

Versuche mit markierten Atomen über den Mechanismus der Vermehrung von Tabakmosaikvirus in *Nicotiana tabacum*

Von

Lydia Sverak und Anna Sikuler

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien
und der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichischen Stickstoffwerke A.G., Linz

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 17. Oktober 1958)

Tabakmosaikvirus hoher spezifischer Aktivität, das am Phosphor und/oder Kohlenstoff markiert war, wurde biosynthetisch hergestellt. Damit wurde jeweils ein Blatt einer Pflanze von *Nicotiana tabacum* infiziert und der etwaige Transport von intaktem Virus durch das Leitungssystem der Pflanzen dadurch weitgehend unterbunden, daß die Leitgefäße des „behandelten“ Blattes durchtrennt wurden.

Das aus den „unbehandelten“ Blättern der Pflanze nach 17 $\frac{1}{2}$, 48 und 72 Stdn. isolierte Virus wies im Vergleich zum eingesetzten TMV einen viel geringeren Anteil an Gesamtradiokohlenstoff im Protein auf. Dies deutet darauf hin, daß das Virus der „unbehandelten“ Blätter höchstens zu einem sehr geringen Teil aus intakt transportiertem TMV bestehen könnte.

Die nicht im TMV enthaltenen Polynukleotide der „unbehandelten“ Blätter enthalten 7 Stdn. nach der Infektion verhältnismäßig viel ^{32}P , doch tritt derselbe innerhalb 70 Stdn. zum allergrößten Teil in niedermolekulare Verbindungen über.

Die in Puffer unlöslichen Polynukleotide der unbehandelten Blätter („Blattnukleinsäure“) weisen ein mit der Zeit abnehmendes Verhältnis von $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ auf. Auch innerhalb der Nukleinsäure (NS) des TMV dieser Blätter nimmt dieses Verhältnis zunächst ab, steigt aber später wieder an.

Die angeführten Ergebnisse stehen mit der Vorstellung im Einklang, daß das Virus NS abspaltet und sowohl die systemische Infektion der Pflanze wie auch die Virusvermehrung mindestens zum Teil durch diese freie NS bewirkt wird. Die aus dem

Virus stammende freie NS unterliegt zum großen Teil lebhaftem Abbau, wobei ihre Komponenten wahrscheinlich dem Aufbau normaler Blattbestandteile dienen.

Einleitung

Versuche mit Tabakmosaikvirus (TMV), das aus TMV-Protein und TMV-Nukleinsäure (TMV-NS) *in vitro* rekombiniert worden war, haben gezeigt, daß die Eigenschaften der „Nachkommenschaft“ mindestens vorwiegend durch die Nukleinsäure bestimmt werden¹. Für die genetisch bestimmende Rolle der NS bei der Fortpflanzung von Pflanzenviren spricht auch der Umstand, daß der Protein-Anteil des TMV chemisch modifiziert werden kann, ohne daß die Eigenschaften der Nachkommenschaft dadurch beeinflußt würden^{2, 3}. Schließlich wurde gezeigt, daß bereits die TMV-NS allein infektiös ist und die befallene Pflanze zur Bildung von komplettem Virus veranlaßt⁴.

Durch diese Ergebnisse ist die Frage nahegelegt worden, ob die Vermehrung von Viren innerhalb der Pflanzen durch komplettes Virus oder aber durch abgespaltene NS vermittelt wird. Tatsächlich wurde nach einer chromatographischen Methode wahrscheinlich gemacht, daß in Tabakpflanzen, die mit TMV infiziert worden waren, außer infektiösem Nukleoprotein auch infektiöse freie NS vorhanden ist, und zwar in besonders hohem Maße kurz nach der Infektion der Pflanze⁵. Für das Vorhandensein freier TMV-NS spricht weiter die Tatsache, daß Ribonuclease, die intaktes Virus nicht angreift, die Infektion verhindert, falls sie vor dem TMV in die Tabakpflanze eingeführt wird⁶. Auch Experimente über die zeitliche Abhängigkeit der Inaktivierung von TMV in *Nicotiana glutinosa* durch UV-Licht⁷ wurden in dem Sinne gedeutet, daß die Vermehrung des Virus in der Pflanze mindestens zum Teil durch abgespaltene NS bewirkt wird.

Die vorliegende Untersuchung sollte weitere Aufschlüsse über die Rolle der aus dem TMV ausgetretenen NS bei der Vermehrung von TMV in Tabakpflanzen bringen. Zu diesem Zwecke wurde am Phosphor oder am Kohlenstoff oder auch an beiden Atomen markiertes TMV in einzelne Blätter von Tabakpflanzen eingeführt. Nach verschiedenen Zeiträumen wurde dann geprüft, inwieweit die Radioisotope in den anderen

¹ H. Fraenkel-Conrat und R. C. Williams, Proc. Nat. Acad., Wash. **41**, 690 (1955).

