STRUCTUUR EN EIGENSCHAPPEN VAN COWPEA-MOZAIEKVIRUS

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS
0000 0092 2357

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.).

NN 8201,574

J.L.M.C. GEELEN

Structuur en eigenschappen van cowpea-mozaïekvirus

With a summary: Structure and properties of cowpea mosaic virus

Proefschrift
ter verkrijging van de graad van
doctor in de landbouwwetenschappen, op gezag van de
Rector Magnificus, Prof. dr. ir. H.A. Leniger, hoogleraar in de
technologie,
in het openbaar te verdedigen op
vrijdag 11 januari 1974 des namiddags te vier uur in de
aula van de Landbouwhogeschool te Wageningen

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

1053-04

Dit proefschrift met stellingen van Joannes Lambertus Matheus Christiaan Geelen, landbouwkundig ingenieur, geboren te Kelpen (Gem. Grathem) op 8 juli 1944, is goedgekeurd door de promotoren, dr. A. van Kammen, hoogleraar in de moleculaire biologie en dr. ir. J.P.H. van der Want, hoogleraar in de virologie.

De Rector Magnificus van de Landbouwhogeschool
H.A. Leniger

Wageningen, 17 november 1973

NN08201,574

Stellingen

I

De conclusie van Verbraeken en Fiers, dat de geëxpandeerde en de niet geëxpandeerde deeltjes van de MS2 bacteriofaag een gelijke zweefdichtheid in CsCl-gradiënten hebben op grond van een gelijke samenstelling is onjuist.

Verbraeken, E. en Fiers, W. (1972). *Virology* 50, 690-700.

II

De eiwitten die de polyeders van insektenvirussen vormen zijn waarschijnlijk niet virusspecifiek.

Bergoin, M. en Dales, S. (1971). In *Comparative Virology* (Maramorosch, K. en Kurstak, E., red.), Academic Press, New York.
Bellett, A.J.D., Fenner, F. en Gibbs, A.J. (1973). In *Viruses and invertebrates* (Gibbs, A.J., red.), North-Holland, Amsterdam.

III

De conclusie van Butterworth et al., dat het RNA-polymerase uit rattelever op andere plaatsen aan het chromatine-DNA uit rattelever bindt dan het RNA-polymerase uit *Micrococcus lysodeikticus* , wordt onvoldoende door hun experimentele gegevens ondersteund.

Butterworth, P.H.W., Cox, R.F. en Chesterton, C.J. (1971). *Eur. J. Biochem.* 23, 229-241.

IV

De mening van White et al., dat RbBr-gradiënten beter zijn voor het tot evenwicht centrifugeren van radish mosaic virus dan CsCl-gradiënten is niet juist.

White, R.F., Kassanis, B. en Woods, R.D. (1973). *J. gen. Virol.* 20, 387-389.

V

Het door Reed en Oliver voorgestelde model voor het pyruvaatdehydrogenase complex uit *Escherichia coli* is niet in overeenstemming met de door hen gegeven stoechiometrie.

Reed, L.J. en Oliver, R.M. (1968). *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 397-412.
Vogel, O., Hoehn, B. en Henning, U. (1972). *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 69, 1615-1619.

VI

De veronderstelling van Kassanis et al., dat elk van beide RNAs van radish mosaic virus de genetische informatie bevat voor één van de manteleiwitten wordt onvoldoende door hun experimentele gegevens ondersteund.

Kassanis, B., White, R.F. en Woods, R.D. (1973). *J. gen. Virol.* 20, 277-286.

VII

De informatie die verkregen kan worden uit de verdeling van macromoleculen over een dichtheidsgradiënt wordt te weinig gebruikt om de verdeling zelf te verklaren.

Bancroft, J.B., Hiebert, E., Rees, M.W. en Markham, R. (1968). *Virology* 34, 224-239.

Johnson, M.W. (1973). *J. gen. Virol.* 18, 207-209.

Ifft, J.B. en Vinograd, J. (1962). *J. Phys. Chem.* 66, 1990-1998.

VIII

Voor het ontstaan van 9-methyl-2-phenyl-9H-imidazo(1,2-*a*)benzimidazool uit de reactie van 3-broom-9-methyl-2-phenyl-9H-imidazo(1,2-*a*)benzimidazool met diethylamine in dimethylformamide kan een ander mechanisme opgesteld worden dan dat van Shiokawa en Ohki.

Shiokawa, Y. en Ohki, S. (1973). *Chem. Pharm. Bull.* 21, 981-988.

IX

Het is onjuist te menen, dat één van beide bodemcomponenten van cowpea-mozaïekvirus, die ontstaan na evenwichtscentrifugeren in een CsCl-gradiënt bij neutrale pH een artefact is.

Van Griensven, L.J.L.D. (1970). *De zuivering en de eigenschappen van de replicatieve vorm van cowpea-mozaïekvirus*. Dissertatie, Wageningen.

Wood, H.A. (1971). *Virology* 43, 511-513.

X

Het meten van de spin-rooster en de spin-spin relaxatietijden als functie van de resonantiefrequentie zou een aanzienlijk deel van het speculatieve karakter van de interpretatie van deze metingen wegnemen.

Gallo, A.A., Hansen, I.L., Sable, H.Z. en Swift, T.J. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 5913-5920.

Ray, W.J. en Mildvan, A.S. (1970). *Biochemistry* 9, 3886-3894.
Palmer, G. en Mildvan, A.S. (1972). In *Structure and function of oxidation-reduction enzymes* (Åkerson, Å. en Ehrenberg, Å., red.), Pergamon Press, Oxford.

XI

De beste manier om op grote schaal ijs te verwijderen is het veranderen van het sneeuw- of ijsoppervlak. Verspreiding van olie in het Noordpoolgebied zal dan ook een stijging van de zeespiegel tot gevolg hebben.

Campbell, W.J. en Martin, S. (1973). *Science* 181, 56-58.

Proefschrift van J.L.M.C. Geelen
Wageningen, 11 januari 1974

Voor mijn ouders

Voorwoord

Gaarne wil ik allen danken die op enigerlei wijze hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift. In het bijzonder wil ik vermelden:
Prof. dr. ir. J.P.H. van der Want en Prof. dr. A. van Kammen voor de wijze waarop ze mij in het onderzoek hebben weten te stimuleren en voor de vrijheid die ze mij hierbij gelaten hebben.
De heren B. Kraal en C. Vonk voor het uitvoeren van de aminozuuranalyses.
De heer B. van Markwijk voor de hulp bij de lichtverstrooiïngsmetingen.
De heer R.A. Heytink voor de sedimentatie-evenwichtsruns.
De heren J.E. Mellema en R.A. Crowther voor hun bijdrage in de ontsluiering van de structuur van het CPMV.
De heer L. Reynders voor de hulp bij de gelelektroforese van het RNA.
De leden van de cowpea-mozaïekvirusgroep die in belangrijke mate het microklimaat bepaalde waarin dit proefschrift tot stand is gekomen.
De leden van de vakgroep Virologie.
De heer K. Boekhorst voor de vervaardiging van de figuren.
De heer G. Eimers voor het fotografisch werk en de heer G. Looyen als representant van de kas.

Inhoud

VOORWOORD

INHOUD

GEBRUIKTE AFKORTINGEN

INLEIDING 1

1 EIGENSCHAPPEN VAN HET COWPEA-MOZAIEKVIRUS EN DAAROP LIJKENDE VIRUSSEN 3

1.1. Het cowpea-mozaïekvirus 3

1.2. Eigenschappen van op CPMV gelijkende virussen 6

2 MATERIALEN EN METHODES 8

2.1. Virus 8

2.2. Zuivering van het virus 8

2.3. De bereiding van het CPMV-RNA 9

2.4. De bereiding van het eiwit 9

2.4.1. Afbraak met SDS en carboxymethylering met joodaceetamide 9

2.4.2. Afbraak met mierenzuur en oxydatie met permierenzuur 9

2.4.3. Afbraak met SDS en succinylering met barnsteenzuuranhydride 10

2.4.4. Afbraak met guanidiniumchloride-LiCl en carboxymethylering met joodaceetamide 10

2.5. Het scheiden van de centrifugale componenten van het CPMV 11

2.6. Het scheiden van de elektroforetische vormen van het CPMV 12

2.7. Het scheiden van de eiwitten van het CPMV 14

2.7.1. Het scheiden door middel van gelfiltratie over Sephadex G-200 14

2.7.2. Het scheiden door middel van polyacrylamide-gelelektroforese 14

2.8. Polyacrylamide-gelelektroforese 14

2.8.1. Elektroforese van het CPMV 15

2.8.2. Elektroforese van het eiwit 15

2.8.3. Elektroforese van het RNA 16

2.8.4. Weergave van de eiwit- en RNA banden 16

2.9. Analytische ultracentrifuge 17

2.10. CsCl-evenwichtscentrifugatie 17

2.11. Lichtverstrooiïng 18

2.12. Elektronenmicroscopie 19

2.13. Aminozuuranalyses 19

2.14.	Partieel specifiek volume van de eiwitmantel van CPMV	20
2.15.	Fosfaat-bepaling	20
2.16.	Chemicaliën	21
3	DE MOLECUULGEWICHTEN VAN DE CENTRIFUGALE COMPONENTEN VAN CPMV EN HUN RNAs	22
3.1.	Bepaling van de deeltjesgewichten van T, M en B door middel van lichtverstrooiïng	22
3.2.	Bepaling van de deeltjesgewichten van T, M en B met behulp van sedimentatie-evenwichtscentrifugatie	25
3.3.	De molecuulgewichten van de RNAs	26
3.3.1.	Bepaling van het RNA-gehalte van M en B	26
3.3.2.	Bepaling van de molecuulgewichten van M- en B-RNA via de sedimentatiecoëfficiënt na reactie met formaldehyde	27
3.3.3.	Bepaling van de molecuulgewichten van M- en B-RNA door middel van polyacrylamide-gelelektroforese	27
3.3.4.	Bepaling van de molecuulgewichten van M- en B-RNA door middel van polyacrylamide-gelelektroforese onder denaturerende omstandigheden	28
3.4.	Samenvatting van de resultaten	29
3.5.	Bespreking	29
4	DE STRUCTUUR VAN DE EIWITMANTEL VAN CPMV; DE CHEMISCHE SUBEENHEID	32
4.1.	Isolatie van het eiwit	32
4.1.1.	Afbraak met SDS	32
4.1.2.	Afbraak met guanidiniumchloride-LiCl	34
4.2.	Verhouding van de eiwitten	34
4.3.	Schatting van de molecuulgewichten van de eiwitten	36
4.4.	Scheiding van de eiwitten	36
4.5.	Aminozuursamenstelling van de eiwitten van het CPMV	39
4.6.	De molaire verhouding van de eiwitten	41
4.7.	Het aantal eiwitmoleculen in de eiwitmantel	41
4.8.	Bespreking	42

5 VERANDERINGEN IN HET ELEKTROFORETISCH GEDRAG VAN EIWIT EN VIRUS TIJDENS DE BEWARING 44
5.1. Invloed van veroudering 44
5.2. Invloed van de zuiveringsmethode 46
5.3. Bespreking 49

6 DE INFECTIOSITEIT VAN DE ELEKTROFORETISCHE VORMEN VAN HET CPMV 52
6.1. Infectiositeit van de elektroforetische vormen en hun RNAs 52
6.2. Invloed van veroudering op de infectiositeit van S en F 54
6.3. Bespreking 56

7 DE STRUCTUUR VAN DE EIWITMANTEL VAN CPMV 58

8 DE ZWEEFDICHTHEID VAN DE CENTRIFUGALE COMPONENTEN VAN HET CPMV IN CsCl 62
8.1. Verband elektroforetische vormen en zweefdichtheid in CsCl 62
8.2. De zweefdichtheid van de centrifugale componenten in CsCl 63
8.3. Invloed van de pH op de verhouding van B_u tot B_l 64
8.4. Invloed van formaldehyde op de verhouding van B_u tot B_l 66
8.5. Bespreking 69

9 SAMENVATTING 72

10 SUMMARY 77

11 LITERATUUR 82

CURRICULUM VITAE 86

Gebruikte afkortingen

B	Bodemcomponent
B_u	Bodemcomponent met zweefdichtheid 1,404 g/cm^3 in CsCl
B_l	Bodemcomponent met zweefdichtheid 1,442 g/cm^3 in CsCl
BPMV	Bean pod mottle virus
BBSV	Broad bean stain virus
CPMV	Cowpea-mozaïekvirus
D	Dalton
DTT	Dithiothreïtol
E_{260}	Optische dichtheid bij 260 nm
EAMV	Echtes Ackerbohnenmosaik-virus
EDTA	Ethyleendiaminotetra-azijnzuur
F	Snel migrerende elektroforetische vorm
M	Middencomponent
Mw	Molecuulgewicht
MCE	Mercaptoëthanol
n_D^{20}	Brekingsindex bij 20° C (Na-D lijn)
PEG	Polyethyleenglycol
PVX	Aardappel-X-virus
RNA	Ribonucleïnezuur
RNase	Ribonuclease
rpm	Toeren per minuut
ρ	Dichtheid (g/cm^3)
S	Langzaam migrerende elektroforetische vorm
S	Sedimentatiecoëfficiënt in Svedberg eenheden (1 *S* = 10^{-13} sec)
$S^{\circ}_{20,w}$	Sedimentatiecoëfficiënt in water bij 20° C, en concentratie=0
SDS	Natriumlaurylsulfaat
SMV	Squash mosaic virus
RMV	Radish mosaic virus
RCMV	Red clover mottle virus
SSC	Standard saline citrate, oplossing van 0,15 *M* NaCl en 0,015 *M* Na-citraat pH 7,2
T	Topcomponent
TCA	Trichloorazijnzuur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyleendiamine
TMV	Tabaksmozaïekvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan

Inleiding

Cowpea-mozaïekvirus (CPMV) is een meercomponentenvirus. Wanneer men een preparaat van dit virus analyseert door centrifugeren in een suikergradiënt worden drie bestanddelen gevonden, op grond van hun positie in de gradiënt aangeduid als top- (T), midden (M) en bodemcomponent (B). De sedimentatiecoëfficiënten en RNA-gehaltes van deze componenten bedragen resp. T: 58 *S*, geen RNA; M: 95 *S*, 24% RNA en B: 115 *S*, 33% RNA (Van Kammen, 1971). Beide nucleoproteïnes zijn noodzakelijk voor infectie (Van Kammen, 1968).

Naast deze centrifugale heterogeniteit is het CPMV ook heterogeen in een elektrisch veld. Wanneer het virus geëlektroforeerd wordt op polyacrylamide gels, worden twee elektroforetische vormen gevonden, een langzaam migrerende (S) en een snel migrerende (F) vorm. S en F bestaan beide uit alle drie centrifugale componenten, zodat het waarschijnlijk is, dat het RNA geen invloed op de mobiliteit heeft en dat de capside van de centrifugale componenten op identieke wijze is opgebouwd (Semancik, 1966). De infectiositeit van S is veel lager dan de infectiositeit van F, maar kan sterk verhoogd worden door incubatie met trypsine of chymotrypsine (Niblett en Semancik, 1970; Lee et al., 1973).

Een derde heterogeniteit wordt gevonden in de zweefdichtheid van de centrifugale componenten in CsCl-gradiënten. De bodemcomponent blijkt dan op te splitsen in twee componenten met sterk verschillende zweefdichtheid (1,422 en 1,470 g/cm^3; Bruening, 1969; Van Griensven, 1970).

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had tot doel de karakterisering van de componenten van het CPMV, hun eiwit en hun RNA, en daarna met behulp van deze gegevens te komen tot een model voor de capside en om de verschillen in zweefdichtheid van de twee bodemcomponenten en de verschillen in infectiositeit van S en F te verklaren.

Er kon aangetoond worden, dat de eiwitmantel van het CPMV opgebouwd is uit twee verschillende eiwitten (hoofdstuk 4). Uit de molecuulgewichten van de eiwitten en het deeltjesgewicht van de topcomponent (hoofdstuk 3, 4) en een driedimensionale beeldreconstructie van elektronenmicroscopische opnames is een model voor de capside afgeleid (hoofdstuk 7). De relatie tussen de eiwitsamenstelling van de capside en de elektroforetische vormen (hoofdstuk 5) en de relatie tussen veroudering en specifieke infectiositeit van de elektroforetische vormen (hoofdstuk 6) zijn eveneens onderzocht. Het experimentele gedeelte van deze dissertatie is afgesloten met een onderzoek naar de eigenschappen van de twee zweefdichtheidscomponenten van de bodemcomponent (hoofdstuk 8). In het eerste hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de eigenschappen van CPMV en een aantal nauw verwante

virussen, zoals die in de literatuur beschreven zijn.

Gedeeltes van het hier beschreven onderzoek zijn reeds gepubliceerd (Geelen et al., 1972; Geelen en Van Kammen, 1972; Geelen et al., 1973; Geelen en Van Kammen, 1973; Crowther et al., in druk).

1 Eigenschappen van het cowpea-mozaïekvirus en daarop lijkende virussen

Het cowpea-mozaïekvirus rekent men met bean pod mottle virus (BPMV; Bancroft, 1962), squash mosaic virus (SMV, Mazzone et al., 1962), red clover mottle virus (RCMV; Valenta en Marcinka, 1971), radish mosaic virus (RMV; Campbell, 1973), broad bean stain virus (BBSV; Gibbs en Smith, 1970) en Echtes Ackerbohnenmosaikvirus (EAMV; Gibbs en Paul, 1970) tot een groep van virussen: de cowpea-mozaïekvirusgroep. Deze groep wordt gekarakteriseerd door het voorkomen van drie centrifugale componenten met als sedimentatiecoëfficiënten: 54-60 *S* (top); 91-100 *S* (midden) en 112-127 *S* (bodem). De topcomponent bevat geen RNA, de midden- en bodemcomponent bevatten resp. 24-29% RNA en 33-37% RNA. In de elektronenmicroscoop zijn de deeltjes isometrisch met een diameter van 24-30 nm. Voor een overzicht van deze groep wordt verwezen naar Van Kammen (1972).

1.1. Het cowpea-mozaïekvirus.

Het cowpea-mozaïekvirus (CPMV; R/1: 1,5/24 + 2,5/33: S/S: S/Cl; Van Kammen, 1971) werd reeds in 1924 door Smith beschreven. Agrawal (1964) heeft drie isolaten van CPMV uit Suriname (Vu, Vs, en Sb) bestudeerd en vergeleken met een isolaat uit Trinidad (Dale, 1949) en cowpea yellow mosaic virus uit Nigeria (Chant, 1959). Deze isolaten werden door Agrawal (1964) ingedeeld in twee stammen: de 'severe' stam (Vu, Vs en het isolaat uit Trinidad) en de gele stam (Sb en het isolaat uit Nigeria).

De sedimentatiesnelheden van de drie centrifugale componenten van het CPMV bedragen 58 *S*, 95 *S* en 115 *S*. Uitgaande van een gelijke eiwitmantel voor de centrifugale componenten, kunnen volgens de relatie van Reichmann (1965) uit deze sedimentatiecoëfficiënten RNA-gehaltes van 24% (M) en 33% (B) berekend worden (Van Kammen en Van Griensven, 1970).

De gescheiden nucleoproteïnes zijn niet infectieus; voor een infectie zijn beide noodzakelijk (Van Kammen, 1968). De veronderstelling, dat de genetische informatie van het CPMV verdeeld is over het M- en het B-RNA wordt gesteund door het werk met mutanten van Bruening (1969) en De Jager en Van Kammen (1970). Uit heterologe combinaties van midden- en bodemcomponenten van mutanten van CPMV-Sb bleek, dat de middencomponent de informatie leverde voor de systemische infectie van *Phaseolus vulgaris* L. var. 'Beka' (De Jager en Van Kammen, 1970) en de produktie van de topcomponent (Bruening, 1969; De Jager en Van Kammen, 1970). Bij andere mutanten van het CPMV is ook gevonden, dat de symptoomexpressie geregeld wordt door de bodemcomponent (Wood, 1972; De Jager, 1971), zodat de uiteindelij-

ke symptomen waarschijnlijk het resultaat zijn van genen op zowel de midden- als de bodemcomponent.

De molaire samenstelling van de basen in M- en B-RNA is respectievelijk G 20,7; A 28,4; C 19,3; U 31,6 en G 22,9; A 28,5; C 17,2; U 31,4 (Van Kammen en Van Griensven, 1970). Op grond van moleculaire-hybridisatieproeven met M- en B-RNA met het voor CPMV karakteristiek dubbelstrengig RNA is er geen overeenkomst in basenvolgorde van beide RNAs. De hoeveelheden M- en B-RNA die na annealing in het dubbelstrengig RNA gevonden worden, zijn additief en er wordt geen competitie gevonden tussen M- en B-RNA in de hybridisatie reactie (Van Kammen, 1971b; Van Griensven et al., 1973).

De sedimentatiecoëfficiënten van M- en B-RNA bedragen in 1 x SSC + 0,005 *M* Na_3EDTA resp. 26,4 en 33,5 *S* (Van Griensven, 1970; Van Kammen en Van Griensven, 1970). Met behulp van de door Spirin (1963) afgeleide relatie tussen sedimentatiesnelheid en molecuulgewicht ($M = 1550\ S^{2,1}$) kunnen hieruit de volgende waardes berekend worden: $1,45 \times 10^6$ D (M-RNA) en $2,58 \times 10^6$ D (B-RNA) (Van Griensven, 1970). In combinatie met de percentages RNA geeft dit als deeltjesgewichten voor M en B: $6,04 \times 10^6$ D (M, 24% RNA) en $7,74 \times 10^6$ D (B, 33% RNA) (Van Kammen, 1971), en voor de eiwitmantel $4,59 \times 10^6$ D (M) en $5,16 \times 10^6$ D (B). Van Velsen (geciteerd door Haselkorn, 1966) vond voor het deeltjesgewicht van de middencomponent $5,4 \times 10^6$ D en voor de bodemcomponent $7,2 \times 10^6$ D, en veronderstelde, dat de middencomponent een kleinere diameter had dan de bodemcomponent. Door Agrawal (1964) werden echter geen verschillen in diameter gevonden tussen bodem- en middencomponent. Deze componenten hadden een diameter van 24-27 nm, en de topcomponent van 23-25 nm. Op grond van elektronen-microscopische opnames van negatief gekleurde CPMV-deeltjes veronderstelde Agrawal (1964), dat het CPMV opgebouwd is uit 60 subeenheden die geordend zijn volgens 5, 3, 2 symmetrie (icosaëder).

De eiwitmantel van het CPMV is opgebouwd uit twee verschillende types eiwitten met als molecuulgewichten 42.900 ± 2.000 D en 21.800 ± 1.500 D (Wu, 1970; Wu en Bruening, 1971). Volgens Wu (1970) komen er 60 grote en 60 kleine eiwitten voor in de eiwitmantel, waarbij telkens een groot en een klein eiwit een morfologische subeenheid vormen overeenkomstig het model dat Mouse-Elberfeld virus door Rueckert et al. (1969) voorgesteld is.

Elke centrifugale component van het CPMV bestaat uit twee elektroforetische vormen: de langzaam migrerende vorm (S) en de snel migrerende vorm (F) (Semancik, 1966). De mobiliteit van de elektroforetische vormen van de gele stam (in 0,1 *M* fosfaat pH 7,0; in richting van de anode) bedraagt resp. $4,0\text{-}4,2 \times 10^{-5}$ $cm^2.sec^{-1}.V^{-1}$ en $2,6\text{-}2,8 \times 10^{-5}$ $cm^2.sec^{-1}.V^{-1}$ (Agrawal, 1964). De verhouding

van de elektroforetische vormen verandert met de duur van de infectie. Vroeg in het infectieproces wordt vrijwel alleen S gevonden, terwijl laat in het infectieproces het grootste deel van het virus als F voorkomt. Door incubatie met proteolytische enzymen zoals een mengsel van carboxypeptidase A en B, of chymotrypsine is het mogelijk om S om te zetten in F (Niblett en Semancik, 1969). Op grond van de aminozuren die bij deze incubatie vrijgemaakt werden, veronderstelden Niblett en Semancik (1969), dat het C-terminale eind van het eiwit van CPMV als volgt was (het was toen nog niet bekend, dat er in feite twee eiwitten waren): ..|Leu-Arg-Lys-Ala-Gln-Ile-Val-Met-COOH, waarbij de aminozuren rechts van de onderbreking afgesplitst zouden worden bij de overgang van S naar F. De verhouding van de elektroforetische vormen is bij alle centrifugale componenten gelijk, terwijl iedere elektroforetische vorm uit alle drie centrifugale componenten bestaat. De RNA-inhoud lijkt dus geen invloed op de elektroforetische mobiliteit te hebben en is blijkbaar goed afgeschermd.

Volgens Niblett en Semancik (1970) zou F een hogere specifieke infectiositeit hebben dan S, hoewel het RNA van F meer afgebroken en minder infectieus was dan het RNA van S. De eiwitmantel van F zou dan zodanig verschillend moeten zijn, dat F ondanks zijn inferieure RNA, toch infectieuzer is dan S. De stabiliteit van de drie centrifugale componenten is niet gelijk. Een gedeeltelijke afbraak van de bodemcomponent wordt verkregen, wanneer het virus in 0,01 *M* fosfaatbuffer pH 7,0 gedurende 50 min bij 50°C verhit wordt (Van Kammen, 1968). Bij een lagere pH (ca. 5,8) heeft bij verwarming meer afbraak van de middencomponent dan van de bodemcomponent plaats (Duncan en Bruening, 1971). Bij verhogen van de pH wordt na dialyse in de koude kamer tegen 0,02 *M* glycine/NaOH-buffers eerst de topcomponent afgebroken (pH 9,5), daarna volgt de bodemcomponent (pH 10,5) en als laatste de middencomponent (gedeeltelijk bij pH 11,5). Wanneer 1 *M* NaCl aan de preparaten toegevoegd wordt, wordt er bij iets lagere pH afbraak gevonden, terwijl bij pH 11,5 dan alle componenten volledig zijn afgebroken (Geelen, niet gepubliceerd).

Een bijzondere eigenschap van het CPMV die mogelijk verband houdt met de verschillen in stabiliteit tussen de drie centrifugale componenten, is de heterogeniteit in zweefdichtheid van de bodemcomponent in CsCl-gradiënten. Wanneer het CPMV tot evenwicht gedraaid wordt in CsCl-gradiënten worden vier banden gevonden die overeenkomen met de topcomponent (1,297 g/cm^3) de middencomponent (1,402 g/cm^3) en twee bodemcomponenten (1,422 en 1,470 g/cm^3) (Bruening, 1969). De relatieve verhouding van deze twee bodemcomponenten is pH afhankelijk: bij pH 6,5 wordt vrijwel alleen de lichtere component gevonden en bij pH 8,5 vrijwel alleen de zwaardere (Wood, 1971). Omdat de dichtheid van de zware bodemcomponent vrijwel gelijk is aan de dichtheid die voor een deeltje met de samenstelling van

nent vrijwel gelijk is aan de dichtheid die voor een deeltje met de samenstelling van de bodemcomponent berekend kan worden uit de dichtheid van de topcomponent en de middencomponent, veronderstelde Van Griensven (1970), dat de lichtere bodemcomponent een artefact zou zijn. Daar het niet mogelijk is om de zware bodemcomponent om te zetten in de lichte bodemcomponent door de pH te veranderen van 8,5 in 6,5, terwijl het wel mogelijk is om de lichte bodemcomponent om te zetten in de zware component door van pH 6,5 naar pH 8,5 te gaan, veronderstelde Wood (1971) echter, dat de zware bodemcomponent een artefact zou zijn en ontstaan door een irreversibele verandering in de conformatie, waardoor de hydratatie en/of de binding van Cs^+-ionen veranderd is.

1.2. Eigenschappen van op CPMV gelijkende virussen

De tot de cowpea-mozaïekvirusgroep behorende virussen, zijn virussen met een gedeeld genoom. De genetische informatie is verdeeld over twee verschillende nucleoproteïnes, die beide noodzakelijk zijn om een infectie tot stand te brengen (Van Kammen, 1972). Bij BPMV ligt de informatie voor het manteleiwit (een of beide eiwitten) op de middencomponent, aangezien heterologe kruisingen van verschillende stammen serologisch verwante virussen opleveren, wanneer ze dezelfde middencomponent bezitten (Moore en Scott, 1971).
Een aantal eigenschappen van deze virussen zijn samengevat in Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Overzicht van eigenschappen van op CPMV gelijkende virussen.

	Sed. coëfficiënt (*S*)			% RNA		diameter	El.[a]	Eiw.[b]	Lit.[c]
Virus	T	M	B	M	B	(nm)			
BBSV	60	100	127	25	35	25	-	-	1
BPMV	54	91	112	30	37	30	2	2	2, 3
EAMV	-	98	119	26	35	28	-	-	4
RCMV	60	101	127	25	36	30	-	-	5
RMV	57	97	116	26	35	30	2	2	6, 7
SMV	57	95	118	25	35	30	1	2	3, 8
CPMV	58	95	118	24	33	24, 28	2	2	3, 9, 10

[a] aantal elektroforetische vormen
[b] aantal eiwitten in de capside
-niet bekend
[c] Lit.: 1, Gibbs en Smith (1970); 2, Semancik (1972); 3, Wu (1970); 4, Gibbs en

Paul (1970); 5, Valenta en Marcinka (1972); 6, Campbell (1973); 7, Kassanis et al., (1973); 8, Campbell (1971); 9, Van Kammen (1971); 10, Geelen et al., (1972).

Behalve de in Tabel 1.1 vermelde gegevens is weinig bekend over de fysisch-chemische eigenschappen van deze groep van virussen. Deeltjesgewichten van de centrifugale componenten zijn gegeven voor SMV: $4,5 \times 10^6$ D (T), $6,1 \times 10^6$ D (M) en $6,9 \times 10^6$ D (B) (Mazzone et al., 1962) en voor EAMV : $6,1 \times 10^6$ D (M) en $7,5 \times 10^6$ D (B) (Gibbs en Paul, 1970).

Van SMV is met behulp van Röntgen-verstrooiing de elektronendichtheidsverdeling van de centrifugale componenten onderzocht. Uit de elektronendichtheidsverdeling volgt dat alle centrifugale componenten een buitenstraal hebben van ca. 14 nm. De binnenstraal van de topcomponent (lege eiwitmantel) is ca. 9,5 nm. Bij de nucleoproteïnes (M en B) werd tot een straal van 11 nm (M) en 11,1 nm (B) invloed van het RNA gevonden op de elektronendichtheidsverdeling, zodat er vanaf 9,5 nm tot tenminste 11 nm overlap is van RNA en eiwit (Anderegg, 1968).

