

Untersuchungen über den Infektionsverlauf von Tabakmosaikvirus in *nicotiana tabacum* mit Hilfe von ^{14}C -markiertem Virus

Von

H. Altmann und G. Stehlik

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft des Reaktorzentrums
Seibersdorf

(Leiter: Doz. Dr. K. Kaindl)

(Eingegangen am 11. August 1962)

Es wurde ^{14}C -markiertes Tabakmosaikvirus (*TMV*) von hoher spezifischer Aktivität durch Radiophotosynthese hergestellt und damit *nicotiana tabacum*-Pflanzen beimpft. Zu drei verschiedenen Zeiten nach der *TMV*-Beimpfung wurden die Pflanzen geerntet und das primär infizierte Blatt jeweils getrennt von der übrigen Pflanze aufgearbeitet. Neben dem *TMV* wurden noch die Chloroplasten, die pH 4,7- und pH 3,0-Fraktion, die pufferunlöslichen Fraktionen und die niedermolekularen Zellbestandteile isoliert. Aus dem Verhältnis der Aktivitätswerte Protein zu Nukleinsäure (*NS*) kann man annehmen, daß die Virus-Ribonukleinsäure (*RNS*) allein oder zumindestens zum überwiegenden Teil ohne ihren Proteinmantel in die systemisch infizierten Teile der Pflanze wandert und daß der Proteinanteil zum Großteil an pufferunlösliche Zellbestandteile gebunden bleibt.

Im Vergleich zu den tierischen Viren und den Bakteriophagen ist das Tabakmosaikvirus sehr einfach gebaut. Es besteht nur aus einer Ribonukleinsäure-Spirale, die in einem Proteinmantel eingebaut ist. Gierer und Schramm¹ gelang es durch Behandlung mit Phenol und Fraenkel-Conrat, Singer und Williams² durch Behandlung mit Dodecylsulfat, infektiöse *RNS* aus *TMV* zu isolieren und nachzuweisen, daß nur diese allein für die Infektion verantwortlich und als genetischer Faktor imstande ist, die Bildung von kompletten Viruspartikeln in der Wirtszelle zu induzieren.

¹ A. Gierer und G. Schramm, *Z. Naturforsch.* **11b**, 138 (1956).

² H. Fraenkel-Conrat, B. Singer und R. C. Williams, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **25**, 87 (1957).

Daß bei einer Infektion zuerst die *RNS* in Freiheit gesetzt wird, wurde von Siegel, Ginoza und Wildmann³ durch Vergleich der Latenzzeiten von freier *TMV-RNS* und der von kompletten Viruspartikeln nachgewiesen. Ein steiler Anstieg der Konzentration an Virusteilchen setzt nach etwa 30 Stdn. ein⁴. Neu synthetisiertes *TMV* zeigte nach Einsatz von ¹⁴C-markiertem Virus einen viel geringeren Anteil an Gesamtradiokohlenstoff im Protein als in der *RNS*⁵. Die gleichen Autoren schließen aus dem Einbau von ursprünglich im eingesetzten *TMV* vorhandenem ¹⁴C und ³²P in verschiedene Blattfraktionen, daß die aus dem Virus stammende freie *RNS* zum großen Teil einem lebhaften Abbau unterliegt, wobei die Abbauprodukte bei der Synthese blatteigener Substanzen Verwendung finden. Diese Untersuchungen wurden nicht am primär infizierten Blatt, sondern nur im übrigen Teil der Pflanze durchgeführt. Von uns wurden zusätzlich auch noch einige nukleinsäure-(*NS*-)haltige Zellfraktionen untersucht. Uns erschien es interessant, einen Vergleich des Infektionsverlaufes zwischen dem primär beimpften Blatt und dem Teil der Pflanze vorzunehmen, in dem sich das Virus allein durch die systemische Infektion ausbreitet. Weiters sollten die früher gefundenen Wechselwirkungen zwischen *TMV-RNS* und Wirts-*NS*⁶ weiter verfolgt werden.

