese van 150 µg RNA (fig. 8 A) per dag mogelijk te maken (zie ook Fong, 1964).

Het dubbelstrengige RNA dat op bovenstaande wijze geïsoleerd was bleek in een suikergradiënt te sedimenteren met een piek bij 8 S en een schouder bij 11 S (fig. 20). Deze lage sedimentatiewaarde wijst op een partiële degradatie van het dubbelstrengige RNA. Ditzelfde werd door Ralph et al. (1965), Billeter en Weissmann (1966) en door Wolstenholme en Bockstahler (1967) gevonden voor de dubbelstrengige RNA's specifiek voor respectievelijk TYMV, bacteriofaag MS-2, TYMV en TMV. Zij schreven het toe aan de invloed van de incubatie met RNase die bij de isolatie toegepast werd.

Zo ook hier, wanneer namelijk het enkelstrengige RNA door precipitatie met 2 M NaCl uit de oplossing verwijderd was, bleek het dubbelstrengige RNA in een suikergradiënt te sedimenteren met een piek bij 15 S en een schouder bij 18-19 S (fig. 22). Dit bewijst dat inderdaad minder fragmentatie optreedt wanneer geen gebruik gemaakt wordt van een incubatie met RNase.

De hypothese die op grond van de gevonden sedimentatiecoëfficiënten werd opgesteld, namelijk dat voor beide RNA-componenten van het CPMV in de plant een eigen RF gevormd zou worden, wordt door de resultaten van de lengtemetingen met de elektronenmicroscopie gesteund. Voor de bereiding van het intact dubbelstrengig RNA werd de in 5.5 beschreven methode opgesteld, die een preparatieve variant is van de methode die gebruikt werd om de sedimentatiecoëfficiënten van het intacte dubbelstrengige RNA te meten. Na de precipitatie van het enkelstrengige RNA met zout en de daaropvolgende gelfiltratie werd het resterende hoogmoleculaire RNA gefractioneerd op een dichtheidsgradiënt. Het RNA met de zweefdichtheid van de RF (zie 5.3) werd opgevangen en gebruikt voor de elektronenmicroscopie. Het is uitgesloten dat de opnamen die met de elektronenmicroscopie gemaakt werden betrekking hebben op enkelstrengig CPMV-RNA. Hiervoor gelden de volgende overwegingen.

- De voor de elektronenmicroscopie gevolgde methode maakt alleen dubbelstrengige nucleïnezuurmoleculen zichtbaar.
- Enkelstrengig RNA precipiteert in oplossingen met een hoge Cs_2SO_4 concentratie (Lozeron en Szybalski, 1966).
- Het enkelstrengige RNA is met zout uit het preparaat neergeslagen en afgecentrifugeerd.
- Er is geen of slechts weinig CPMV of CPMV-RNA aanwezig in een preparaat, waarin zich chloroplasten, kernfragmenten en nucleoli bevinden.

De resultaten van de lengtemetingen (fig. 23, fig. 26) bewijzen nogmaals dat incubatie met RNase een fragmentatie van het dubbelstrengige RNA veroorzaakt. Bovendien tonen zij dat de methode die gebruik maakt van precipitatie met zout, gelfiltratie en fractionering in een dichtheidsgradiënt weinig afbraak van het dubbelstrengige RNA ten gevolge heeft. De hypothese dat CPMV in de plant de vorming van twee RF's zou bewerkstelligen wordt door de resultaten bevestigd. In de literatuur zijn slechts weinig succesvolle elektronenmicroscopische metingen van dubbelstrengig RNA beschreven. Alleen de resultaten van de lengtemetingen die Granboulan en Franklin (1966) deden aan de RF van het RNA van bacteriofaag R 17 kwamen overeen met de lengten berekend uit het molecuulgewicht van het R 17-RNA. Voor plantevirussen zijn tot dusverre geen succesvolle experimenten gepubliceerd. Wolstenholme en Bockstahler (1967) bestudeerden de lengteverdelingen van dubbelstrengig TMV-RNA en dubbelstrengig TYMV-RNA en vonden dat minder dan 1% van het aantal gemeten deeltjes de verwachte lengte bezat. Zij schreven dit toe aan de invloed van de incubatie met

RNase tijdens de isolatieprocedure. Nicolaieff et al. (1964) maakten om deze rede gebruik van chromatografie op kolommen van hydroxyapatiet om het dubbelstrengig RNA uit met luzerne-mozaïekvirus geïnfecteerde planten te zuiveren. De lengtemetingen die zij verrichtten hadden echter geen beter resultaat en moleculen met de verwachte lengten kwamen in wezen niet voor.