Evenals bij het CPMV bestaan er bij de andere vertegenwoordigers van deze groep verschillen in stabiliteit van de verschillende centrifugale componenten. Bij het BPMV is het mogelijk om de middencomponent specifiek af te breken door het virus, opgelost in glycinebuffer pH 9,5, te emulgeren met chloroform bij $4^{\circ}C$, terwijl emulgeren met chloroform bij pH 7,0, of incubatie alleen in buffer van pH 9,5 geen effect heeft (Semancik en Bancroft, 1965). Ook bij het SMV is de stabiliteit van de centrifugale componenten duidelijk van de pH afhankelijk. Bij pH 9,5 zijn M en B na 24 uur volledig afgebroken en T gedeeltelijk. Wanneer de pH verlaagd wordt tot pH 2,5 dan is na 24 uur T volledig verdwenen, terwijl M en B nog nauwelijks afgebroken zijn (Mazzone et al., 1962).

Opsplitsing van de bodemcomponent in twee componenten met een verschillende zweefdichtheid bij centrifugatie in CsCl- of RbCl-gradiënten wordt gevonden bij SMV (RbCl, Mazzone et al., 1962) en bij RMV (CsCl, White et al., 1973). Een bevredigende verklaring voor dit verschijnsel kon evenals bij CPMV echter niet gegeven worden.

2 Materialen en methodes

2.1. Virus

Voor het onderzoek werd de laboratorium-cultuur van de isolatie van het cowpea-mozaïekvirus uit Nigeria (CPMV-Nig; Agrawal, 1964) gebruikt. Het virus werd vermeerderd in cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. var. Blackeye Early Ramshorn) in de kas bij 22-24°C, een lichtintensiteit van ca. 30.000 erg.cm^{-2}.sec^{-1} en een relatieve luchtvochtigheid van 65-80%, of in een klimaatkast, fabrikaat Sherer, model 255-6, bij een temperatuur van 30°C, een relatieve luchtvochtigheid van 80-90% en onder continu licht van gloeilampen en fluorescentiebuizen met een intensiteit van ca. 100.000 erg.cm^{-2}.sec^{-1}. De planten werden in de kas opgekweekt en na ongeveer 12-15 dagen (zodra de enkelvoudige bladeren zich hadden gestrekt) bepoederd met carborundum, grofte 600 mesh, en geïnoculeerd met sap van zieke planten. De secundaire bladeren werden verwijderd, en de planten of wel in de kas gelaten, of wel overgebracht in een klimaatkast. Het blad van de in de kas geplaatste planten werd 10 dagen na inoculatie en het blad van de planten in de klimaatkast 4 à 5 dagen na inoculatie geoogst. Het zieke bladmateriaal werd of wel direkt gebruikt voor de zuivering van het virus of wel bewaard bij -16°C.

De infectiositeit van de preparaten werd getoetst op *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. 'Pinto', die met lokale lesies reageert op infectie met CPMV. Per behandeling werden zes halve bladeren geïnoculeerd met 0,1-0,5 µg/ml van het te toetsen preparaat; de andere bladhelften werden geïnoculeerd met een viruspreparaat van bekende concentratie. Na inoculatie werden de blaadjes in petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd en gedurende 3 à 4 dagen geïncubeerd bij 18-20°C onder continu licht en bij een relatieve vochtigheid van 65-80%. Daarna werden de lokale lesies geteld en vergeleken met het aantal op de controle bladhelften.

2.2. Zuivering van het virus

Het virus werd gezuiverd volgens de polyethyleenglycol/NaCl methode van Van Kammen (1967) of volgens de butanol-chloroform methode van Steere (1956). Bij de zuivering met butanol-chloroform werden alle handelingen in de koude kamer verricht. De concentratie van het virus werd spectrofotometrisch bepaald waarbij de volgende extinctiecoëfficiënt gebruikt werd: E_{260} = 8,1 (1 cm lichtweg; 1 mg/ml).

2.3. De bereiding van het CPMV-RNA

Het CPMV-RNA werd geëxtraheerd volgens de fenol-Na-laurylsulfaat (SDS) methode, zoals beschreven door Van Griensven (1970). Het enige verschil met deze procedure was, dat de extractiebuffer geen NaCl bevatte en dat het RNA na de precipitatie met ethanol opgenomen werd in 0,1 x SSC (1 x SSC = standard saline citrate, bevattende 0,15 *M* NaCl + 0,015 *M* Na-citraat pH 7,2). De concentratie werd spectrofotometrisch bepaald met als extinctiecoëfficiënt E_{260} = 24,0 (1 cm lichtweg; 1 mg/ml). De infectiositeit van de RNA-preparaten werd getoetst op de lokale lesie waardplant *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. 'Pinto'. De concentratie van het inoculum bedroeg 5-50 µg/ml.

2.4. De bereiding van het eiwit

Bij de eiwitbereiding bleek het voor het verkrijgen van homogene preparaten noodzakelijk de SH-groepen van het eiwit te beschermen met reducerende agentia of te blokkeren door oxydatie of carboxymethylatie. De volgende procedures werden gebruikt:

2.4.1. Afbraak met SDS en carboxymethylering met joodaceetamide

CPMV (3 mg/ml) werd gedurende drie uur geïncubeerd onder N_2 in 0,1 *M* Na-fosfaat buffer pH 7,1 + 1% SDS + 1% 2-mercaptoëthanol (2-MCE) bij 37°C. Daarna werd het gereduceerde eiwit gecarboxymethyleerd door joodaceetamide toe te voegen tot een eindconcentratie van 0,3 *M*, en gedurende 30-60 min in het donker bij 37°C geïncubeerd. De reactie werd gestopt door een overmaat 2-MCE toe te voegen. Vervolgens werd het reactiemengsel gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedialyseerd tegen 0,01 *M* Na-fosfaat-buffer pH 7,1 + 0,1% SDS + 0,1% 2-MCE. In latere experimenten werd de reactie niet meer gestopt door een overmaat 2-MCE toe te voegen, maar werd het reactiemengsel direkt gedialyseerd tegen genoemde buffer.

2.4.2. Afbraak met mierenzuur en oxydatie met permierenzuur.

CPMV (5-7 mg) werd door centrifugeren bij hoog toerental geconcentreerd tot een pellet. Dit pellet werd geresuspendeerd in 0,5 ml ijskoud mierenzuur (99%); daarna werd 0,5 ml ijskoud permierenzuur (gemaakt volgens Hirs, 1967) toegevoegd en het reactiemengsel gedurende 2 uur op ijs geïncubeerd. Na de incubatie werd de reactie gestopt met een overmaat Na-bisulfiet en het reactiemengsel gedialy-

seerd gedurende een nacht bij kamertemperatuur tegen 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,1 + 0,1% SDS + 0,1% 2-MCE.

In andere experimenten werd het virus eerst met SDS afgebroken door het CPMV (10 mg/ml) gedurende 5 min bij 95°C te incuberen in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,1 + 2% SDS. Na afkoelen op ijs werd per 0,15 ml eiwitoplossing 0,5 ml mierenzuur en 0,1 ml permierenzuur toegevoegd. Na twee uur incubatie op ijs werd de reactie gestopt met een overmaat Na-bisulfiet en het reactiemengsel gedialyseerd tegen gedestilleerd water in de koude kamer. Het neergeslagen eiwit werd verzameld door centrifugeren bij laag toerental en daarna opgelost in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,1 + 0,1% SDS.

2.4.3. Afbraak met SDS en succinylering met barnsteenzuuranhydride

CPMV werd gesuccinyleerd volgens de methode van Frist et al. (1965), zoals die beschreven is door Niblett en Semancik (1969). De gesuccinyleerde eiwitten werden verder gedesaggregeerd door dialyse gedurende de nacht bij kamertemperatuur tegen 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,1 + 0,1% SDS + 0,1% 2-MCE.

2.4.4. Afbraak met guanidiniumchloride-LiCl en carboxymethylering met joodaceetamide

De afbraak van het CPMV met guanidiniumchloride-LiCl werd uitgevoerd volgens Wu (1970). Daartoe werd een virusoplossing (5-20 mg/ml) gemengd met een gelijk volume van het guanidiniumchloride-LiCl reagens (5,3 *M* guanidiniumchloride + 3,3 *M* LiCl + 0,01 *M* NaOH + 0,02 *M* boorzuur + 0,01 *M* 2-MCE). Dit reactiemengsel werd gedurende 24 uur op ijs geïncubeerd en af en toe geroerd. Het witte neerslag van nucleïnezuur dat zich tijdens deze incubatie vormde, werd verwijderd door 10 min bij 8.000 x *g* te centrifugeren. Het neerslag werd tweemaal gewassen met een kleine hoeveelheid 1 op 1 met water verdund guanidiniumchloride-LiCl reagens (ca. 0,1 x het oorspronkelijke volume). De supernatanten werden gecombineerd en de guanidiniumchloride-concentratie op 4 *M* gebracht met vast guanidiniumchloride. Ook werden dithiothreïtol en 2-MCE toegevoegd tot eindconcentraties van resp. 0,005 *M* en 0,1 *M*. Dit reactiemengsel werd gedurende 4 uur bij 37°C onder N_2 geïncubeerd. Na afkoelen tot kamertemperatuur werd joodaceetamide toegevoegd tot een concentratie van 0,15 *M* en het mengsel gedurende 1 uur in het donker onder roeren geïncubeerd. De pH werd hierbij op 8,2 gehouden door toevoegen van eerst 0,1 *M* NaOH en later 0,01 *M* NaOH. De reactie werd gestopt met een overmaat 2-MCE en het reactiemengsel gedialyseerd tegen gedesioniseerd water in de koude kamer

(2x verversen). De neergeslagen eiwitten werden verzameld door 10 min bij 8.000 x *g* te centrifugeren. Het neerslag werd tweemaal gewassen met een gelijk volume ijskoude 0,1 *M* ammoniumacetaat-oplossing in 95% ethanol om nucleotides te verwijderen (Wu, 1970). Het precipitaat werd drooggedampt in een exsiccator en bewaard bij -16°C, wanneer het niet direkt voor analyse gebruikt werd. Voor analyse werd het eiwit opgelost in 6 of 8 *M* ureum in gedesioniseerd water.

2.5.Het scheiden van de centrifugale componenten van het CPMV

De drie centrifugale componenten werden gescheiden door centrifugatie in een suikergradiënt in een B XXIX zone rotor (inhoud 1470 ml) van een MSE 65 ultracentrifuge. De rotor werd bij 2.500 rpm gevuld met een 15-30% (w/v) saccharosegradiënt in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0. De gradiënt was lineair met de straal en werd gevormd met een gradiënt-vormer, fabrikaat MSE. Ongeveer 120-140 mg CPMV werd met een injectiespuit in 8 ml 8% saccharose (w/v) in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 in het midden van de rotor gebracht. Daarna werd nog 100 ml 2% (w/v) saccharose in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 in het midden van de rotor gepompt met een snelheid van ca. 20 ml/min. Dit dient om de leidingen schoon te maken, zodat het volledige preparaat zich in een dunne cylindrische laag in de rotor bevindt. Bovendien wordt het preparaat dan wat verder van het centrum gebracht, zodat de centrifugaalkracht die op de te scheiden deeltjes werkt, aan het begin wat groter is en de deeltjes een grotere beginsnelheid hebben. Er werd gedurende 18 uur bij 23.000 rpm en 8°C gecentrifugeerd. Daarna werd de rotor afgeremd tot 2.500 rpm en gedesioniseerd water via het centrum in de rotor gepompt, zodat de gradiënt via de buitenkant uit de rotor geduwd werd. De optische dichtheid van de uitstromende vloeistof werd gemeten bij 281 nm met een LKB Uvicord II model 8300A, gekoppeld aan een Goerz RE 514 recorder, en opgevangen in fracties. Fracties die resp. T, M en B bevatten, werden gecombineerd en het virus geconcentreerd met 8% PEG en 0,2 *M* NaCl (Van Kammen en Van Griensven, 1970).

De gescheiden midden- en bodemcomponent werden nogmaals in de B XXIX rotor gecentrifugeerd, zoals hierboven aangegeven. Om verontreiniging van middencomponent met bodemcomponent en vice versa te voorkomen, werd de bodemcomponent uitgepompt met gedesioniseerd water via de buitenkant en de middencomponent met een 40% (w/v) oplossing van consumptiesuiker via het centrum van de rotor. Indien zeer zuivere componenten nodig waren (bv. voor de bepaling van de molecuulgewichten), werden M en B na scheiden in de zone rotor tot evenwicht gedraaid in 40% (w/v) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 8,5 gedurende 72 uur bij 22.000 rpm en ca. 10°C in een Spinco SW 25.1 rotor. De componenten werden met behulp van

een injectiespuit met een kromme naald uit de gradiënten gehaald; de banden werden zichtbaar gemaakt door een microscooplampje boven de gradiënt te plaatsen (Tyndall-effect). Na de evenwichtscentrifugatie werden de componenten gedialyseerd tegen tenminste tweemaal twee liter 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 en vervolgens geconcentreerd door centrifugatie bij hoog toerental. De topcomponent werd extra gezuiverd door centrifugeren in een lineaire 10-40% (w/v) saccharosegradiënt in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 gedurende 16 uur bij 23.000 rpm in een Spinco SW 25.1 rotor bij ca. 8°C. Ook hier werd de band van de topcomponent zichtbaar gemaakt met behulp van een microscooplampje, waarna de topcomponent met een injectiespuit uit de gradiënt werd gehaald. De suiker werd verwijderd door dialyse tegen 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0.

De concentraties van de gescheiden componenten werden spectrofotometrisch bepaald waarbij de volgende extinctiecoëfficiënten gebruikt werden: voor T, E_{280} = 1,28, voor M, E_{260} = 6,2 en voor B, E_{260} = 9,0 (1 cm lichtweg; 1 mg/ml).

2.6. Het scheiden van de elektroforetische vormen van het CPMV

De elektroforetische vormen van het CPMV werden gescheiden door zone-elektroforese in een 6-25% (w/v) lineaire saccharose-gradiënt in 0,005 *M* Tris/glycinebuffer pH 8,6. Het elektroforeseapparaat (Fig. 2.1) was geconstrueerd volgens de modificaties van A.H. Gold van het apparaat van Van Regenmortel (1964), zoals beschreven door Peters en Kitajima (1970). De procedure was als volgt (vgl. met Fig. 2.1). Eerst werd het apparaat gevuld tot even boven de geopende kraan A met elektroforesebuffer (A en C open). Daarna werd via kraan B 50% (w/v) saccharose in elektroforesebuffer toegevoerd, totdat het niveau van de suikeroplossing tot even boven kraan D gestegen was. Vervolgens werden kranen A, B en C gesloten en via kraan D zoveel suikeroplossing afgetapt, dat het grensvlak tussen suikeroplossing en elektroforesebuffer gelijk aan D kwam te liggen. Daarna werd via D de gradiënt (6-25% saccharose, lichtste deel eerst) ingepompt met een snelheid van ca. 2 ml/min. Nadat de gradiënt ingepompt was, werd via D met een injectiespuit het preparaat (6-16 mg CPMV in 2-4 ml 35% saccharose in elektroforesebuffer) onder de continue gradiënt op de 50% saccharoselaag gebracht. Om kraan D vrij te maken van virus werd na het preparaat nog 2 ml 50% saccharose in elektroforesebuffer via D in het apparaat gebracht. Vervolgens werden de elektrodevaten tot de verbindingsstukken gevuld met de elektroforesebuffer, de elektroden in de vaten geplaatst en via E_1 en E_2 werd verzadigde KCl-oplossing in de vaten gebracht, totdat de elektrodes ruim bedekt waren. Het bufferniveau moet dan rechts iets hoger staan dan links, zodat een gelijk gewicht van de vloeistofkolommen aan bei-

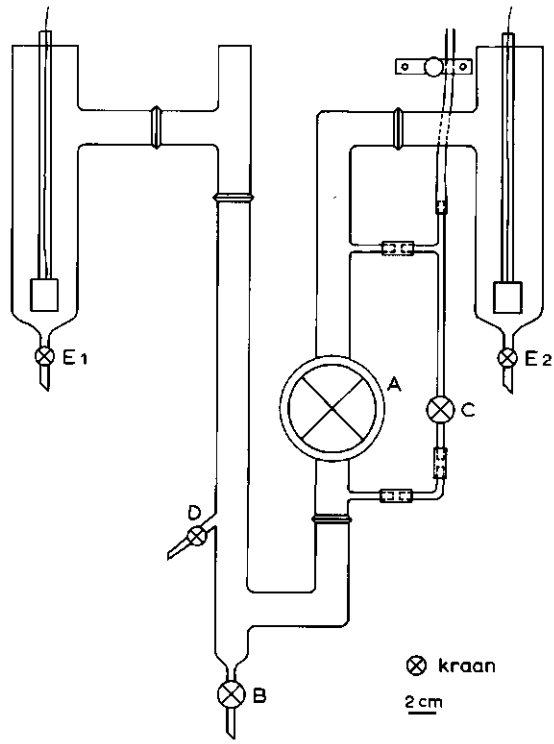


Fig. 2.1. Zone-gradiëntelektroforeseapparaat volgens Peters en Kitajima (1970)

de kanten benaderd wordt. Daarna werd kraan C geopend, zodat het hydraulisch evenwicht zich kon instellen. De virusband werd daarbij op zijn plaats gehouden door aan het linker of het rechter elektrodevat buffer toe te voegen. Zodra het evenwicht zich had ingesteld, hetgeen te zien was aan het op zijn plaats blijven van het preparaat, werd kraan A geopend en werden de elektrodes aangesloten aan een spanningsbron. Er werd geëlektroforeerd gedurende 16-20 uur bij 1-2 mA (ca. 300 V, constante spanning) in de koude kamer (ca. 4°C). Na de elektroforese werd de langzaam migrerende elektroforetische vorm afgetapt via kraan D, en de snel migrerende elektroforetische vorm met behulp van een injectiespuit met lange naald van boven af uit de gradiënt gehaald, zodat de vormen niet met elkaar in contact konden komen. Bij het beëindigen van de elektroforese waren de elektroforetische vormen 3 à 4 cm van elkaar gescheiden, en had F ongeveer 15 cm afgelegd. De elektroforetische vormen werden geconcentreerd door gedurende 3 uur bij 60.000 rpm en 8°C te centrifugeren in een MSE 65-Ti rotor (10 x 10 ml). De zuiverheid van de elektroforetische vormen werd gecontroleerd met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese.

2.7. Het scheiden van de eiwitten van het CPMV

De eiwitten werden gescheiden door middel van gelfiltratie over Sephadex G-200 met 5 *M* ureum in gedesioniseerd water als eluent (Wu, 1970) en door middel van polyacrylamide-gelelektroforese.

2.7.1. Scheiden door middel van gelfiltratie over Sephadex G-200

Vijf gram Sephadex G-200 werd gesuspendeerd in 5 *M* ureum in gedesioniseerd water en gedurende 4 dagen iedere dag gedecanteerd om de fijne deeltjes te verwijderen, en opnieuw gesuspendeerd. Daarna werd de gelmassa ontlucht onder vacuüm in een exsiccator en een kolom van ca. 100 x 1 cm gegoten. Voor gebruik werd deze kolom gedurende 24 uur gespoeld met 5 *M* ureum (2 ml/uur). De kolom werd beladen met ca. 18 mg gecarboxymethyleerd eiwit in 1 à 1,5 ml 6 *M* ureum en vervolgens geëlueerd met 5 *M* ureum met een snelheid van 1,5 ml/uur (bij kamertemperatuur). De optische dichtheid van het eluaat werd gemeten bij 281 nm met een Uvicord II (LKB model 8300-A), gekoppeld aan een LKB recorder type 6520 H. Fracties van ca. 2 ml werden opgevangen en doorgemeten met een Zeiss spectrofotometer, model PMQ II, en per piek gecombineerd. De zuiverheid van het eiwit in de pieken werd gecontroleerd met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van 0,1% SDS. Het eiwit werd uit de ureumoplossing neergeslagen door dialyse in de koude kamer tegen gedesioniseerd water en verzameld door 10 min bij 8.000 x *g* te centrifugeren. Daarna werd het eiwit geresuspendeerd in tweemaal gedestilleerd water en drooggevroren.

2.7.2. Scheiden door middel van polyacrylamide-gelelektroforese

Op kleine schaal werden de eiwitten ook gescheiden door elektroforese op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van 0,1% SDS. De eiwitbanden werden gekleurd met Amidozwart 10B en daarna met behulp van scheermesjes uitgesneden. Deze gelstukjes werden direkt gebruikt voor de bepaling van de aminozuursamenstelling van de eiwitten.

2.8. Polyacrylamide-gelelektroforese

Voor de polyacrylamide-gelelektroforese werden herkristalliseerde acrylamide en bisacrylamide gebruikt. Acrylamide werd herkristalliseerd uit chloroform en bisacrylamide uit aceton.

Glazen elektroforesebuisjes (65 x 6 mm) werden gereinigd door ze tenminste gedurende een nacht te weken in bichromaat-zwavelzuur. Daarna werden ze gespoeld met kraanwater en gedesioniseerd water. Deze voorzorgen zijn nodig om te voorkomen, dat de gels sterk aan de wand hechten, waardoor het vrijwel onmogelijk wordt om de gels onbeschadigd uit de buisjes te krijgen. Voor de elektroforese met SDS werden buisjes van perspex gebruikt.

2.8.1. Elektroforese van het CPMV

Het CPMV werd geëlektroforeerd op 3% polyacrylamidegels. De gels werden samengesteld uit de volgende voorraadoplossingen:
A: gelbuffer: 48 ml 1N HCl + 36,6 g Tris + gedesioniseerd water tot 100 ml
B: 30 g acrylamide + 0,8 g bisacrylamide + gedesioniseerd water tot 100 ml
P : 0,1 g ammoniumperoxydisulfaat in 10 ml gedesioniseerd water
T : 0,1 ml TEMED in 10 ml gedesioniseerd water.
Voor 3% gels werden direkt voor het gebruik gemengd: 2,5 ml A, 2 ml C, 0,58 ml T, 13,5 ml water en als laatste 1,4 ml P. Van dit mengsel werd per buisje 1,4 ml gepipeteerd. Het mengsel werd afgedekt met een laagje van ca. 6 mm gedesioniseerd water, waarna polymerisatie plaats vond in ca. een uur bij kamertemperatuur. Als elektroforesebuffer werd 0,005 *M* Tris/glycine pH 8,6 gebruikt. De preparaten (30-40 µg CPMV in 0,1 ml 10% sucrose of glycerine in elektroforesebuffer) werden door de buffer heen op de gels gebracht. Aan het kathode-reservoir werd een weinig broomfenolblauw als loopkleurstof toegevoegd. De gels werden bij 4°C in een Acrylophor elektroforeseapparaat (Pleuger) geëlektroforeerd met een constante spanning van ca. 30 V/cm (ongeveer 2 mA/buisje), totdat de loopkleurstof tot ca. 0,5 cm van het eind van de gel gemigreerd was (na 3 à 4 uur). Na afloop van de elektroforese werden de gels uit de buisjes gehaald door met behulp van een prepareernaald de gels onder water los te maken van de wand. Nadat het broomfenolblauw-front gemerkt was met Oostindische inkt werden de gels overgebracht in een kleurstofoplossing bestaande uit een verzadigde oplossing van Amidozwart 10B in 5% TCA (trichloorazijnzuur) (Van Loon, 1972). Na kleuren gedurende tenminste 3 uur werden de gels gespoeld met kraanwater, en ontkleurd door de kleurstof uit te wassen in 7% azijnzuur of door elektroforese in 7% azijnzuur loodrecht op de lengterichting van de gel.

2.8.2. Elektroforese van het eiwit

Het eiwit werd geëlektroforeerd op 7,5 en 10% polyacrylamidegels in de aanwe-

zigheid van 0,1% SDS volgens Weber en Osborn (1969). De gels werden gedurende 3-3½ uur geëlektroforeerd bij een constante spanning van ca. 8 V/cm (stroomsterkte ca. 8 mA/buisje). De eiwitten werden gekleurd met een oplossing van 2,5 g Amidozwart 10B in 500 ml 45,4% methanol + 9,2% azijnzuur in water. De gels werden ontkleurd door spoelen in 5% methanol + 7,5% azijnzuur. De positie van de loopkleurstof broomfenolblauw werd direct na de elektroforese gemerkt met Oost-indische inkt. De relatieve mobiliteit van de eiwitten werd berekend door de afstand afgelegd door de eiwitten te delen door de afstand afgelegd door de broomfenolblauwband.

Bij de schatting van de molecuulgewichten van de CPMV-eiwitten door middel van SDS-polyacrylamide-gelelektroforese werden de volgende eiwitten als molecuulgewichtsmarkers gebruikt: cytochroom c (11.700 D), ribonuclease A (13.700 D), TMV-eiwit (17.400 D), trypsine (23.300 D), carboxypeptidase A (34.600 D), ovalbumine (43.000 D), fumarase (49.000 D), runderserumalbumine (68.000 D). De molecuulgewichten zijn ontleend aan Weber en Osborn (1969) en Dunker en Rueckert (1969).

2.8.3. Elektroforese van het RNA

Voor de elektroforese van het RNA op polyacrylamidegels werden twee methodes gebruikt. Een methode waarbij het RNA niet gedenatureerd is (volgens Loening en Ingle, 1967) en een methode waarbij het RNA wel gedenatureerd is (volgens Reynders et al., 1973).

Bij de methode volgens Loening en Ingle (1967) werden de RNAs gedurende 2 uur bij 4°C geëlektroforeerd op 2% polyacrylamidegels + 0,5% agarose met een constante stroomsterkte van 5 mA/buisje.

Bij de methode volgens Reynders et al.(1973) werden de RNAs gedurende 5,5 uur bij 60°C in een buffer waarin 8 *M* ureum op 2,1% polyacrylamidegels geëlektroforeerd bij een constante stroomsterkte van 7,5 mA/buisje.

2.8.4. Weergave van de eiwit- en RNAbanden

De met Amidozwart 10B gekleurde gels werden gescand met een densitometer met een spleetbreedte van 0,05 cm, (Photovolt model 520-A), gekoppeld aan een lin/log recorder (Photovolt model 43 Varicord). De log mode werd gebruikt. Het elektroferogram van het RNA op de gels werd bepaald door de verdeling van de optische dichtheid bij 260 nm te meten met een spectrofotometer (Beckman DU), voorzien van een lineair transport accessoire (Gilford model 2410), een energy re-

cording adapter (ERA Beckman model 5800) en een lin/log recorder (Beckman model 1005).

2.9. Analytische ultracentrifuge

Voor analytische ultracentrifugering werd gebruik gemaakt van een ultracentrifuge (Spinco model E), uitgerust met Schlieren- en UV-optiek. De sedimentatiecoëfficiënten werden bepaald via de grafische methode van Markham (1960). Voor sedimentatie-evenwichtscentrifugering werd gebruik gemaakt van een Spinco model E analytische ultracentrifuge voorzien van UV-optiek met monochromator, fotoëlektrische scanner en multiplexer systeem. De sedimentatie-evenwichtsruns werden uitgevoerd door R.A. Heytink, Lab. voor Biochemie, Rijksuniversiteit, Leiden.

2.10. CsCl-evenwichtscentrifugatie

Evenwichtscentrifugatie in CsCl-oplossingen werd gedaan in een MSE SW 60-Ti rotor of een Spinco SW 39 rotor. Daartoe werd 0,1-0,3 mg virus gemengd met 5 ml (SW 39) of 6 ml (SW 60) 41% (w/w) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 6,5 of pH 8,5 afhankelijk van het doel van de run. De buisjes werden gedurende 18-22 uur gedraaid bij 10°C in de MSE SW 60 rotor bij 42.000 rpm of in de Spinco SW 39 rotor bij 35.000 rpm. Na de run werd de bodem van de buisjes aangeprikt met een MSE tube piercer en de inhoud met een LKB Varioperpex pomp door een Uvicord II (LKB model 8300-A) gepompt om de verdeling van het materiaal over de gradiënt vast te stellen,en opgevangen in fracties van 5 druppels. Van deze fracties werd de dichtheid bepaald uit de brekingsindex met behulp van de volgende formule (Stols, 1964):

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

waarbij ρ is de dichtheid bij 20°C en n_D^{20} de brekingsindex bij 20°C bij de Na-D lijn. De brekingsindex werd gemeten met een Atago refractometer.

De bepalingen van de zweefdichtheid werden gedaan met de analytische ultracentrifuge. Daartoe werden de te analyseren viruscomponenten gedurende 20-22 uur gedraaid bij 35.600 rpm en 20°C in cellen met KelF centerpieces. De plaats van de viruscomponenten in de cel werd vastgesteld met de Schlierenoptiek. Voor de run werd de dichtheid van de CsCl-oplossing, met 0,15-0,20 mg virus/ml met vast CsCl of gedesioniseerd water zo dicht mogelijk bij de op grond van de runs met SW rotoren te verwachten zweefdichtheid van de te analyseren component gebracht en daarna gedraaid. Na de run werd de inhoud van de cellen grondig gemengd en de

dichtheid van de oplossing bepaald. De zweefdichtheid van de preparaten werd berekend uit de afstand van de virusband tot het punt met een dichtheid gelijk aan de begindichtheid en de gradiënt. De gradiënt werd berekend uit de begindichtheid. De gradiënt op afstand r van het rotatiecentrum wordt gegeven door de formule: $d\rho/dr = \frac{\omega^2 r}{\beta_o}$ (Ifft en Vinograd, 1966).

In deze formule is $d\rho/dr$, de gradiënt; ω, de hoeksnelheid; β_o, een factor die afhankelijk is van de concentratie van de CsCl-oplossing. De β_o-waardes werden ontleend aan Ifft et al.(1961). Het punt in de cel met een dichtheid gelijk aan de begindichtheid werd berekend uit de wortel van het gemiddelde van de kwadraten van de afstand van de meniscus (r_m) en de bodem van de cel (r_b) tot het rotatiecentrum:

$$r_e = \sqrt{\frac{r_m^2 + r_b^2}{2}}$$

(Ifft et al., 1961). Met behulp van de dichtheidsgradiënt, de begindichtheid en de afstand van de virusband tot het punt met een dichtheid gelijk aan de begindichtheid kan dan de zweefdichtheid van het preparaat berekend worden.