² G. Schramm und H. Müller, Z. physiol. Chem. **266**, 43 (1940); **274**, 267 (1942).

³ J. I. Harris und C. A. Knight, Nature **170**, 613 (1952).

⁴ A. Gierer und G. Schramm, Z. Naturforsch. **11 b**, 138 (1956).

⁵ G. W. Cochran und J. L. Chidester, Virology **4**, 390 (1957).

⁶ C. Casterman und R. Jeener, Biochim. Biophys. Acta **16**, 433 (1955).

⁷ A. Siegel, W. Ginoza und S. G. Wildman, Virology **3**, 554 (1957).

(unbehandelten) Blättern der gleichen Pflanze in Form von TMV, NS oder anderen Verbindungen vorlagen. Als Versuchspflanze diente ausschließlich im Glashaus gezogene *Nicotiana tabacum*.

Experimentelles

Die Gewinnung des TMV, das zur Infektion diente, erfolgte nach dem Verfahren von *Commoner*⁸. Eine gegebenenfalls beobachtete Färbung des der-

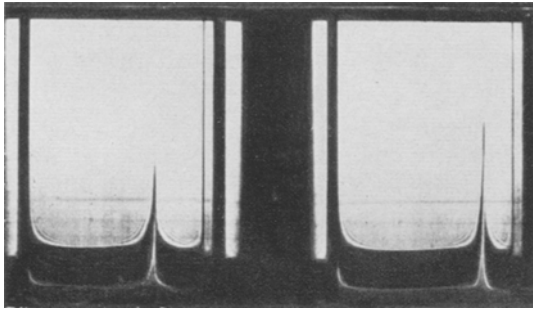


Abb. 1. Sedimentation von TMV, aufgenommen in einer analytischen Ultrazentrifuge

art erhaltenen Virus konnte durch Behandlung mit Tierkohle fast gänzlich beseitigt werden. Die Reinheit des TMV wurde durch Ultrazentrifugierung, durch trägerfreie Elektrophorese und durch UV-Spektrophotometrie geprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 1—3 festgehalten.

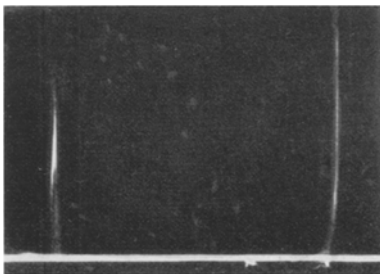


Abb. 2. Prüfung der Reinheit von TMV in einem Elektrophoreseapparat nach Tiselius. 1 und 2 stellen zu verschiedenen Zeiten ausgeführte Aufnahmen dar

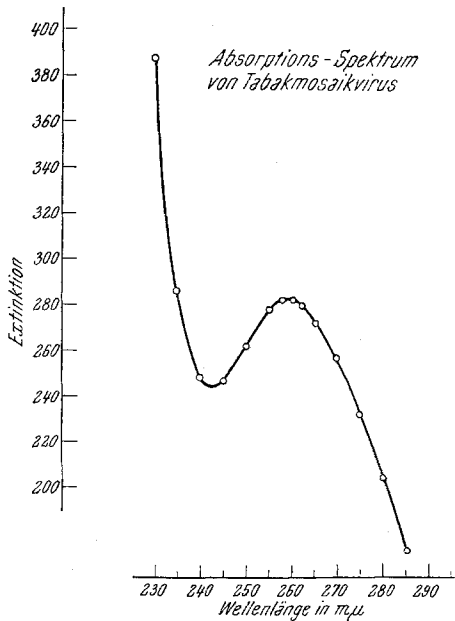


Abb. 3

⁸ B. *Commoner*, F. L. *Mercer*, P. *Merrill* und A. *Zimmer*, Arch. Biochem. Biophys. **27**, 271 (1950).

Bei radioaktiv markiertem Virus kam es besonders darauf an, TMV hoher spezifischer Aktivität einzusetzen. Zur Markierung am Phosphor wurde eine trägerfreie Lösung von radioaktivem Orthophosphat im gleichen Zeitpunkt, in dem ein Blatt der gleichen Pflanze in üblicher Weise durch Reiben mit TMV infiziert wurde, in den Stamm oder in die Hauptleitgefäße der Blätter eingespritzt. Vorversuche hatten gezeigt, daß TMV besonders hoher spezifischer Aktivität erhalten wird, wenn nach der Infektion 6—8 Tage abgewartet wird. Deshalb wurde das ^{32}P -TMV nach Ablauf einer Woche — und zwar aus der gesamten Pflanze — isoliert.