De voorlopige resultaten van de hybridisatieexperimenten tonen in de eerste plaats dat de preparaten van dubbelstrengig RNA zeer zuiver zijn. Dit blijkt uit de hybridisatiegraad van 1,0 die zowel met het mengsel bij het bepalen van de verzadigingscurve (fig. 28) bereikt wordt als bij de experimenten met M-RNA en B-RNA (tabel 8). Dat de hybridisatiereactie werkelijk verlopen is, blijkt uit de dichtheid van het gevormde radioactieve produkt (fig. 29). De moleculaire hybridisatie vormt tevens het directe bewijs dat het geïsoleerde dubbelstrengige RNA specifiek is voor CPMV. Billeter en Weissmann (1966) geven een hybridisatiegraad op van 0,972 voor MS-2 RNA met zijn homologe negatieve keten. Voor plantevirussen zijn weinig gegevens beschikbaar. Noch Shipp en Haselkorn (1964) noch Burdon et al. (1964) geven waarden op waaruit de hybridisatiegraad van TMV-RNA met zijn homologe negatieve keten berekend kan worden. Ook Pinck et al. (1968) gebruiken de moleculaire hybridisatie slechts om aan te tonen dat in hun preparaten dubbelstrengig RNA - in dit geval specifiek voor luzerne-mozaïekvirus - aanwezig is. Uit de resultaten van Bové (1967^b) laat zich een hybridisatiegraad van 0,72 berekenen voor het geval van TYMV-RNA met zijn homologe negatieve keten. Het is duidelijk dat de door ons bereikte hybridisatiegraad van 1,0 een grote mate van zuiverheid reflecteert.

De experimenten beschreven in 6.2 met betrekking tot de hybridisatie met de afzonderlijke M-RNA en B-RNA ketens geven nog slechts voorlopige resultaten. Het onderzoek dient te worden voortgezet alvorens een zekere uitspraak gedaan kan worden.

8 Summary

Purified infectious preparations of cowpea mosaic virus (CPMV) consist of three centrifugal components with sedimentation coefficients of 58, 95 and 115 *S*. These are referred to as top (T), middle (M) and bottom (B) component and contain 0, 24 and 33% RNA respectively (Van Kammen, 1967). All three components are isometric particles with a diameter of 28 μ and have serologically similar capsids. Van Kammen (1968) demonstrated that both RNA-containing components of the virus are necessary for infection.

This thesis deals with the isolation and properties of the replicative form (RF) of CPMV-RNA. Some properties of the virus and its RNA are studied to provide reference values for the isolation of the RF.

After the virus had been separated into its components by means of centrifugation in a zonal rotor, the buoyant densities of middle and bottom component were determined in a CsCl gradient. They proved to be 1.412 g/cm^3 and 1.469 g/cm^3 respectively. From both middle and bottom component the RNA was extracted with phenol. This RNA was homogeneous in the analytical ultracentrifuge and had sedimentation coefficients of 26.4 *S* and 33.5 *S* respectively. By applying Spirin's (1963) relationship between the sedimentation coefficient of an RNA and its molecular weight ($M = 1550 \times S^{2.1}$) molecular weights were calculated as 1.5×10^6 dalton and 2.5×10^6 dalton for middle and bottom component RNA. In a Cs_2SO_4 gradient the mixture of both RNAs showed only one band with a mean density of 1.628 g/cm^3 .

The RF was isolated from CPMV-infected primary leaves of *Vigna unguiculata*. After homogenization of the leaves the fraction sedimenting at 15,000 \times g was used for extraction of the RNA. This fraction consisting mainly of chloroplasts, membranes, nuclear fragments and nucleoli was suspended in a small volume of a buffer solution composed of 0.1 M glycine + NaOH pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.005 M Na_3EDTA , 1% sodium-dodecylsulphate and 3% diethylpyrocarbonate. This mixture was deproteinized by three extractions with phenol. The nucleic acid was precipitated as the quaternary ammonium salt by adding 0.33% cetyltrimethylammoniumbromide. The precipitate was collected by centrifugation and by repeated washing with 0.1 M sodiumacetate in 70% alcohol converted into the sodium salt. This treatment removed even small traces of protein from the nucleic acid preparation. DNA was broken down by DNase and the single-stranded RNA was hydrolyzed by incubation with RNase A and RNase T_1 . Subsequently the solution was passed through a Sephadex G 200 column (2.5 \times 35 cm) to separate the breakdown products from the remaining high molecular weight material. The sharp frontrunning peak was collected. The nucleic acid in this peak proved to have the properties expected for the RF of CPMV-RNA. It was RNase

resistant in 1 x SSC. It showed a sharp helix-coil transition curve in 1 x SSC with a T_m of 94° C as measured by the temperature dependent RNase resistance. Its buoyant density proved to be 1.60 g/cm^3 .

The yield of RF was 10 μg per 100 g of leaf material. A modified isolation procedure was worked out for the determination of the sedimentation coefficient of the RF. To overcome breakdown due to the effect of the RNase incubation, the single-stranded RNA was precipitated in high salt. For this the RNA solution was brought to 2 M NaCl and frozen at -20° C. After slowly thawing at 4° C the precipitated single-stranded RNA was centrifuged off. The resulting supernatant, containing the double-stranded RNA, s-RNA and some contaminating single-stranded RNA, was subjected to gel filtration on a Sephadex G 200 column (2.5 x 35 cm). The peak eluting just after the void volume of the column was collected and centrifuged on a 5 to 20% linear sucrose gradient. After centrifugation the gradient was fractionated and each fraction was tested for RNase resistance. The RF sedimented with a peak at 15 S and a shoulder at 18 to 19 S. Studier's (1965) formula ($S_{20, w} = 0.0882 \times M^{0.346}$) permits the calculation of the molecular weight of double-stranded RNA from its sedimentation coefficient. The molecular weights calculated were 2.8×10^6 dalton and 5.0×10^6 dalton. This suggested that there are two RFs in plants infected by CPMV: one for the middle component RNA and one for the bottom component RNA.