2.11. Lichtverstrooiïng

Lichtverstrooiïngsmetingen werden gebruikt om de deeltjesgewichten van de centrifugale componenten te bepalen. Daartoe werd de volgende formule (Tanford, 1961) gebruikt:

$$\frac{I_\theta}{I_o} = \frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 (1+\cos^2\theta)c}{N\lambda^4 r^2 (1/M + 2Bc + 3\,Cc^2 \ldots)}$$

In deze formule is M het deeltjesgewicht, I_θ/I_o de verhouding van de intensiteit van het onder een hoek θ verstrooide licht en het invallende licht; n_o de brekingsindex van het oplosmiddel; dn/dc het brekingsindex increment; c, de concentratie in g/ml; N het getal van Avogadro; λ de golflengte van het licht in vacuüm, is 546,1 nm; r de afstand van het centrum van het verstrooiende volume tot de fotocel; B en C zijn constantes. De metingen werden gedaan door B. van Markwijk, Nederlands Instituut voor Zuivelonderzoek, Ede, met een Cenco-TNO lichtverstrooiïngsapparaat. Als standaard werd benzeen gebruikt. Omdat benzeen een hogere brekingsindex heeft dan het oplosmiddel, moet er gecorrigeerd worden voor het verschil in volume dat gezien wordt bij de benzeenstandaard en bij de preparaten. Door deze correctie in te voeren gaat voornoemde formule over in de volgende, waarbij de brekingsindex van het oplosmiddel vervangen wordt door de brekingsindex van benzeen (n_b = 1,503; Kerker, 1969):

$$\frac{I_\theta}{I_o} = \frac{2\pi^2 n_b^2 (dn/dc)^2 (1+\cos^2\theta)c}{N\lambda^4 r^2 (1/M + 2Bc + 3\,Cc^2 \ldots)}$$

Door in deze formule R_θ te substitueren voor $r^2 I_\theta / I_o (1+\cos^2\theta)$ en K, de optische constante, voor $2\pi^2 n_b^2 (dn/dc)^2 / N\lambda^4$ gaat deze formule over in de volgende:

$$R_\theta = \frac{Kc}{1/M+2Bc+3Cc2.....}$$

Voor de lichtverstrooiïngsmetingen werden de centrifugale componenten gedurende tenminste 72 uur gedialyseerd tegen 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 + 10^{-3} *M* NaN_3. Het dialysaat werd gebruikt als controle, de metingen werden hiervoor gecorrigeerd. Om stof te verwijderen werden het dialysaat en de preparaten (0,15-0,015 mg/ml) door een 100 mμ filter direkt in de meetcuvet gefiltreerd.

De brekingsindex werd gemeten met een Zeiss interferometer bij 25°C en een golflengte van 546,1 nm, het dialysaat werd gebruikt als blanco.

2.12. Elektronenmicroscopie

De viruspreparaten werden negatief gekleurd met of wel 2% fosforwolframaat pH 6,0 of pH 7,0, of wel met 1% uranyloxalaat pH 7,0 op een koolstofvlies en bekeken in een Siemens Elmiskop I of 101 bij een versnellingsspanning van 80 kV.

2.13. Aminozuuranalyses

De aminozuursamenstelling van de CPMV-eiwitten werd geanalyseerd met een Beckman Unichrom aminozuur analysator. De analyses werden gedaan door C. Vonk, Centrum voor Plantenfysiologisch Onderzoek, Wageningen en B. Kraal, Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit, Leiden. Voor de aminozuuranalyses werden de eiwitten gescheiden door gelfiltratie op Sephadex G-200 met 5 *M* ureum als eluent (Wu, 1970) of door middel van polyacrylamide-gelelektroforese (Butler, 1970). Bij de op de gels gescheiden eiwitten werden de eiwitbanden uit de gels gesneden en met een gelijke hoeveelheid (v/w) 12 N HCl onder vacuüm bij 105°C gedurende 24 uur gehydrolyseerd. Na hydrolyse werden de capsules afgekoeld op ijs en het neerslag van acrylzuur dat bij afkoelen ontstaat, afgecentrifugeerd. Het neerslag werd tweemaal uitgewassen met 6 N HCl en de gecombineerde supernatanten drooggedampt aan een filmverdamper onder vacuüm. De door middel van gelfiltratie gescheiden eiwitten werden gedialyseerd tegen gedestilleerd water, zodat de eiwitten uitvlokten en verzameld konden worden door centrifugeren bij laag toerental. De eiwitneerslagen werden daarna gedroogd onder vacuüm boven $CaCl_2$. Het eiwit werd opgenomen in 6 N HCl en gedurende 24 uur bij 110°C onder vacuüm gehy-

drolyseerd. Na hydrolyse werd het hydrolysaat drooggedampt en gebruikt voor de aminozuuranalyse.

2.14. Partieel specifiek volume van de eiwitmantel van CPMV

Het partieel specifiek volume van de eiwitmantel van CPMV werd berekend uit de aminozuursamenstelling en de partieel specifieke volumina van deze aminozuren (Schachman, 1957).

2.15. Fosfaat-bepaling

Via het fosfaatgehalte van de centrifugale componenten werd het RNA-gehalte van de componenten berekend. Op basis van de basensamenstelling van middencomponent-RNA en de bodemcomponent-RNA (Van Kammen en Van Griensven, 1970) bevatten deze RNAs resp. 9,146 en 9,106% fosfor. De hoeveelheid fosfor werd bepaald volgens de micromethode van Morrison (1964). Daartoe werden de centrifugale componenten gedurende 4 à 5 dagen in de koude kamer gedialyseerd tegen 4 à 5 maal ververste 0,02 *M* Tris/HCl buffer pH 7,2 + 0,08 *M* KCl. Een hoeveelheid virus overeenkomend met 3-4 µg P werd bij 100°C in een reageerbuis in een stoof gedroogd. Aan het residu werd 0,3 ml zwavelzuur (98%) toegevoegd. Het mengsel werd verhit boven een gasvlam, totdat de verassing compleet was hetgeen te zien was aan het niet verder verkleuren van de oplossing. Daarna werd 0,025 ml 30% (w/v) waterstofperoxyde in de oplossing gepipeteerd en opnieuw voorzichtig boven een gasvlam verhit, totdat geen gasbelletjes meer ontweken, hetgeen er op wees dat het peroxyde verdwenen was. De oplossing moest nu helder zijn, anders werd de behandeling met peroxyde herhaald. Na afkoelen werd 3,4 ml tweemaal gedestilleerd water langs de wand van de buis toegevoegd en 0,1 ml 16,5% (w/v) natriumsulfiet en gemengd. Daarna werd nog 1,0 ml 2% (w/v) ammoniummolybdaat en 0,01 g ascorbinezuur toegevoegd en opnieuw gemengd. Vervolgens werd het reactiemengsel gedurende 10 min in een kokend waterbad verwarmd. Na afkoelen werd het volume in gecalibreerde buizen precies op 5 ml gebracht met tweemaal gedestilleerd water, en de blauwe kleur werd gemeten bij 822 nm tegen een blanco waaraan alleen de diverse reagentia waren toegevoegd. De bepalingen werden tenminste in triplo uitgevoerd. De hoeveelheid P werd gevonden door extrapolatie naar een ijklijn die verkregen was door de extinctie van bekende hoeveelheden P te meten. Het glaswerk (erlenmeyers, buizen e.d.) werd gereinigd door het gedurende een nacht te weken in bichromaat-zwavelzuur. Daarna werd het gespoeld met kraanwater en

nagespoeld met tweemaal gedestilleerd water. Alle reagentia werden gemaakt met tweemaal gedestilleerd water.

2.16. Chemicaliën

Acrylamide, Koch-Light Labs.
Albumine, bovine serum, Sigma, fraction I, powder.
Albumine, egg, Sigma.
Ammoniumperoxydisulfaat, p.a., Merck.
Bis, N,M-metyleenbisacrylamide, Koch-Light Labs. Ltd.
Carboxypeptidase A, pancreas, Calbiochem.
CsCl, p.a. Merck.
Diethylpyrocarbonaat, K & K rare chemicals.
Fenol, p.a., Merck.
Guanidinium-hydrochloride, pfs, Sigma.
Lysozyme, Boehringer.
Natriumlaurylsulfaat (SDS), specially pure, BDH Chemicals Ltd.
Sephadex G-200, Pharmacia.
TEMED, N,N,N', N'-tetramethylethyleendiamine, Koch-Light Labs. Ltd.
TMV-eiwit, bereid volgens Fraenkel-Conrat (1957).
Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethaan, p.a. Merck.
Trypsine, Merck.
RNase A, bovine pancreas, protease free 1-A, Sigma.
Alle andere chemicaliën waren van de kwaliteit pro analyse, tenzij anders vermeld, en afkomstig van Merck,of BDH Chemicals Ltd.
Visking dialysehuls 8/32, 18/32 en 32/32 was afkomstig van Höfelt, 's-Gravenhage, en werd voor het gebruik uitgekookt in 10^{-4} *M* Na_3 EDTA.

3 De molecuulgewichten van de centrifugale componenten van CPMV en hun RNAs

De molecuulgewichten van de centrifugale componenten kunnen berekend worden uitgaande van het percentage RNA van elk der componenten en de molecuulgewichten van de RNAs. Op grond van het verschil in sedimentatiecoëfficiënt tussen T, M en B kan met behulp van de door Reichmann (1965) gegeven relatie een RNA-gehalte voor M en B geschat worden van resp. 24% en 33% RNA. De molecuulgewichten van de RNAs zijn berekend uit de sedimentatiecoëfficiënten van M-RNA en B-RNA. Daarvoor is gevonden $1{,}45 \times 10^6$ D voor M-RNA en $2{,}58 \times 10^6$ D voor B-RNA (Van Kammen, 1971). Voor het molecuulgewicht van de middencomponent kan zo $6{,}04 \times 10^6$ D berekend worden, waarvan $4{,}59 \times 10^6$ D voor rekening van de capside komt. Evenzo wordt voor de bodemcomponent een waarde van $7{,}74 \times 10^6$ D gevonden, waarvan $5{,}16 \times 10^6$ D voor rekening van de eiwitmantel komt.Dit zou er op kunnen wijzen, dat M en B verschillende capsides hebben. Er is echter geen verschil in grootte tussen M en B in de elektronenmicroscoop zichtbaar (Agrawal, 1964) en er is geen verschil bij elektroforese van M en B (Semancik, 1966). De betekenis van de genoemde molecuulgewichten is ook erg twijfelachtig, omdat ze geen van alle berusten op een direkte bepaling van het molecuulgewicht. Het is bovendien bekend, dat het sedimentatiegedrag van RNAs sterk afhankelijk is van de compactheid van het molecuul, die sterk kan variëren afhankelijk van de ionensterkte. Daarmee is bij deze molecuulgewichtsbepalingen geen rekening gehouden.

In dit hoofdstuk worden de deeltjesgewichten van de centrifugale componenten op twee manieren direkt bepaald namelijk uit lichtverstrooiingsmetingen en met de methode van sedimentatie-evenwicht. De molecuulgewichten van de RNAs zijn bepaald uit de relatieve mobiliteit ten opzichte van de ribosomale RNAs van *Escherichia coli* door polyacrylamide-gelelektroforese en uit de sedimentatiesnelheid van het RNA, nadat dit gedenatureerd was met formaldehyde.

3.1. Bepaling van de deeltjesgewichten van T, M en B door middel van lichtverstrooiing

De basisvergelijking die bij de bepaling van de deeltjesgewichten door middel van lichtverstrooiing gebruikt wordt, is de volgende (Tanford, 1961):

$$R_\theta = I_\theta r^2 / I_o \ (1+\cos^2\theta) = Kc/(1/M + 2Bc + 3Cc^2 \ldots)$$

K is de optische constante K en is gelijk aan : $\frac{2\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{N\lambda^4}$, n is de brekingsindex van het oplosmiddel; dn/dc, het brekingsindexincrement; N, het getal van Avogadro; λ de golflengte van het gebruikte licht (= 546,1 nm);

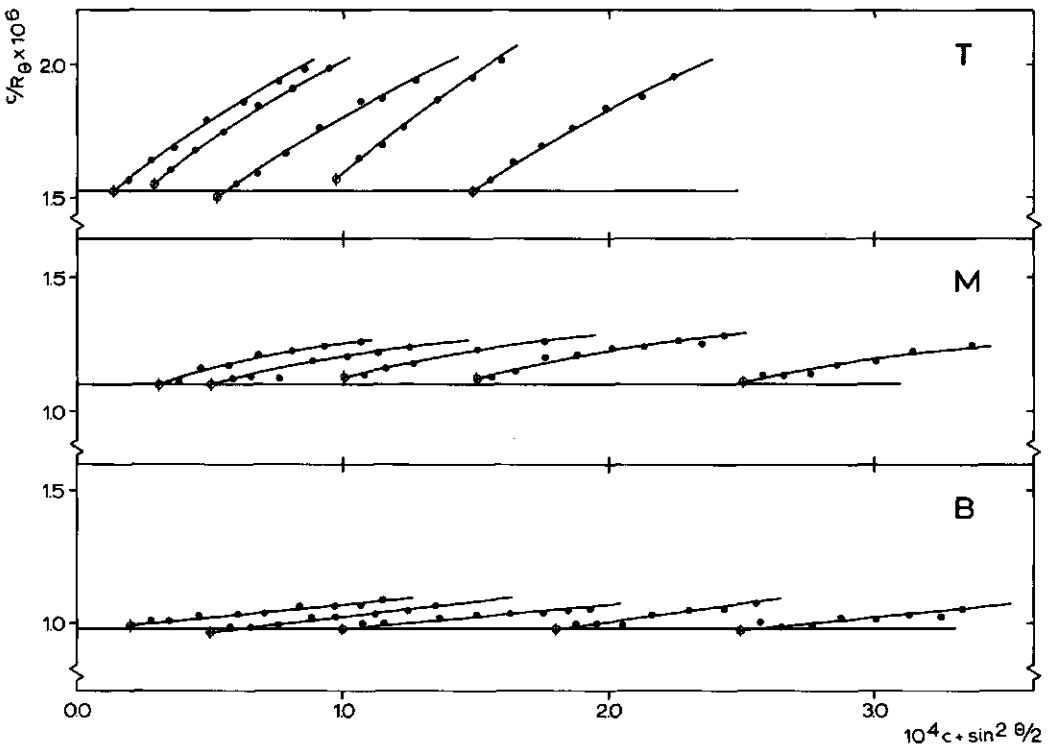


Fig. 3.1. Zimm plots van de centrifugale componenten van CPMV in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer + 0,001 *M* Natriumazide pH 7,0. T is topcomponent; M is middencomponent; B is bodemcomponent.

$\frac{I_\theta}{I_o}$ de verhouding tussen de intensiteit van het onder een hoek θ verstrooide licht en het invallende licht, c de concentratie in g/ml en M het deeltjesgewicht. Omdat de deeltjes vrij groot zijn ten opzichte van de golflengte van het gebruikte licht heeft er destructieve interferentie plaats. De mate van interferentie is hoek afhankelijk en wordt nul bij een hoek van 0°. Om deze reden worden de lichtverstrooiïngsmetingen onder verschillende hoeken gedaan. De gegevens, berekend als $^c/R_\theta$ waardes worden uitgezet tegen $\sin^2 \theta/2 + 10.000\ c$ (ZIMM-plot; Zimm, 1948) en geëxtrapoleerd naar een hoek van 0°. De factor 10.000 is gekozen om een goede spreiding te krijgen van de punten. In Fig. 3.1 zijn de ZIMM-plots van T, M en B gegeven. Wanneer de $^c/R_\theta$ waardes bij $\theta = 0°$ voor de verschillende concentraties geëxtrapoleerd worden naar $c = 0$, kan uit het snijpunt van deze lijn met de $^c/R_\theta$-as (ordinaat) het deeltjesgewicht berekend worden. Wanneer c nadert 0, kan namelijk formule (1) ook als $^c/R_\theta = 1/KM$ geschreven worden, zodat de asafsnede gelijk is aan 1/KM. De in Fig. 3.1 gegeven resultaten zijn geba-

seerd op een verstrooiïng van 10 voor benzeen, dat als standaard werd gebruikt. De werkelijke verstrooiïng van benzeen ($R_{90}o$) is 15,6 x 10^{-6} cm^{-1} (Kerker, 1969), zodat hiervoor gecorrigeerd moet worden. De berekening van de molecuulgewichten uit de waarnemingen uitgezet in Fig. 3.1 is weergegeven in Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Bepaling van de deeltjesgewichten van T, M en B door middel van lichtverstrooiïng.

component	snijpunt[a] $^c/R_\theta$ x 10^6	dn/dc	K^a x 10^7	$Kc/R_\theta{}^a$ x 10^{13}	$Kc/R_\theta{}^b$ x 10^7	MW x 10^6
top	1,53	0,164	2,28	3,48	2,23	4,48
midden	1,12	0,174	2,49	2,78	1,77	5,60
bodem	0,98	0,178	2,63	2,57	1,65	6,06

[a] gebaseerd op $R_{90}o$ benzeen = 10

[b] gecorrigeerd voor $R_{90}o$ benzeen = 15,6 x 10^{-6} cm^{-1} (Kerker, 1969)

$K = \frac{2\pi^2 n_b^2 (dn/dc)^2}{N\lambda^4}$; n_b = 1,503

Opvallend is het verschil in de hellingen van de lijnen die in de ZIMM-plots (zie Fig. 3.1) gevonden worden bij extrapolatie naar hoek is nul, bij de verschillende centrifugale componenten. De helling van deze lijnen geeft de hoekafhankelijkheid van de $^c/R_\theta$ waardes weer, en is in combinatie met het deeltjesgewicht een maat voor de gyratiestraal (R_G). De limiet van de helling, wanneer $c \to 0$, vermenigvuldigd met het deeltjesgewicht is gelijk aan $(16\pi^2/3\lambda^2)\ R^2_G$ (Tanford, 1961). Door de gyratiestraal wordt de massaverdeling van het deeltje gegeven volgens de vergelijking: $R^2_G = \Sigma m_i r_i / \Sigma m_i$, waarbij m de massa is op afstand r van het middelpunt van de massa.

Uitgaande van een gelijke diameter voor elk van de centrifugale componenten betekent dit, dat de gemiddelde massa zich bij T op de grootste afstand van het midden bevindt en bij B op de kleinste afstand. Dit is ook te verwachten op grond van de RNA-inhoud van de deeltjes: T is een lege eiwitmantel en bevat geen RNA, M en B zijn nucleoproteïnes en bevatten resp. 25% en 36% RNA.

3.2. Bepaling van de deeltjesgewichten van T, M en B met behulp van sedimentatie-evenwichtscentrifugatie

De deeltjesgewichten van de centrifugale componenten werden bepaald door centrifugatie tot sedimentatie-evenwicht volgens de 'high speed equilibrium' methode van Yphantis (1964).
De formule die bij deze bepalingen wordt gebruikt is de volgende:

$$M = \frac{2RT}{\omega^2(1-\bar{v}\rho)} \times \frac{d \ln c}{d r^2} \qquad (2)$$

In deze formule is M het molecuulgewicht; R, de gasconstante; T, de absolute temperatuur in ^{o}K; ω , de hoeksnelheid (rad/sec); $\bar{v}$, het partieel specifiek volume; ρ , de dichtheid van het oplosmiddel bij de gegeven temperatuur; c, de concentratie van het preparaat op afstand r van het rotatiecentrum. De preparaten werden tot evenwicht gedraaid bij 20± 0,1^{o}C in 0,02 *M* Tris/HCl buffer pH 7,2 + 0,08 *M* KCl + 10^{-3} *M* NaN_3 in een 6-channel equilibrium cel (12 mm cel; kolomhoogte 3 mm) in een AN-J rotor in een Spinco model E analytische ultracentrifuge. De dichtheid van het oplosmiddel was 1,0023 g/cm^3. De concentratieverdeling van de preparaten in de cel werd gemeten met de absorptieoptiek (bij 265 nm). Als maat voor de concentratie werd het aantal mm recorderuitslag gebruikt. De natuurlijke logaritme van de concentratie (ln c) werd daarna uitgezet tegen het kwadraat van de afstand tot het rotatiecentrum (r^2). In Fig 3.2 wordt de grafische weergave van de ln c ten opzichte van r^2 functie gegeven. Deze plots geven rechte lijnen, wat er op wijst dat de preparaten homogeen waren. Het partieel specifiek volume

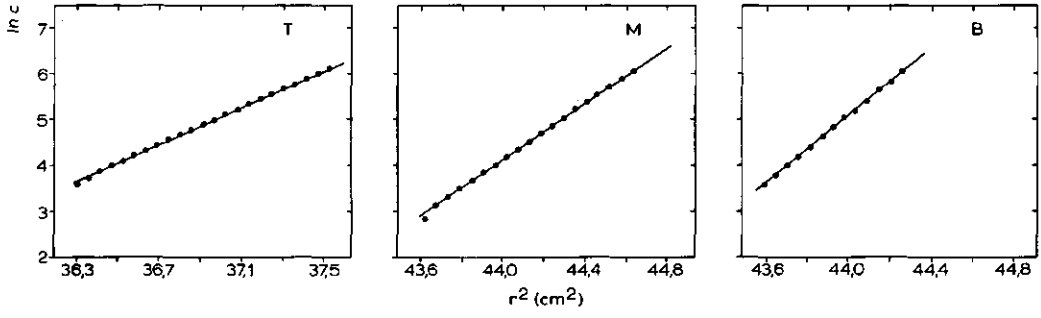


Fig. 3.2. Bepaling van het deeltjesgewicht van top- (T), midden- (M) en bodemcomponent (B). De rotorsnelheid bedroeg resp. 2985 rpm, 2600 rpm en 2586 rpm.

van de eiwitmantel werd berekend uit de aminozuursamenstelling gegeven in hoofdstuk 4 (Tabel 4.3) met behulp van de partieel specifieke volumina van de afzonderlijke aminozuren (Schachman, 1957) volgens de formule $\bar{v} = \bar{v}_i w_i$, waarbij $\bar{v}_i$ het partieel specifiek volume van aminozuur i is en w_i het gewichtsaandeel van dit aminozuur. Het partieel specifiek volume van het RNA werd op 0,55 ml/g gesteld (Markham, 1962). Ervan uitgaande dat T geen RNA bevat werd voor T een $\bar{v}$ van 0,73 ml/g berekend, voor M met 25% RNA een $\bar{v}$ van 0,69 ml/g en voor B met 36% RNA een $\bar{v}$ van 0,67 ml/g. De RNA-gehaltes zijn de percentages RNA, zoals die bepaald zijn uit de P-gehaltes (paragraaf 3.3.1.). Invoeren van het partieel specifiek volume, hoeksnelheid, richtingscoëfficiënt van de ln c versus r^2 ($= \frac{d \ln c}{d r^2}$) lijnen en de dichtheid van de buffer in formule (2) geeft dan als deeltjesgewicht voor T: $3{,}80 \times 10^6$ D, voor M: $5{,}15 \times 10^6$ D en voor B: $5{,}87 \times 10^6$ D.

3.3. De molecuulgewichten van de RNAs

De molecuulgewichten van de RNAs van CPMV werden bepaald volgens drie empirische methodes. Deze methodes verschillen in de mate waarin de RNAs bij de bepaling gedenatureerd zijn. De resultaten van deze bepalingen zijn met elkaar vergeleken en met de waardes die berekend kunnen worden uit de RNA-gehaltes van M en B.

3.3.1. Bepaling van het RNA-gehalte van M en B

Het RNA-gehalte van M en B werd berekend uit het P-gehalte. Het fosforgehalte van de RNAs werd afgeleid uit de basensamenstelling van M- en B-RNA, zoals die gegeven is door Van Kammen en Van Griensven (1970) met behulp van de formule: $\%P = \Sigma P_i w_i$, waarbij P_i het fosfor-gehalte is van base i en w_i het gewichtsaandeel van deze base. Op deze manier werd voor M-RNA een P-gehalte van 9,146% berekend (basensamenstelling: G 20,7; A 28,4; C 19,3; U 31,6) en voor B-RNA een P-gehalte van 9,109% (basensamenstelling: G 22,9; A 28,5; C 17,2; U 31,4). De hoeveelheid P in M en B werd bepaald volgens de methode van Morrison (1964), waarbij per bepaling uitgegaan werd van 80-100 µg virus. Uit het P-gehalte van M en B werd voor M 25,1 ± 0,15% RNA berekend en voor B 36,1 ± 0,15% RNA (7 bepalingen voor elke component). Gebaseerd op de deeltjesgewichten van M en B (paragraaf 3.2.) en deze RNA-gehaltes kunnen voor M- en B-RNA molecuulgewichten van $1{,}3 \times 10^6$ D (M) en $2{,}1 \times 10^6$ D (B) berekend worden.

3.3.2. Molecuulgewichten van M- en B-RNA uit de sedimentatiesnelheid van de RNAs na denaturatie met formaldehyde

Bepaling van molecuulgewichten van RNAs uit de sedimentatiesnelheid geeft misleidende resultaten, omdat verschillende RNAs een verschillende compactheid hebben bij veranderingen in de zoutsterkte. Omdat de bijdrage van de conformatie moeilijk vast te stellen is, is het niet eenvoudig om molecuulgewichten af te leiden uit S-waardes. Volgens Boedtker (1968) is na formyleren van de RNAs nog steeds ca. 5% secundaire structuur aanwezig en wordt de sedimentatiecoëfficiënt dan wel een betrouwbare maat voor het molecuulgewicht. Volgens haar bestaat dan de volgende relatie tussen sedimentatiecoëfficiënt en molecuulgewicht:
$S_{20,w} = 0{,}05\ M^{0,4}$.
De CPMV-RNAs werden geformyleerd volgens de door Boedtker (1968) beschreven methode. Daarna werden de sedimentatiesnelheden bepaald bij 25°C in 0,01 *M* NaH_2PO_4 + 0,09 *M* Na_2HPO_4 + 1,1 *M* formaldehyde in een analytische ultracentrifuge met UV-optiek. De concentratie van de preparaten was ca. 30 µg RNA/ml. De gevonden sedimentatiesnelheden (S_{app}) werden omgerekend naar standaardcondities ($S_{20,w}$ is snelheid in water bij 20°C) met behulp van de gegevens over dichtheid en viscositeit van de buffer vermeld door Boedtker (1968). De resultaten zijn samengevat in Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Molecuulgewichten van M- en B-RNA bepaald via de sedimentatie-coëfficiënt na reactie met formaldehyde

RNA	S_{app}	$S_{20,w}$	MW x 10^{-6} D
M	12,0	14,36	1,4
B	14,15	16,91	2,1

3.3.3. Bepaling van de molecuulgewichten van M- en B-RNA door middel van polyacrylamide-gelelektroforese

Op grond van de resultaten van Loening (1967) lijkt er voor de meeste RNAs een lineair verband te bestaan tussen de afstand afgelegd bij polyacrylamide-gelelektroforese en de logaritme van het molecuulgewicht. Dit lineaire verband kan grafisch uitgezet worden door de afstand afgelegd door een aantal RNAs met bekend molecuulgewicht uit te zetten tegen de logaritme van hun molecuulgewicht.

Uit de loopsnelheid van RNAs met onbekend molecuulgewicht kan dan uit deze grafiek direkt het molecuulgewicht afgelezen worden. Als RNAs met bekend molecuulgewicht werden de ribosomale RNAs van *Escherichia coli* gebruikt. De molecuulgewichten van deze RNAs zijn resp. 1,07 x 10^6 D en 0,55 x 10^6 D (Stanley en Bock, 1965). Op deze manier werd voor M-RNA een molecuulgewicht van 1,5 x 10^6 D gevonden en voor B-RNA een molecuulgewicht van 2,55 x 10^6 D.

3.3.4. Bepaling van de molecuulgewichten van M- en B-RNA door middel van polyacrylamide-gelelektroforese onder denaturerende omstandigheden

De conformatie van het RNA heeft grote invloed op de loopsnelheid. Dit kan aanleiding geven tot fouten in de bepaling van de molecuulgewichten met de hierboven beschreven methode, vooral wanneer de mate van secundaire structuur van de te toetsen RNAs niet gelijk is aan de mate van de secundaire structuur van de RNAs waarmee vergeleken wordt. Door Reynders et al. (1973) is een gelelektroforesemethode ontwikkeld, waarbij de RNAs volledig gedenatureerd zijn en er dus geen verschillen in secundaire structuur meer bestaan. Bij deze methode worden de RNAs geëlektroforeerd op polyacrylamidegels bij 60°C in 8 *M* ureum. Onder deze omstandigheden hebben zowel de *Escherichia coli* ribosomale RNAs als de CPMV-RNAs geen secundaire structuur meer. Voor de *Escherichia coli* RNAs is dit aangetoond door Reynders et al, (1973). In Figuur 3.3 is de smeltcurve gegeven van de CPMV-RNAs. In deze figuur is te zien, dat bij uitsmelten van de CPMV-RNAs in de

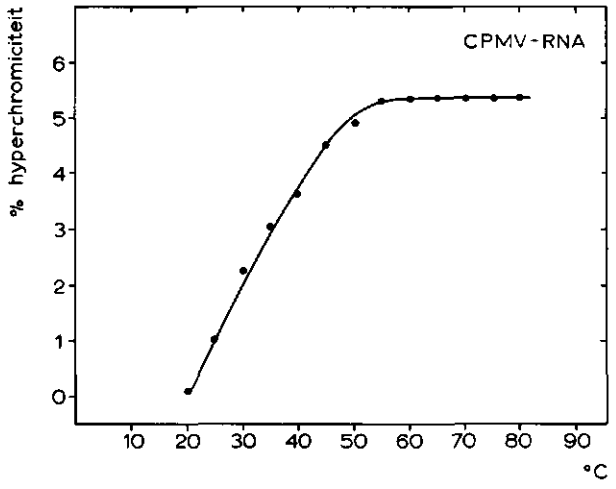


Fig. 3.3. Hyperchromiciteitscurve van de CPMV-RNAs in 8 *M* ureum + 0,02 *M* Tris/HCl + 0,002 *M* EDTA pH 7,5 (bij 20°C).

elektroforesebuffer de extinctie boven 55°C niet meer toeneemt. Het RNA is dan volledig gedenatureerd. Door de afstanden afgelegd door de *Escherichia coli* RNAs uit te zetten tegen de logaritme van hun molecuulgewicht en daarna de afstanden afgelegd door de CPMV-RNAs in deze grafiek te interpoleren werden molecuulgewichten gevonden van 1,37 x 10^6 D (M-RNA) en 2,02 x 10^6 D (B-RNA).