Methodik

a) Herstellung des markierten Virus

Die Markierung erfolgte nur mit Radiokohlenstoff. Auf eine selektive Doppelmarkierung der *NS* mit ³²P wurde verzichtet, da der Phosphor der *NS*, bedingt durch den relativ großen „pool“ freien Phosphats in der Zelle, einem sehr raschen Austausch unterworfen ist. Außerdem kann durch eine Phosphormarkierung viel früher der sogenannte „Selbstmordefekt“ eintreten, der zu einem Infektiositätsverlust führen muß.

Die ¹⁴C-Markierung erfolgte durch folgende Biosynthese des *TMV*: eine *nicotiana tabacum*-Pflanze, die 3 Wochen vor der Radiophotosynthese mit *TMV* beimpft worden war, wurde einer 2proz. radioaktives CO₂ enthaltenden Atmosphäre ausgesetzt⁷. Nach 12stdg. Dauer hatte die Pflanze 98% des angebotenen ¹⁴CO₂ assimiliert und eingebaut. Die Gewinnung des *TMV* erfolgte nach Commoner⁸ durch isoelektrische Fällung und präparative Ultrazentrifugation. Die Reinheit des *TMV* wurde durch einen analytischen Ultrazentrifugationslauf geprüft. Ein kleiner Teil des so gereinigten Virus (von konstanter spezifischer Aktivität) wurde nach Trägerzusatz von nicht-markiertem *TMV* mit einer 1,5 m Ammonformiatlösung durch 3maliges Erhitzen auf Siedetemp. in Protein und *RNS* gespalten. Um eine Abspaltung

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

⁴ G. Schramm und R. Engler, *Nature* [London] **181**, 916 (1958).

⁵ L. Sverak und A. Sikuler, *Mh. Chem.* **89**, 774 (1958).

⁶ H. Altmann, M. Wald und L. Sverak, *Mh. Chem.* **91**, 436 (1960); M. Wald, H. Altmann und L. Sverak, *l. c.* **91**, 991 (1960).

⁷ H. Schönjellinger und E. Broda, *Mh. Chem.* **83**, 837 (1952).

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

von Purinbasen weitergehend auszuschalten, wurde zuerst nur 1 Min. erhitzt, die Lösung nach sofortigem Abkühlen zentrifugiert, das zweite Mal 2 Min. und das dritte Mal 3 Min. gekocht. Die anschließend bestimmten Aktivitätswerte zeigten, daß die spezifische Aktivität der *TMV-RNS* wesentlich höher war als die des Proteinanteils. Infolge der bedeutend größeren Menge des *TMV*-Proteins (95%) überwog aber die Gesamtaktivität dieser Komponente bei weitem.

b) *Beimpfung der Blätter*

Für die Beimpfung mit markiertem *TMV* wurde ein mittelständiges Blatt verwendet. Dieses Blatt wurde am oberen Teil und an den Rändern mit Carborundumpulver so aufgeraut, daß zwar die Zellen, aber nicht die Hauptleitgefäße beschädigt wurden. Auf diese Weise konnte verhindert werden, daß das *TMV* auch durch direkte Weiterleitung in diese Hauptleitgefäße in den übrigen Teil der Pflanze gelangte. Die Ergebnisse aus unseren Versuchen wie auch die Untersuchungen von *Sverak*⁵ zeigen, daß unter den angegebenen Bedingungen dies nur, wenn überhaupt, in ganz minimalen Mengen möglich ist. 24, 38 und 62 Stdn. nach der Beimpfung wurden die primär infizierten Blätter von den übrigen Pflanzenteilen getrennt und analog zu diesen auf die im folgenden beschriebene Art aufgearbeitet.