Electron microscopy provided independent data on the length distribution of the double-stranded RNA. Again the single-stranded RNA was precipitated from the RNA solution by treatment with high salt as described above. After gel filtration the peak eluting just after the void volume of the column was collected and subjected to equilibrium centrifugation in a Cs_2SO_4 gradient with a starting density of 1.60 g/cm^3 . After equilibrium had been reached, the material banding at a density between 1.58 g/cm^3 and 1.62 g/cm^3 was collected and used for electron microscopy. Electron microscopy was carried out according to the spreading method of Kleinschmidt et al. (1962). The frequency distribution of the lengths of 397 molecules showed that molecules varied in length from 0.1μ to 2.4μ . No molecules longer than 2.4μ were found. The relative frequency distribution of the length of the double-stranded RNA, i.e. the amount of RNA (number of molecules x length) having a certain length, indicated that a large amount of the double-stranded RNA consisted of molecules of the expected length of 1.48μ and 2.45μ respectively, which was calculated from the base translation of 3.17 \AA published by Granboulan and Franklin (1966). This again suggested that both middle component RNA and bottom component RNA each induce their own replicative structure.

The double-stranded RNA has been used in molecular hybridization experiments with viral RNA and RNA of the separate components. A saturation curve was determined to gain information on the amount of single-stranded ^{32}P -labeled RNA necessary to

replace the homologous RNA completely from the double-stranded structure. Two micrograms of double-stranded RNA were heated for 20 minutes in a closed tube with increasing amounts of ^{32}P -labeled CPMV-RNA to 105°C to get separation of the strands of the double-stranded structure. Thereafter the tube with the hybridisation mixture was kept at 70°C for 2 hours to obtain annealing of the complementary strands. The tube was cooled on ice, opened and the mixture was incubated with $100\ \mu\text{g}$ RNase A and $150\ \text{U}$ RNase T_1 to break down the single-stranded RNA. The RNase-resistant RNA was precipitated with TCA and collected on millipore filters. The amount of annealed exogenous RNA was determined from the radioactivity of the RNase-resistant RNA. With $2\ \mu\text{g}$ double-stranded RNA, saturation was reached at $50\ \mu\text{g}$ of virus-RNA.

The hybridization product was subjected to equilibrium centrifugation in a Cs_2SO_4 gradient and was shown to have a density of $1.58\ \text{g}/\text{cm}^3$. This proved that a true hybrid was formed during the annealing process.

Hybridization was also carried out with separate middle and bottom component RNAs. The preliminary results show that with middle component RNA alone 85% of the maximum hybridization level was reached, and with bottom component RNA alone 14%. Turnip yellow mosaic virus RNA did not give any hybridization. These results suggest that M-RNA and B-RNA hybridized independently with the minus strands of the double-stranded structures, which indicates that no overlap occurs in base sequence between M-RNA and B-RNA. This means that M-RNA and B-RNA do not have any genes in common.

The final conclusion is that the cowpea mosaic virus genome consists of two different pieces of RNA, both carrying a different part of the genetic information of the virus and both inducing their own replicative structure in the host cell.