3.4. Samenvatting van de resultaten

De resultaten van de verschillende deeltjes- en molecuulgewichtsbepalingen zijn samengevat in Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Overzicht van de deeltjesgewichten van de centrifugale componenten en de molecuulgewichten van hun RNAs (x 10^{-6} D)

centrifugale componenten			RNAs			
methode	lichtverstr.	sed.-evenw.	sed.	snelh.[a]	PAAGE[b]	PAAGE[c]
T	4,5	3,80		-	-	-
M	5,6	5,15	M-RNA	1,4	1,5	1,37
B	6,1	5,87	B-RNA	2,1	2,55	2,02

[a] na formyleren volgens Boedtker (1968)

[b] PAAGE: polyacrylamide-gelelektroforese (paragraaf 3.3.3.)

[c] PAAGE: polyacrylamide-gelelektroforese onder denaturerende omstandigheden: 8 *M* ureum, 60°C

3.5. Bespreking

De deeltjesgewichten van de centrifugale componenten werden bepaald door middel van lichtverstrooiing en sedimentatie-evenwichtscentrifugeren. De waardes die bij lichtverstrooiing gevonden worden zijn iets hoger dan bij sedimentatie-evenwicht. De verschillen in molecuulgewichten voor M en B bij lichtverstrooiing en sedimentatie-evenwicht bedragen resp. 450.000 D en 200.000 D. Deze verschillen liggen binnen de experimentele fout en kunnen verklaard worden door onzekerheden bij de bepalingen uit sedimentatie-evenwicht in de berekening van het partieel specifiek volume van de componenten, bijv. voor RNA op 0,55 ml/g gesteld en door onzekerheid over de concentratie bij lichtverstrooiing. In het laatste geval is het effect zeer groot, omdat de concentratie in het kwadraat

voorkomt in de optische constante. Het verschil in deeltjesgewicht, dat bij T gevonden wordt tussen sedimentatie-evenwicht en lichtverstrooiïng bedraagt ca. 700.000 D. De hoge waarde bij lichtverstrooiïng zou veroorzaakt kunnen worden door de aanwezigheid van geaggregeerd eiwit. Dit geaggregeerde materiaal wordt bij sedimentatie-evenwicht neergeslagen en wordt dan niet verder opgemerkt. Bij de lichtverstrooiïngsmetingen wordt alleen materiaal met een grotere diameter dan 100 mμ verwijderd door filtreren. Alles wat dan nog buiten de buffer en het preparaat aanwezig is, zal het resultaat beïnvloeden. De mogelijkheid van enige verontreiniging met hoogmoleculair materiaal bij de lichtverstrooiïngsmetingen van M en B is niet uitgesloten. De waardes van lichtverstrooiïng liggen alle consequent hoger dan bij sedimentatie-evenwicht. Daarom lijkt het niet onaannemelijk dat aggregatie of een kleine verontreiniging met grote deeltjes hier een rol heeft gespeeld. Omdat het molecuulgewicht dat met lichtverstrooiïng gevonden wordt een gewogen gemiddelde is, zal verontreiniging met hoogmoleculair materiaal veel meer invloed hebben op het gevonden molecuulgewicht van een laagmoleculaire verbinding (bijv. T) dan op een hoogmoleculaire verbinding (bijv. B).

De molecuulgewichten van de RNAs werden bepaald volgens drie empirische methodes. Bij deze methodes varieert de secundaire structuur van de RNAs van aanwezig tot volledig afwezig. Uit de gevonden molecuulgewichten voor de CPMV-RNAs blijkt, dat verschillen in secundaire structuur tussen de marker-RNAs en de te toetsen RNAs invloed hebben op het resultaat. Dit is het duidelijkst te zien aan het molecuulgewicht van B-RNA. Onder niet denaturerende omstandigheden wordt 2,55 x 10^6 D gevonden en onder volledig denaturerende omstandigheden 2,02 x 10^6 D. Bij de bepaling onder denaturerende omstandigheden is geen secundaire structuur meer aanwezig, zoals ook gebleken is uit de smeltcurves van de marker-RNAs (Reynders et al., 1973) en de CPMV-RNAs (Fig. 3.3). Omdat onder deze condities de RNAs een gelijke ruimtelijke structuur hebben, geeft de empirische relatie tussen loopsnelheid bij polyacrylamide-gelelektroforese dan wel betrouwbare resultaten. De molecuulgewichten van M- en B-RNA komen ook redelijk goed overeen met de waardes die uit de lengte van de ds-RNAs berekend kunnen worden (J.M.H. Assink, 1973, dissertatie). De lengte van B-ds-RNA van 1,8 μ komt bij een internucleotideafstand van 2,73-2,75 Å (Arnott et al., 1967; Nicolaieff et al., 1970) overeen met een molecuulgewicht voor B-RNA van 2,16 x 10^6 D, en de lengte van 1,1 μ voor het M-ds-RNA met een molecuulgewicht van 1,33 x 10^6 D voor M-RNA.

De waardes die gevonden werden voor de molecuulgewichten van M- en B-RNA onder denaturerende omstandigheden (1,37 x 10^6 D en 2,02 x 10^6 D) komen zeer goed overeen met de waardes die voor de deeltjesgewichten van de centrifugale compo-

nenten die gevonden werden door middel van sedimentatie-evenwichtscentrifugeren (resp. 3,80 x 10^6 D, 5,15 x 10^6 D en 5,87 x 10^6 D). Voor M kan hieruit een eiwitdeel van 3,78 x 10^6 D berekend worden en voor B een eiwitdeel van 3,85 x 10^6 D. Deze waardes liggen dicht bij de waarde voor de topcomponent (lege eiwitmantel) van 3,80 x 10^6 D. Omdat deze balans zeer goed klopt, lijken de deeltjesgewichten die door sedimentatie-evenwichtscentrifugeren zijn bepaald de beste.

4 De structuur van de eiwitmantel van CPMV; de chemische subeenheid

CPMV is zeer resistent tegen afbraak. Wanneer gepoogd wordt de eiwitmantel te dissociëren met bijv. fenol, of door hoge zoutsterkte, of door incubatie bij zeer hoge of lage pH is het niet mogelijk om het manteleiwit in niet geaggregeerde vorm in handen te krijgen (Niblett en Semancik, 1969; Wu en Bruening, 1971).

In de jaren '69 en '70 is het gebruik van natriumlaurylsulfaat (SDS) sterk naar voren gekomen als middel om viruseiwitten te bereiden in een oplosbare en niet geaggregeerde vorm (Kruseman, 1969; Kaper, 1972). Met behulp van dit reagens bleek het inderdaad mogelijk om de CPMV-eiwitten te bereiden en in oplossing te houden (Geelen et al., 1972). Ongeveer tegelijkertijd is door Wu (1970) een methode gepubliceerd waarbij gebruik gemaakt werd van guanidiniumchloride-LiCl. Beide methodes zijn toegepast bij het onderzoek naar de chemische subeenheid van de eiwitmantel van het CPMV, dat in dit hoofdstuk beschreven wordt.

4.1. Isolatie van het eiwit

4.1.1. Afbraak met SDS

Wanneer het CPMV gedurende 3 uur bij 37°C werd geïncubeerd met 1% SDS en 1% 2-MCE en het reactiemengsel vervolgens geanalyseerd werd met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS (Weber en Osborn, 1969) werden er vijf eiwitcomponenten gevonden (zie Fig. 4.1.A). Aangezien dit meer

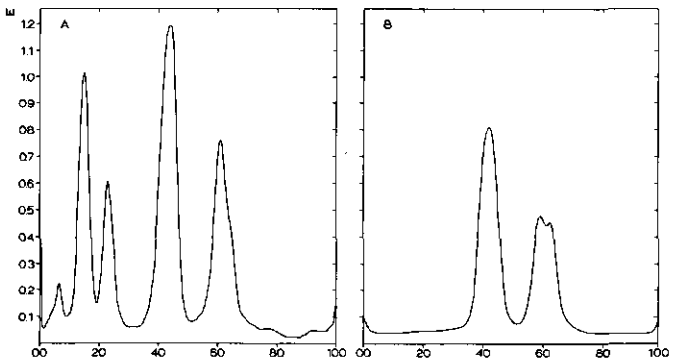


Fig. 4.1. Elektroforesepatronen van de eiwitten van CPMV geanalyseerd op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van 0,1% SDS. A: SH- groepen niet beschermd of geblokkeerd; B: SH- groepen gecarboxymethyleerd met joodaceetamide. De elektroforese was van links naar rechts met de anode rechts. De mobiliteit van de broomfenolblauw-band werd gelijk aan 100 gesteld.

Tabel 4.1. Afbraak van cowpea-mozaïekvirus onder verschillende omstandigheden.

Exp.	Incubatie condities			analyse[b]	Elektroforese-patroon gelijk aan Figuur:
	tijd	temp.	medium[a]		
1	3 uur	37°C	1% SDS	standaard	4.1.A
2	3 uur	37°C	1% SDS, 1% 2-MCE	standaard	4.1.A
3	3 uur	37°C	1% SDS, 1% 2-MCE	0,1% 2-MCE	4.1.B
4	3 uur	37°C	1% SDS, 1% 2-MCE + CM[c]	standaard	4.1.B
5	3 uur	37°C	2% SDS, 1% 2-MCE, 8 *M* ureum	2 *M* ureum	4.1.A
6	3 uur	37°C	2% SDS, 1% 2-MCE, 8 *M* ureum	0,2% 2-MCE	4.1.B
7	5 min	95°C	1% SDS, 1% 2-MCE	standaard	4.1.A
8	5 min	95°C	1% SDS, 1% 2-MCE	0,1% 2-MCE	4.1.A
9	5 min	95°C	1% SDS, 1% 2-MCE + CM	standaard	4.1.A
10	5 min	95°C	1% SDS + permierenzuur[d]	standaard	4.1.A

[a] eindconcentratie van SDS, 2-mercaptoëthanol (2-MCE) en ureum in een 0,3-0,4% virusoplossing in 0,1 *M* natriumfosfaatbuffer pH 7,1.

[b] standaardanalyse is analyse door elektroforese op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van SDS, volgens de methode van Weber en Osborn (1969). Aan dit systeem zijn ureum en 2-MCE toegevoegd als aangegeven.

[c] CM betekent, dat het eiwit gecarboxymethyleerd is met joodaceetamide na de aangegeven incubatieperiode.

[d] na de aangegeven incubatieperiode werd het eiwit geoxydeerd met permierenzuur.

componenten zijn, dan ooit gevonden waren voor een plantevirus met afmetingen van CPMV, en bovendien de mobiliteit van een aantal banden suggereerde, dat het eiwit in die banden een molecuulgewicht zou hebben, veel hoger dan de eiwitten van bekende plantevirussen (N.B. de molecuulgewichten van de manteleiwitten van plantevirussen variëren van 17.000 tot 50.000 *D* voor verschillende virussen), leek het waarschijnlijk, dat enkele banden aggregaten zouden zijn. Daarom werden in de afbraakmethode en ook in de analysemethode een aantal modificaties aangebracht. Een overzicht van deze modificaties en hun effect op het eiwitpatroon is gegeven in Tabel 4.1. In deze tabel is ook het aantal banden dat verkregen werd met elk der methodes na analyse door gelelektroforese gegeven. Uit deze tabel blijkt, dat wanneer 2-MCE weggelaten werd uit de gels en de elektroforesebuffer, of wanneer de SH- groepen van het eiwit niet geblokkeerd waren door oxydatie met permierenzuur of door carboxymethylering, het aantal eiwitbanden 5 à 6 bedroeg (Fig. 4.1.A), maar dat het aantal 2 à 3 was (Fig. 4.1.B), wanneer deze

voorzorgsmaatregels wel getroffen waren. De SH- groepen van het eiwit spelen blijkbaar een belangrijke rol in het aggregatiegedrag. De densitometerpatronen van de eiwitten van de gescheiden centrifugale componenten na analyse door middel van gelelektroforese in de aanwezigheid van 0,1% SDS waren identiek. Dit is in overeenstemming met de waarnemingen van Niblett en Semancik (1969) en ondersteunt de veronderstelling, dat de centrifugale componenten een gelijke eiwitmantel hebben.

4.1.2. Afbraak met guanidiniumchloride-LiCl

De bereiding van het CPMV-eiwit volgens de guanidiniumchloride-LiCl methode werd exact uitgevoerd zoals beschreven door Wu (1970). Het met deze methode verkregen eiwit gedroeg zich bij elektroforese identiek aan het met de SDS-methode verkregen eiwit. Na carboxymethylering van zulk eiwit werden bij analyse op gels in de aanwezigheid van 0,1% SDS ook slechts 2 à 3 banden gevonden.

4.2. Verhouding van de eiwitten

In de meeste analyses met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS werden 3 eiwitten gevonden, die met toenemende migratiesnelheid I, II en III genoemd worden. De verhouding van de hoeveelheden van elk der eiwitten werd bepaald met gels door de oppervlaktes onder de pieken te meten van gels die met amidozwart 10B gekleurd waren en daarna bij 610 nm gescand (Bennett en Scott, 1971).
Hierbij viel op dat:

- de verhouding van de hoeveelheid van eiwit I tot die van eiwitten II en III, of de verhouding van hoeveelheid eiwit I tot die van eiwitten II of III in alle preparaten constant was,
- de verhouding van eiwit II tot eiwit III constant was voor een bepaald preparaat, maar aanzienlijk varieerde tussen verschillende preparaten,
- de positie van eiwit II ten opzichte van I en III niet vast lag, soms viel eiwit II zelfs samen met eiwit III.

Aangezien de verhouding van de hoeveelheid van eiwit II tot eiwit III variabel was voor verschillende preparaten en de afstand van II tot III ook variabel was, leek het niet uitgesloten, dat eiwit II of eiwit III een artefact zou zijn. Artefacten kunnen ontstaan bij de analyse met behulp van polyacrylamide-gelelektroforese door oxydatie van het eiwit door spoortjes ammoniumpersulfaat die in de gels achterblijven (Brewer, 1967) of bij de afbraak van het virus doordat de pH

bij de carboxymethyleringsreactie niet op pH 7,1 gehouden werd. De carboxymethylering wordt minder specifiek voor SH- groepen bij de daling van de pH (er komt HJ vrij). Er kan dan ook carboxymethylering van bijv. histidine gevonden worden. Om na te gaan of deze factoren het eiwitpatroon beïnvloeden, werd het effect van preëlektroforese, het effect van verschillende ammoniumpersulfaatconcentraties in de gels en de pH van de buffer bij de carboxymethylering onderzocht. Al deze variaties bleken echter geen invloed te hebben op het elektroforesepatroon van de eiwitten.

Omdat het niet mogelijk bleek de verhouding van de kleine eiwitten te beïnvloeden, werd nagegaan of er een verband bestond tussen de elektroforetische vormen en het eiwitpatroon. Hiertoe werden de elektroforetische vormen gescheiden door middel van elektroforese in een suikergradiënt. Daarna werden de eiwitten van de aldus gescheiden elektroforetische vormen bereid volgens de SDS-methode. De resultaten van de analyse van deze eiwitpreparaten door middel van gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS worden gegeven in Fig. 4.2. Uit deze figuur blijkt, dat eiwit II of eiwit III geen artefact van de extractie of de analyse is, maar dat eiwit II karakteristiek is voor de langzaam migrerende en eiwit III voor de

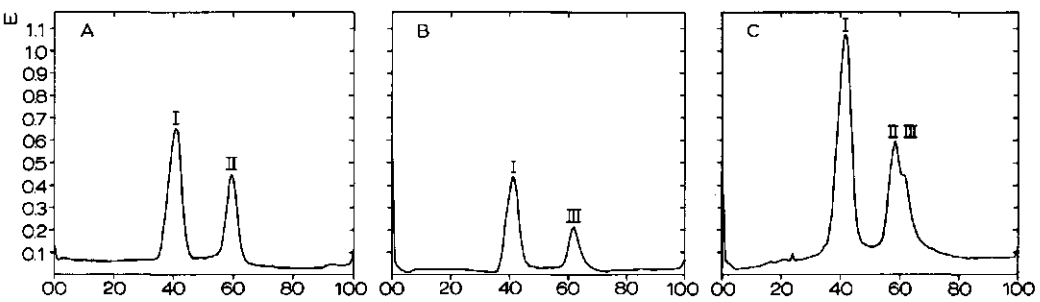


Fig. 4.2. Elektroforesepatronen van de eiwitten van de elektroforetische vormen van CPMV na elektroforese op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van 0,1% SDS. A, langzaam migrerende vorm; B, snel migrerende vorm; C, mengsel van langzaam en snel migrerende vorm. De elektroforetische vormen werden gescheiden door zonegradiënt-elektroforese en afgebroken volgens de SDS-methode. De elektroforese was van links naar rechts met de anode rechts. De mobiliteit van de broomfenolblauw-band werd gelijk aan 100 gesteld.

snel migrerende vorm. Een compleet CPMV-preparaat geeft derhalve drie banden te zien bij analyse op polyacrylamidegels: een groot eiwit (I), dat voor S en F een gelijke mobiliteit heeft en twee kleinere eiwitten (II en III), waarbij de mobiliteit van het kleine eiwit afhankelijk is van de elektroforetische vorm.
De afstand tussen eiwit II en eiwit III op de gels was variabel. De verkleining van de afstand van eiwit II tot eiwit III bleek samen te gaan met een toename in de elektroforesesnelheid van S. Dit wordt verder beschreven in hoofdstuk 5.

4.3. Schatting van de molecuulgewichten van de eiwitten

De molecuulgewichten van de eiwitten werden geschat volgens de methode van Weber en Osborn (1969). Deze methode berust er op, dat eiwitten met SDS complexen vormen, waarvan de lading per massaeenheid en de conformatie ongeveer gelijk zijn, waardoor de mobiliteit van de eiwitten bij polyacrylamide-gelelektroforese in aanwezigheid van SDS een functie wordt van het molecuulgewicht. Een grafische weergave van deze functie werd verkregen door de mobiliteiten van een aantal eiwitten met bekend molecuulgewicht (zie paragraaf 2.8.2.) ten opzichte van de mobiliteit van broomfenolblauw uit te zetten tegen de logaritme van hun molecuulgewicht. Met behulp van deze grafiek werden voor de CPMV-eiwitten de volgende molecuulgewichten gevonden: 44.000 D (I), 25.000 D (II) en 22.000 D (III) voor met joodaceetamide gecarboxymethyleerde eiwitten en 49.000 D (I), 27.500 D (II) en 25.000 D (III) voor met permierenzuur geoxydeerde eiwitten.

4.4. Scheiding van de eiwitten

Het molecuulgewicht van eiwit I ten opzichte van II en III is zodanig, dat de mogelijkheid dat het grote eiwit een dimeer van het kleinere eiwit is, niet uitgesloten mocht worden, ook al was de verhouding van de hoeveelheid van eiwit I ten opzichte van die van eiwit II en III niet te beïnvloeden door modificaties in de analyse- en afbraakprocedures. Om hier een uitspraak over te doen werden de eiwitten gescheiden en daarna de aminozuursamenstelling bepaald (paragraaf 4.5.). De eiwitten werden op kleine schaal gescheiden door middel van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS. De gekleurde eiwitbanden werden uit de gels gesneden en gebruikt voor de bepaling van de aminozuursamenstelling. Aangezien bij deze methode erg veel ammoniak afkomstig van polyacrylamide in de preparaten gevonden wordt, die interfereert met de bepaling van de basische aminozuren, werden de eiwitten ook gescheiden door gelfiltratie op Sephadex G-200. Bij deze methode werd gebruik gemaakt van de aggregatieneiging van de

CPMV-eiwitten. In 5 *M* ureum is eiwit I zodanig geaggregeerd, dat het geëlueerd wordt in het void volume; het kleine eiwit is onder deze omstandigheden niet geaggregeerd (Wu, 1970). Het elutiepatroon van de eiwitten van de snel migrerende elektroforetische vorm (F) is gegeven in Fig. 4.3. De samenstelling van de pieken in het elutiepatroon werd gecontroleerd door middel van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS. In Fig. 4.4. wordt de analyse gegeven van de eiwitsamenstelling van de pieken uit Fig.4.3.

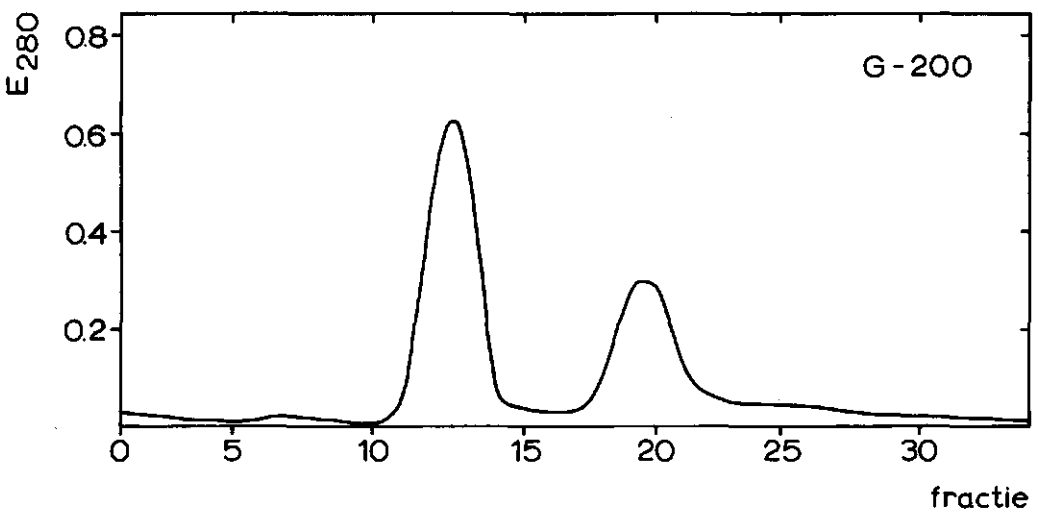


Fig. 4.3. Scheiding van de eiwitten van de snel migrerende vorm (F) van CPMV met behulp van gelfiltratie op Sephadex G-200 met 5 *M* ureum als eluent. Op de kolom werd ca. 15 mg eiwit in 1,5 ml 6 *M* ureum opgebracht. De loopsnelheid was 1,5 ml/uur en er werden fracties van 2,0 ml opgevangen.

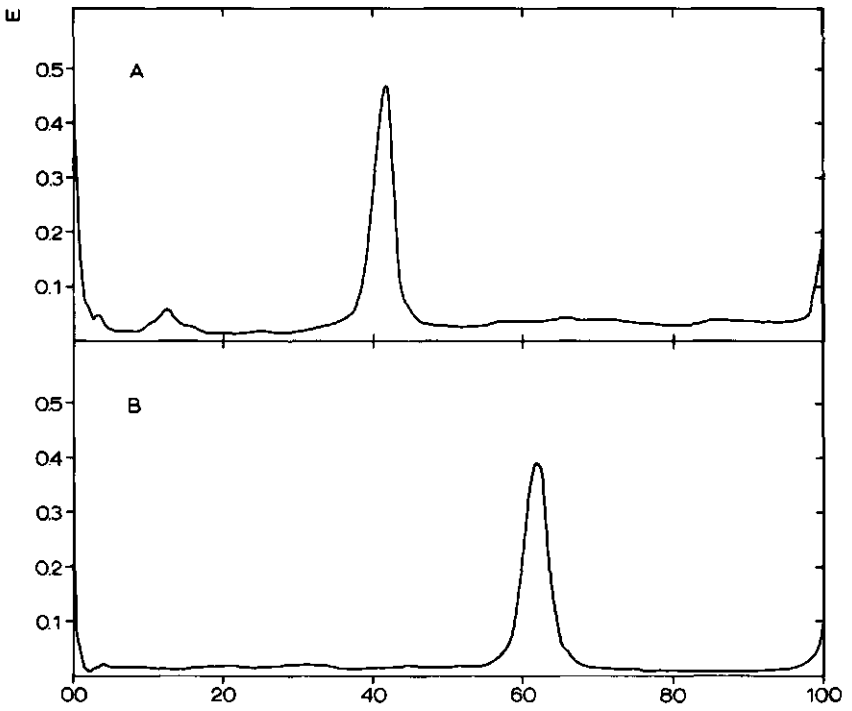


Fig. 4.4. Elektroforesepatronen van de eiwitten van F na elektroforese op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van 0,1% SDS. A, eiwit I; B, eiwit III. De elektroforese was van links naar rechts, met de anode rechts. De mobiliteit van de broomfenolblauw-band werd gelijk aan 100 gesteld.

In deze figuur is te zien, dat het mogelijk is om na één maal gelfiltratie beide eiwitten van F volledig vrij van verontreiniging met het andere eiwit te krijgen.

Bij gelfiltratie van de eiwitten van de langzaam migrerende elektroforetische vorm (S) was dit niet in één maal mogelijk. Over de hele piek van eiwit I werd een gelijke mate van verontreiniging met eiwit II gevonden. De oorzaak hiervan moet gezocht worden in aggregatie van eiwit II, waardoor dit eiwit samen met eiwit I in het void volume geëlueerd wordt. Om eiwit I van S (I_S) vrij van eiwit II te krijgen werd de gelfiltratie van dit eiwit nog tweemaal herhaald. Met behulp van gelelektroforese kon dan geen eiwit II meer aangetoond worden.

4.5. Aminozuursamenstelling van de eiwitten van het CPMV

De aminozuursamenstellingen van het grote eiwit (I) en de kleine eiwitten (II + III) werden in eerste instantie bepaald met eiwitten die door middel van polyacrylamide-gelelektroforese gescheiden waren. De resultaten van deze analyse (S en F niet gescheiden) zijn gegeven in Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Molaire verhouding van de aminozuren van de eiwitten van CPMV[a].

Aminozuur	I	II + III
Asp	12,9	13,4
Thr	9,4	7,9
Ser	9,9	8,4
Glu	9,9	9,6
Pro	6,9	9,6
Gly	11,3	9,8
Ala	6,7	7,5
Val	7,8	7,5
Ile	4,9	5,7
Leu	8,4	6,4
Phe	6,3	6,5
Lys	1,2	3,8
His	0,8	0,6
Arg	2,3	3,9

[a]weergegeven als mol. aminozuur/100 mol.; de eiwitten zijn gescheiden door middel van polyacrylamide-gelelektroforese.

Uit deze tabel blijkt dat er aanzienlijke verschillen bestaan in de molaire verhoudingen van de aminozuren van het grote eiwit en de kleine eiwitten. De verschillen betroffen vooral threonine, proline, glycine, lysine en arginine. Op grond van deze resultaten is het dan ook waarschijnlijk, dat eiwit I niet gelijk is aan eiwit II en eiwit III.

Wanneer de aminozuuranalyse gedaan wordt van uit de gels gesneden eiwitten wordt tyrosine volledig afgebroken en histidine gedeeltelijk (Houston, 1971). Bovendien was de grote hoeveelheid ammoniak in de preparaten als gevolg van afbraak van polyacrylamide soms dermate storend, dat het niet mogelijk was om de basische aminozuren goed te bepalen. Om een betere aminozuursamenstelling van

Tabel 4.3. Aminozuursamenstelling van de eiwitten van de gescheiden elektroforetische vormen van het CPMV[a].

Aminozuur	Eiwit[b]			
	I_S	I_F	II	III
Asp	9,3	11,3	13,6	13,6
Thr	7,4	9,1	6,9	7,3
Ser	7,6	9,2	7,5	7,3
Glu	23,8	7,2	8,6	8,8
Pro	3,5	4,4	9,7	10,7
Gly	7,2	9,1	6,1	6,3
Ala	5,7	6,5	8,0	8,4
Cys	0,8	0,4	+	+
Val	5,3	6,2	7,6	7,8
Met	2,2	2,9	2,7	2,8
Ile	4,1	4,7	4,9	5,1
Leu	7,3	8,8	5,2	5,3
Tyr	2,3	2,8	2,4	2,2
Phe	4,9	6,1	7,1	6,7
Try	+	+	+	-
Lys	3,0	5,4	2,4	1,6
His	1,2	-	1,2	1,1
Arg	3,7	5,4	5,8	4,4

- = niet aanwezig.

+ = wel aanwezig, maar in zeer gering mate.

a weergegeven als mol. aminozuur/100 mol.; de eiwitten zijn gescheiden door middel van gelfiltratie.

b eiwit: I_S = eiwit I van S; I_F = eiwit I van F; II = klein eiwit van S; III = klein eiwit van F.

de eiwitten te krijgen en om te zien welke verschillen er bestaan tussen de eiwitten van de elektroforetische vormen, werden de aminozuursamenstellingen bepaald na scheiden van de eiwitten van de gescheiden elektroforetische vormen door middel van gelfiltratie over Sephadex G-200. De resultaten van de bepaling van de aminozuursamenstelling van deze eiwitten zijn weergegeven in Tabel 4.3. Uit deze tabel blijkt, dat er niet alleen verschillen zijn tussen eiwit I en eiwit II en III, maar dat ook eiwit I van S (I_S) en eiwit I van F (I_F) duidelijk verschillen in aminozuursamenstelling. De verschillen betreffen vooral glutaminezuur (veel in I_S), proline (meer bij eiwit II en III dan bij eiwit I), glycine (meer bij I_S en I_F dan bij II en III), cystine (komt bij II en III vrijwel niet voor), leucine (minder bij II en III, dan bij I_S en I_F), tryptofaan (komt bij III niet voor) en histidine (komt bij I_F niet voor).

Op grond van deze gegevens is het zeer waarschijnlijk, dat er bij de overgang van S in F, zowel veranderingen optreden in het grote eiwit als in het kleine eiwit van de eiwitmantel. De verschillen in de grote eiwitten van S en F resp. I_S en I_F leiden niet tot een verschil in loopsnelheid bij polyacrylamide-gelelektroforese in aanwezigheid van SDS. De verschillen in de kleine eiwitten, II van S en III van F, zijn zodanig, dat ze een verschillende loopsnelheid hebben. Per eiwitmantel worden dus twee verschillende eiwitten gevonden: eiwit I_S en eiwit II bij S en eiwit I_F en eiwit III bij F.

4.6. De molaire verhouding van de eiwitten

De molaire verhouding van de eiwitten werd geschat door de oppervlaktes onder de pieken van met amidozwart 10B gekleurde en bij 610 nm gescande gels (Bennett en Scott, 1971) te meten. Een verhouding op massabasis van ca. 2 : 1 werd gevonden. In combinatie met de verhouding in molecuulgewichten (4.3) van ca. 2 : 1 geeft dit een molaire verhouding van de twee eiwitten in de capside van 1 : 1.