c) *Pflanzenaufarbeitung*

Das Pflanzenmaterial wurde in einem Mixer unter Zusatz von gekühltem 0,1 m Phosphatpuffer von pH 7,0 homogenisiert, über eine Nutsche abgesaugt (Trennung der „pufferlöslichen“ von der „pufferunlöslichen“ Fraktion) und aus dem Filtrat die Chloroplasten während 15 Min. bei 3000 g niedergeschlagen und nach *Cooper* und *Loring*⁹ gereinigt. Die Phosphatpufferlösung wurde mit 2 n HCl auf pH 4,7 eingestellt. Aus den nach längerem Stehen in der Kälte ausgefallenen Nukleoproteiden wurden die Farbstoffe nach dem Abzentrifugieren mit Alkohol-Äther und reinem Äther entfernt und anschließend nach dreimaliger Spaltung mit heißer 1,5 m Ammonformiatlösung das Protein („pH 4,7-Protein“) durch Abfiltrieren von der in Lösung gegangenen Nucleinsäure („pH 4,7-*NS*“) getrennt. Bei pH 3,4 wurde schließlich unter Trägerzusatz das *TMV* isoliert und dann bei pH 3,0 nach Zusatz des gleichen Volumens Alkohol in der Kälte weitere hochmolekulare Stoffe ausgefällt („pH 3,0-Fraktion“); die ebenfalls mit Ammonformiat in Protein und *NS* gespalten wurden. Von dem verbleibenden Filtrat wurde ein aliquoter Teil direkt zur Aktivitätsmessung verwendet, der Rest bei pH 8–9 über einen Anionenaustauscher geschickt und gut nachgewaschen. Das mit dem Washwasser vereinigte Filtrat enthält Aminosäuren, freie *NS*-Basen und freie Zucker. Mit Hilfe von 4 m HCOOH + 0,5 m HCOONH₄ wurden dann die Nucleotide und Zuckerphosphate eluiert.

Die am Anfang des Aufarbeitungsganges abgetrennte „pufferunlösliche Fraktion“ wurde genau wie die pH 4,7-Fraktion nach Entfernung der Farbstoffe in *NS* und Protein + unlösliche Zellsubstanzen (Zellwandbestandteile) gespalten. Nach der quantitativen Bestimmung der einzelnen Fraktionen (Trockengewicht, UV-Extinktion) wurden diese jeweils naß verascht¹⁰ und die ¹⁴C-Aktivität in einem Gaszählrohr bestimmt¹¹.

⁹ *W. D. Cooper* und *H. S. Loring*; J. biol. Chem. **228**, 813 (1957).

¹⁰ *D. D. van Slyke* und *J. Folch*, J. biol. Chem. **136**, 509 (1940).

¹¹ *E. Broda* und *G. Rohringer*, Z. Elektrochem. **58**, 634 (1954).

Ergebnisse und Diskussion

Die in Tab. 1 und 2 angegebene Radioaktivitätsverteilung im primär infizierten Blatt gibt eine Übersicht über die Ausbreitung des ^{14}C eines durch Biosynthese markierten *TMV* in die einzelnen Blattfraktionen.

Tabelle 1. Verteilung der ^{14}C -Aktivität im eingesetzten *TMV* und im primär infizierten Blatt von *nicotiana tabacum* zu verschiedenen Zeiten nach der Beimpfung in Impulsen pro Minute (Mittelwert aus zwei parallel durchgeführten Versuchen)

Fraktion	Std. nach der Beimpfung	^{14}C -Aktivitäten von			Aktivitäts- verhältnis Protein/NS
		Nukleoprotein	Protein	NS	
Eingesetztes <i>TMV</i> *	—	38658	31887	6351	5,0
Pufferunlösliche Fraktion (pH 7)	24	—	483	55	8,8
	38	—	582	71	8,2
	62	—	1205	135	8,9
pH 4,7-Fraktion	24	—	421	54	7,8
	38	—	372	67	5,6
	62	—	347	109	3,2
pH 3,0-Fraktion	24	—	57	267	0,2
	38	—	55	174	0,3
	62	—	59	104	0,6
Chloroplasten	24	473	—	—	—
	38	485	—	—	—
	62	441	—	—	—
isoliertes <i>TMV</i>	24	935	—	—	—
	38	380	—	—	—
	62	319	—	—	—

* Diese Menge an markiertem *TMV* wurde pro Versuch eingesetzt. Das primär infizierte Blatt wurde vor der Aufarbeitung gut gewaschen, so daß nicht eingedrungenes, an der Oberfläche haftendes *TMV* wieder entfernt wurde.