Literatuur

- Agrawal, H.O. (1964). Identification of cowpea mosaic virus isolates. Meded. Landb-Hogesch., Wageningen, 64-5.
- Amman, J., Delius, H. en Hofschneider, P.H. (1964). Isolation and properties of an intact phage-specific replicative form of RNA phage M12. J. Mol. Biol. 10, 557-561.
- Arnott, S., Wilkins, M.H.F., Fuller, W. en Langridge, R. (1967). Molecular and crystal structure of double-helical RNA. II. Determination and comparison of diffracted intensities for the α and β crystalline forms of reovirus RNA and their interpretation in terms of groups of three RNA molecules. J. Mol. Biol. 27, 525-531.
- Aten, J.B.T. (1965). Sedimentatiesnelheid en viscositeit van desoxyribonucleïnezuur met groot molecuulgewicht. Proefschrift Leiden. Enroprint, Rijswijk.
- Bancroft, J.B. (1962). Purification and properties of bean pod mottle virus and associated centrifugal and electrophoretic components. Virology 16, 419-427.
- Bancroft, J.B. (1968). Tomato Top Necrosis Virus. Phytopathology 58, 1360-1363.
- Bancroft, J.B. en Kaesberg, P. (1960). Macromolecular particles associated with alfalfa mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta 39, 519-528.
- Bancroft, J.B. en Key, J.L. (1964). Effect of actinomycin D and ethylenediamine tetraacetic acid on the multiplication of a plant virus in etiolated soybean hypocotyls. Nature 202, 729-730.
- Beemster, A.B.R. (1957). Onderzoekingen over een virusziekte bij stoppelknollen (*Brassica rapa* var. *rapifera*). Tijdschr. PlZiekt. 63, 1-12.
- Bellamy, A.R., Shapiro, L., August, J.F. en Joklik, W.K. (1967). Studies on reovirus RNA. I. Characterization of reovirus genome RNA. J. Mol. Biol. 29, 1-17.
- Billeter, M.A., Dahlberg, J.E., Goodman, H.M., Hindley, J. en Weissmann, C. (1969). Sequence of the first 175 nucleotides from the 5' terminus of Q β RNA synthesized in vitro. Nature 224, 1083-1086.
- Billeter, M.A., Libonati, M., Vinuela, E. en Weissmann, C. (1966). Replication of viral ribonucleic acid. X. Turnover of virus-specific double stranded ribonucleic acid during replication of phage MS2 in *E. coli*. J. Biol. Chem. 241, 4750-4757.
- Billeter, M.A. en Weissmann, C. (1966). Double-stranded MS2 RNA from MS2-infected *Escherichia coli*. In: "Procedures in nucleic acid research". Cantoni and Davies Eds. Harper and Row, New York and London, 498-512.
- Bishop, J.M. en Koch, G. (1967). Purification and characterization of poliovirus-induced infectious double-stranded ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 242, 1736-1743.
- Bishop, D.H.L., Pace, N.R. en Spiegelman, S. (1967). The mechanism of replication: A novel polarity reversal in the in vitro synthesis of Q β -RNA and its complement. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 1790-1797.

- Bockstahler, L.E. (1967). Biophysical studies on double-stranded RNA from turnip yellow mosaic virus-infected plants. *Molec. Gen. Genetics* 100,337-348.
- Bové, J.M. (1966). Forme répliquative de RNA du virus de la mosaïque jaune du navet: synthèse asymétrique in vitro. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.* 12,307-324.
- Bové, J.M. (1967). Virus de la mosaïque jaune du navet: synthèse asymétrique in vitro d'un segment de RNA viral. Thèse de doctorat d'Etat ès Sci. Nat., NO CNRS A01289, Paris.
- Bové, J.M. (1967^b). RNA bicaténaire spécifique du virus de la mosaïque jaune du navet: expérience de dilution spécifique. *C.R. Soc. Biol., Paris* 161,537-542.
- Bové, J.M., Bové, C., Rondot, M.J. en Morel, G. (1965). Chloroplasts and virus-RNA synthesis. In: "Biochemistry of chloroplasts" II. Goodwyn T.W. Ed. Aberystwyth, Wales, U.K. 19-28th Aug. 1965,329-339.
- Bruening, G. (1969). The inheritance of top component formation in cowpea mosaic virus. *Virology* 37,577-584.
- Bruening, G. en Agrawal, H.O. (1967). Infectivity of a mixture of cowpea mosaic virus nucleoprotein components. *Virology* 32,306-320.
- Burdon, R.H., Billeter, M.A., Weissmann, C., Warner, R.C., Ochoa, S. en Knight, C.A. (1964). Replication of viral RNA. V. Presence of a virus specific double-stranded RNA in leaves infected with TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52,768-775.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenyl amine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62,315-323.
- Cadman, C.H. (1962). Evidence for association of tobacco rattle virus nucleic acid with a cell component. *Nature* 193,49-52.
- Campbell, R.N. (1964). Radish mosaic virus, a crucifer virus serologically related to strains of bean pod mottle virus and to squash mosaic virus. *Phytopathology* 54,1418-1424.
- Chamberlin, M.J. (1965). Comparative properties of DNA, RNA and hybrid homopolymer pairs. *Fed. Proc.* 24,1446-1457.
- Cherry, J.H. (1964). Association of rapidly metabolized DNA and RNA. *Science* 146, 1066-1069.
- Clark, J.M., Chang, A.Y. en Spiegelman, S. (1965). The in vitro translation of a monocistronic message. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 54,1193-1197.
- Click, R.E. en Hackett, D.P. (1966). The isolation of ribonucleic acid from plant, bacterial or animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 129,74-84.
- Cooper, S. en Zinder, N.D. (1962). The growth of an RNA bacteriophage: The role of DNA synthesis. *Virology* 18,405-411.
- Dale, W.T. (1949). Observations on a virus disease of cowpea in Trinidad. *Ann. Appl. Biol.* 36,327-333.