4.7. Het aantal eiwitmoleculen in de eiwitmantel

Het aantal eiwitmoleculen in de capside van CPMV werd berekend uit de molaire verhouding van de eiwitten, de molecuulgewichten van de eiwitten en het deeltjesgewicht van de topcomponent (een lege eiwitmantel.). Op grond van deze gegevens en de hypothese, dat de eiwitmantel volgens bepaalde wetmatigheden opgebouwd moet zijn om te voldoen aan een quasi-equivalente positie van de eiwitsubeenheden, is de capside waarschijnlijk opgebouwd uit 60 grote en 60 kleine eiwitsubeenheden. Aannemende, dat dit aantal juist is kan voor de elektroforeti-

sche vorm S een gewicht van de eiwitmantel van $4,1 \times 10^6$ D berekend worden voor de gecarboxymethyleerde eiwitten (I 44.000 D; II 25.000 D). Deze waarde is in redelijke overeenstemming met het molecuulgewicht van de topcomponent van $3,8 \times 10^6$ D, dat bepaald is met behulp van sedimentatie-evenwichtscentrifugeren en die van $4,5 \times 10^6$ D bepaald met behulp van lichtverstrooiing (hoofdstuk 3).

4.8. Bespreking

Elektroforetische analyse van de CPMV-eiwitten op SDS-polyacrylamidegels gaf drie eiwitbanden te zien: een groot eiwit (I) en twee kleinere eiwitten (II en III). Wanneer de resultaten afweken van dit patroon, dan bleek dit altijd terug te voeren te zijn tot afwijkingen in het elektroforesepatroon van het originele virus, die het gevolg waren van afbraak van het virus tijdens de bewaring (zie ook hoofdstuk 5).
Voor het verkrijgen van reproduceerbare resultaten was het noodzakelijk om van vers gezuiverd virus (1-6 dagen oud) uit te gaan en de SH- groepen van het eiwit of wel te beschermen door 2-MCE aanwezig te houden tijdens de bereiding en de analyse van de eiwitten, of wel deze SH- groepen te oxyderen met permierenzuur of te blokkeren door carboxymethylatie met joodaceetamide. Het grote eiwit had ook na carboxymethyleren in de afwezigheid van SDS nog neiging tot aggregeren, zoals blijkt uit de gelfiltratie-experimenten in 5 *M* ureum, waarbij het grote eiwit geëlueerd werd in het void volume bij een Sephadex G-200 kolom.
De verhouding van de kleine eiwitten (II en III) was afhankelijk van de verhouding van de elektroforetische vormen in het viruspreparaat. Op grond van deze elektroforetische analyses werden derhalve in de capside van het CPMV twee eiwitten gevonden: een groot eiwit (I) en een klein eiwit (II of III, afhankelijk van de elektroforetische vorm).
Voor eiwit I werd een molecuulgewicht van 47.500 D, voor eiwit II 27.500 D en voor eiwit III 25.000 D gevonden wanneer met permierenzuur geoxydeerde eiwitten werden gebruikt en waardes van 45.000 D voor eiwit I, 25.000 D voor eiwit II en 22.000 D voor eiwit III na carboxymethylering van de manteleiwitten.

Opvallend is dat voor geoxydeerde eiwitten hogere molecuulgewichten gevonden worden dan voor de gecarboxymethyleerde eiwitten, terwijl bij oxydatie negatieve groepen en bij carboxymethylatie positieve groepen ingevoerd worden. Blijkbaar bestaan er toch conformatieverschillen tussen de geoxydeerde eiwitten en de gecarboxymethyleerde eiwitten, die niet door de binding van SDS verwaarloosbaar worden. De verschillen in de molecuulgewichten van eiwit II en III duiden op een veel groter verschil tussen deze eiwitten dan de 7 aminozuren, die vol-

gens Niblett en Semancik (1969) het verschil tussen S en F uitmaken. Wanneer bij de overgang van S naar F bovendien veranderingen in eiwit I plaats vinden, is het duidelijk dat de overgang van S naar F aanzienlijk gecompliceerder is, dan aanvankelijk door Niblett en Semancik (1969) is aangenomen.

De verhouding tussen de molecuulgewichten van het grote en de kleine eiwitten is zodanig, dat in eerste instantie een monomeer-dimeer verband niet uitgesloten lijkt. Om deze mogelijkheid te onderzoeken werden de eiwitten gescheiden door middel van polyacrylamide-gelelektroforese (eiwitten van S + F) en door middel van gelfiltratie (eiwitten van gescheiden S en F) en de aminozuursamenstelling bepaald. Uit de aminozuursamenstellingen van de eiwitten van de gescheiden elektroforetische vormen bleek, dat bij CPMV vier verschillende eiwitten voorkomen: een groot en een klein eiwit in S (I_S en II), en een groot en een klein eiwit in F (I_F en III). Omdat de eiwitten van S niet gelijk zijn aan de eiwitten van F, lijkt het waarschijnlijk, dat bij de omzetting van S naar F die in de plant wordt gevonden (Niblett en Semancik, 1969) beide eiwitten betrokken zijn. Tussen de resultaten van de analyses na scheiden van de eiwitten door polyacrylamide-gelelektroforese en door gelfiltratie zijn geen grote verschillen, wanneer de gegevens van de eiwitten van de gescheiden elektroforetische vormen weer gecombineerd worden tot een groot eiwit en de kleine eiwitten. De verschillen hebben vooral betrekking op de basische aminozuren (de bepaling wordt gestoord door de zeer grote hoeveelheden ammoniak die vrijkomt bij hydrolyse van de polyacrylamidegel-stukjes) en op tyrosine. Dit aminozuur werd niet gevonden bij de door polyacrylamide-gelelektroforese gescheiden eiwitten, evenmin als cystëine en methionine. Cystëine en methionine werden wel gevonden bij de door gelfiltratie gescheiden eiwitten.

5 Veranderingen in het elektroforetisch gedrag van eiwit en virus tijdens de bewaring

In het voorgaande hoofdstuk is opgemerkt, dat de relatieve mobiliteit van eiwit II ten opzichte van eiwit III niet constant was. Het verschil in mobiliteit tussen beide eiwitten werd meestal kleiner naarmate het viruspreparaat waaruit het eiwit bereid werd, ouder was. Bij analyse van het virus op 3% polyacrylamidegels bleek, dat deze toename in mobiliteit van eiwit II gepaard ging aan een toename in mobiliteit van de langzaam migrerende elektroforetische vorm. In dit hoofdstuk worden de factoren die invloed hebben op deze verandering, beschreven.

5.1. Invloed van veroudering

Wanneer CPMV op ijs bewaard werd in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0, bleek dat na verloop van tijd de mobiliteit van S ten opzichte van F toenam. In Fig. 5.1 is het elektroforesepatroon gegeven van een CPMV-preparaat na zuivering volgens de PEG/NaCl-methode.

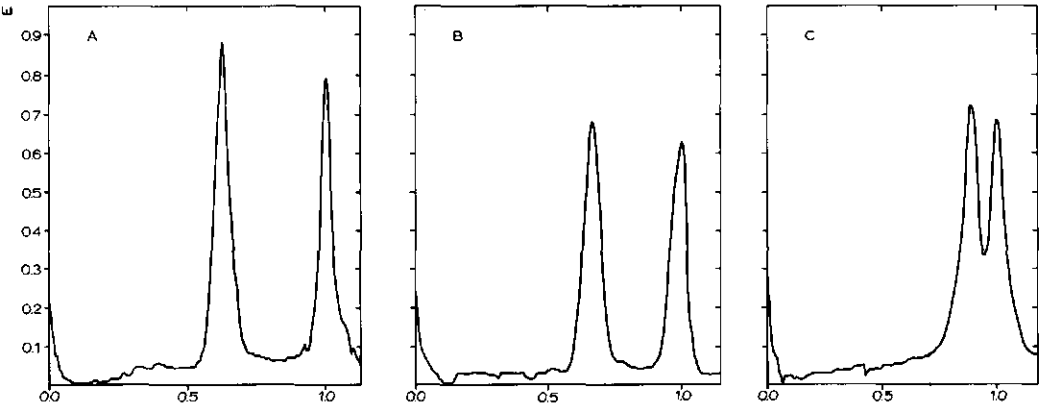


Fig. 5.1. Elektroforesepatronen van CPMV geanalyseerd op 3% polyacrylamidegels. Het virus werd geëlektroforeerd op 0 (A), 7 (B) en 16 (C) dagen na zuivering van het virus met PEG/NaCl uit vers bladmateriaal en bewaring op ijs. De elektroforese was van links naar rechts, met de anode rechts. De mobiliteit van F veranderde niet en werd gelijk aan 1,0 gesteld.

Hieruit blijkt, dat de mobiliteit van S in de loop van 16 dagen, waarbij het preparaat op ijs bewaard was, sterk was toegenomen en bijna gelijk geworden was aan de mobiliteit van F.

Wanneer van deze preparaten het eiwit bereid werd en geanalyseerd werd door mid-

del van polyacrylamide-gelelektroforese op 10% gels in de aanwezigheid van SDS, dan werd het beeld van Fig. 5.2. verkregen. Hierin zijn de elektroforesepatronen gegeven van de eiwitten bereid uit versgemaakt virus (A), uit 7 dagen bewaard virus (B), en uit 16 dagen bewaard virus (C). Hieruit blijkt, dat tijdens de bewaring van het virus er een verandering plaats heeft van eiwit II. De mobiliteit van eiwit II neemt toe, en komt uiteindelijk overeen met die van eiwit III.

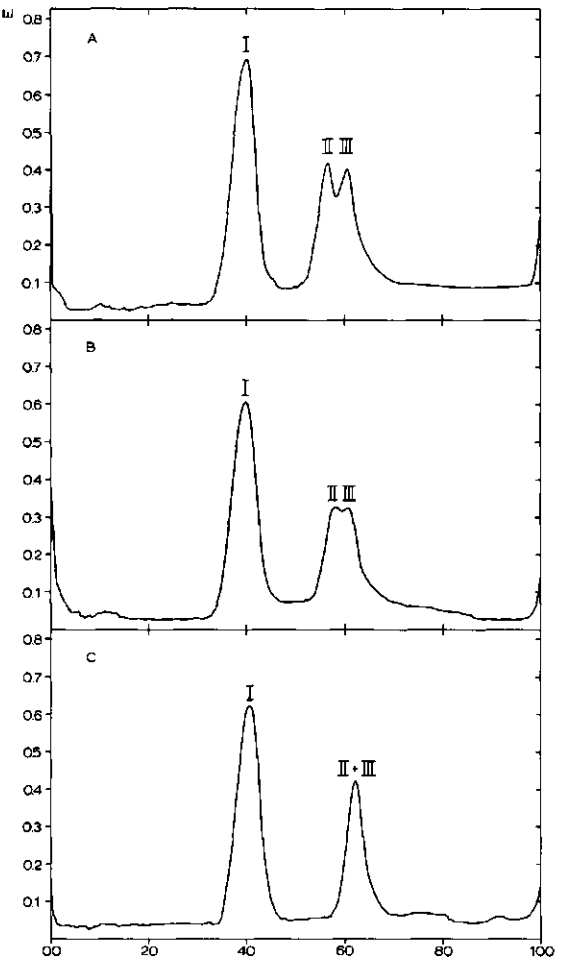


Fig. 5.2. Elektroforesepatronen van CPMV-eiwit geanalyseerd op 10% polyacrylamidegels in de aanwezigheid van 0,1% SDS. Het eiwit werd bereid uit met PEG/NaCl gezuiverd virus dat alvorens het eiwit te extraheren gedurende 0 (A), 7 (B) en 16 dagen (C) op ijs bewaard was. De elektroforese was van links naar rechts met de anode rechts. De afstand afgelegd door de broomfenolblauwband werd op 100 gesteld.

5.2. Invloed van de zuiveringsmethode

De snelheid waarmee de mobiliteit van S toenam tijdens de bewaring was afhankelijk van de voorbehandeling van het bladmateriaal en de manier van zuiveren. Werd het virus in plaats van uit vers bladmateriaal, uit diepgevroren blad gezuiverd, dan verliep de omzetting langzamer dan uit vers materiaal. Vrijwel geen verandering in de mobiliteit van S werd gevonden, wanneer het virus gezuiverd werd met butanol-chloroform (Steere, 1956), zoals blijkt uit Fig. 5.3.

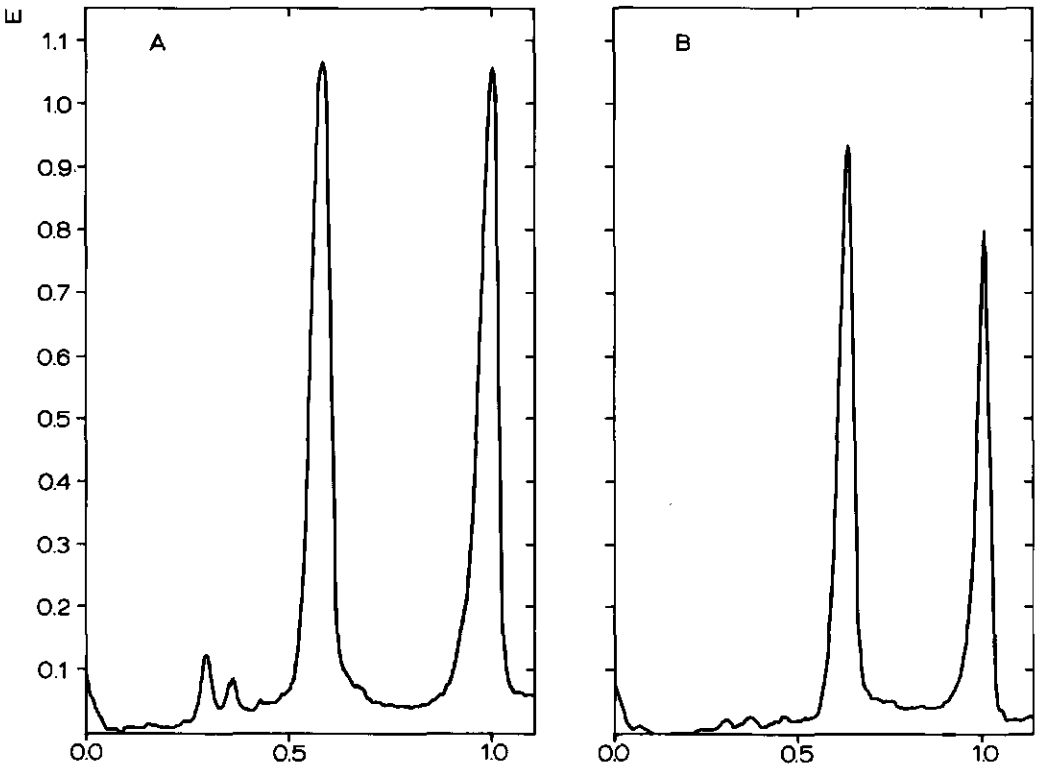


Fig. 5.3. Elektroforesepatronen van CPMV geanalyseerd op 3% polyacrylamidegels. Het virus werd geëlektroforeerd op 0 (A) en 16 (B) dagen na zuivering van het virus met butanol-chloroform uit vers blad, en bewaring op ijs. De elektroforese was van links naar rechts met de anode rechts. De mobiliteit van F werd op 1,0 gesteld.

Zuiveren met PEG/NaCl is een milde methode waarbij weinig denaturatie van planteeiwitten plaats vindt. Veel meer denaturatie wordt veroorzaakt door zuiveren met butanol-chloroform of door invriezen van het bladmateriaal. Het leek dan ook mogelijk, dat de omzetting het gevolg was van verontreiniging van de preparaten met proteolytische enzymen van de waardplant. De verschillen in omzettingssnelheid van virus na respectievelijk zuiveren met PEG/NaCl en butanol-chloroform zou het gevolg kunnen zijn van een verschil in de mate van verontreiniging met zulke enzymen. Een andere mogelijkheid zou zijn, dat ten gevolge van de zuiveringsprocedure conformatieveranderingen in de eiwitmantel van het virus bewerkstelligd worden, die een verschil in gevoeligheid voor proteolytische enzymen met zich mee brengen. Om onderscheid te kunnen maken tussen verontreiniging met proteolytische enzymen en verschillen in gevoeligheid tussen met PEG/NaCl en met butanol-chloroform gezuiverd virus, werd de gevoeligheid voor trypsine en chymotrypsine getoetst van virus na zuivering volgens beide methodes. Daartoe werd virus gezuiverd zowel met PEG/NaCl als met butanol-chloroform uit vers blad en daarna geïncubeerd met 2 µg trypsine of chymotrypsine per 100 µg CPMV gedurende 30, 60 en 120 min bij 30°C. Onder invloed van deze enzymen heeft een omzetting plaats van S naar F (Niblett en Semancik, 1969). Er werd evenwel geen verschil gevonden in de snelheid waarmee de mobiliteit van S veranderde tussen viruspreparaten die met PEG/NaCl of met butanol-chloroform gezuiverd waren zodat een verschil in gevoeligheid niet waarschijnlijk lijkt. Om nu na te gaan of in plantesap proteolytische activiteit aanwezig is, werden geïnfecteerde bladeren direkt na het oogsten gemalen in een Waring mixer en het homogenaat gedurende 10 min bij 10.000 x *g* gecentrifugeerd. Dit CPMV bevattende sap werd gedurende 0, 7 en 16 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd, waarna het virus hieruit gezuiverd werd met butanol-chloroform en daarna geanalyseerd door elektroforese op 3% polyacrylamidegels. Deze elektroforesepatronen worden gegeven in Fig. 5.4., waar duidelijk te zien is, dat door incubatie in sap vóór de zuivering de mobiliteit van S toegenomen is. Een dergelijke toename werd ook verkregen, wanneer gezuiverd CPMV bij 25°C geïncubeerd werd in de oplosbare eiwitfractie van geïnfecteerd cowpeablad (d.i. supernatant van gehomogeniseerd, geïnfecteerd bladmateriaal na centrifugeren gedurende 10 min bij 10.000 x *g*, 30 min bij 30.000 x *g* en 2 uur bij 105.000 x *g*). Het effect van incubatie bij 25°C in de oplosbare eiwitfractie en in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 met en zonder 0,1% 2-MCE is weergegeven in Fig. 5.5. Door incubatie in de oplosbare eiwitfractie is de mobiliteit van S sterk toegenomen, de mobiliteit van F is niet veranderd. Het bleek, dat de toename het sterkst was, wanneer 0,1% 2-MCE in de oplosbare eiwitfractie aanwezig was (Fig. 5.5.). Het effect van deze incubatie en het verschil

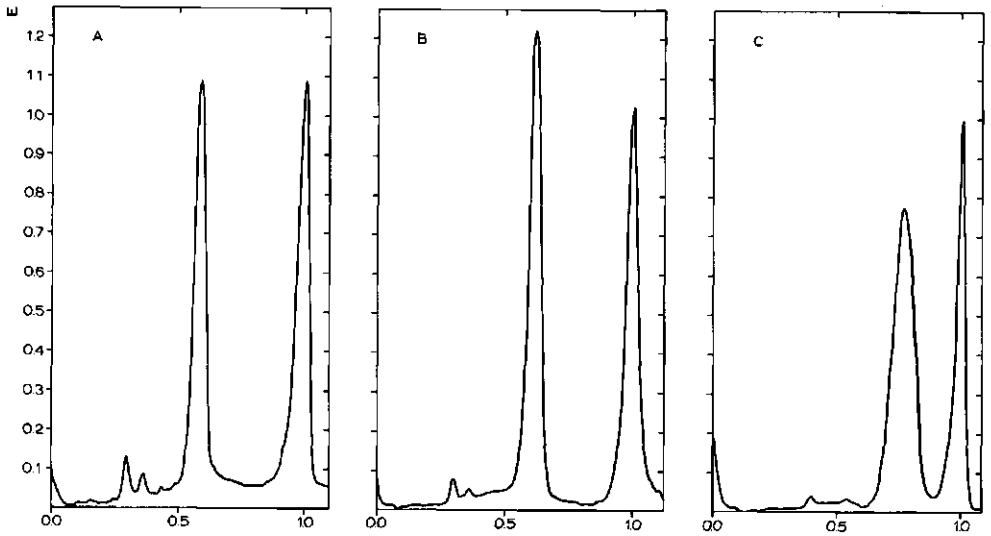


Fig. 5.4. Elektroforesepatronen van CPMV, gezuiverd na 0 (A), 7 (B) en 16 (C) uur incubatie van gehomogeniseerd, geïnfecteerd bladmateriaal bij kamertemperatuur, en geanalyseerd op 3% polyacrylamidegels. De elektroforese was van links naar rechts met de anode rechts. De mobiliteit van F werd op 1,0 gesteld.

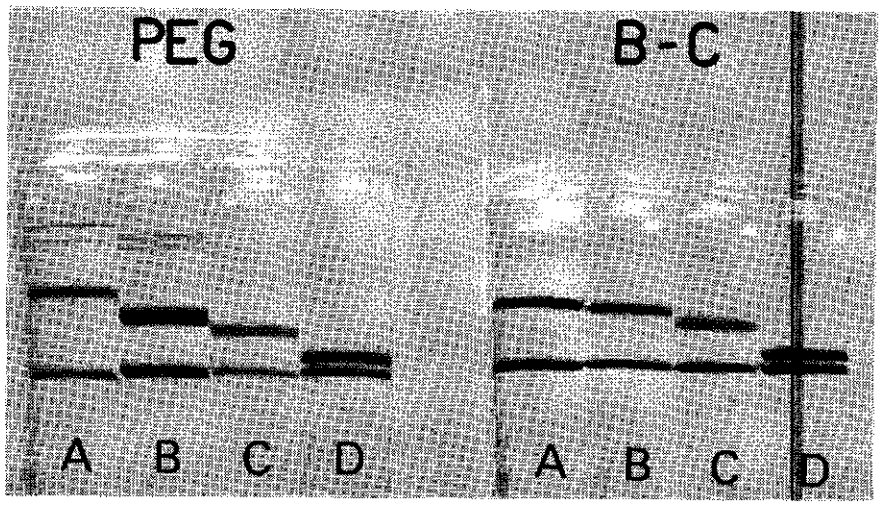


Fig. 5.5. Polyacrylamidegels (3%) die het effect weergeven van incubatie van met PEG/NaCl (PEG) en butanol-chloroform (B-C) gezuiverd CPMV in de oplosbare eiwitfractie op de mobiliteit van de elektroforetische vormen. A : virus, bewaard op ijs; B : virus, 18 uur bij 25°C geïncubeerd in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0; C : virus, 18 uur bij 25°C geïncubeerd in de oplosbare eiwitfractie; D : virus, 18 uur bij 25°C geïncubeerd in de oplosbare eiwitfractie met 0,01 *M* 2-MCE. De elektroforese was boven naar beneden met de anode beneden.

in omzettingssnelheid van met PEG/NaCl en met butanol-chloroform gezuiverd virus bij incubatie in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 maakt het waarschijnlijk, dat de omzetting tijdens de bewaring van S in F het gevolg is van verontreiniging van de viruspreparaten met proteolytische enzymen van de waardplant. Het verschil in omzettingssnelheid bij verschillende zuiveringsmethodes lijkt het gevolg te zijn van een verschillende mate van verontreiniging van de preparaten.

5.3. Bespreking

De omzetting van S naar F tijdens de bewaring is waarschijnlijk het gevolg van contaminatie met proteolytische enzymen van de waardplant. Dit, omdat de omzetting versneld kon worden door incubatie met de oplosbare eiwitfractie en omdat de zuiveringsmethode invloed had. Over het algemeen is het zo, dat de omzetting langzaam is of niet voorkomt naar mate de viruspreparaten meer gezuiverd zijn. Virus, dat ook nog onderworpen was aan zonegradiëntcentrifugatie of zonegradiëntelektroforese vertoonde hoegenaamd geen omzetting meer van S. Geen significante toename in de mobiliteit van S werd gevonden na zuivering met butanol-chloroform. Dat bij met butanol-chloroform gezuiverd virus geen of vrijwel geen omzetting plaats vindt, is niet het gevolg van lage gevoeligheid voor afbraak met proteolytische enzymen. Trypsine en chymotrypsine werken op met butanol-chloroform en op met PEG/NaCl gezuiverd virus even snel in. Het is veel aannemelijker, dat verschillen in omzettingssnelheid berusten op verschil in zuiverheid.

Wanneer bij incubatie van virus met de oplosbare eiwitfractie 0,1% 2-MCE werd toegevoegd werd daardoor de omzetting van S versneld. Dit duidt er op, dat de in dit proces betrokken enzym(en) niet actief zijn in geoxydeerde toestand. Deze eigenschap (activatie door reducerende agentia, zoals bijv. glutathion, cysteïne e.d.) wordt bij vele plantaardige proteolytische enzymen gevonden (bijv. papaïne, lycine e.a.; Smith, 1951).

Een gedeeltelijke afbraak van virus in plantesap werd voor het aardappel-X-virus (PVX) beschreven door Koenig et al., (1970), die vonden dat na incubatie van geïnfecteerd, gehomogeniseerd blad bij kamertemperatuur, het molecuulgewicht van de eiwitsubeenheid daalt van 28.000 D naar 24.500 D. Deze omzetting kon ook gesimuleerd worden door incubatie met trypsine. Mayo en Cooper (1973) hebben voor het tabaksratelvirus aangetoond, dat het molecuulgewicht van de eiwitsubeenheid daalt met veroudering van het virus. Deze auteurs veronderstellen dat deze afbraak het gevolg is van proteolytische enzymen van bacteriën die de preparaten verontreinigden, hoewel het niet mogelijk bleek om de omzetting te be-

werkstelligen met uit de viruspreparaten geïsoleerde bacteriën.
Een 'spontane' afbraak van CPMV ten gevolge van proteolytische activiteit die specifiek met het virusdeeltje is geassocieerd, zoals Pereira en Skehel (1971) veronderstellen dat bij adenovirus voorkomt, is onwaarschijnlijk. Er zijn grote verschillen in omzettingssnelheid afhankelijk van de mate van zuiverheid van de preparaten. Bovendien zou dan ook bij de meest denaturerende zuiveringsmethoden (butanol-chloroform) meer of sneller afbraak verwacht kunnen worden.

De omzetting van S naar F lijkt stapsgewijs te verlopen. In geen der preparaten werd een 'smeer' gevonden van de S-band, die zou kunnen wijzen op een verschil in stadium van omzetting tussen verschillende deeltjes. De veranderingen in het eiwitpatroon van eiwitten die geëxtraheerd zijn uit bewaarde viruspreparaten, beperkten zich tot een toename van de mobiliteit van eiwit II, dat karakteristiek is voor S. Tijdens de bewaring werd geen verandering in de mobiliteit van eiwit I of eiwit III (karakteristiek voor F) gevonden.
In hoeverre er ook een verandering in eiwit I plaats heeft is uit de elektroforesepatronen niet af te leiden. In hoofdstuk 4 hebben we gevonden, dat er verschil is in aminozuursamenstelling tussen eiwit I van S en eiwit I van F. Dit leidt kennelijk niet tot een verschil in mobiliteit bij polyacrylamide-gelelektroforese.

Uit proeven met carboxypeptidase A en B concludeerden Niblett en Semancik (1969), dat de afbraak plaats heeft aan het C-terminale einde. Of dit betrekking heeft op beide of op een van beide eiwitten is niet zeker, omdat toen nog niet bekend was, dat in de capside van CPMV twee verschillende eiwitten voorkomen. Opmerkelijk is, dat ook de omzetting van eiwit II naar eiwit III, die gecorreleerd was aan de omzetting van S naar F, stapsgewijze leek te verlopen. Ook hier werden geen diffuse of brede banden gevonden tijdens de omzetting. Dit is in tegenstelling tot de verandering in de eiwitsubeenheid van aardappel-X-virus na incubatie van het virus in sap of met trypsine, waarbij geen tussenvormen tussen niet afgebroken eiwit en gedeeltelijk afgebroken eiwit gevonden werden (Koenig et al., 1970). Ook werden er geen combinaties van onveranderd eiwit II en intermediairen tussen eiwit II en eiwit III gevonden, zoals bij tabaksratelvirus na bewaring (Mayo en Cooper, 1973). De omzetting van eiwit II naar eiwit III gaat blijkbaar in discrete stappen, waarbij vrijwel alle subeenheden van eiwit II op elk ogenblik in hetzelfde stadium van afbraak zijn. Hoeveel aminozuren van eiwit II afgesplitst worden bij de overgang naar eiwit III is niet bekend. Volgens Niblett en Semancik (1969) worden bij de overgang van S naar F maximaal 7 aminozuren van het eiwit afgesplitst. Of dit aminozuren zijn van eiwit I en/of eiwit II is niet zeker, omdat de gegevens van Niblett en Semancik gebaseerd zijn op

slechts een manteleiwit.

6 De infectiositeit van de elektroforetische vormen van het CPMV

Door Niblett en Semancik (1969; 1970) is onderzoek gedaan naar de specifieke infectiositeit van de gescheiden elektroforetische vormen en hun RNAs. Zij vonden dat S veel minder infectieus was dan F. Het S-RNA was echter minder afgebroken en infectieuzer dan het F-RNA. De infectiositeit van S kon sterk vergroot worden door incubatie met trypsine, waarbij de mobiliteit van S ook verhoogd werd. Dit deed Niblett en Semancik veronderstellen, dat het verschil in infectiositeit veroorzaakt zou worden door het verschil in lading tussen S en F. Deze verklaring leek ook ondersteund te worden door het effect van basische eiwitten op de infectiositeit van de gescheiden elektroforetische vormen, waarbij meer remming van de infectiositeit van F dan van S gevonden werd. Deze basische eiwitten zouden kunnen interfereren met de adsorptie van de virusdeeltjes aan de kationische receptor sites op het blad (Stahmann en Gothoskar, 1958). Een andere mogelijkheid die ook door Niblett en Semancik geopperd werd, is dat er verschil in stabiliteit tussen S en F bestaat, waarbij het F-deeltje minder stabiel is dan het S-deeltje, gemakkelijker ontmantelt en daardoor infectieuzer is. Om meer licht te werpen op de achtergronden van de verschillen in infectiositeit tussen de elektroforetische vormen van het CPMV, werden de experimenten van Niblett en Semancik (1969, 1970) gedeeltelijk herhaald, en werd ook het effect van veroudering en lading in het onderzoek betrokken.