Zum Zwecke der Doppelmarkierung wurde eines der Blätter einer infizierten und mit radioaktivem Phosphat behandelten Pflanze abgetrennt und dieses überlebende Blatt in einer Atmosphäre, die 2—5% radioaktives Kohlendioxyd enthielt, durch ca. 8 Stdn. im Sonnenlicht oder unter einer Leuchtröhre der Photosynthese unterworfen⁹. Das auf diese Weise doppelt markierte Blatt wurde sodann gemeinsam mit den übrigen Blättern der gleichen Pflanze — die nur am Phosphor markiert waren — homogenisiert und auf TMV aufgearbeitet.

Für die einzelnen Versuche wurden bis zu 30 mC ^{32}P bzw. 0,5 mC ^{14}C eingesetzt. Die Aktivität des P wurde mit einem Geiger-Fenster-Zählrohr (Ausbeute ca. 10%), die Aktivität des C mit einem Geiger-Gas-Zählrohr (Ausbeute ca. 80%)¹⁰ bestimmt. Die im folgenden angeführten Aktivitäten des P und C sind bezüglich Meßausbeute, die Phosphoraktivitäten auch bezüglich Abklingen korrigiert; die Viruspräparate höchster spezifischer Aktivität wiesen in bezug auf P $1,55 \cdot 10^5$ und in bezug auf C $4,9 \cdot 10^5$ Zerfälle/mg · min. (also 0,07 bzw. 0,22 $\mu\text{C}/\text{mg}$) auf.

Während ^{32}P natürlich nur in der NS enthalten sein kann, wird ^{14}C im Protein und in der NS gefunden. Zur Bestimmung der Verteilung in Viruspräparaten wurde jeweils in einem Aliquot die NS mit Trichloressigsäure (TCE) abgespalten¹¹ und gesondert auf Radioaktivität des C geprüft. Im Einklang mit früheren Ergebnissen¹² wurde festgestellt, daß meist 70—80%, immer aber zumindest die Hälfte des ^{14}C in der NS enthalten war.

Zur Infektion mit markiertem TMV wurde ein Blatt einer Tabakpflanze stellenweise mit Glaspapier oberflächlich aufgeraut. Sodann wurde die Lösung des TMV in einigen Zehntel ml Puffer (meist 0,01 M) auf die aufgerauten Stellen getropft und dort eintrocknen gelassen. Die Pflanzen wurden nun bis zur Aufarbeitung bei Zimmertemperatur und diffusem Licht gehalten. Die Blätter, an denen die Infektion vollzogen worden war, wurden nicht weiter verwendet. Die übrigen („unbehandelten“) Blätter wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und in flüssiger Luft eingefroren.

In den ersten Versuchen wurde jedes Blatt zur Aufarbeitung in zwei gleiche Teile geteilt. Es wurde jeweils in der einen Hälfte das TMV nach *Commoner*⁸ isoliert, die andere Hälfte homogenisiert und nach *Schneider*¹³ zuerst mit kalter 7-proz. TCE, dann mit Alkohol-Äther und schließlich mit heißer 7-proz. TCE extrahiert. Die drei Fraktionen enthalten unter anderem die niedermolekularen Phosphorverbindungen bzw. die Lipide bzw. die Polynukleotide.

Diese Methode der Fraktionierung ist insofern unbefriedigend, als die

⁹ H. Schönjellinger und E. Broda, Mh. Chem. **83**, 837 (1952).

¹⁰ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. **58**, 634 (1954).

¹¹ G. Schramm und H. Dannenberg, Ber. dt. chem. Ges. **77**, 53 (1944).

¹² G. Wüstinger, H. Schönjellinger und E. Broda, Nature **176**, 306 (1955).

¹³ W. C. Schneider, J. Biol. Chem. **161**, 293 (1946).

Polynukleotide durch die heiße TCE teilweise abgebaut werden. Sie können daher nicht als solche isoliert und nach Isolierung in reinem Zustand auf Aktivität gepruft werden. Deshalb wurde folgende Aufarbeitungsmethode entwickelt, die von der Fähigkeit von Salzlösungen zur Spaltung von Nukleoproteinen Gebrauch macht.

Die in flüssiger Luft eingefrorenen Blätter werden mit ca. 15 ml 80-proz. Alkohols knapp oberhalb 0° C homogenisiert, die Suspension 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung zentrifugiert. Die Extraktion mit heißem Alkohol wird dreimal wiederholt. Die vereinigten Extrakte enthalten unter anderem das anorganische Phosphat und die niedermolekularen Nukleotide. Der Rückstand wird dreimal mit je 10 ml Alkohol-Äther (3:1) je 5 Min. im Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung niedertourig abzentrifugiert. Die Lösung enthält unter anderem restliche Farbstoffe und Lipide. Der nun verbleibende farblose Rückstand, in dem sich u. a. die Proteine, die Nukleoproteine und die Polynukleotide befinden, wird nach Vertreibung des thers dreimal je 5 Min. mit 5 ml 1,5 m NaCl im Wasserbad erhitzt; nach Abkühlung wird jedesmal zentrifugiert. Den vereinigten Extrakten wird dann das 1,7fache Vol. Alkohol zugefügt. Die ausgefallenen Polynukleotide werden abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und nach Vertreibung des thers in 5 ml 0,1 m wäßrigem NaCl gelöst. Die Reinheit der so erhaltenen Polynukleotide (RNS + DNS) wird durch Aufnahme des UV-Spektrums gepruft. Wenn die Reinheit nicht befriedigt, kann die Alkoholfällung wiederholt werden.