- Davis, J.E. en Sinsheimer, R.L. (1963). The replication of bacteriophage MS2. I. Transfer of parental nucleic acid to progeny phage. *J. Mol. Biol.* 6,203-207.
- De Jager, C.P. en Van Kammen, A. (1970). The relationship between the components of cowpea mosaic virus. III. Location of genetic information for two biological functions on the middle component of CPMV. *Virology*, ter perse.
- Diener, T.O. en Schneider, I.R. (1966). The two components of tobacco ringspot virus nucleic acid: origin and properties. *Virology* 29,100-105.
- Dische, Z. (1955). Color reactions of nucleic acid components. In: "The nucleic Acids", E. Chargaff and J.W. Davidson Eds. Academic Press, New York, I,285.
- Doi, R.H. en Spiegelman, S. (1963). Conservation of a viral RNA genome during replication and translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49,353-360.
- Eigner, J., Schildkraut, C. en Doty, P. (1962). Concentration effects in the hydrodynamic properties of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 55,13-21.
- Eikhom, T.S. en Spiegelman, S. (1967). The dissociation of Q β -replicase and the relation of one of the components to a poly-C-dependent poly-G-polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,1833-1840.
- Eikhom, T.S., Stockley, D.J. en Spiegelman, S. (1968). Direct participation of a host protein in the replication of viral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59,506-512.
- Erikson, R.L. (1968). Replication of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 22,305-322.
- Erikson, R.L. en Franklin, R.M. (1966). Symposium on replication of viral nucleic acids. I. Formation and properties of a replicative intermediate in the biosynthesis of viral ribonucleic acid. *Bact. Rev.* 30,267-278.
- Feix, G., Pollet, R. en Weissmann, C. (1968). Replication of viral RNA. XVI. Enzymatic synthesis of infectious viral RNA with noninfectious Q β minus strands as template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59,145-152.
- Feix, G., Slor, H. en Weissmann, C. (1967). Replication of viral RNA. XIII. The early product of phage RNA synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,1401-1408.
- Fenwick, M.L., Erikson, R.L. en Franklin, R.M. (1964). Replication of the RNA of bacteriophage R17. *Science* 146,527-530.
- Fong, P. (1964). The replication of the DNA molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52,641-647.
- Fraenkel-Conrat, H., en Singer, B. (1961). Purification of viral RNA by means of bentonite. *Virology* 14,54-58.
- Frisch-Niggemeyer, W. en Steere, R.L. (1961). Chemical composition of partially purified alfalfa mosaic virus. *Virology* 14,83-87.
- Frost, R.R., Harrison, B.D. en Woods, R.D. (1967). Apparent symbiotic relationship between particles of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* 1,57-70.

- Fulton, R.W. (1967). Purification and some properties of tobacco streak and Tulare apple mosaic viruses. *Virology* 32,153-162.
- Geiduschek, E.P., Moehr, J.W. en Weiss, S.B. (1962). The secondary structure of complementary RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1078-1086.
- Gibbs, A.J., Nixon, H.L. en Woods, R.D. (1963). Properties of purified preparations of lucerne mosaic virus. *Virology* 19,441-449.
- Gillaspie, A.G. en Bancroft, J.B. (1965). Properties of ribonucleic acid from alfalfa mosaic virus and related components. *Virology* 27,391-397.
- Gomatos, P.J. en Tamm, I. (1963^a). The secondary structure of reovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49,707-714.
- Gomatos, P.J. en Tamm, I. (1963^b). Animal and plant viruses with double-helical RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50,878-885.
- Granboulan, N. en Franklin, R.M. (1966). Electron microscopy of viral RNA, replicative form and replicative intermediate of the bacteriophage R17. *J. Mol. Biol.* 22,173-177.
- Granboulan, N. en Girard, M. (1969). Molecular weight of poliovirus ribonucleic acid. *J. Virol.* 4,475-479.
- Hall, B.D. en Spiegelman, S. (1961). Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. U.S.* 47,137-146.
- Harrison, B.D. en Nixon, H.L. (1959). Separation and properties of tobacco rattle virus with different lengths. *J. Gen. Microbiol.* 21,569-581.
- Haruna, I. en Spiegelman, S. (1965^a). Recognition of size and sequence by an RNA replicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,1189-1193.
- Haruna, I. en Spiegelman, S. (1965^b). The autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science* 150,884-886.
- Haruna, I. en Spiegelman, S. (1965^c). Specific template requirements of RNA replicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,579-587.
- Hayashi, M., Hayashi, M.N. en Spiegelman, S. (1963). Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50,664-672.
- Haywood, A.M. en Sinsheimer, R.L. (1963). Inhibition of protein synthesis in *E. coli* protoplasts by actinomycin D. *J. Mol. Biol.* 6,247-249.
- Hearst, J.E. en Vinograd, J. (1961). The net hydration of deoxyribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47,85-830.
- Hebert, T.T. (1963). Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology* 53,362.
- Hoagland, D.R. en Arnon, D.I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Circular* 347, Calif. Agric. Exp. Station.