6.1. Infectiositeit van de elektroforetische vormen en hun RNAs

De specifieke infectiositeit van de elektroforetische vormen werd bepaald met 'verse' preparaten. De zuivering van het virus werd dan in een dag gedaan en het virus op dezelfde dag nog gescheiden in de elektroforetische vormen. Na scheiden van S en F werden ze geconcentreerd door 3 à 4 uur bij 60.000 rpm en 10°C te centrifugeren in een MSE 65-Ti rotor, zodat de elektroforetische vormen een dag na de aanvang van de zuivering van het virus beschikbaar waren voor experimenten. De specifieke infectiositeiten van S en F en hun RNAs worden gegeven in Tabel 6.1.

Tabel 6.1. Infectiositeit van de elektroforetische vormen van het CPMV en hun RNAs[a].

vorm	CPMV[b]	RNA[c]
S	27	76
F	28	78

[a] gegeven als aantal lokale lesies per bladhelft van *Phaseolus vulgaris*
[b] inoculumconcentratie: 0,1 µg/ml
[c] inoculumconcentratie: 5,0 µg/ml

Uit deze tabel blijkt, dat van deze verse preparaten de infectiositeiten zowel van S en F als van S- en F-RNA gelijk zijn in tegenstelling tot de gegevens van Niblett en Semancik (1970). Deze tegenstelling tot de gepubliceerde gegevens werd ook gevonden wat betreft de intactheid van het RNA. Wanneer F- en S-RNA geëlektroforeerd werden op 2% polyacrylamide-gels, dan werd voor beide RNAs een gelijk patroon gevonden.

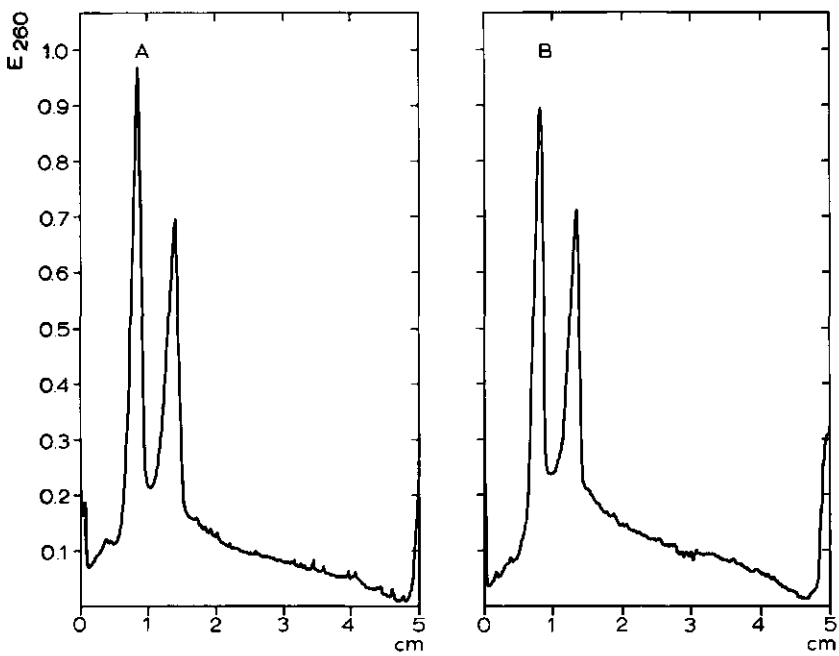


Fig. 6.1. Elektroforesepatronen van RNA geëxtraheerd uit de gescheiden elektroforetische vormen van CPMV na analyse op 2% polyacrylamidegels + 0,5% agarose. De elektroforese is van links naar rechts met de anode rechts.

Er waren geen aanwijzingen in deze patronen voor meer afbraak bij F- dan bij S-RNA. Beide RNAs waren even intact. Omdat uit eerdere experimenten (hoofdstuk 5) bekend was, dat bewaring van S tot veranderingen in de mobiliteit kan leiden, werd ook het effect van veroudering op de infectiositeit onderzocht.

6.2. Invloed van veroudering op de infectiositeit van S en F

Wanneer de gescheiden elektroforetische vormen op ijs bewaard werden gedurende 1 à 2 weken, was de infectiositeit van S meestal sterk gedaald, zonder dat afbraak van het RNA of verandering in de elektroforesesnelheid gevonden werd. Om dit effect te onderzoeken, werden de elektroforetische vormen kunstmatig verouderd door incubatie gedurende 18 uur bij 25°C in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 met en zonder 0,01 *M* 2-MCE. Daarna werden de preparaten getoetst op infectiositeit, en geanalyseerd op elektroforetische snelheid door middel van polyacrylamide-gelelektroforese. De resultaten van deze incubatie bij 25°C zijn samengevat in Fig. 6.2. en Tabel 6.2, waarin ook het effect van incubatie gedurende 18 uur bij 25°C in de oplosbare eiwitfractie is opgenomen.

Tabel 6.2. Effect van kunstmatige veroudering van de elektroforetische vormen van het CPMV op hun infectiositeit.

object	% controle[a]	elektroforesepatroon
S, bewaard op ijs	100	Fig. 6.2.A
F, bewaard op ijs	93	Fig. 6.2.B
S, 18 uur 25°C	57	Fig. 6.2.C
F, 18 uur 25°C	77	Fig. 6.2.C
S, 18 uur 25°C + 0,01 *M* 2-MCE	24	Fig. 6.2.D
F, 18 uur 25°C + 0,01 *M* 2-MCE	73	Fig. 6.2.D
S, 18 uur 25°C in oplosbare eiwitfractie	102	Fig. 6.2.E
F, 18 uur 25°C in oplosbare eiwitfractie	76	Fig. 6.2.E

[a] controle: S, bewaard op ijs, 72 lokale lesies per half blad. Inoculumconcentratie: 0,5 µg/ml.

Uit deze tabel en Fig. 6.2. blijkt, dat bij de incubatie in de buffer met en zonder 2-MCE er een sterke achteruitgang in de infectiositeit plaats heeft, die niet gecorreleerd is aan een verandering in mobiliteit van S (Fig.6.2.D), en dat bij incubatie van S in de oplosbare eiwitfractie er geen achteruitgang is in in-

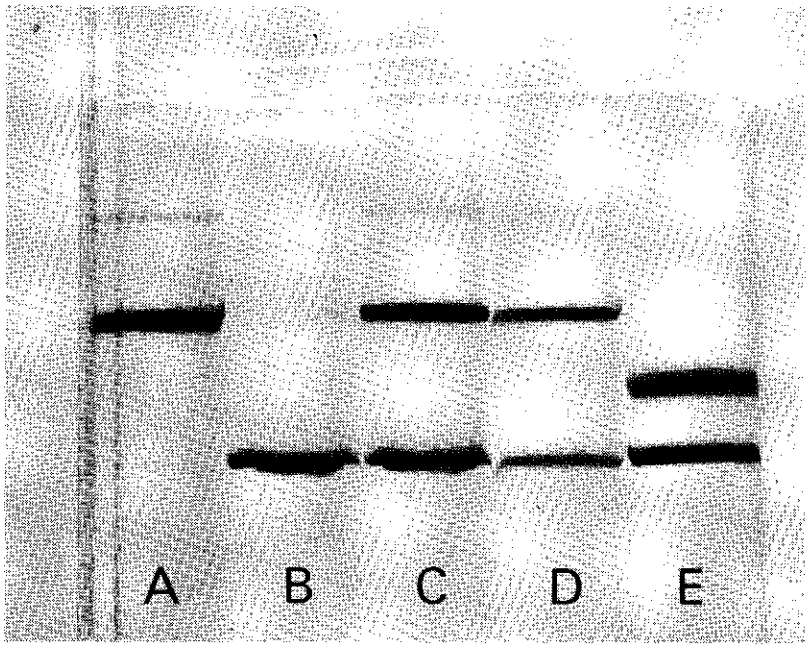


Fig. 6.2. Polyacrylamidegels (3%) die het effect weergeven van incubatie gedurende 18 uur bij 25°C op de gescheiden elektroforetische vormen van CPMV. A: S, bewaard op ijs; B: F, bewaard op ijs; C: S en F na incubatie bij 25°C in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0; D: S en F na incubatie als C, maar + 0,01 *M* 2-MCE; E: S en F na incubatie bij 25°C in de oplosbare eiwitfractie.

fectiositeit, terwijl de mobiliteit dan juist sterk toegenomen is (Fig. 6.2.E). De infectiositeit van F neemt in alle behandelingen iets af, terwijl er geen verandering in mobiliteit van deze vorm gevonden wordt. Uit deze gegevens is niet duidelijk of er bij de incubatie in de oplosbare eiwitfractie behalve de verandering in mobiliteit niets met S gebeurt, of dat er twee processen verlopen, nl. verlies van de infectiositeit door veroudering en herstel van de infectiositeit door verandering in de eiwitmantel. Om dit te onderzoeken werden de gescheiden elektroforetische vormen van het CPMV gedurende 18 uur bij 25°C geïncubeerd in 0,1 *M* Na-fosfaatbuffer pH 7,0 met 0,01 *M* 2-MCE (hetgeen verlies van infectiositeit van S geeft, zie Tabel 6.2.) en daarna gedurende 2 uur geïncubeerd met trypsine (enzym/substraat = 1/30) bij 37°C (hierdoor neemt de mobiliteit van S toe). De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in Tabel 6.3.

Tabel 6.3. Effect van veroudering en incubatie met trypsine op de infectiositeit van de elektroforetische vormen van CPMV.

object	% controle[a]
S, bewaard op ijs	100
F, bewaard op ijs	97
S, 18 uur 25°C + 0,01 *M* 2-MCE	30
F, 18 uur 25°C + 0,01 *M* 2-MCE	86
S, als vorige, daarna 2 uur 37°C + trypsine	106
F, als vorige, daarna 2 uur 37°C + trypsine	84

[a]controle: S, bewaard op ijs, 80 lokale lesies per half blad. Inoculumconcentratie: 0,5 µg/ml.

Uit deze tabel blijkt, dat de infectiositeit van S tot zijn oorspronkelijke niveau teruggebracht kan worden door incubatie met trypsine, wanneer de infectiositeit door veroudering gedaald is. Het is dan ook waarschijnlijk, dat in het geval van incubatie van S in de oplosbare eiwitfractie twee processen een rol spelen (verlies van de infectiositeit door veroudering en herstel van de infectiositeit door proteolytische activiteit in deze fractie).

6.3. Bespreking

De discrepantie tussen onze resultaten en de gegevens van Niblett en Semancik (1969, 1970) kunnen verklaard worden door het effect van veroudering op de infectiositeit van S. Bij veroudering gaat de specifieke infectiositeit van S omlaag ten opzichte van F. Met zo een verouderd S en F preparaat konden de resultaten van Niblett en Semancik wat betreft de werking van proteolytische enzymen gesimuleerd worden. Waarschijnlijk hebben Niblett en Semancik met een verouderd preparaat gewerkt. Verschillen in kwaliteit van het RNA wat betreft infectiositeit en elektroforesepatroon zoals aangetoond door Niblett en Semancik (1970), werden echter niet gevonden. Het is ook niet zo, dat het verschil in lading tussen S en F de oorzaak is van de verschillen in infectiositeit, zoals Niblett en Semancik (1970) suggereerde. De mobiliteit van S veranderde niet tijdens bewaring, maar de infectiositeit daalde wel sterk. Het herstel van de infectiositeit van S door incubatie met proteolytische enzymen gaat wel gepaard aan een toename in mobiliteit, zodat het waarschijnlijk is, dat de structuur van de eiwitmantel een rol speelt. Bij deze incubatie worden bij S een aantal aminozuren afgesplitst.

Wanneer het verwijderen van deze aminozuren het herstel van de infectiositeit tot gevolg heeft, lijkt het voor de hand liggend, dat deze aminozuren ook een rol spelen bij het verlies van de infectiositeit bij bewaring. Hoe het effect van deze aminozuren tot uiting komt is niet duidelijk. Het is mogelijk, dat deze aminozuren van verschillende eiwitsubeenheden van het deeltje bindingen aangaan, waardoor het S-deeltje stabieler wordt en de ontmanteling moeilijker gaat verlopen met als gevolg verlies aan infectiositeit. Een extreem voorbeeld van de rol van intereiwitbindingen bij de infectiositeit van een virusdeeltje is beschreven door Bancroft et al. (1971) voor een mutant van het cowpea chlorotic mottle virus. Bij deze mutant is een arginyl-residu vervangen door een cysteneyl-residu. Dit cysteneyl-residu vormt met plantechinonen intereiwitverbindingen die niet meer verbroken kunnen worden bij de ontmanteling, zodat het deeltje niet meer infectieus is. Een dergelijk proces, waarbij SH- groepen betrokken zijn, speelt bij CPMV waarschijnlijk geen rol, aangezien bewaren en verouderen in de aanwezigheid van 0,01 *M* 2-MCE tot een even sterke of zelfs sterkere daling van de infectiositeit van S leidt. Een andere mogelijkheid is, dat deze aminozuren geen rol spelen bij bindingen tussen eiwitten in hetzelfde deeltje, maar leiden tot aggregatie van verschillende deeltjes. Deze aggregatie zou dan opgeheven worden door incubatie met proteolytische enzymen, zoals bijv. bij de incubatie van aardappel-X-virus met trypsine (Bawden en Kleckowski, 1948). Voor aggregatie zijn geen aanwijzingen gevonden in het spectrum, in het elektroforesepatroon of bij analyse in de analytische ultracentrifuge. Informatie over de rol van de aminozuren die volgens Niblett en Semancik (1969) bij de omzetting van S naar F van de S vorm afgesplitst worden en waardoor de infectiositeit hersteld kan worden, is er verder niet; mogelijk dat het kennen van de volgorde en soort van deze aminozuren een beter inzicht zal kunnen geven.

7 De structuur van de eiwitmantel van CPMV

Op grond van de molaire verhouding van de eiwitten, hun molecuulgewichten (44.000 D en 25.000 D) en het deeltjesgewicht van de topcomponent ($3{,}80 \times 10^6$ D) is de eiwitmantel van CPMV opgebouwd uit ca. 60 kopieën van elk van de eiwitten. Agrawal (1964) veronderstelde op grond van elektronenmicroscopische opnames, dat het CPMV een 5, 3, 2 symmetrie (= icosaëder) heeft. Bij een icosaëder kunnen in de eiwitmantel slechts bepaalde aantallen eiwitten voorkomen. De eiwitten in de mantel kunnen ook weer op bepaalde manieren geaggregeerd zijn zonder dat de symmetrie verloren gaat. Deze aggregaten worden de morfologische subeenheden of capsomeren genoemd. Omdat in de elektronenmicroscopische opnames geen duidelijke capsomeren zichtbaar waren, zoals bijv. bij TYMV, kwam Agrawal (1964) tot een model voor de eiwitmantel, waarbij deze is opgebouwd uit 60 identieke subeenheden. Over de aard en het aantal en de molaire verhouding van de subeenheden was toen nog niets bekend.

Door drie-dimensionale beeldreconstructie is het mogelijk om aan de hand van elektronenmicroscopische opnames van negatief gecontrasteerde preparaten een beeld te construeren van de topografie van de eiwitmantel. Voor de drie-dimensionale beeldreconstructie werd gebruik gemaakt van elektronenmicroscopische opnames van met uranylacetaat negatief gecontrasteerde deeltjes van de langzaam migrerende elektroforetische vorm. De gemiddelde diameter van de deeltjes was 20 nm, terwijl de maximum diameter gemeten over de uitersten van het deeltje, 24 nm was. Deze waardes zijn lager dan de waardes die door Agrawal (1964) gevonden werden (23-25 nm voor T, en 24-27 nm voor de nucleoproteïnes) en de waardes die door Van Kammen (1967) bepaald zijn (28 nm). De oorzaak hiervan ligt waarschijnlijk in de calibratie van de microscoop (door Agrawal met polystyreen-latex bolletjes, in ons geval met een raster met een gegeven aantal lijnen/mm) en in het gebruik van verschillende kleurstoffen. Uranylacetaat is kleiner dan PTA, zodat het mogelijk is, dat uranylacetaat verder doordringt in de oppervlakte van het deeltje (door het negatieve contrast lijkt het dan kleiner). Dikwijls zijn er ook deeltjes te zien, waarvan de profielen karakteristiek zijn voor oriëntatie volgens een bepaalde symmetrie-as. In Fig. 7.1. zijn een aantal deeltjes met 2, 3 en 5 aangegeven die respectievelijk de 2-tallige, de 3-tallige en de 5-tallige symmetrie laten zien. Deze typische profielen en het feit, dat de deeltjes een regelmatige vorm hebben, zijn al duidelijke aanwijzingen, dat de deeltjes 5, 3, 2 symmetrie hebben. Verdere aanwijzingen voor 5, 3, 2 symmetrie werden verkregen uit de drie-dimensionale beeldreconstructie uit de deeltjes die in Fig. 7.1. zijn aangegeven. De reconstructie werd uitgevoerd volgens de methode die door Crowther, DeRosier

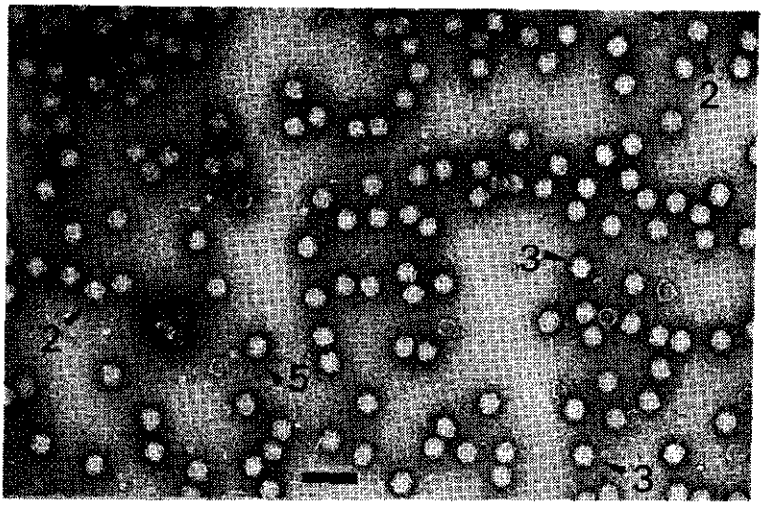


Fig. 7.1. Elektronenmicroscopische opname van CPMV, negatief gecontrasteerd met 0,5% uranylacetaat pH 4,2 en gespreid over gaatjes in een koolstofvlies. Deeltjes aangegeven met 2, 3 en 5 vertonen profielen die karakteristiek zijn voor oriëntatie volgens de 2-tallige, de 3-tallige en de 5-tallige as. De lijn komt overeen met 50 nm.

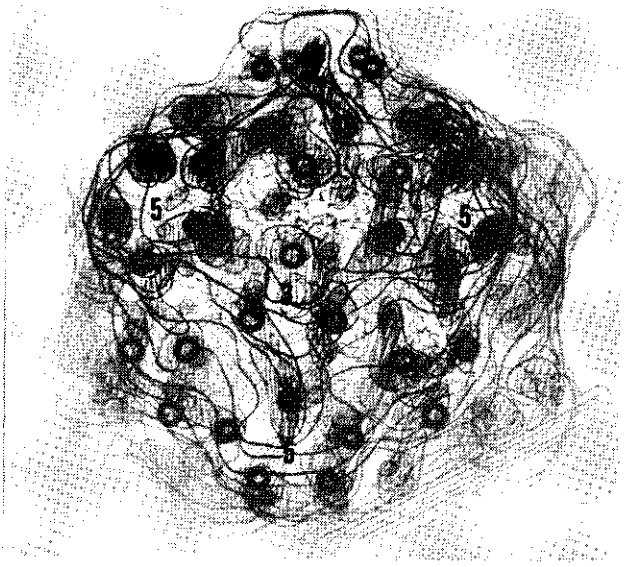


Fig. 7.2. Drie-dimensionale weergave van de contouren van de helft van een beeldreconstructie van CPMV. De markers geven sterke pieken in dichtheid aan bij de 3-tallige en de 5-tallige plaatsen. Opvallend zijn de uitstulpingen op de 5-tallige plaatsen, de kleinere uitstulpingen op de 3-tallige posities en de instulpingen op de 2-tallige plaatsen. Het aanzicht is ongeveer overeenkomstig de 3-tallige as.

en Klug (1970) en Crowther (1971) is beschreven. De reconstructie van CPMV-deeltjes is uitvoerig beschreven door Crowther, Geelen en Mellema (1973, in druk). In Fig. 7.2. is de reconstructie gegeven van drie deeltjes uit Fig. 7.1. De reconstructie toont aan, dat het oppervlakte van de capside tamelijk glad en golvend is. Er zijn vrij duidelijke uitstulpingen op de 5-tallige posities met richels die naar kleinere uitstulpingen op de 3-tallige posities lopen. Op de 2-tallige posities is het oppervlakte iets ingedeukt. Het geometrische beeld dat gevormd wordt door de randen van de eiwitten die de 5-tallige en de 3-tallige posities met elkaar verbinden komt vrijwel overeen met een rhombisch triacontaëder. Een rhombisch triacontaëder is evenals een icosaëder een figuur met 2, 3, 5 symmetrie. Het verschil tussen beide figuren betreft de plaatsing van de asymmetrische subeenheden. Beide modellen hebben 60 asymmetrische subeenheden, waarvan er bij een icosaëder telkens drie op 20 driehoekige vlakken liggen en bij een rhombisch triacontaëder telkens twee op 30 ruitvormige vlakken. Bij alle tot nu toe in detail bestudeerde kleine isometrische virussen is icosaëdrische symmetrie gevonden. CPMV is het eerste voorbeeld van een klein isometrisch virus met een symmetrie volgens een rhombisch triacontaëder. Omdat het oppervlakte van het model tamelijk glad is, en de kleurstof niet ver doorgedrongen is, is het niet mogelijk om de posities van de aparte eiwitten te bepalen. Op grond van de molecuulgewichten en de molaire verhouding van de eiwitten en uitgaande van het gereconstrueerde beeld wordt het model voorgesteld, dat gegeven wordt in Fig.7.3.

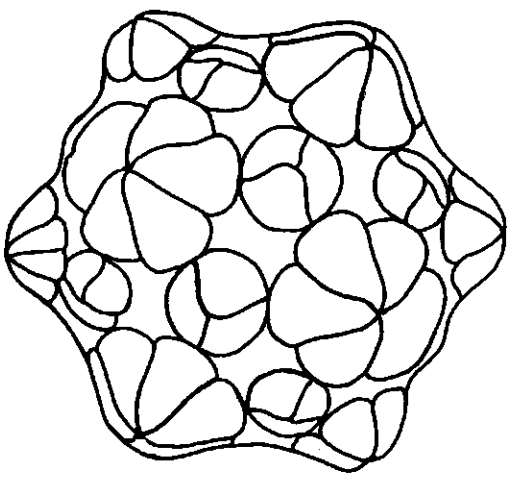


Fig. 7.3. Schematische weergave van het model voor CPMV gebaseerd op de drie-dimensionale beeldreconstructie en de chemische samenstelling. De grote eiwitsubeenheden zijn rond de 5-tallige posities geclusterd en de kleine eiwitten rond de 3-tallige posities.

Bij dit model zijn de 60 grote eiwitten geclusterd in 12 pentameren op de 5-tallige posities en de 60 kleine eiwitten geclusterd in 20 trimeren op de 3-tallige posities. Een model opgebouwd uit twee concentrische eiwitmantels met in iedere mantel een type eiwit is niet waarschijnlijk. De omzetting van S naar F door incubatie met proteolytische enzymen gaat gepaard met een beperkte hydrolyse van het kleine eiwit. Dit eiwit moet dan ook tenminste gedeeltelijk aan de oppervlakte van het deeltje liggen. Een aaneengesloten eiwitmantel met een diameter van 24 nm kan echter niet opgebouwd zijn uit alleen 60 kleine eiwitten, zodat zowel de grote als de kleine eiwitten deel hebben aan de opbouw van een eiwitmantel van deze diameter. De meest aannemelijke verklaring van het gereconstrueerde model is, dat het grote eiwit de grote uitstulpingen op de 5-tallige posities vormt, terwijl de kleinere uitstulpingen op de 3-tallige posities opgebouwd zijn uit het kleine eiwit. De volumina van de grote en de kleine eiwitten zouden zich dan ongeveer als 2 tot 1 verhouden. Dit is in goede overeenstemming met de verhouding van de molecuulgewichten van de twee eiwitten, die ook ongeveer 2 tot 1 is.

De drie-dimensionale beeldreconstructie is uitgevoerd aan de hand van elektronenmicroscopische opnames van deeltjes van S. Van deze deeltjes is immers bekend, dat ze het minste structurele veranderingen ondergaan hebben (hoofdstuk 4.5.). Elektronenmicroscopische opnames van F geven hiermee echter geen verschillen te zien. Dit is ook niet te verwachten, wanneer het verlies van een peptide van ca. 2.500 D niet tot een herorganisatie van de capside leidt. Een dergelijk klein peptide is niet waarneembaar bij het oplossend vermogen van de microscoop (ca. 2,5 nm). Het hier voorgestelde model heeft interessante consequenties voor de manier waarop een dergelijke capside geassembleerd zou moeten worden. Een van de mogelijkheden is, dat de capside geassembleerd wordt uit 60 strikt gelijke dimeren die elk uit een groot en een klein eiwit bestaan. Een andere mogelijkheid is, dat de grote en de kleine eiwitten resp. pentameren en trimeren vormen, die daarna aggregeren om de eiwitmantel te vormen. Op het ogenblik is het echter nog niet bekend of de assemblage inderdaad volgens een van beide mogelijkheden verloopt.

8 De zweefdichtheid van de centrifugale componenten van het CPMV in CsCl

Wanneer CPMV in een CsCl-gradiënt bij pH 7,0 tot evenwicht gedraaid wordt, dan worden vier dichtheidscomponenten gevonden die overeenkomen met de topcomponent (1,297 g/cm^3), de middencomponent (1,405 g/cm^3) en de bodemcomponent (1,422 en 1,467 g/cm^3) (Bruening, 1969). Deze opsplitsing van de bodemcomponent in CsCl in een lichte (B_u) en een zware (B_l) bodemcomponent is ook beschreven door Van Griensven (1970) en Van Kammen en Van Griensven (1970). Op grond van de dichtheden van top- en middencomponent en de RNA-gehaltes van midden- en bodemcomponent veronderstelde Van Griensven (1970), dat B_u een artefact was en ontstaan door veranderingen in het deeltje. In dit hoofdstuk is aandacht besteed aan kleine verschillen in zweefdichtheid die het gevolg zijn van ladingsverschillen (elektroforetische vormen en pH afhankelijkheid) en het grote verschil in zweefdichtheid tussen B_u en B_l. Om meer inzicht te krijgen in de oorzaak van het grote verschil in zweefdichtheid tussen de twee bodemcomponenten werden van deze componenten een aantal eigenschappen vergeleken, zoals eiwit- en RNAsamenstelling, effect van de pH.

8.1. Verband elektroforetische vormen en zweefdichtheid in CsCl.

Wanneer de vier centrifugale componenten van CPMV tot evenwicht gedraaid worden in CsCl in de analytische ultracentrifuge bleken alle op te splitsen in twee componenten die ongeveer 0,004 g/cm^3 in dichtheid verschilden. In totaal werden er dus 8 componenten gevonden: 2 x topcomponent, 2 x middencomponent, 2 x B_u en 2 x B_l.

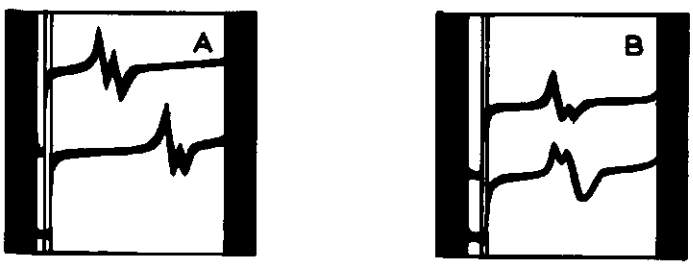


Fig. 8.1. Schlierenpatronen van de centrifugale componenten van CPMV tot evenwicht gedraaid gedurende 23 uur bij 20°C en 35.600 rpm in 0,01 *M* Nafosfaatbuffer pH 6,5 + CsCl. A, boven B_l (ρ = 1,463), onder B_u (ρ = 1,404); B, boven M (ρ = 1,400), onder T (ρ = 1,290).

De opsplitsing in twee componenten was lang niet altijd zo duidelijk als in deze figuur. De mate van opsplitsing leek afhankelijk te zijn van de leeftijd van het preparaat en de manier van zuivering. Aangezien de mobiliteit van de langzaam migrerende elektroforetische vorm kan veranderen met veroudering van het preparaat afhankelijk van de zuiveringsmethode (hoofdstuk 5) leek het waarschijnlijk, dat deze opsplitsing verband zou houden met het voorkomen van elektroforetische vormen van het virus. Daarom werden de elektroforetische vormen gescheiden en vervolgens tot evenwicht gedraaid in CsCl in de analytische ultracentrifuge. De Schlierenpatronen van een dergelijk experiment met de bodemcomponent worden gegeven in Fig. 8.2.



Fig. 8.2. Schlierenpatronen van de bodemcomponent van CPMV gedurende 20 uur bij 20°C tot evenwicht gedraaid in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 8,5 + CsCl (ρ = 1,460). A, boven S + F (2/1), onder S; B, boven S + F (1/2), onder F.

Uit deze figuur blijkt, dat de gescheiden elektroforetische vormen slechts één zweefdichtheidscomponent hebben, en dat de combinatie van de elektroforetische vormen weer een dubbele band geeft.

8.2. De zweefdichtheid van de centrifugale componenten in CsCl.

De zweefdichtheid van de componenten werd bepaald met de analytische ultracentrifuge met de Schlieren-optiek, uit de afstand van de virusband tot het punt in de cel met een dichtheid gelijk aan de begindichtheid en de gradiënt, zoals aangegeven in materialen en methodes. De gradiënten werden niet gecorrigeerd voor samendrukbaarheid. De resultaten van de zweefdichtheidsbepalingen van de componenten van CPMV worden gegeven in Tabel 8.1.