Bei der Betrachtung der pufferunlöslichen Fraktion zeigt sich, daß im primär infizierten Blatt die Aktivitätswerte sowohl der NS als auch des Proteins etwa parallel zueinander ansteigen. Im Einklang damit nimmt die Menge des aus dem primär infizierten Blatt isolierbaren kompletten Virus ab, wie es sich in den Aktivitätswerten des unter Trägerzusatz isolierten *TMV* widerspiegelt. Da man bei der Inoculierung von *nicotiana tabacum* mit *TMV* einige Zellen verletzen muß, um eine Infektion hervorzurufen, könnte man annehmen, daß eine Protein-NS-Trennung⁵ erst in der Zelle stattfindet. Nun zeigt es sich aber, daß ein Großteil des *TMV*-Proteins, das ja eigentlich in einer pufferlöslichen Fraktion auftreten

Tabelle 2. Radioaktivitätsverteilung in den niedermolekularen Verbindungen des primär infizierten Blattes und des systemisch infizierten Pflanzenteiles zu verschiedenen Zeiten nach der Beimpfung mit ^{14}C -markiertem *TMV*

Fraktion	Stdn. nach der Impfung	Primär infiziertes Blatt	Systemisch infizierter Pflanzenteil
Aminosäuren und Purin- bzw. Pyrimidinbasen.....	24	46	157
	38	152	209
	62	133	216
Nukleotide und Zuckerphosphate	24	2	8
	38	8	14
	62	8	12
Höhermolekulare, aus dem Anionenaustauscher nicht eluierbare Substanzen	24	100	4
	38	19	0
	62	4	2

müßte, in derjenigen Fraktion zu finden ist, die hauptsächlich Zellwandkomponenten und Kernproteine enthält. Man könnte also annehmen, daß das *TMV*-Protein an einem der genannten Zellbestandteile gebunden vorliegt.

Im Verlauf der Infektion nimmt in der pH 4,7-Fraktion das Aktivitätsverhältnis von Protein zu *NS* ab, was man mit dem Abbau von Virusprotein und gleichzeitiger Neusynthese von Blattnukleoproteiden unter Verwertung abgebauter *TMV*-Bausteine erklären kann. Die Zunahme dieses Verhältnisses in der pH 3,0-Fraktion kann man dagegen durch Ribonukleaseabbau von *RNS* erklären, da ja in dieser Fraktion zum überwiegenden Teil freie Nukleinsäuren enthalten sind. Die aus dem systemisch infizierten Teil der Pflanze (ohne primär infiziertes Blatt) erhaltenen Aktivitätswerte liegen in allen Fraktionen für das Protein sogar unter denen der Nukleinsäuren (siehe Tab. 3).

Verglichen mit dem primär infizierten Blatt ist das Verhältnis Protein zu *NS* in diesem Teil der Pflanze weitaus zugunsten der *NS* verschoben. Es scheint also auch bei Pflanzenviren recht plausibel, wie beim Analogiefall der Bakteriophagen, daß das Virusprotein zumindest teilweise an eine Zellwandkomponente gebunden bleibt und nur zum geringeren Teil abgebaut wird. Diese Abbauprodukte können infolge der doch weitgehenden Verletzung verschiedener Zellen gemeinsam mit den cytoplasmatischen Proteinen isoliert werden, aber auch in den Chloroplasten und pH 4,7-Proteinen durch de-novo-Synthese eingebaut worden sein. Warum dann aber bei den Pflanzen unbedingt eine Verletzung von Zellen notwendig ist, ist noch ungeklärt. Ebenso unbekannt ist es auch,

Tabelle 3. Radioaktivitätsverteilung in dem Teil der Tabakpflanze, der allein systemisch infiziert wurde, zu verschiedenen Zeiten nach der Beimpfung (Mittelwerte)

Fraktion	Stdn. nach		¹⁴ C-Aktivitäten von		Aktivitäts- verhältnis Protein/ <i>NS</i>
	der Beimpfung	Nukleoprotein	Protein	<i>NS</i>	
Pufferunlösliche					
Fraktion (pH 7)	24	—	31	60	0,5
	38	—	28	44	0,6
	62	—	16	66	0,5
pH 4,7-Fraktion	24	—	28	64	0,4
	38	—	23	77	0,3
	62	—	48	118	0,4
pH 3,0-Fraktion	24	—	17	134	0,1
	38	—	10	162	0,1
	62	—	5	22	0,2
Chloroplasten	24	161	—	—	—
	38	36	—	—	—
	62	72	—	—	—
isoliertes <i>TMV</i>	24	72	—	—	—
	38	102	—	—	—
	62	105	—	—	—

ob dabei nur die äußere Cellulosezellwand oder auch der lebende Anteil der Zellwand beschädigt werden muß.