- Hofschneider, P.H. (1963). Untersuchungen über "kleine" *E. coli* K 12 Bakteriophagen. II. Mitt.: Versuche über die DNS-Abhängigkeit der Vermehrung der RNS-Phagen M 12. Z. Naturforsch. 18b,203-210.
- Hotta, Y. en Bassel, A. (1965). Molecular size and circularity of DNA in cells of mammals and higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53,356-362.
- Jaspars, E.M.J. en Moed, J.R. (1966). The complexity of alfalfa mosaic virus. In: "Viruses of Plants", Beemster en Dijkstra Eds. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 188-195.
- Kado, C.I. en Knight, C.A. (1966). Location of a local lesion gene in tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55,1276-1283.
- Kaerner, H.C. en Hoffmann-Berling, H. (1964). Synthesis of double-stranded RNA in RNA-phage infected *Escherichia coli* cells. Nature 202,1012-1013.
- Kassanis, B. en Nixon, H.L. (1961). Activation of one tobacco necrosis virus by another. J. Gen. Microbiol. 25,459.
- Kelley, J.J. en Kaesberg, P. (1962). Biophysical and biochemical properties of top component and bottom component of alfalfa mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta 61,865-871.
- Kingsbury, D.W. (1966). Newcastle disease virus RNA. II. Preferential synthesis of RNA complementary to parental viral RNA by chick embryo cells. J. Mol. Biol. 18,204-214.
- Kleczkowski, A. (1950). Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and numbers of local lesions. J. Gen. Microbiol. 4,53-69.
- Kleinschmidt, A.K., Lang, D., Jacherts, D. en Zahn, R.K. (1962). Darstellung und Längemessungen des gesamten Desoxyribonucleinsäure-inhaltes von T2 Bakteriophagen. Biochim. Biophys. Acta 61,857-864.
- Lauffer, M.A. (1944). The influence of concentration upon the sedimentation rate of tobacco mosaic virus. J. Am. Chem. Soc. 66,1195-1201.
- Lister, R.M. (1966). Possible relationship of virus-specific products of tobacco rattle virus infections. Virology 28,350-353.
- Lister, R.M. en Bracker, C.E. (1969). Defectiveness and dependence in three related strains of tobacco rattle virus. Virology 37,262-275.
- Lodish, H.F. en Zinder, N.D. (1966^a). Semiconservative replication of bacteriophage f2 RNA. J. Mol. Biol. 21,207-209.
- Lodish, H.F. en Zinder, N.D. (1966^b). Replication of the RNA of bacteriophage f2. Science 152,372-378.
- Loening, U.E. en Ingle, J. (1967). Diversity of RNA components in green plant tissues. Nature 215,363-367.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. en Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193,265-275.

- Lozeron, H.A. en Szybalski, W. (1966). Suppression of RNA precipitation during Cs_2SO_4 density gradient centrifugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 612-618.
- Mandell, J.D. en Hershey, A.D. (1960). A fractionation column for the analysis of nucleic acids. *Anal. Biochem.* 1,66-67.
- Mandel, H.G., Matthews, R.E.F., Matus, A. en Ralph, R.K. (1964). Replicative form of a plant viral RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16,604-609.
- Martin, R.G. en Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Matus, A.I., Ralph, R.K. en Mandel, H.G. (1964). Complexes of viral and ribosomal ribonucleic acids. *J. Mol. Biol.* 10,295-302.
- Mazzone, H.M., Incardona, W.L. en Kaesberg, P. (1962). Biochemical and biophysical properties of squash mosaic virus and related macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta* 55,164-175.
- Michelson, A.M., Massoulié, J. en Guschlbauer, W. (1967). Synthetic polynucleotides. In: "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology". Davidson en Cohn Eds. Acad. Press, New York en London. 6,83-141.
- Mills, D.R., Bishop, D.H.L. en Spiegelman, S. (1968). The mechanism of RNA synthesis templated by free minus strands of a "little" variant of Q β -RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 60,713-720.
- Mills, D.R., Pace, N.R. en Spiegelman, S. (1966). The in vitro synthesis of a non-infectious complex containing biologically active viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56,1778-1785.
- Miura, K.I., Kimura, I. en Suzuki, W. (1966). Double-stranded ribonucleic acid from rice dwarf virus. *Virology* 28,571-579.
- Montagnier, L. en Sanders, F.K. (1963). Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. *Nature* 199,664-667.
- Nathans, D., Notani, G., Schwartz, J.H. en Zinder, N.D. (1962). Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by *E. coli* extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1424-1431.
- Niblett, C.L. en Semancik, J.S. (1969). Conversion of the electrophoretic forms of cowpea mosaic virus in vivo and in vitro. *Virology* 38,685-693.
- Nicolaieff, A., Pinck, L. en Hirth, L. (1969). Examen en microscopie électronique de l'ARN répliatif du virus de la mosaïque de la luzerne. *J. Gen. Virol.* 4, 283-286.
- Ogur, M. en Rosen, G. (1950). The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid. *Arch. Biochem.* 25,262-276.