Tabel 8.1. De zweefdichtheden (g/cm^3) van de centrifugale componenten van CPMV[a].

component	elektroforetische vorm	pH 6,5	pH 8,5
Top	S	1,285	1,288
Top	F	1,288	1,291
Midden	S	1,391	1,396
Midden	F	1,395	1,400
Bodem-U	S	1,404	-----[b]
Bodem-U	F	1,408	-----
Bodem-L	S	1,442	1,447
Bodem-L	F	1,446	1,451

[a] de zweefdichtheden werden bepaald in de analytische ultracentrifuge in CsCl-oplossingen in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer van de aangegeven pH bij 20°C en 35.600 rpm.

[b] niet bepaald, deze component komt bij deze pH vrijwel niet voor.

Uit deze tabel blijkt, dat er kleine verschillen in dichtheid zijn afhankelijk van de pH. Bij hogere pH zijn de dichtheden iets hoger, waarschijnlijk als gevolg van een iets verhoogde adsorptie van Cs^+-ionen ten gevolge van een toegenomen negatieve lading van de virusdeeltjes. De dichtheid van B_u bij pH 8,5 werd niet bepaald, omdat het aandeel van deze component bij de gegeven pH minimaal was.

8.3. Invloed van de pH op de verhouding van B_u tot B_l

Door Wood (1971) werd gevonden, dat de verhouding van B_u tot B_l sterk afhankelijk was van de pH waarbij de evenwichtsrun gedaan werd. Deze experimenten werden herhaald en bevestigd, zoals te zien is in Fig. 8.3., waarbij de bodemcomponent van CPMV tot evenwicht werd gedraaid in een CsCl-gradiënt bij pH 6,5 en pH 8,5. Zoals te zien is wordt bij pH 6,5 vrijwel alleen B_u gevonden en bij pH 8,5 vrijwel alleen B_l. Wanneer de bodemcomponentband uit Fig.8.3.**A** (bij pH 6,5) afgetapt werd en opnieuw gedraaid maar nu bij pH 8,5, dan werd een patroon als Fig. 8.3.**B** gevonden. Werd de virusband uit Fig. 8.3.**B** (bij pH 8,5) afgetapt en opnieuw gedraaid maar nu bij pH 6,5 dan werd er geen overgang van B_l naar B_u gevonden, maar werd hetzelfde patroon als Fig.8.3.**B** verkregen. De omzetting van B_u naar B_l kan blijkbaar niet meer ongedaan gemaakt worden door van pH 8,5 naar pH 6,5 te gaan.

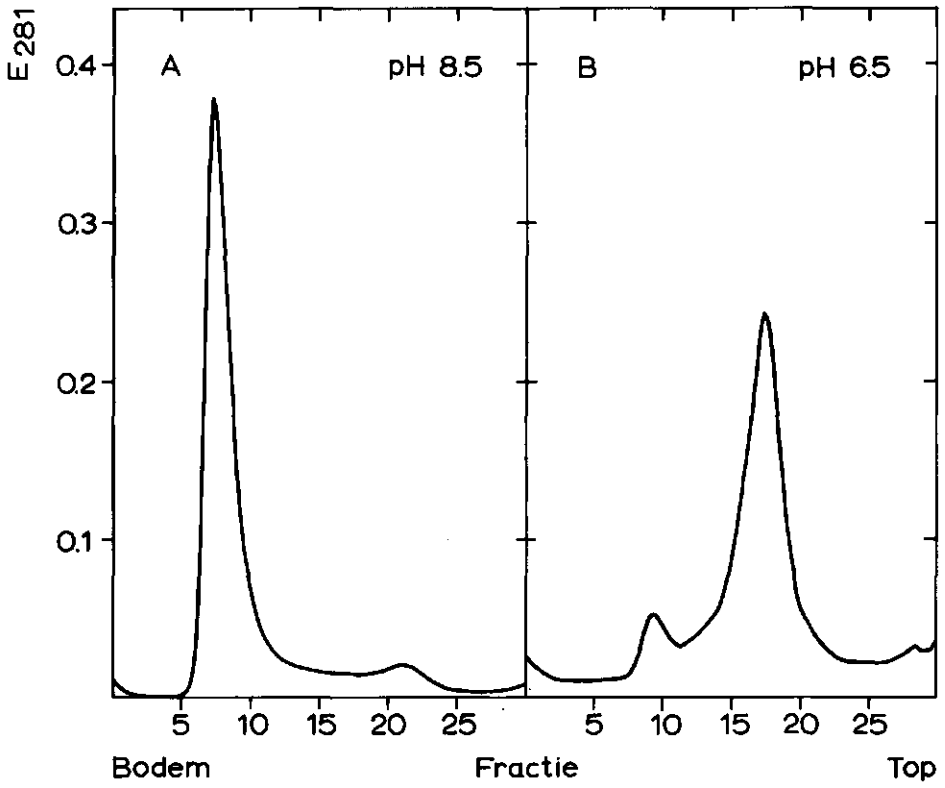


Fig. 8.3. Invloed van de pH op de verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l na centrifugeren gedurende 22 uur bij 10°C en 42.000 rpm in een MSE SW 60-Ti rotor in 41% (w/w) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer. A : pH 8,5; B : pH 6,5.

De verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l is niet afhankelijk van de pH alleen, aangezien de elektroforetische vormen, die nota bene gescheiden waren in 0,005 *M* Tris/glycinebuffer pH 8,6,zowel bij pH 6,5 als bij pH 8,5 een patroon gaven, dat identiek was aan niet gefractioneerde bodemcomponent. De door de verhoogde pH geïnduceerde, niet reversibele verandering van de bodemcomponent heeft blijkbaar plaats tijdens de evenwichtscentrifugatie in CsCl. Deze veronderstelling wordt ondersteund door het feit dat de hoeveelheid B_l toenam bij langer centrifugeren bij pH 6,5 (Fig. 8.4., blz. 66). De druk die tijdens de centrifugatie op de deeltjes staat heeft waarschijnlijk geen invloed. Er werd geen verschil in de verhouding van de twee bodemcomponenten gevonden, wanneer er bij 30.000, 40.000 of 50.000 rpm gedraaid werd. Ook herhaald stoppen en starten van het centrifugeren, waarbij de druk op het preparaat dus beurtelings afneemt en toeneemt, had geen effect op de verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l.

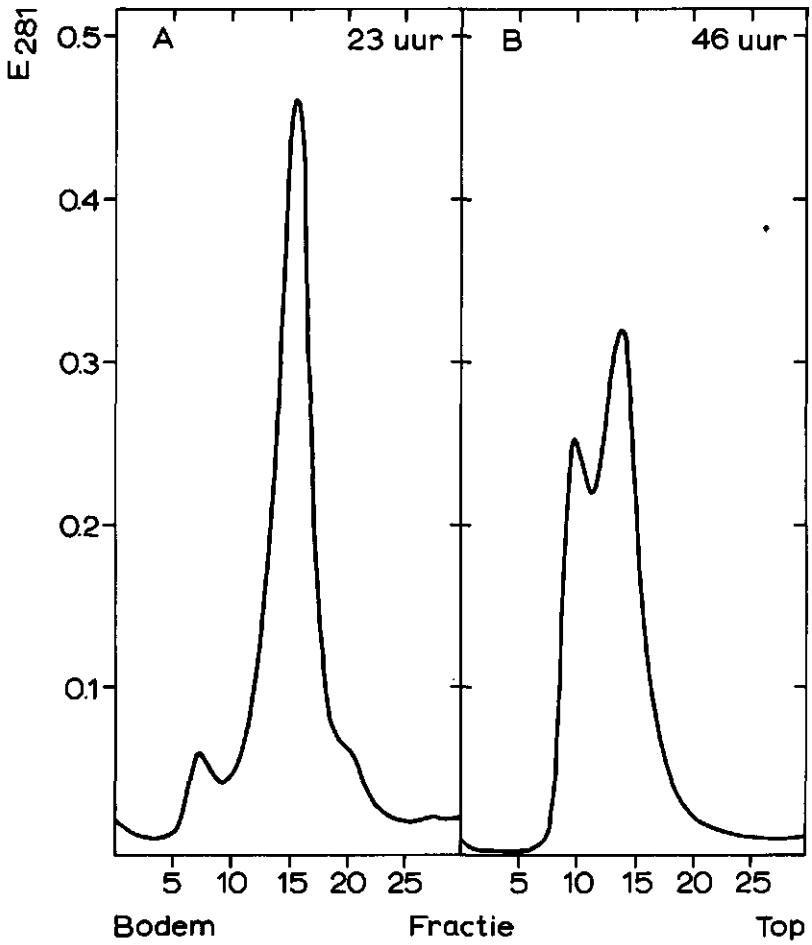


Fig. 8.4. Invloed van de duur van de run op de verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l. De bodemcomponent werd gedurende 23 (A) en 46 (B) uur gecentrifugeerd in 41% (w/w) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 6,5 in een MSE SW 60-Ti rotor bij 10°C en 42.000 rpm.

8.4. Invloed van formaldehyde op de verhouding van B_u tot B_l

Formaldehyde bindt aan aminogroepen van RNA en aminozuren, waarbij methyleenbruggen gevormd worden en bestaande structuren gestabiliseerd kunnen worden (Feldman, 1972). Door deze stabiliserende werking van formaldehyde is het mogelijk om bijv. komkommermozaïekvirus in CsCl-gradiënten tot evenwicht te draaien, terwijl dit virus onder normale omstandigheden in hoge zoutsterkte uiteen valt (Francki en Habili, 1972).

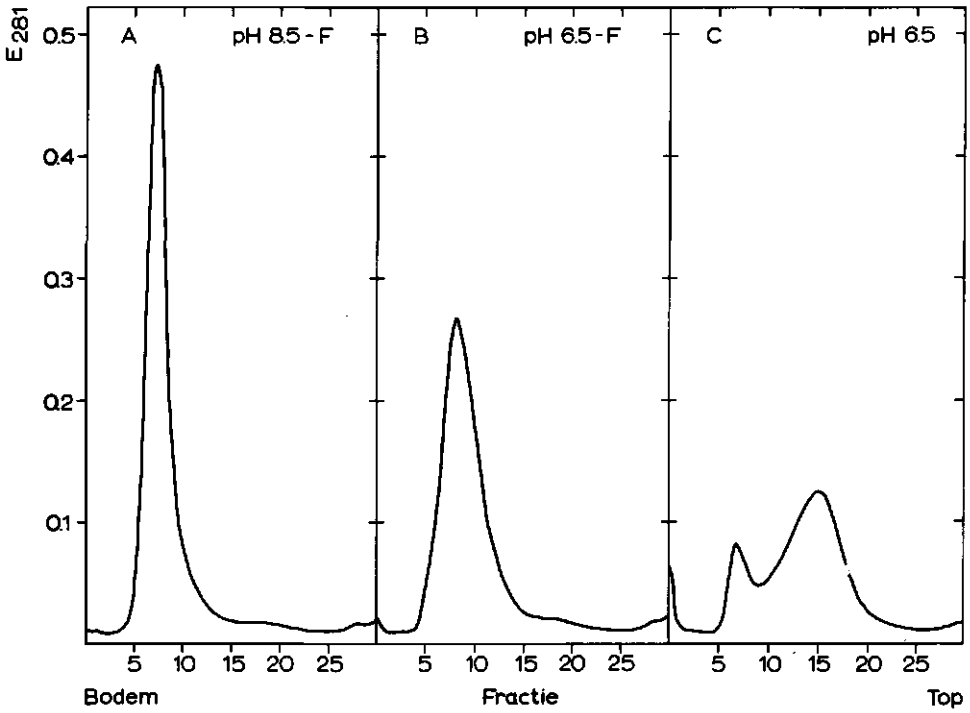


Fig. 8.5. De invloed van fixeren met 1% formaldehyde op de verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l na centrifugeren bij 10°C en 42.000 rpm gedurende 20 uur in een MSE SW 60-Ti rotor in 41% (w/w) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer + 0,1% formaldehyde. A : pH 8,5; B : pH 6,5; C : onbehandeld, gradiënt zonder formaldehyde, pH 6,5.

Om te zien of het mogelijk was om de bodemcomponent in een bepaalde dichtheidscomponent met formaldehyde te fixeren werd de bodemcomponent gedurende 2 uur bij kamertemperatuur met 1% formaldehyde geïncubeerd en daarna gedurende 20 uur bij 10°C en 42.000 rpm tot evenwicht gedraaid in 41% (w/w) CsCl in 0,01 *M* Na-fosfaatbuffer pH 6,5, respectievelijk pH 8,5. In Fig. 8.5. wordt het effect van formyleren op de verhouding van de bodemcomponenten gegeven. In deze figuur is te zien, dat na formyleren niet alleen bij pH 8,5 maar ook bij pH 6,5 voornamelijk B_l voorkomt, in tegenstelling tot centrifugeren bij pH 6,5 zonder formaldehyde wanneer voornamelijk B_u gevonden werd (zie Fig. 8.3.). Het effect van formaldehyde op de structuur van de bodemcomponentdeeltjes werd onderzocht met behulp van de elektronenmicroscoop.

Daartoe werden de afzonderlijke componenten van CPMV bij pH 6,5 en pH 8,5 tot evenwicht gedraaid in CsCl-gradiënten en gedurende 2 uur met 1% formaldehyde gefixeerd. Daarna werden ze gedialyseerd in de koude kamer tegen 0,01 *M* Na-fos-

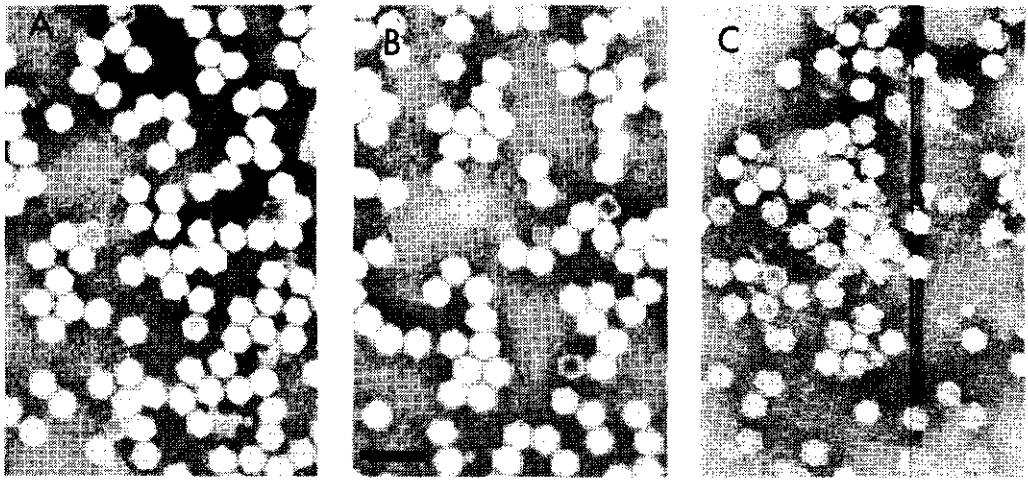


Fig. 8.6. Elektronenmicroscopische opnames van de bodemcomponent van CPMV na negatieve contrastering met 2% PTA pH 7,0. De bodemcomponent was tot evenwicht gedraaid in CsCl bij pH 6,5 (B) en bij pH 8,5 (C) en daarna in de CsCl oplossing gefixeerd met 1% formaldehyde. A, is een onbehandeld preparaat. De lijn komt overeen met 50 nm.

faatbuffer pH 6,5 of pH 8,5 met 0,1% formaldehyde en vervolgens bekeken in de elektronenmicroscoop na negatieve contrastering met 2% PTA pH 7,0 of 1% uranyloxalaat pH 7,0. Bij vergelijking van de gefixeerde preparaten met de onbehandelde controles werden na kleuring met uranyloxalaat geen verschillen gevonden. In de met PTA negatief gecontrasteerde preparaten van de bij pH 8,5 gefixeerde bodemcomponent werden echter een groot aantal min of meer afgebroken virusdeeltjes gezien, zoals blijkt uit Fig. 8.6. Om na te gaan of het effect van formaldehyde op een andere manier gesimuleerd kon worden, werd de bodemcomponent ook tot evenwicht gedraaid in CsCl bij pH 6,5 en 8,5 in de aanwezigheid van 10^{-2} *M* EDTA of 10^{-3} *M* $MgCl_2$. EDTA vermindert de stabiliteit van verscheidene virussen (bijv. turnip yellow mosaic virus en southern bean mosaic virus; Wells en Sisler, 1969; Seghal, 1973), terwijl Mg^{++} het tegenovergestelde effect heeft. Beide reagentia bleken echter geen invloed te hebben op de verdeling van de bodemcomponent over B_u en B_l.

Behalve door veranderingen in de conformatie van de deeltjes (zwellen, krimpen, reorganisatie van de eiwitten), zou het grote verschil in zweefdichtheid tussen de twee bodemcomponenten ook het gevolg kunnen zijn van verlies van eiwit, hetgeen tot een grotere zweefdichtheid leidt of verlies van RNA, hetgeen tot een

lagere zweefdichtheid leidt. Het verschil in dichtheden van de twee bodemcomponenten is zodanig (0,039 g/cm^3), dat B_u een eiwitgehalte van ca. 70% zou hebben en B_l van ongeveer 60%. Het was echter niet mogelijk om door middel van gelelektroforese van nucleoproteïne, van de eiwitten en van de RNAs enig verschil tussen de twee bodemcomponenten aan te tonen. Ze hadden ook een gelijke sedimentatiesnelheid en leverden dezelfde bijdrage in de infectiositeit bij toetsen in combinatie met de middencomponent. Het is dan ook onwaarschijnlijk, dat er verlies van RNA optreedt. Ook voor verlies van eiwit zijn er geen aanwijzingen.

8.5. Bespreking

Wanneer de centrifugale componenten van het CPMV bij neutrale pH in CsCl tot evenwicht worden gedraaid, dan worden 8 componenten van verschillende zweefdichtheid gevonden, die in groepjes van twee dicht bij elkaar liggen. Deze groepjes van twee banden komen overeen met de topcomponent, de middencomponent, een lichte bodemcomponent en een zware bodemcomponent. De twee banden met een klein verschil in dichtheid die bij iedere component gevonden worden, komen overeen met de twee elektroforetische vormen van elke centrifugale component, waarbij de snel migrerende vorm (F) een iets grotere zweefdichtheid heeft (ongeveer 0,004 g/cm^3) dan de langzaam migrerende vorm (S). Dit verschil kan verklaard worden door de grotere negatieve lading van F die daardoor relatief meer Cs^+-ionen kan binden. De zweefdichtheid van de componenten is afhankelijk van de pH. Bij pH 6,5 is de dichtheid van alle CsCl-componenten (tweemaal T; tweemaal M en viermaal B) iets lager dan bij pH 8,5 (ca. 0,005 g/cm^3). Deze toename in zweefdichtheid bij verhoging van de pH is reversibel, en is waarschijnlijk het gevolg van een toenemende dissociatie van ioniseerbare groepen in het manteleiwit, waardoor in toenemende mate Cs^+-ionen gebonden kunnen worden.
Naast deze kleine variaties in dichtheid, waarin de pH en de elektroforetische vorm van een bepaalde component tot uiting komt, heeft er bij de bodemcomponent een opsplitsing plaats in CsCl in twee bodemcomponenten met een sterk verschillende zweefdichtheid. De zweefdichtheden bedragen bij pH 6,5 resp. 1,404 g/cm^3 en 1,442 g/cm^3 voor de langzaam migrerende vorm. De oorzaak van dit grote verschil in zweefdichtheid is niet duidelijk. Waarschijnlijk is de zwaardere component (B_l) een artefact en niet de lichtere component (B_u), zoals door Van Griensven (1970) verondersteld werd. Aanwijzingen hiervoor zijn, dat de omzetting van B_u naar B_l wel mogelijk is, maar niet andersom, en dat de hoeveelheid B_l toeneemt met de duur van de centrifugatie.

Het is niet bekend welke veranderingen de bodemcomponent ondergaat tijdens de run. Deze opsplitsing van B is waarschijnlijk een algemene eigenschap van de cowpea-mozaïekvirusgroep. Zij wordt bijv. ook gevonden bij squash mosaic virus (Mazzone et al., 1962) en radish mosaic virus (White et al., 1973). Het heterogeen zijn bij evenwichtscentrifugatie in dichtheidsgradiënten van schijnbaar homogene preparaten is niet specifiek voor CPMV, het wordt ook bij een aantal andere virussen gevonden. Het verschil in zweefdichtheid tussen de verschillende componenten bij deze virussen weerspiegelt meestal een verschil in RNA-inhoud (cowpea chlorotic mottle virus, Bancroft, 1971; bromegrass mosaic virus, Lane en Kaesberg, 1971; komkommermozaïekvirus, Lot en Kaper, 1973; tabakskringvlekkenvirus, Schneider et al., 1972) of een verschil in oppervlaktelading (southern bean mosaic virus, Magdoff-Fairchild, 1967; turnip yellow mosaic virus, Stols 1964). Bij reovirus (Engler et al., 1970) neemt de dichtheid van het virus toe door verlies van eiwit. Dit soort verschillen kon tussen de twee bodemcomponenten van CPMV echter niet aangetoond worden. Beide componenten hadden een gelijk elektroforesepatroon van virus, eiwit en RNA, terwijl de bijdrage in de infectiositeit in combinatie met de middencomponent gelijk was.

Behalve het grote verschil in zweefdichtheid tussen de componenten konden er verder geen verschillen tussen de twee bodemcomponenten aangetoond worden. De deeltjes waren biologisch en chemisch gelijk, en ook qua structuur en grootte waren geen verschillen zichtbaar in de elektronenmicroscoop. De toename in zweefdichtheid van B bij pH 8,5 kon bij pH 6,5 gesimuleerd worden door incubatie met formaldehyde: ook bij pH 6,5 werd dan vrijwel alleen de zware bodemcomponent gevonden. Hieruit mag echter niet geconcludeerd worden, dat de normale vorm van de bodemcomponent in afwezigheid van CsCl overeenkomt met B_1. Wanneer de bodemcomponent na fixeren bij pH 8,5 met formaldehyde in de elektronenmicroscoop bekeken wordt na negatieve contrastering met PTA blijkt een groot aantal deeltjes een lossere structuur te hebben dan bij de onbehandelde bodemcomponent. Het is dan ook niet zeker of de bodemcomponent door formaldehyde gefixeerd wordt, of dat formaldehyde de eiwitmantel verstoort, zoals bij poliovirus het geval lijkt te zijn (Wouters et al., 1973). Deze verstoring zou dan een verandering in de binding van Cs^+-ionen of de hydratatie van het RNA en/of het eiwit tot gevolg kunnen hebben.

Het lijkt niet onmogelijk, dat B_u ontstaat door zwellen van de bodemcomponent in de hoge CsCl concentratie bij het evenwichtscentrifugeren. De zwelling zou dan weer resulteren in een toename in de binding van Cs^+-ionen, hetgeen de overgang van B_u in B_1 weerspiegelt. Hiermee in overeenstemming is, dat lang centrifugeren bij pH 6,5 omzetting geeft van B_u naar B_1. Ook het feit, dat B_u

overgaat in B_1 wanneer de pH verhoogd wordt past ook goed in dit verband, omdat verhogen van de pH door de toegenomen ionisatiegraad van het eiwit zal resulteren in zwelling of de zwelling bij hoge CsCl concentratie zal bevorderen. In hoeverre het voorkomen van twee bodemcomponenten met een groot verschil in dichtheid gerelateerd is aan de stabiliteit van de bodemcomponent is niet bekend.

9 Samenvatting

Gezuiverde preparaten van het cowpea-mozaïekvirus (CPMV) bestaan uit drie centrifugale componenten die aangeduid worden als top- (T), midden- (M) en bodemcomponent (B). De sedimentatiecoëfficiënten bedragen respectievelijk 58 S, 95 S en 118 S. Alle componenten zijn isometrische deeltjes met een diameter van 20 nm en hebben een gelijke eiwitmantel. T is een lege eiwitmantel, M en B zijn nucleoproteïnes die resp. 25 en 36% RNA bevatten. Per deeltje (M of B) wordt slechts één streng enkel-strengig RNA gevonden.

De molecuulgewichten van de RNAs zijn bepaald volgens een drietal empirische methodes die verschillen in de mate waarin de secundaire structuur van de RNAs het resultaat kan beïnvloeden. Uit de sedimentatiesnelheden van geformyleerde RNAs (nog 5% secundaire structuur aanwezig, Boedtker 1968) kunnen molecuulgewichten van 1,4 x 10^6 D (M) en 2,1 x 10^6 D berekend worden. Uit de mobiliteit van de CPMV-RNAs op polyacrylamidegels ten opzichte van de ribosomale RNAs van *Escherichia coli* konden bij elektroforese onder niet denaturerende omstandigheden molecuulgewichten berekend worden van 1,5 x 10^6 D voor M-RNA en 2,55 x 10^6 D voor B-RNA. Bij elektroforese onder denaturerende omstandigheden (8 *M* ureum; 60° C) wordt voor M-RNA 1,37 x 10^6 D gevonden en voor B-RNA 2,02 x 10^6 D. Uit de grote verschillen in de waardes vooral voor B-RNA die gevonden worden bij de verschillende methodes blijkt, dat de secundaire structuur veel invloed heeft op de uiteindelijk gevonden molecuulgewichten. Bij de elektroforese in 8 *M* ureum bij 60°C zijn zowel de *Escherichia coli* RNAs als de CPMV-RNAs volledig gedenatureerd (zie hyperchromiciteitscurve in Fig. 3.3.), zodat bij deze methode er geen verschillen bestaan in secundaire structuur tussen de te toetsen RNAs en de RNAs met bekend molecuulgewicht. Deze methode geeft ons inziens dan ook de meest betrouwbare resultaten.

De capside van CPMV is opgebouwd uit twee verschillende eiwitten. De eiwitten werden geëxtraheerd door incubatie met natriumlaurylsulfaat en 2-mercaptoëthanol. Om aggregatie van het eiwit te voorkomen was het noodzakelijk om de SH- groepen van het eiwit of wel te beschermen door 2-mercaptoëthanol aanwezig te houden, of wel te blokkeren door carboxymethyleren of oxyderen. De molecuulgewichten van de eiwitten werden geschat door middel van polyacrylamide-gelelektroforese in de aanwezigheid van SDS volgens de methode van Weber en Osborn (1969). Voor gecarboxymethyleerde eiwitten werden molecuulgewichten van 44.000 D en 25.000 D gevonden en voor geoxydeerde eiwitten 49.000 D en 27.500 D. Deze verschillen in de molecuulgewichten van de eiwitten na carboxymethyleren en na oxyderen duiden er op, dat de conformatie van de eiwitten toch nog een rol speelt bij het gevonden

resultaat.
De twee eiwitten worden bij alle drie centrifugale componenten in equimolaire verhouding gevonden, zodat het zeer waarschijnlijk is, dat de centrifugale componenten identieke eiwitmantels hebben.
De deeltjesgewichten van de centrifugale componenten zijn bepaald door lichtverstrooiingsmetingen en door sedimentatie-evenwichtscentrifugeren. Bij lichtverstrooiing worden deeltjesgewichten van $4{,}5 \times 10^6$ D (T), $5{,}6 \times 10^6$ D (M) en $6{,}1 \times 10^6$ D (B) gevonden en bij sedimentatie-evenwichtscentrifugeren $3{,}8 \times 10^6$ D (T), $5{,}15 \times 10^6$ D (M) en $5{,}87 \times 10^6$ D (B). De verschillen in de waardes gevonden bij lichtverstrooiing en bij sedimentatie-evenwichtscentrifugeren zijn wat betreft M en B klein en liggen binnen de experimentele fout (± 5%). De verschillen zijn wel groot bij T. Dit kan veroorzaakt worden door aggregatie of verontreiniging met hoogmoleculair materiaal dat bij lichtverstrooiing wel het resultaat beïnvloedt, maar bij sedimentatie-evenwichtscentrifugeren gesedimenteerd wordt. Het is niet uitgesloten, dat ook enige aggregatie of verontreiniging met grote deeltjes een rol speelt bij M en B. De waardes van lichtverstrooiing liggen allen hoger dan bij sedimentatie-evenwichtscentrifugeren.

Gezuiverde preparaten van het virus zijn heterogeen, wanneer ze geanalyseerd worden door middel van elektroforese. Er worden dan twee elektroforetische vormen gevonden die aangeduid worden als de langzaam migrerende (S) en de snel migrerende (F) vorm. S en F kunnen gescheiden worden door middel van elektroforese in een saccharose-gradiënt. Elke elektroforetische vorm bestaat uit alle drie centrifugale componenten. Wanneer de eiwitsamenstelling van een CPMV-preparaat bestaande uit S en F, geanalyseerd wordt door middel van polyacrylamide-gelelektroforese, worden drie eiwitten gevonden: een groot eiwit (I), en twee kleine eiwitten (II en III). Eiwit II is specifiek voor S en eiwit III voor F (Fig.4.2.). Uit de loopsnelheid van eiwit II en III kan, na carboxymethyleren van de eiwitten door middel van SDS-polyacrylamide-gelelektroforese een molecuulgewicht van 25.000 D voor eiwit II en 22.000 D voor eiwit III geschat worden. De loopsnelheid van eiwit I van S (I_S) is gelijk aan de loopsnelheid van eiwit I van F (I_F) bij elektroforese op polyacrylamide gels. Om te zien of er toch verschillen bestaan tussen deze twee eiwitten, werden de aminozuursamenstellingen bepaald na scheiden van de eiwitten van de gescheiden elektroforetische vormen door middel van gelfiltratie over Sephadex G-200 met 5 *M* ureum als eluent (Tabel 4.3.). Uit deze tabel blijkt dat er niet alleen verschillen bestaan tussen eiwit I en eiwit II en III, maar dat ook eiwit I van S (I_S) en eiwit I van F (I_F) duidelijk verschillen. Beide eiwitten van een gegeven elektroforetische vorm zijn dan ook specifiek voor die elektroforetische vorm.