Die in der Fraktion der niedermolekularen Verbindung gefundenen Aktivitäten gehören zu 95% Aminosäuren und eventuell Nucleinsäurebasen und höchstens zu 6% den Nucleotiden und Zuckerphosphaten an.

Beim Vergleich des Infektionsverlaufs von primär und systemisch infiziertem Teil der Pflanze sieht man aus dem Verhältnis der Aktivitäten Protein zu *NS* sowohl in der pufferunlöslichen als auch in der pH 4,7-Fraktion, daß aus dem primär infizierten Blatt ¹⁴C fast nur aus *TMV-RNS* in die übrige Pflanze wandert, während dagegen nur sehr wenig Aktivität aus *TMV*-Protein und dessen Abbauprodukten dort nachzuweisen ist.

Die Aktivität der pufferunlöslichen Fraktion dürfte in erster Linie von infektiösen *TMV-RNS*-Teilchen herrühren, aber auch von Nucleinsäuren stammen, die de novo aus niedermolekularen *TMV-RNS*-Abbauprodukten, wahrscheinlich Nucleotiden, synthetisiert wurden. Durch Einbau doppelt markierter Nucleotide und Bestimmung ihrer spezifischen Aktivität nach dem Einbau wurde schon früher gezeigt, daß die „pufferunlösliche *NS*-Fraktion“ heterogen ist und aus zwei physiologisch voneinander verschiedenen *RNS*-Komponenten besteht, die der sogenannten Kernnuclein-

säure zuzuordnen sind¹². Daß nur ein kleiner Teil der gesamten *TMV-RNS* sich in der Kernnukleinsäure festsetzen und behaupten kann, hängt wahrscheinlich mit der Infektiosität und damit auch mit der Stabilität dieser *RNS* zusammen¹³. *Schramm* und *Röttger*¹⁴ wiesen darauf hin, daß in der Zelle die *RNS*-Synthese, die ja zeitlich gesehen vor der Proteinsynthese verläuft, wahrscheinlich im Zellkern stattfindet. Diese *RNS* dürfte aber in das Plasma wandern, um die Proteinsynthese dort zu induzieren.

Der Anstieg der Aktivitätswerte der pufferunlöslichen *NS*-Fraktion von primär infizierten Blättern während der beobachteten Zeit könnte daher rühren, daß im Laufe der Zeit immer mehr *TMV-RNS* freigesetzt und ein Großteil der infektiösen *RNS*-Partikel im Kern als Matrix fixiert wird. An dieser Matrix könnte sich dann neue *TMV-RNS* bilden, die dann aus dem Kerngebiet austritt. Da in der pH 3,0-Fraktion verhältnismäßig viel ¹⁴C-Aktivität aus freier *TMV-RNS* nachweisbar ist, könnte es sich bei diesen Aktivitäten um nichtinfektiöse *TMV-RNS*-Partikel handeln. Die Abnahme der Aktivität in der pH 3,0-Fraktion im Verlaufe der Infektion wird nahezu kompensiert durch den Anstieg der Aktivität in der pH 4,7-*RNS*.

Es erschien uns nicht notwendig, bei dieser Arbeit eine *RNS-DNS*-Trennung vorzunehmen.

Nicht berücksichtigt werden konnte bei der vorliegenden Arbeit ein im kleineren Ausmaß möglicher Einbau von markierten Aminosäuren aus dem abgebauten *TMV*-Proteinanteil bei der Biosynthese neuer *NS*-Basen.

Frau *Ingrin Dolejs* danken wir für fleißige und geschickte Mitarbeit.

Der Austria Tabak-Werke A. G. danken wir für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

¹² *H. Altmann*, V. Internat. Kongr. f. Biochemie, Moskau 1961; *E. Basler* und *B. Commoner*, *Virology* **2**, 13 (1956).

¹³ *W. Wacker*, V. Internat. Kongr. f. Biochemie, Moskau 1961.

¹⁴ *G. Schramm* und *B. Röttger*, *Z. Naturforsch.* **14b**, 510 (1959).