- Paul, H.L. en Bode, O. (1955). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelvirien. II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-Virus. *Phytopath. Zeitschr.* 24(3),341-351.
- Pinck, L., Hirth, L. en Bernardi, G. (1968). Isolation of replicative RNA from alfalfa mosaic virus infected plants by chromatography on hydroxyapatite columns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31,481-487.
- Pollet, R., Knolle, P. en Weissmann, C. (1967). Replication of viral RNA. XV. Purification and properties of Q β minus strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,766-773.
- Pons, M. (1967). Effect of actinomycin D on the replication of influenza virus and influenza virus RNA. *Virology* 33,150-154.
- Pound, G.S. en Bancroft, J.B. (1956). Cumulative concentrations of tobacco mosaic virus in tobacco at different photoperiods and light intensities. *Virology* 2, 44-56.
- Pound, G.S. en Helms, K. (1955). Effects of temperature on multiplication of potato virus X in *Nicotiana* species. *Phytopathology* 45,493-499.
- Ralph, R.K. en Bellamy, A.R. (1964). Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 87,9-16.
- Ralph, R.K. en Clark, M.F. (1966). Intracellular location of double-stranded plant viral ribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 119,29-36.
- Ralph, R.K., Matthews, R.E.F., Matus, A.I. en Mandel, H.G. (1965). Isolation and properties of double stranded viral RNA from virus-infected plants. *J. Mol. Biol.* 11,202-212.
- Ralph, R.K. en Wojcik, S.J. (1966). Synthesis of double stranded viral RNA by cell free extracts from turnip yellow mosaic virus infected leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 119,347-361.
- Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J. en Tatum, E.L. (1962). Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1238-1245.
- Reichmann, M.E. (1964). The satellite tobacco necrosis virus: A single protein and its genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52,1009-1017.
- Reichmann, M.E., Chang, A.Y., Faiman, L., en Clark, J.M. Jr. (1966). The satellite tobacco necrosis virus in studies of genetic coding. *Cold Spr. Harb. Sym. Quant. Biol.* XXXI,139-144.
- Reichmann, M.E., Rees, M.W., Symons, R.H. en Markham, R. (1962). Experimental evidence for the nucleotide triplet code. *Nature* 195,999-1000.
- Rice, R.V., Lindberg, G.D., Kaesberg, P., Walker, J.C. en Stahmann, M.A. (1955). The three components of squash mosaic virus. *Phytopathology* 45,145-148.
- Roy, D., Fraenkel-Conrat, H., Lesnaw, J. en Reichmann, M.E. (1969). The protein subunit of the satellite tobacco necrosis virus. *Virology* 38,368-369.

- Sanger, H.L. (1968). Characteristics of tobacco rattle virus. I. Evidence that its two particles are functionally defective and mutually complementing. *Molec. Gen. Genetics* 101,346-367.
- Sanger, H.L. (1969). Functions of the two particles of tobacco rattle virus. *J. Virol.* 3,304-312.
- Sanger, H.L. en Brandenburg, E. (1961). Ueber die Gewinnung von infektiosem Presssaft aus "Wintertyp" Pflanzen des Tabak-Rattle-Virus durch Phenolextraktion. *Naturwissenschaften* 48,391.
- Sanger, H.L. en Knight, C.A. (1963). Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus-infected tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13, 455-461.
- Scholtissek, C. (1969). Synthesis in vitro of RNA complementary to parental viral RNA by RNA polymerase induced by influenza virus. *Biochim. Biophys. Acta* 179, 389-397.
- Semal, J. en Hamilton, R.I. (1968). RNA-synthesis in cell-free extracts of barley leaves infected with bromegrass mosaic virus. *Virology* 36,293-302.
- Semancik, J.S. (1966). Studies on electrophoretic heterogeneity in isometric plant viruses. *Virology* 30,698-704.
- Semancik, J.S. en Bancroft, J.B. (1964). Further characterization of the nucleoprotein components of bean pod mottle virus. *Virology* 22,33-39.
- Semancik, J.S. en Kajiyama, M.R. (1968). Enhancement of tobacco rattle virus stable form infection by heterologous short particles. *Virology* 34,170-172.
- Shipp, W. en Haselkorn, R. (1964). Double-stranded RNA from tobacco leaves infected with TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52,401-408.
- Simon, E.H. (1961). Evidence for the nonparticipation of DNA in RNA synthesis. *Virology* 13,105-118.
- Sinsheimer, R.L., Starman, B., Nagler, C. en Guthrie, S. (1962). The process of infection with bacteriophage ϕ X-174. I. Evidence for a "replicative form". *J. Mol. Biol.* 4,142-160.
- Solymosy, F., Fedorcsak, I., Gulyas, A., Farkas, G.L. en Ehrenberg, L. (1968). A new method based on the use of diethylpyrocarbonate as a nuclease inhibitor for the extraction of undegraded nucleic acid from plant tissues. *European J. Biochem.* 5,520-527.
- Spiegelman, S. (1967). An in vitro analysis of a replicating molecule. *American Scientist* 55,221-264.
- Spiegelman, S., Haruna, I., Holland, I.B., Beaudreau, G. en Mills, D. (1965). The synthesis of a self propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,919-927.