Zum Studium dieser Methode wurde radioaktives Orthophosphat zunächst einer TMV-freien Pflanze injiziert. Nach 3 Tagen wurden die Blätter abgenommen und wie beschrieben chemisch zerlegt. In der alkoholischen Fraktion wurden $4,6 \cdot 10^5$, im Äther $3,6 \cdot 10^4$ und in der Natriumchlorid-Fraktion $4,1 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. gefunden. Eine nochmalige Behandlung des Rückstandes mit Natriumchlorid ergab keine nennenswerte Menge an ^{32}P . Mit heißer TCE konnten zwar weitere größere Mengen an ^{32}P aus dem Rückstand extrahiert werden, doch entsprachen die UV-Spektren solcher Extrakte nicht denen von NS.

Von vornherein war mit der Möglichkeit eines „mechanischen“ Transportes von unverändertem TMV durch das Leitungssystem der Pflanze gerechnet worden. Dann würde in den unbehandelten Blättern TMV gefunden werden, ohne daß eine Vermehrung des Virus stattgefunden hätte. Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen stets das Hauptleitgef des zu infizierenden Blattes unmittelbar vor seiner Behandlung nahe der Basis durchschnitten. Um eine mechanische Fortleitung durch die Randgefe zu verhindern, wurde dieses Blatt auch an den Rändern eingeschnitten.

Eine Kontrolle der Wirksamkeit dieser Vorsichtsmaßregeln beruht auf dem Vergleich der Isotopengehalte des eingesetzten TMV einerseits und des TMV der unbehandelten Blätter nach systemischer Infektion andererseits. Im nunmehr folgenden Abschnitt wird die Frage behandelt, ob die Ergebnisse der Experimente diesbezüglich sichere Schlüsse gestatten.

Ergebnisse

Zur Untersuchung, inwieweit Virus nach Durchtrennung der Leitgefäße in die unbehandelten Blätter mechanisch fortgeleitet werden kann, wurde je ein Blatt dreier Pflanzen mit am C markiertem Virus

(insgesamt $9 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min.) infiziert und das Virus nach verschiedenen Zeiträumen mit Hilfe von nicht-radioaktivem TMV-Träger aus den unbehandelten Teilen dieser Pflanzen isoliert. Dabei wurde, um durch Parallelbestimmungen bessere Sicherheit zu gewinnen, jede der drei Pflanzen in zwei oder drei Portionen geteilt, die dann gesondert aufgearbeitet wurden. Die gewonnenen Viruspräparate wurden nach der TCE-Methode¹¹ gespalten und die Aktivität einerseits des Proteins, andererseits der NS bestimmt (Tab. 1). Ein entsprechender Versuch am eingesetzten TMV ergab 41% des ^{14}C im Proteinanteil und 59% in der NS.

Tabelle 1. Verteilung des Radiokohlenstoffs innerhalb des TMV der unbehandelten Blätter

Pflanze Nr.	Versuchsdauer Stdn.	Aktivität in		Aktivität in	
		NS (Zerfälle/Min.)	Protein	NS (%)	Protein
1	17,5	252	0	100	0
1	17,5	283	26	92	8
1	17,5	364	34	91	9
2	48	590	38	94	4
2	48	627	61	91	9
3	72	1670	4	100	0
3	72	1480	15	99	1
3	72	378	40	90	10

Offenbar unterscheidet sich die Aktivitätsverteilung innerhalb des TMV der unbehandelten Blätter grundlegend von jener innerhalb des eingesetzten TMV. Dies kann einerseits dadurch gedeutet werden, daß zwar intaktes Virus mechanisch transportiert wird, aber unterwegs oder in den unbehandelten Blättern Radiokohlenstoff austauscht. Die zweite, viel wahrscheinlichere Möglichkeit der Deutung besteht darin, daß das Virus der unbehandelten Blätter durch einen Prozeß neu aufgebaut wurde, der bewirkt, daß mehr ^{14}C in die NS als in das Protein aufgenommen wird. (Der scheinbare, zeitlich bedingte Anstieg der Radioaktivität im TMV kann nicht als real betrachtet werden. Es ist nämlich nicht bekannt, welche Mengen an radioaktivem Virus jede einzelne der drei Pflanzen bei der Infektion aufgenommen hatte, d. h. wieviel Virus in jedem Falle wirksam geworden war; außerdem waren die Gewichte der aufgearbeiteten Blätter stark verschieden.)