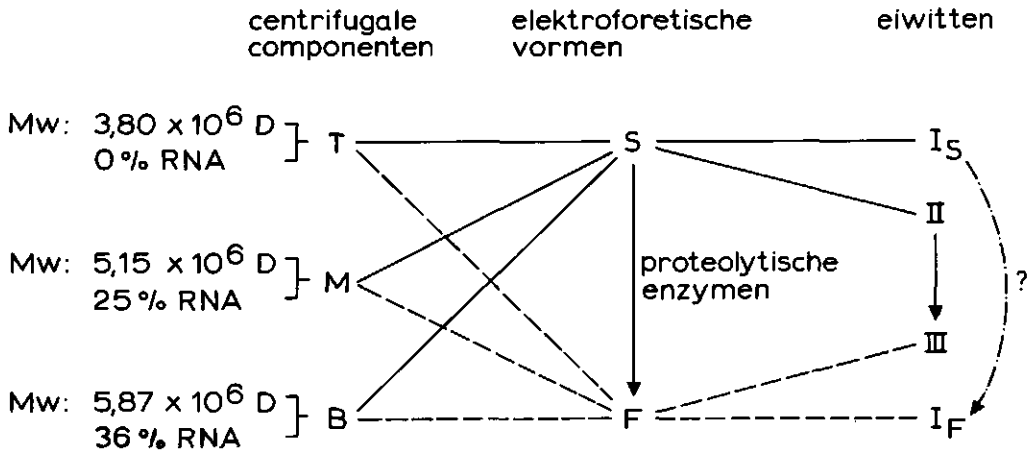


Fig. 9.1. Overzicht van de eigenschappen van CPMV

Door incubatie met proteolytische enzymen is het mogelijk om de loopsnelheid van S te verhogen. Deze toename van de loopsnelheid van S gaat gecorreleerd aan een toename in loopsnelheid van eiwit II. Uiteindelijk valt eiwit II samen met eiwit III. (Fig. 5.1. en Fig. 5.2.). De verschillen tussen de molecuulgewichten van eiwit II en III duiden op een veel groter verschil dan 7 aminozuren tussen eiwit II en III. Wanneer, zoals blijkt uit Tabel 4.3. bij de overgang van S naar F bovendien veranderingen in eiwit I optreden, is het duidelijk dat de overgang van S naar F aanzienlijk gecompliceerder is, dan aanvankelijk door Niblett en Semancik (1969) werd verondersteld. Een overzicht van de eigenschappen van CPMV en het verband tussen de centrifugale componenten, de elektroforetische vormen en de eiwitten is gegeven in Figuur 9.1.

Tussen de deeltjes van S en F zijn in de elektronenmicroscoop geen verschillen zichtbaar. Dit is ook niet te verwachten, wanneer de omzetting van S naar F niet gepaard gaat aan een herorganisatie van de eiwitmantel. Een verschil in molecuulgewicht van ca. 2.500 D (tussen eiwit II en eiwit III) is bij het oplossend vermogen van de microscoop (ca. 2,5 nm) niet aantoonbaar.

De opbouw van de eiwitmantel is onderzocht door middel van drie-dimensionale beeldreconstructie aan de hand van negatief gecontrasteerde preparaten. Het gereconstrueerde beeld heeft 5, 3, 2 symmetrie en lijkt op een rhombisch triacontaëder (Fig. 7.3.). De grote eiwitten zijn in dit model geclusterd in 12 penta-

meren op de 5-tallige posities en de kleine eiwitten in 20 trimeren op de 3-tallige posities (Crowther, Geelen en Mellema, in druk).

De infectiositeiten van S en F zijn gelijk dit in tegenstelling tot de gegevens van Niblett en Semancik (1969, 1970). Bij veroudering gaat de infectiositeit van S echter snel achteruit, en van F slechts langzaam, zodat na verloop van tijd wel grote verschillen tussen S en F gevonden worden. De loopsnelheid van S verandert niet tijdens het verlies van de infectiositeit. De oorspronkelijke infectiositeit van S kan vrijwel hersteld worden door incubatie met trypsine en chymotrypsine. Bij deze incubatie neemt de loopsnelheid van S sterk toe en wordt bijna gelijk aan de snelheid van F. Incubatie met trypsine of chymotrypsine heeft geen effect op de infectiositeit of de loopsnelheid van F. De ladingsverschillen tussen S en F hebben blijkbaar geen invloed op de specifieke infectiositeiten van S en F. Wel lijken de aminozuren die bij de overgang van S naar F van S afgesplitst worden een rol te spelen bij het verlies van de infectiositeit van S. Afsplitsing geeft namelijk een herstel van de oorspronkelijke infectiositeit.

Tijdens bewaring van CPMV wordt soms een omzetting van S naar F gevonden. Een snelle toename in de loopsnelheid van S wordt gevonden bij virus dat met PEG/NaCl uit vers bladmateriaal gezuiverd was, en vrijwel geen verandering bij virus dat met butanol-chloroform gezuiverd is (Fig. 5.1. en Fig. 5.3.). Vrijwel geen verandering in de loopsnelheid van S wordt ook gevonden bij preparaten die een extra zuivering hebben ondergaan, zoals het scheiden van de centrifugale componenten of het scheiden van de elektroforetische vormen. De omzetting van S naar F die bij bewaring soms gevonden wordt, is waarschijnlijk het gevolg van verontreiniging van de preparaten met proteolytische enzymen van de waardplant, aangezien incubatie van CPMV in het sap van geïnfecteerde planten of in de oplosbare eiwitfractie leidt tot dezelfde omzetting (Fig. 5.4.).

Wanneer de centrifugale componenten van CPMV tot evenwicht gedraaid worden bij neutrale pH in CsCl-gradiënten, worden acht componenten gevonden. Deze componenten komen overeen met S en F van elke centrifugale component, terwijl B daar overheen nog opsplitst in twee componenten met een groot verschil in dichtheid (B_u : dichtheid 1,406 g/cm^3; B_l : dichtheid 1,444 g/cm^3). Het verschil in zweefdichtheid tussen de elektroforetische vormen van een bepaalde component (ca. 0,004 g/cm^3) lijkt grotendeels het gevolg van een grotere binding van Cs^+-ionen aan F, die meer negatieve lading heeft dan aan S. In het bijzonder wijst hierop het feit, dat ook bij T die alleen uit eiwit bestaat vrijwel hetzelfde verschil in zweefdichtheid tussen F en S wordt gevonden als bij de andere componenten. De zweefdichteid van alle componenten is afhankelijk van de pH. Bij een hogere pH wordt een hogere dichtheid gevonden. Dit effect is reversibel, en waarschijnlijk

het gevolg van verschillen in binding van Cs^+-ionen bij verandering van de pH.

Naast de kleine verschillen in dichtheid in CsCl die afhankelijk zijn van de elektroforetische vormen en de pH, wordt er bij de bodemcomponent een groot verschil in zweefdichtheid gevonden (ca. 0,040 g/cm^3) tussen B_u en B_l. Het is niet duidelijk, wat de oorzaak is voor dit verschil in zweefdichtheid. B_u en B_l hebben een gelijke RNA-inhoud, een gelijke eiwitsamenstelling, een gelijke sedimentatiesnelheid en een gelijke bijdrage tot de infectiositeit. Na centrifugeren bij pH 8,5 wordt vrijwel alleen B_l gevonden en na centrifugeren bij pH 6,5 vrijwel alleen B_u. Door de pH te verhogen van pH 6,5 naar pH 8,5, of door lang bij pH 6,5 te centrifugeren (Fig. 8.3. en Fig. 8.4.) is het mogelijk om B_u om te zetten in B_l. Deze omzetting is irreversibel. Een mogelijke verklaring voor dit verschijnsel is de volgende: onder invloed van de hoge zoutsterkte zwellen de deeltjes. Dit resulteert in een toegenomen binding van Cs^+-ionen (B_u gaat over naar B_l, na lang draaien bij pH 6,5). Verhogen van de pH van 6,5 naar 8,5 bevordert het zwellen van de deeltjes, zodat het proces van zwellen en toename in Cs^+-ionen binding bij hogere pH sneller zal verlopen en minder B_u gevonden zal worden dan bij lagere pH na dezelfde tijd van centrifugeren in CsCl-oplossingen.

10 Summary

Purified infectious preparations of cowpea mosaic virus (CPMV) consist of three centrifugal components with sedimentation coefficients of 58, 95 and 118 S. These are referred to as top (T), middle (M) and bottom (B) component. M and B are nucleoproteins containing 25 and 36% RNA respectively. All three components are isometric particles with a diameter of 20 nm and have identical capsids. Both nucleoproteins (M and B) are necessary for infectivity (Van Kammen, 1968) and some direct evidence for the distribution of the genetic properties has been given by Bruening (1969) and De Jager and Van Kammen (1970).

The molecular weights of the RNAs have been determined by three emperical methods which differ in the remaining secondary structure of the RNAs. From the sedimentation velocities after formylation of the RNAs (5% secondary structure remaining; Boedtker, 1968) values of 1.4×10^6 D (M-RNA) and 2.1×10^6 D (B-RNA) could be calculated. From the mobilities of the CPMV-RNAs compared to the mobilities of the *Escherichia coli* ribosomal RNAs upon electrophoresis in polyacrylamide gels under non denaturing conditions molecular weights of 1.55×10^6 D (M-RNA) and 2.55×10^6 D (B-RNA) could be calculated. If the molecular weights were determined by electrophoresis on polyacrylamide gels under denaturing conditions (8 *M* urea, 60°C) values of 1.37×10^6 D (M-RNA) and 2.02×10^6 D (B-RNA) were found. In 8 *M* urea at 60°C the secondary structure of the *Escherichia coli* ribosomal RNAs is completely eliminated (Reynders et al., 1973). The CPMV-RNAs are also completely denatured under these conditions as has been shown by hyperchromicity measurements (Fig. 3.3.). As the values determined by gel electrophoresis under denaturing conditions are not affected by differences in secondary structure between the marker-RNAs and the CPMV-RNAs, these molecular weights are the most reliable.

The capsid of CPMV is constructed from two different proteins. CPMV was degraded with 1% sodium dodecyl sulfate in the presence of 1% 2-mercaptoethanol. To prevent aggregation of the proteins it was necessary to protect the SH- groups of the protein with mercaptoethanol or to block these groups by carboxymethylation or performic acid oxidation. The molecular weights of the proteins were estimated by SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis according to Weber and Osborn (1969). Molecular weights of 44,000 D (I) and 25,000 D (II) were found for the carboxymethylated proteins and 49,000 D (I) and 27,500 D (II) for the performic acid oxidized proteins. The SDS bound to the protein apparently does not eliminate differences in the conformation of the proteins. The two proteins are found in all three centrifugal components in equimolar ratio, indicating an identical

capsid of T, M and B.

The particle weights of the centrifugal components have been determined by light-scattering and sedimentation-equilibrium centrifugation. By light-scattering particle weights of 4.5×10^6 D, 5.6×10^6 D and 6.1×10^6 D, and by sedimentation-equilibrium particle weights of 3.80×10^6 D, 5.15×10^6 D and 5.87×10^6 D were found for T, M and B respectively. The differences between the particle weights determined by light-scattering and by sedimentation-equilibrium are within the experimental error (± 5%) for M and B. The difference is larger for T. This is probably caused by aggregation or contamination with large particles. This will affect the particle weight obtained by light-scattering, but not the particle weight obtained by sedimentation-equilibrium if the contaminant or the aggregates precipitated. Although the differences between the values obtained by the two methods are not very large for M and B, the values of sedimentation-equilibrium are probably the best, since the agreement of these particle weights with the molecular weights of the RNAs and the RNA-content of M and B is very good (M : 25% RNA; Mw-RNA : 1.37×10^6 D and B : 36% RNA ; Mw-RNA : 2.02×10^6 D). It can not be excluded, that some aggregation or contamination with large particles affects also the particle weights obtained by light-scattering of M and B, as all light-scattering values are consistently higher than the sedimentation-equilibrium values.

When purified preparations of CPMV are analysed by electrophoresis, two electrophoretic forms are seen : a slow (S) moving and a fast (F) moving electrophoretic form. Each of the electrophoretic forms consists of all three centrifugal components. S and F can be separated by electrophoresis in a sucrose gradient. If the proteins of a CPMV preparation consisting of S and F, are analysed by electrophoresis on polyacrylamide gels, three proteins are seen: one large protein (I) and two small proteins (II and III) (Fig. 4.2.). Protein II is specific for S, and protein III for F. Molecular weights of 25,000 D for protein II and 22,000 for protein III can be estimated by SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis of the carboxymethylated proteins. The distance migrated by protein I of S (I_S) and the distance migrated by protein I of F (I_F) is the same. To check if there are differences between these two large proteins, the proteins of the separated electrophoretic forms were separated by gel filtration on Sephadex G 200 with 5 *M* urea as eluent, and the amino acid compositions determined (Table 4.3.). From this table it can be seen that there are not only differences between protein I and protein II and III, but that also protein I of S (I_S) and protein I of F (I_F) are clearly distinct. Both proteins of an eletrophoretic form are therefore characteristic for that form.

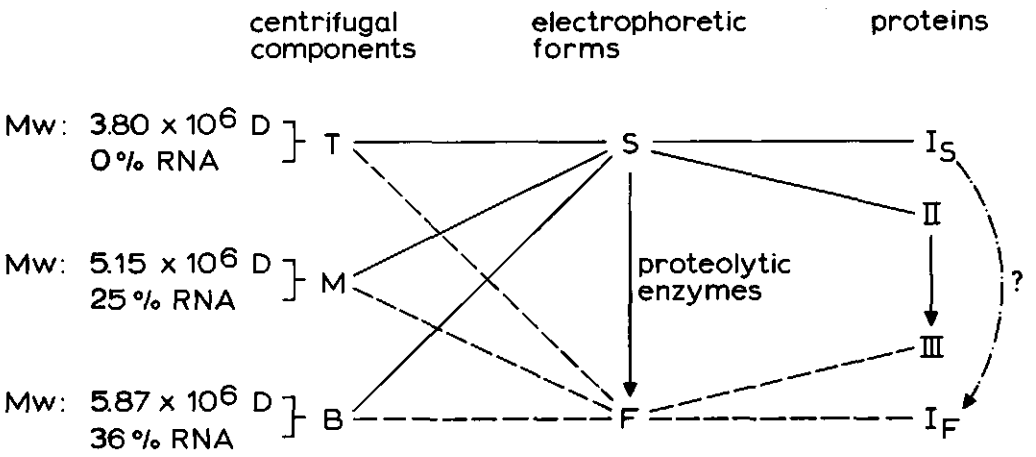


Fig. 10.1. Relationship between the components of CPMV

By incubation with proteolytic enzymes it is possible to increase the electrophoretic mobility of S. This increase in mobility of S is correlated with an increase in mobility of protein II (Fig. 5.1. and Fig. 5.2.). The differences between the molecular weights of protein II and III indicate a larger difference between these two proteins than 7 amino acids. When, as can be seen from Table 4.3., moreover protein I changes upon the conversion of S into F, it is clear, that the conversion of S into F is much more complicated than was supposed by Niblett and Semancik (1969). The properties of CPMV and the relationship between the centrifugal components, the electrophoretic forms and the proteins are summarized in Figure 10.1.

No differences can be seen in the electron microscope between the particles of S and F. This can be expected, as the conversion of S into F apparently does not lead to a reorganisation of the protein coat. A difference in molecular weight of approximately 2,500 D (estimated by SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis) between protein II and III is not detectable in the electron microscope.

By three-dimensional image reconstruction of electron micrographs it was shown that the capsid of CPMV possesses 5, 3, 2 symmetry. Based on the properties of the proteins and the reconstructed image a model is proposed consisting of twelve pentamers of the large protein at the 5-fold positions and twenty trimers of the small protein at the 3-fold positions (Fig. 7.3., Crowther et al.,

in press). The geometrical figure traced out by the ridges of proteins joining 5-fold and 3-fold positions is approximately a rhombic triacontahedron.

Niblett and Semancik (1969, 1970) showed that S was less infectious than F, even though the RNA of S was more infectious and less degraded than the RNA of F. This is only true, if old preparations are tested. The infectivities of S and F are equal, provided fresh preparations are used. The infectivities of the RNAs of S and F are equal, and there is no appreciable sign of a difference in degradation, as judged by gel electrophoresis (Fig. 6.1.). After *in vitro* aging of S a loss in infectivity is observed; the initial infectivity can be restored by incubation with trypsin or chymotrypsin (Table 6.3.). Upon aging the mobility of S is not changed, but the mobility increases upon incubation with trypsin or chymotrypsin. Aging *in vitro* and incubation with trypsin or chymotrypsin affect neither the infectivity nor the mobility of F. Since no increase in mobility of S was observed upon aging, the charge is not decisive for the difference in infectivity between S and F, as has been suggested by Niblett and Semancik (1970). But it is likely that the amino acids which determine the difference between S and F, do play an important role in the loss of infectivity of S upon aging. Removal of these amino acids by incubation with proteolytic enzymes results in an restoration of the initial infectivity.

During storage partial conversion of S into F is sometimes observed. A fast conversion is seen with virus purified by the PEG/NaCl method from fresh leaves and essentially no conversion with virus purified by the butanol-chloroform method from frozen tissue (compare Fig. 5.1. and Fig. 5.3.). Essentially no increase in the mobility of S is observed also with preparations which have undergone an extra purification step, e.g. separation of the electrophoretic forms or separation of the centrifugal components. This partial conversion probably results from proteolytic enzymes contaminating the preparations, as incubation of CPMV in the soluble protein fraction or in the homogenate of infected *Vigna* leaves leads to the same conversion (Fig. 5.4.).

If the centrifugal components are centrifuged to equilibrium in CsCl gradients at neutral pH, eight components are found. These components are S and F of top component, S and F of middle component, S and F of a bottom component with a low buoyant density (B_u) and S and F of a bottom component with a high buoyant density (B_l). The difference in buoyant density between S and F of a centrifugal component (ca. 0.004 g/cm^3) is probably caused by a difference in the amount of Cs^+-ions bound to S and F, as the same difference in buoyant density is also found between S and F of top component (which consists of only protein). The buoyant density of all the components is dependent upon the pH. The density in-

creases with increasing pH. The difference in density between pH 6.5 and pH 8.5 is approximately 0,005 g/cm^3. This density-shift is reversible and probably the result of an increased Cs^+-ions binding with increasing pH.

Besides these small differences in buoyant density observed at different pH's and between the electrophoretic forms, there is a large difference in buoyant density between the two bottom components (about 0,040 g/cm^3). It is not clear what causes this difference. B_u and B_l have the same RNA-content, the same protein composition, the same sedimentation coefficient and the same contribution to the infectivity. When bottom component is centrifuged in CsCl solutions at pH 8.5 almost only B_l is found and at pH 6.5 almost only B_u (Fig. 8.3.). By increasing the pH from 6.5 to 8.5 or by increasing the length of the run at pH 6.5 (Fig. 8.4.) B_u can be converted in B_l.

The conversion from B_u into B_l is irreversible. A possible explanation for this phenomenon is as follows: the particles swell due to the high ionic strenght. The swelling causes an irreversible change in the conformation of the particles, resulting in an increased binding of Cs^+-ions (B_u changes to B_l by increasing the length of the run at pH 6.5). Increasing the pH from 6.5 to 8.5 promotes the swelling. The process of the swelling to B_u and the conversion of B_u to B_l is then so greatly accelerated that after about 20 hours centrifugation (the standard time in these experiments) almost no B_u is left.

Parts of this thesis have been published earlier (Geelen et al., 1972; Geelen et al., 1973; Crowther et al., in press).

11 Literatuur

Agrawal, H.O. (1964). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen,* 64 (5), 1-53.

Anderegg, J.W. (1968). In *Small Angle X-ray scattering* (Brumberg, H., red.), pp. 243-265, Gordon en Breach, Londen.

Arnott S., Wilkins, M.H.F., Fuller, W. en Langridge, R. (1967). *J. Mol. Biol.* 27, 535-548.

Assink, J.M.H. (1973). *Lokalisatie van de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus.* Dissertatie, Wageningen.

Bancroft, J.B. (1962). *Virology* 16, 419-427.

Bancroft, J.B. (1971). *Virology* 45, 830-834.

Bancroft, J.B., McLean, G.D., Rees, M.W. en Short, M.N. (1971). *Virology* 45, 707-715.

Bawden, F.C. en Kleckowski, A. (1948). *J. Gen. Microbiol.* 2, 173-185.

Bennett J. en Scott (1971). *Anal. Biochem.* 43, 173-182.

Boedtker, H. (1968). *J. Mol. Biol.* 35, 61-70.

Brewer, J.M. (1967). *Science* 156, 256-257.

Bruening, G. (1969). *Virology* 37, 577-584.

Butler, P.J.G. (1970). *J. Mol. Biol.* 52, 589-593.

Campbell, R.N. (1971). *C.M.I./A.B.B. Descriptions of plant viruses,* 43.

Campbell, R.N. (1973). *C.M.I./A.B.B. Descriptions of plant viruses,* 121.

Chant, S.R. (1959). *Ann. Appl. Biol.* 47, 565-572.

Crowther, R.A. (1971). *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 261, 221-230.

Crowther, R.A., DeRosier, D.J. en Klug, A. (1970).*Proc. Roy. Soc. Lond.* A.317, 319-340.

Crowther, R.A., Geelen, J.L.M.C. en Mellema, J.E. (1973). *Virology*, in druk.

Dale, W.T. (1949). *Ann. Appl. Biol.* 36, 327-333.

De Jager, C.P. (1971). *Proc. 7th Conf. Czechoslovak Plant Virol.*, High-Tatras.

De Jager, C.P. en Van Kammen, A. (1970). *Virology* 41, 281-287.

Duncan, R.E. en Bruening, G. (1971). *Virology* 46, 973-976.

Dunker, A.K. en Rueckert, R.R. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 5074-5080.

Engler, R., Broome, C., Garrison, C., en Moore, B. (1970). *Arch. Ges. Virusf.* 32, 329-336.

Feldman, M. Ya. (1973). In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Davidson, J.N. en W.E. Cohn, red.), vol. 9, pp. 1-50, Academic Press, New York.

Fraenkel-Conrat, H. (1957). *Virology* 4, 1-4.

Francki, R.I.B. en Habili, N. (1972). *Virology* 48, 309-315.

Frist, R.H., Bendet, I.J., Smith, K.M. en Lauffer, M.A. (1965). *Virology* 26, 558-566.

Geelen, J.L.M.C., Rezelman, G. en Van Kammen, A. (1973). *Virology* 51, 279-286.

Geelen, J.L.M.C. en Van Kammen, A. (1972). *Abstr. Commun. Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.* 8, no.727.

Geelen, J.L.M.C. en Van Kammen, A. (1973). *Abstr. 2nd Int. Congr. of Plant Pathology*, Minneapolis no. 299.

Geelen, J.L.M.C., Van Kammen, A. en Verduin, B.J.M. (1972). *Virology* 49, 205-213.

Gibbs, A.J. en Paul, H.L. (1970). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, no. 20.

Gibbs, A.J. en Smith, H.G. (1970). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, no. 29.

Haselkorn, R. (1966). *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17, 137-154.

Hirs, C.H.W. (1967). In *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. en Kaplan, N.S., red.), vol. 11, pp. 197-199, Academic Press, New York.

Houston, L.L. (1971). *Anal. Biochem.* 44, 81-88.

Ifft, J.B. en Vinograd, J. (1966). *J. Phys. Chem.* 70, 2814-2822.

Ifft, J.B., Voet, D.H. en Vinograd, J. (1961). *J. Phys. Chem.* 65, 1138-1145.

Kaper, J.M. (1972). *Proc. 8th Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc.* vol. 27, 19-41, North-Holland, Amsterdam.

Kassanis, B., White, R.F. en Woods, R.D. (1973). *J. Gen. Virol.* 20, 277-286.

Kerker, M. (1969). *The scattering of light and other electromagnetic radiation*, pp. 487-573, Academic Press, New York.

Koenig, R., Stegemann, H., Francksen, H. en Paul, H.L. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 207, 184-189.

Kruseman, J. (1969). *Onderzoekingen over de bouw van de eiwitmantel van alfalfa mosaic virus*. Dissertatie, Leiden.

Lane, L.C. en Kaesberg, P. (1971). *Nature New Biology*, 232, 40-43.

Lee, R.F., Johnson, L.B. en Niblett, C.L. (1973). *Abstr. 2nd Int. Congr. of Plant Pathology*, Minneapolis, no. 265.

Loening, U.E. (1967). *Biochem. J.* 102, 251-257.

Loening, U.E. en Ingle, J. (1967). *Nature* 215, 363-367.

Lot, H. en Kaper, J.M. (1973). *Virology* 54, 540-543.

Magdoff-Fairchild, B.S. (1967). *Virology* 31, 142-153.

Markham, R. (1960). *Biochem. J.* 77, 516-519.

Markham, R. (1962). *Advan. Virus Res.* 9, 241-270.

Mayo, M.A. en Cooper, J.I. (1973). *J. Gen. Virol.* 18, 281-289.

Mazzone, H.M., Incardona, N.L. en Kaesberg, P. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 55, 164-175.

Moore, B.J. en Scott, H.A. (1971). *Phytopathology* 61, 831-833.

Morrison, W.R. (1964). *Anal. Biochem.* 7, 218-224.

Niblett, C.L. en Semancik, J.S. (1969). *Virology* 38, 685-693.

Niblett, C.L. en Semancik, J.S. (1970). *Virology* 41, 201-207.

Nicolaieff, A., Koenig-Nikes, A.M., Pinck, L. en Hirth, L. (1970). *Virology* 41, 688-700.

Peters, D. en Kitajima, E.W. (1970). *Virology* 41, 135-150.

Pereira, H.G. en Skehel, J.J. (1971). *J. Gen. Virol.* 12, 13-24.

Reichmann, M.E. (1965). *Virology* 25, 166-169.

Reynders, L., Sloof, P., Sival, J. en Borst, P. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, in druk.

Rueckert, R.R., Dunker, A.K. en Stoltzfus, C.M. (1969). *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, 62, 912-919.

Schachman, H.K. (1957). In *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. en Kaplan, N.O. red.), vol. 4, pp. 32-103, Academic Press, New York.

Schneider, I.R., Hull, R. en Markham, R. (1972). *Virology* 47, 320-330.

Seghal, O.P. (1973). *Phytopathology* 63, 629-633.

Semancik, J.S. (1966). *Virology* 30, 698-704.

Semancik, J.S. (1972). *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses* , no. 108.

Semancik, J.S. en Bancroft, J.B. (1965). *Virology* 27, 476-483.

Smith, C.E. (1924). *Science N.Y.* 60, 268.

Smith, E.L. (1951). In *The Enzymes* (J.B. Sumner en K. Myrbäck, red.), vol. 1, hoofdstuk 23, Academic Press, New York.

Spirin, A.S. (1963). In *Progress in Nucleic Acid Research* (Davidson, J.W. en Cohn, W.E., red.), vol. 1, pp. 301-345, Academic Press, New York.

Stahmann, M.A. en Gothoskar, S.S. (1958). *Phytopathology* 48, 362-365.

Stanley, W.M. en Bock, R.M. (1965). *Biochemistry* 4, 1302-1311.

Steere, R.L. (1956). *Phytopathology* 46, 60-69.

Stols, A.L.H. (1964). *Turnip yellow mosaic virus. Interacties met kwaternaire ammoniumzouten.* Dissertatie Leiden.

Tanford, C. (1961). *Physical chemistry of macromolecules*, pp. 275-316, Wiley, New York.

Valenta, V. en Marcinka, K. (1971). *C.M.I./A.B.B. Descriptions of Plant Viruses*, no. 74.

Van Griensven, L.J.L.D. (1970). *De zuivering en de eigenschappen van de replicatieve vorm van het RNA van cowpea mozaïek virus.* Dissertatie, Wageningen.

Van Griensven, L.J.L.D. en Van Kammen, A. en Rezelman, G. (1973). *J. Gen. Virol.* 18, 359-367.

Van Kammen, A. (1967). *Virology* 31, 633-642.

Van Kammen, A. (1968). *Virology* 34, 312-318.

Van Kammen, A. (1971). *C.M.I./A.B.B. Descriptions of Plant Viruses*, nr. 47.

Van Kammen, A. (1971b). *Physiol. Vég.* 9, 479-485.

Van Kammen, A. (1972). *Ann. Rev. Phytopathology*, 10, 125-150.

Van Kammen, A. en Van Griensven, L.J.L.D. (1970). *Virology* 41, 274-280.

Van Loon, L.C. (1972). *Pathogenese en symptoomexpressie in viruszieke tabak.* Dissertatie, Wageningen.

Van Regenmortel, M.H.V. (1964). *Virology* 23, 495-502.

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

Wells, J.M. en Sisler, H.D. (1969). *Virology* 37, 227-236.

White, R.F., Kassanis, B. en Woods R.D. (1973). *J. Gen. Virol.* 20, 387-390.

Wood, H.A. (1971). *Virology* 43, 511-513.

Wood, H.A. (1972). *Virology* 49, 592-598.

Wouters, M., Miller, A.O.A. en Fenwick, M.L. (1973). *J. Gen. Virol.* 18, 211-214.

Wu, G-j. (1970). *Isolation and characterization of two coat proteins of cowpea mosaic virus.* Dissertatie Universiteit van Californië, Davis.

Wu, G-j. en Bruening, G. (1971). *Virology* 46, 596-612.

Yphantis, D.A. (1964). *Biochemistry* 3, 297-317.

Zimm, B.H. (1948). *J. Chem. Phys.* 16, 1093-1099.

Curriculum vitae

Joannes Lambertus Matheus Christiaan Geelen werd op 8 juli 1944 geboren te Kelpen (Gem. Grathem). Hij bezocht het Bisschoppelijk College te Weert en behaalde in 1962 het einddiploma gymnasium-ß. In hetzelfde jaar ging hij studeren aan de Landbouwhogeschool te Wageningen. Nadat in 1966 het kandidaatsexamen richting Planteziektenkunde was behaald, werd de praktijktijd deels bij het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse en deels bij het Plant Virology Laboratory, PIS, te Beltsville, Md., USA doorgebracht. In 1970 werd het ingenieursdiploma met lof behaald (hoofdvak virologie, verzwaard bijvak biochemie, bijvak organische chemie).

Vanaf januari 1970 is hij als gastmedewerker (ZWO) werkzaam bij het Laboratorium voor Virologie van de Landbouwhogeschool, Wageningen.

Errata

pag. 4, 7de regel van onderen te lezen:
morfologische subeenheid vormen overeenkomstig het model dat voor Mouse-Elber-

pag. 20, 7de regel van onderen te lezen:
gecalibreerde buizen precies op 5 ml gebracht met tweemaal gedestilleerd water,

pag. 36, 7de regel van onderen te lezen:
4.5.). De eiwitten werden op kleine schaal gescheiden door middel van polyacryl-

pag. 52, 2de regel van onderen te lezen:
De specifieke infectiositeiten van S en F en hun RNAs worden gegeven in Tabel

pag. 68, 7de regel van onderen te lezen:
Sisler, 1969; Seghal, 1973), terwijl Mg^{++} het tegenovergestelde effect heeft.