- Spirin, A.S. (1963). Some problems concerning the macromolecular structure of ribonucleic acids. In: "Progress in Nucleic Acid Research". J.W. Davidson en W.E. Cohn Eds., Academic Press, New York, 1,301-345.
- Stace-Smith, R., Reichmann, M.E. en Wright, N.S. (1965). Purification and properties of tobacco ringspot virus and two RNA-deficient components. *Virology* 25, 487-494.
- Stols, A.L.H. (1964). Turnip yellow mosaic virus. Interacties met kwaternaire ammoniumzouten. Proefschrift Leiden, Boosten en Stols N.V., Maastricht.
- Studier, F.W. (1965). Sedimentation studies of the size and shape of DNA. *J. Mol. Biol.* 11,373-390.
- Stutz, E. en Noll, H. (1967). Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants: Evidence for three classes of ribosomal RNA in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,774-781.
- Sueoka, W. en Cheng, T.Y. (1962). Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column. *J. Mol. Biol.* 4,161-172.
- Sueoka, N., Marmur, J. en Doty, P. (1959). II. Dependence of the density of deoxyribonucleic acids on guanine-cytosine content. *Nature* 183,1429-1431.
- Tsugita, A. en Fraenkel-Conrat, H. (1960). The amino acid composition and C-terminal sequence of a chemically evoked mutant of TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 46, 636-642.
- Valenta, V., Gressnerova, M., Marcinka, K. en Nermut, M.V. (1969). Some properties of pea green mottle virus, a member of the cowpea mosaic group, isolated in Czechoslovakia. *Acta Virol. (Praag)* 13,422-434.
- Van der Want, J.P.H. en Rozendaal, A. (1948). Electronenmicroscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. *Tijdschr. PlZiekt.* 54,134-141.
- Van Griensven, L.J.L.D. en Van Kammen, A. (1969). The isolation of ribonuclease-resistant RNA induced by cowpea mosaic virus: Evidence for two double stranded RNA components. *J. Gen. Virol.* 4,423-428.
- Van Hoof, H.A. (1962). Lijst van virusziekten in Suriname waargenomen en overgebracht. *De Surinaamse Landbouw* 10,36.
- Van Kammen, A. (1963). The occurrence of infectious virus ribonucleic acid in the ribosomal fraction from tobacco mosaic virus infected tobacco leaves. *Meded. LandbHogeschool, Wageningen* 63,12.
- Van Kammen, A. (1967). Purification and properties of the components of cowpea mosaic virus. *Virology* 31,633-642.
- Van Kammen, A. (1968). The relationship between the components of cowpea mosaic virus. I. Two ribonucleoprotein particles necessary for the infectivity of CPMV. *Virology* 34,312-318.

- Van Kammen, A. en Van Griensven, L.J.L.D. (1970). The relationship between the components of cowpea mosaic virus. II. Further characterization of the nucleoprotein components of CPMV. *Virology ter perse*.
- Van Ravenswaay Claassen, J.C., Van Leeuwen, A.B.J., Duyts, G.A.H. en Bosch, L. (1967) In vitro translation of alfalfa mosaic virus RNA. *J. Mol. Biol.* 23,535-544.
- Van Vloten-Doting, L.M. (1968). Verdeling van de genetische informatie over de natuurlijke componenten van een plantevirus. Proefschrift Leiden, Bronder Offset, Rotterdam.
- Van Vloten-Doting, L. en Jaspars, E.M. (1967). Enhancement of infectivity by combination of two ribonucleic acid components from alfalfa mosaic virus. *Virology* 33,684-693.
- Van Vloten-Doting, L., Kruseman, J. en Jaspars, E.M.J. (1968). The biological function and mutual dependence of bottom component and top component a of alfalfa mosaic virus. *Virology* 34,728-737.
- Walters, H.J. (1963). Leguminous hosts of soybean mosaic virus. *Pl. Dis. Repr.* 47, 726-728.
- Weissmann, B., Borst, P., Burdon, R.H., Billeter, M.A. en Ochoa, S. (1964). Replication of viral RNA. III. Double stranded replicative form of MS2 phage RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,682-690.
- Weissmann, C., Billeter, M.A., Schneider, M.C., Knight, C.A. en Ochoa, S. (1965). Replication of viral RNA. VI. Nucleotide composition of the replicative form of tobacco mosaic virus RNA and of its component strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 53,653-656.
- Weissmann, C. en Feix, G. (1966). Replication of viral RNA. XI. Synthesis of viral "minus" strands in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,1264-1268.
- Weissmann, C., Feix, G., Slor, H. en Pollet, R. (1967). Replication of viral RNA. XIV. Single-stranded minus strands as template for the synthesis of viral plus strands in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,1870-1877.
- Weissmann, C. en Ochoa, S. (1967). Replication of phage RNA. Progress in nucleic acid research and molecular biology. In: "Progress in Nucleic Acid Research". Davidson en Cohn Eds. Academic Press, New York, 6,353-399.
- Wittmann, H.G. (1960). Comparison of the tryptic peptides of chemically induced and spontaneous mutants of tobacco mosaic virus. *Virology* 12,609-612.
- Wolstenholme, D.R. en Bockstahler, L.E. (1967). Electron microscopy of double-stranded RNA induced by turnip yellow mosaic virus and tobacco mosaic virus. *Molec. Gen. Genetics* 100,349-357.
- Wood, H.A. en Bancroft, J.B. (1965). Activation of a plant virus by related incomplete nucleoprotein particles. *Virology* 27,94-102.