Tab. 2 zeigt die Verteilung des ^{32}P in den verschiedenen Fraktionen der unbehandelten Blätter, nachdem nur am P markiertes TMV zur Infektion eingesetzt worden war; die chemische Auftrennung wurde nach *Schneider*¹³ vorgenommen.

Bemerkenswerterweise lag kurze Zeit nach der Infektion der Hauptteil des ^{32}P der unbehandelten Blätter in Form von Polynukleotiden vor.

Nach 2—3 Tagen hatten diese Verbindungen ihren ^{32}P weitgehend eingebüßt, indem sie entweder abgebaut worden waren oder ihren Phosphor ausgetauscht hatten. Die Aktivitäten der Lipide können weder nach kürzerer noch nach längerer Zeit im biologischen Sinne als signifikant bezeichnet werden.

Tabelle 2. Verteilung des Radiophosphors in den Blättern mit ^{32}P -TMV infizierter Pflanzen

Pflanze Nr.	Fraktion	Zeitraum seit Infektion (Stdn.)	Frischgewicht des Blattes (in g)	Radiophosphor (Zerf./Min.)	Radiophosphor pro Blattgewicht (Zerf./Min. g)	Mittel
1	Niedermolekulare (extrahiert mit kalter TCE)	7	1,7	1400	830}	615
2		6,5	2,5	1000	400}	
1		20	2,0	1400	700}	825
2		20	3,0	2800	950}	
1		48	2,4	2300	960}	960
2		48	1,8	—	—}	
1	Lipide (extrahiert mit Äther)	70	2,7	5000	1860}	2180
2		70	4,2	10500	2500}	
1		7	1,7	200	120}	90
2		6,5	2,5	160	60}	
1	Polynukleotide (extrahiert mit heißer TCE)	20	2,0	170	80}	135
2		20	3,0	560	190}	
1		48	2,4	180	80}	90
2		48	1,8	170	100}	
1		70	2,7	180	70}	65
2		70	4,2	240	60}	
1	Polynukleotide (extrahiert mit heißer TCE)	7	1,7	3530	2080}	1780
2		6,5	2,5	3700	1480}	
1		20	2,0	400	200}	375
2		20	3,0	1650	550}	
1		48	2,4	250	100}	95
2		48	1,8	160	90}	
1	70	2,7	300	110}	135	
2	70	4,2	670	160}		

Die zur Bestimmung des ^{32}P im Virus dienenden Blatthälften wurden mit nicht radioaktivem TMV-Träger aufgearbeitet. Keines der erhaltenen Viruspräparate war signifikant radioaktiv; die gemessenen Werte sind deshalb nicht in die Tab. 2 aufgenommen.

In einer weiteren Versuchsreihe, in der abermals Einzelblätter verarbeitet wurden, wurde die beschriebene Fraktionierungsmethode mit NaCl angewendet. Da in diesem Fall die Polynukleotide in reiner Form gewonnen wurden, ließ sich auch ihre spezifische Aktivität bestimmen. Niedermolekulare Verbindungen oder Lipide wurden in dieser Versuchsreihe nicht gemessen. Die Pflanzen A 1 und A 2 wurden mit einem

³²P-markierten Viruspräparat, die Pflanzen B 1 und B 2 mit einem anderen ³²P-markierten Viruspräparat behandelt; die Ergebnisse sind in Tab. 3 angegeben.

Tabelle 3. Fraktionierung unbehandelter Blätter mit ³²P-TMV infizierter Pflanzen nach der NaCl-Methode

Pflanze	Versuchs- dauer (Stdn.)	Frischgewicht des Blattes in g	Aktivität der NS (Zerf./Min.)	Aktivität pro Blattgewicht (Zerf./Min. g)	NS (mg)	Spezifische Ak- tivität der NS (Zerf./Min. mg)
A 1	7	5,6	2830	510	—	—
A 1	48	4,9	280	60	—	—
A 2	7	3,0	550	130	1,32	41
A 2	48	2,5	100	40	0,72	14
B 1	7	6,3	2400	380	2,30	104
B 1	48	2,2	90	40	0,54	16
B 2	7	10,2	16500	1620	—	—
B 2	48	4,0	320	80	—	—

Sie läßt erkennen, daß nicht nur die gesamte Radioaktivität, sondern auch die spezifische Aktivität der Polynukleotide der nichtbehandelten Blätter rasch mit der Zeit abnimmt. Dagegen erscheint es zweifelhaft, ob der Abnahme der Gewichtsmenge an extrahierbaren Polynukleotiden während der Versuchszeit Bedeutung zuzumessen ist. (Auch in dieser Versuchsreihe lag die Radioaktivität des TMV der unbehandelten Blätter unterhalb der Grenze sicherer Meßbarkeit.)

Weitere Versuche wurden mit TMV angestellt, das sowohl am P als auch am C markiert worden war. Um die Nachweisempfindlichkeit zu steigern, wurde TMV höchster spezifischer Aktivität verwendet und außerdem zur Gewinnung eines jeden Meßpunktes statt eines Blattes jeweils eine ganze Pflanze (natürlich wieder mit Ausnahme des behandelten Blattes) aufgearbeitet (Tab. 4). Dabei wurde zuerst das TMV in üblicher Weise aus den Blättern extrahiert und erst der dabei verbliebene Rückstand der oben beschriebenen Behandlung mit Alkohol, Alkohol-Äther und anschließend mit Kochsalz unterworfen.

Bestimmt wurden die Radioaktivitäten des TMV, der im TMV enthaltenen RNS und der aus dem Rückstand gewonnenen Polynukleotide. Die letztere Fraktion enthält die in gebundener Form vorliegende RNS und DNS des Blattes und kann auch aus dem TMV ausgetretene Virusnukleinsäure oder Bruchstücke derselben enthalten, sofern sie in hinreichend fest gebundener Form vorliegen. Diese Fraktion soll kurz als „Blattnukleinsäure“ bezeichnet werden. Die freien Polynukleotide des Blattes und auch frei vorliegende Virusnukleinsäure dürften zum großen Teil in Puffer löslich sein, so daß sie nicht erfaßt werden konnten.

Die Zahlen der Tab. 4 sind Mittelwerte aus je zwei Parallelbestim-

mungen. In drei Fällen (in Tab. 4 durch * gekennzeichnet) wurden die Aktivitäten der TMV-RNS nicht gesondert bestimmt, sondern für den P und für den C die Aktivitätswerte des TMV selbst eingesetzt. Dies ist laut Tab. 1 ohne größeren Fehler möglich. Umgekehrt wurde in einem Fall (mit zwei Sternen bezeichnet) statt der Aktivität des TMV jene der TMV-RNS eingesetzt.

Tabelle 4. Fraktionierung ganzer Pflanzen (unbehandelter Teile) nach Infektion mit TMV, das am Phosphor und am Kohlenstoff markiert war

Fraktion	Versuch Nr.	Versuchsdauer (Stdn.)	Aktivität		Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$
			^{14}C (Zerfälle/Min.)	^{32}P	
TMV	I ¹⁴	17,5	360	70	0,19
		72	2200	620	0,28
RNS aus TMV	I	17,5*	360	70	0,19
		72	1780	590	0,33
Blatt-NS	I	17,5	750	180	0,24
		72	1650	190	0,12
TMV	II ¹⁵	72	2830	560	0,20
RNS aus TMV	II	72*	2830	560	0,20
Blatt-NS	II	72	14800	2000	0,13
TMV	III ¹⁶	48	4720	600	0,13
		48	12400	1900	0,15
RNS aus TMV	III	48*	4720	600	0,13
		48	8120	1300	0,16
Blatt-NS	III	48	—	—	—
		48	46100	6400	0,14
TMV	IV ¹⁷	17,5**	8350	1610	0,19
RNS aus TMV	IV	17,5	8350	1610	0,19
Blatt-NS	IV	17,5	1790	260	0,15

Da damit zu rechnen ist, daß das radioaktive TMV bei der Infektion in ungleichem Maße in die verschiedenen Pflanzen eingedrungen

¹⁴ Versuch I. Aktivität im eingesetzten TMV: fehlt. Aktivität in NS des eingesetzten TMV: ^{14}C $4,75 \cdot 10^4$, ^{32}P $1,25 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ in NS des eingesetzten TMV = 0,263.

¹⁵ Versuch II. Aktivität im eingesetzten TMV: ^{14}C $4,8 \cdot 10^4$, ^{32}P $1,06 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Aktivität in NS des eingesetzten TMV: ^{14}C $3,85 \cdot 10^4$, ^{32}P $1,06 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ in NS des eingesetzten TMV = 0,28.

¹⁶ Versuch III. Aktivität im eingesetzten TMV: ^{14}C $2,45 \cdot 10^5$, ^{32}P $7,7 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Aktivität in NS des eingesetzten TMV: ^{14}C $1,9 \cdot 10^5$, ^{32}P $7,7 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ in NS des eingesetzten TMV = 0,40.

¹⁷ Versuch IV. Aktivität im eingesetzten TMV: ^{14}C $1,07 \cdot 10^5$, ^{32}P $1,7 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Aktivität in NS des eingesetzten TMV: ^{14}C $8,56 \cdot 10^4$, ^{32}P $1,7 \cdot 10^4$ Zerfälle/Min. Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ in NS des eingesetzten TMV = 0,20.

und dort wirksam geworden ist, darf man die absoluten Aktivitäten der gleichen chemischen Fraktionen aus den unbehandelten Teilen verschiedener Pflanzen nicht miteinander vergleichen. Vielmehr sollte im Rahmen des vorliegenden Versuches nur die Abhängigkeit des Verhältnisses $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ von der seit der Infektion verflossenen Zeit verfolgt werden. Dieses Verhältnis im wirksam gewordenen TMV muß offenbar immer dem entsprechenden Verhältnis im eingesetzten TMV gleich sein und ist daher in jedem Falle bekannt.

Die Verhältnisse $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ für „Blattnukleinsäure“ und für TMV aus Tab. 4 sind in Tab. 5 als Funktionen der Zeit zusammengestellt, wobei die Ergebnisse der Versuchsreihen zum Zweck der Übersichtlichkeit zu Mittelwerten zusammengezogen sind. Um dies zu ermöglichen, wurden die Verhältnisse $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ normalisiert, indem das Verhältnis, das in der NS eines jeden TMV-Präparates im Zeitpunkt der Infektion herrschte, gleich 1,00 gesetzt wurde.

Tabelle 5. Normalisierte Verhältnisse $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ als Funktion der Zeit

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer (Std.)	Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$	Mittelwerte
(Blattnukleinsäure)			
I	17,5	0,91	0,83
IV	17,5	0,75	
III	48	0,35	0,35
III	48	—	
I	72	0,46	0,46
II	72	0,46	
(TMV)			
I	17,5	0,72	0,83
IV	17,5	0,95	
III	48	0,33	0,36
III	48	0,38	
I	72	1,07	0,80
II	72	0,53	

Es ergibt sich also, daß das Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ zwar mit der Zeit abnimmt — und zwar in der Fraktion der „Blattnukleinsäure“ dauernd, im TMV vorübergehend — doch ist die Abnahme des Quotienten im Falle der Polynukleotide viel kleiner als die Abnahme des gesamten Radiophosphor (Tab. 2 und 3).

Diskussion

Die folgende Diskussion bezieht sich nur auf die unbehandelten Blätter, da Fraktionen nur aus diesen gewonnen und zur Messung ge-

bracht wurden. Auch ist zu berücksichtigen, daß die Polynukleotide der Blätter nicht in DNS und RNS aufgeteilt wurden. Da aber ganz allgemein sowohl die Menge als auch die Umsatzgeschwindigkeit der RNS viel größer als die der DNS ist¹⁸, dürfen die Ergebnisse unbedenklich auf die RNS bezogen werden.

Aus den Tab. 2 und 3 folgt, daß die am P markierten Polynukleotide zunächst (also einige Stunden nach der Infektion) ziemlich stark radioaktiv sind, aber schon innerhalb von 2 Tagen fast die Gesamtheit ihres ³²P verlieren. In den Versuchen der Tab. 4 und 5 konnte, da TMV hoher spezifischer Aktivität eingesetzt worden war, ¹⁴C bzw. ³²P auch in der Virusfraktion der unbehandelten Blätter nachgewiesen werden.

Die Abnahme des ³²P der Polynukleotide nach Erreichen eines Maximums kann entweder dadurch erklärt werden, daß die Polynukleotide — bei gleichbleibender spezifischer Aktivität — an Menge abnehmen, oder dadurch, daß die Polynukleotide — bei gleichbleibender Menge — an spezifischer Aktivität verlieren, im Effekt also ihren Radiophosphor gegen inaktiven P austauschen. Auch ein Zusammenwirken beider Einflüsse ist natürlich möglich. Immerhin ist es sehr wahrscheinlich, daß innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 3 Tagen die Menge an NS im Blatt sich so wenig ändert, daß der an zweiter Stelle genannte Faktor maßgebend ist.

In quantitativer Hinsicht zeigen die Tab. 2 und 3, daß die Polynukleotide der unbehandelten Blätter innerhalb von 2—3 Tagen mindestens 80% ihres ³²P verlieren. Wenn im gleichen Zeitraum laut Tab. 4 und 5 das Mengenverhältnis ³²P/¹⁴C in der „Blattnukleinsäure“ nur etwa um den Faktor 2 absinkt, so muß geschlossen werden, daß die Nukleinsäure im gleichen Zeitraum auch den Hauptteil ihres ¹⁴C abgibt, wenn auch ¹⁴C langsamer als ³²P verloren wird.

Frühere Untersuchungen haben zu dem Ergebnis geführt, daß sich TMV innerhalb der lebenden Pflanze in einem dynamischen Zustand befindet^{9, 12, 19}. TMV tauscht ¹⁴C mit dem pflanzlichen Gewebe sogar dann aus, wenn seit der Infektion viele Monate verflossen sind (das Virus viele Monate „alt“ ist), also eine Zunahme an Virus gewiß nicht mehr stattfindet⁹. Auch die NS des TMV ist, wenn die Pflanze mehrere Monate nach der Infektion einer Radiophotosynthese unterworfen wird, noch immer zur Aufnahme von ¹⁴C befähigt, wenn auch das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von TMV-RNS und TMV-Protein mit steigendem „Alter“ des Virus bei derartigen Versuchen stark abnimmt¹².

Es ist somit anzunehmen, daß auch die TMV-NS, die bereits die Bildung von neuem intaktem Virus veranlaßt hat, ebenfalls dem Stoff-

¹⁸ V. G. Allfrey, A. E. Mirsky und H. Stern, Adv. Enzymol. **16**, 411 (1955).

¹⁹ R. Jeener, Arch. intern. Physiol. **60**, 546 (1952).

wechsel unterworfen ist. Nach Einsatz von am P markiertem TMV wird also unter allen Umständen ^{32}P ausgetauscht. Falls die TMV-Bildung darauf beruht, daß sich die NS mit Protein umgibt, so ist allerdings damit zu rechnen, daß diese stabilisierte NS ^{32}P langsamer austauscht als freie NS, da das TMV in geringerem Maße als freie NS am dynamischen Abbau und Aufbau teilnehmen dürfte.

Die angeführten Ergebnisse stehen mit folgendem Bild der Virusvermehrung im Einklang. Im behandelten Blatt spaltet das TMV NS ab. Ein Teil dieser NS wandert in die unbehandelten Teile der Pflanze und kann dort durch seine Radioaktivität nachgewiesen werden. Ob das in den unbehandelten Pflanzenteilen entstehende Virus nur aus dieser NS oder aus kleinen Mengen an intaktem Virus, die ebenfalls in diese Teile eingedrungen sein könnten, oder schließlich aus beiden Substanzen neu gebildet wird, konnte nicht unmittelbar festgestellt werden. Jedenfalls zeigt die Kleinheit der Radioaktivität im Proteinanteil des Virus der unbehandelten Blätter (Tab. 1), daß dieses TMV höchstens einen kleinen Anteil an unverändertem markiertem Virus (also an eingesetztem TMV) enthalten kann.

Wie bereits erwähnt wurde, nimmt der Gehalt an ^{32}P , der letzten Endes aus dem eingesetzten TMV stammt, in den Polynukleotiden rasch ab (Tab. 2 und 3). Was das Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ in der „Blattnukleinsäure“ betrifft, so nimmt dieses nach Tab. 4 und 5 in der ersten Periode des Experimentes ab und erreicht sodann einen konstanten Wert. Dieses Ergebnis sagt aus, daß die in der Fraktion „Blattnukleinsäure“ erfaßten Polynukleotide zunächst mehr ^{32}P als ^{14}C verlieren. Da die Radioaktivität letzten Endes aus der NS des zur Infektion eingesetzten TMV stammt, kann die Verschiebung des Verhältnisses $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ etwa so gedeutet werden, daß die aus dem TMV ausgetretene NS alsbald zum Großteil abgebaut wird und die niedermolekularen Bausteine in die „Blattnukleinsäure“ eingebaut werden. Dabei würde während dieses Umbaues oder nachträglich Radioelement (und zwar mehr ^{32}P als ^{14}C) abgegeben werden. Eine nachträgliche Abgabe wäre eine Folge des dynamischen Zustandes der „Blattnukleinsäure“.

Eine zweite Möglichkeit der Deutung besteht darin, daß die aus dem TMV ausgetretene RNS oder höhermolekulare Bruchstücke desselben durch Bindung an Protein in eine in Puffer (pH = 7) unlösliche Form übergehen, aber dennoch in einem dynamischen Zustand verharren, welcher nur in den ersten zwei Tagen erfaßt werden konnte.

Weiter ist aus den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen, daß sich das Verhältnis $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ im TMV der unbehandelten Blätter zunächst parallel zum entsprechenden Verhältnis in der „Blattnukleinsäure“ verschiebt, sodann jedoch einen neuerlichen Anstieg aufweist. Wie bereits die Tab. 2 zeigt, steigt in der niedermolekularen Fraktion der Gehalt an ^{32}P

mit der Zeit an. Es wäre immerhin möglich, den Anstieg des Verhältnisses $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ im TMV der unbehandelten Blätter so zu deuten, daß das durch Abbau der RNS des eingesetzten TMV entstandene niedermolekulare Phosphat, das sich zweifellos besonders rasch über die Pflanze verbreitet, zum Aufbau des Virusmoleküls verwendet wird. Da sich das TMV anfangs rasch vermehrt, wirkt sich die Aufnahme von ^{32}P im TMV stärker als im Falle der „Blattnukleinsäure“ aus. Jedoch bestehen gewiß noch andere Möglichkeiten der Deutung; die Unterscheidung zwischen ihnen kann nur auf Grund von weiterem experimentellem Material getroffen werden.

Herrn Prof. Dr. *E. Broda* danken wir für wertvolle Anregungen und Ratschläge. Die eine von uns (*L. S.*) dankt dem *Theodor-Körner*-Stiftungsfonds für die Gewährung eines Förderungspreises.